



Законодательная база

Тест бактериальных эндотоксинов



Соответствие требованиям

- Перед реализацией стерильного продукта необходимо провести его тест на бактериальные эндотоксины
- Процедура проведения теста и допустимые пределы эндотоксинов определены в Новой гармонизированной статье и руководстве FDA
- Как и для других тестов испытаний качества, валидация теста бактериальных эндотоксинов является ключевым моментом перед релизом продукции на рынок



Валидация

Ключ к успеху ЛАЛ-теста



Валидация

- Зачем валидировать?
 - Подтвердить функционирование
 - Подтвердить воспроизводимость
- Это необходимо для теста бактериальных эндотоксинов, как и для любого параметра качества

Валидация

- Какими ресурсами можно пользоваться при валидации
 - Руководство FDA
 - Новая гармонизированная статья
 - Документация производителя ЛАЛ

Руководство FDA

- “...руководство... процедуры или стандарты...признаваемые FDA...Руководство не является законом, однако следуя данному руководству, можно быть уверенным, что данные процедуры или стандарты приемлемы FDA.”

Руководство...

- Руководство FDA:
 - Определяет пределы эндотоксинов для фармацевтических препаратов и изделий медицинского назначения.
 - Описывает процедуру валидации ЛАЛ-теста для готового продукта.
 - Описывает процедуру разработки стандартного протокола испытаний.
- Одно из основных отличий Руководства FDA Новой гармонизированной статьи – это детализация описаний стандартного протокола испытаний

Требования к валидации теста бактериальных ЭНДОТОКСИНОВ

- Независимо от продукта
 - Лаборатория / аналитик
 - Подтверждение чувствительности лизата или линейности
 - Оборудование, программное и аппаратное обеспечение
 - Дополнительные требования, например требования к условиям хранения образцов
- Касательно продукта
 - Тест ингибирования / усиления
 - (3) партии продукта

Валидация независимо от продукта

- Соответствие лаборатории / аналитика
 - Подтверждение чувствительности лизата или линейности в исполнении нового аналитика
- Подтверждение функционирования реактива
 - Подтверждение чувствительности лизата или линейности при изменении партии
- Два этих требования можно проверить в одном анализе

Признанные методы

- Руководство FDA по валидации ЛАЛ-теста
 - Признанные ЛАЛ-методы:
 - Гель-тромб тест
 - Хромогенный конечной точки
 - Турбидиметрический конечной точки
 - Кинетический турбидиметрический
 - Кинетический хромогенный*

* Interim Guidance ; July , 1991

Подтверждение заявленной чувствительности

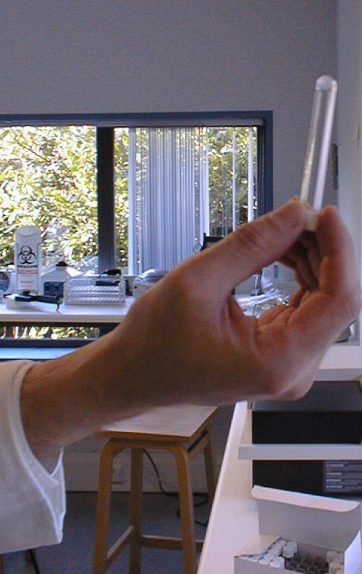
- Подтверждение заявленной чувствительности производится по стандартной процедуре в 4 репликатах
- Подсчитывается среднее геометрическое
- Результат должен быть в диапазоне двойных разведений заявленной чувствительности

Подтверждение заявленной чувствительности

- Среднее геометрическое вычисляется путем суммирования \log крайней концентрации эндотоксина при которой образуется гель для каждого репликата
- 4 значения \log суммируются и делятся на 4
- Antilog результата и есть среднее геометрическое значение

Пример подтверждения чувствительности

Репликация	Концентрация эндотоксина ЕЭ/мл				
	0.5	0.25	0.125	0.062	0.031
1	+	+	+		
2	+	+	+		
3	+	+	+	+	
4	+	+	+	+	+



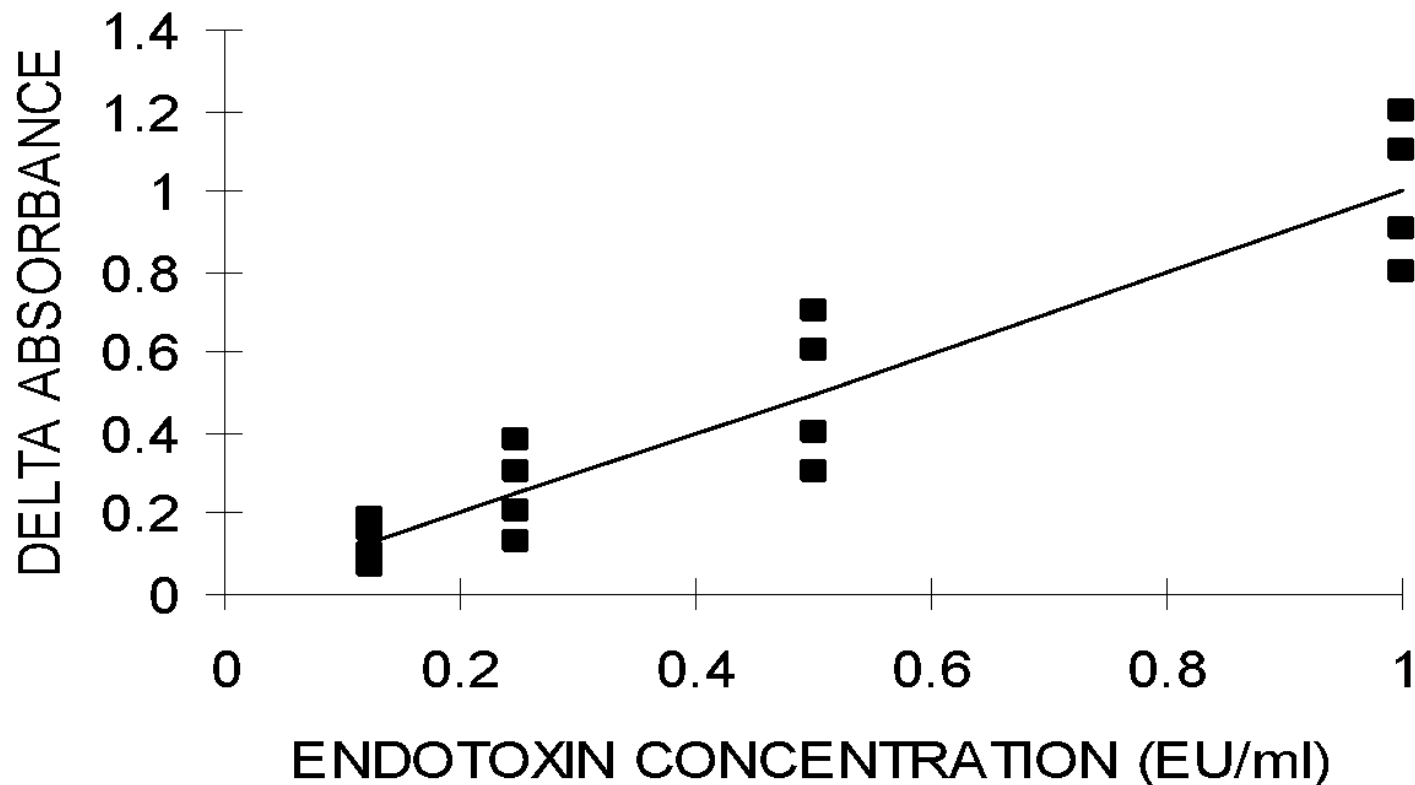
Вычисление среднего геометрического значения

- Результаты примера:
 - $\text{Log } 0.125 + \text{Log } 0.125 + \text{Log } 0.063 + \text{Log } 0.063$
 - Просуммировать результаты и разделить на 4
 - antilog результата = 0.09 ЕЭ/мл
 - Допустимый диапазон 0.25 до 0.063 ЕЭ/мл
- Результат анализа – аналитик / реактив соответствует требованиям

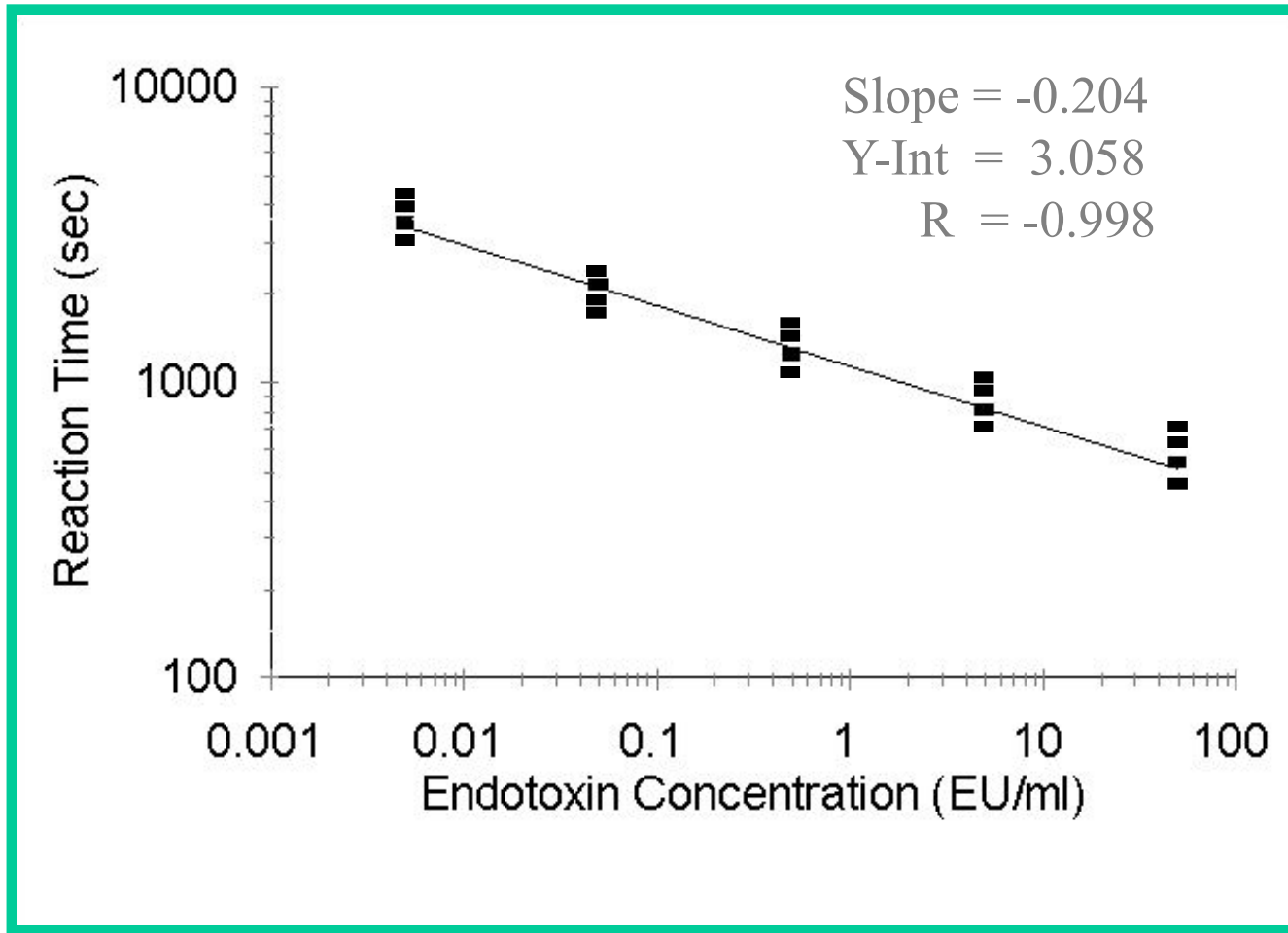
Количественные анализы – подтверждение линейности

- Оператор должен создать стандартную кривую по 4 репликатам
- Для анализа применяется полный диапазон, например 50-0.005 ЕЭ/мл
- Корреляционный коэффициент должен быть >0.98 (-0.98)
- Результаты не усредняются

Подтверждение линейности хромогенного теста конечной точки



Подтверждение линейности кинетического теста



Валидация независимо от продукта

- Оборудование
 - Валидация нагревательного блока или водяной бани
 - Валидация оптической линейности и равномерности распределения температуры для кинетических ридеров
 - Валидация программного обеспечения для кинетических систем
- Данные процедуры должны проводиться как IQ/OQ/PQ перед применением
- Валидационную документацию получают от производителей, в особенности на программное обеспечение

Валидация

независимо от продукта

- Дополнительные требования
- Валидация контейнеров для хранения
 - Храните предполагаемый определяемый уровень концентрации эндотоксина в течение максимального ожидаемого срока хранения
- Депирогенизационные шкафы
 - Оборудование для депирогенизации стеклянной посуды должны валидироваться как минимум ежегодно
- Аксессуары
 - В Гармонизированной статье указано, что наконечники, планшеты, др. также требуется валидировать

Валидация с продуктом

- Данная процедура необходима для доказательства того, что продукт не оказывает интерферентное действие на ЛАЛ-реактив
- Наиболее широко применяемый метод преодоления интерферентных действий является разведение ЛАЛ-реагентной водой
- Необходимо определить правильное разведение/обработку продукта

Предельное значение эндотоксина

- Первым требованием является определение предельного значения эндотоксина в тестируемом продукте
 - Это может быть указано в монографии фармакопеи
 - Если не существует монографии, требуется произвести вычисления
 - Метод расчета включает константы, которые применяются для определения максимальной дозы для человека

Предельное значение эндотоксина

- Определение предельного значения эндотоксина
 - Исходно установлена доза / предел чувствительности теста на кроликах
 - Пределы для ЛАЛ-теста были установлены НИМА в 1980
 - Определенная тогда доза эндотоксина, вызывающая пирогенную реакцию в теле человека применима и сейчас - 5 ЕЭ/кг

Пределные значения эндотоксина

- По данным НИМА пирогенность *E. coli* 055:B5 эндотоксина (ЕС-2).

Концентрация эндотоксина (нг/мл)	Количество колоний для непрохождения теста
1	12 (100%)
0.625	8 (67%)
0.25	2 (17%)
0.0156	0
Отрицательный	0

Предельные значения эндотоксина

- Пирогенность *E. coli* 055:B5 эндотоксина по данным НИМА
- Вывод:
 - Данные исследования установили с 95% точностью, что статистически средняя лаборатория будет получать 50% положительных/отрицательных результатов теста при концентрации выше 0.098 нг/мл эндотоксина Difco *E. coli* 055:B5

– Dabba et al. J. PDA 34:212,1980

Единицы эндотоксина

- Определение единиц эндотоксина:
 - Одна единица эндотоксина = минимальная концентрация стандартного эндотоксина U.S. standard endotoxin EC-2, дающего положительный результат со стандартным лизатом U.S. Reference Lysate Lot 4.

Лаборатория	К-во тестов	Конеч. точка (Нг/мл)
A	1	0.186
	8	0
B	3	0.214
	0	2
C	3	0.173
		8
D	5	0.166
		7

Среднее=0.1940

1 ЕЭ=0.2 нг

ЕС-2 или 5

ЕЭ/нг

Предельные значения эндотоксина

- Активность ЕС-2 при 5 ЕЭ/нг дает увеличение ограничения дозы 5 ЕЭ/кг, применяемая и сейчас
- Доза 2.5 ЕЭ/кг принято в 1990 USP для радиофармацевтических препаратов
- Значительно более низкая доза 0.2 ЕЭ/кг принята для интратекальных препаратов в 1983

Предельные значения эндотоксина

- Вычисление предельного значения эндотоксина для фармацевтических препаратов
- Предельные значения эндотоксина = $(K / M) \times$ активность
 - K = макс. Допустимое к-во эндотоксина
 - 5.0 ЕЭ/кг/час или 350 ЕЭ/на тело человека/час
 - 0.2 ЕЭ/кг/час или 14 ЕЭ/на тело человека/час (интратекальные)
 - M = Макс. Человеческая доза
 - Активность = концентрация препарата (не требуется, если доза выражена в мл)

Вычисление предельного значения ЭНДОТОКСИНА

• Пример 1

- Инсулин
- Доза: 2 ед/кг
- Активность: 100 ед/мл
- Вычисление предельного значения эндотоксина:

• Example 2

- 5% глюкоза
- Доза: 10 мл/кг
- Активность: неприменимо
- Вычисление предельного значения эндотоксина :

$$\frac{5 \text{ Е / кг}}{2 \text{ Э / кг}} \times 10 \text{ ед / мл} = 25 \text{ Е / мл}$$

$$\frac{5 \text{ Е / кг}}{1 \text{ Э / кг}} = 0.5 \text{ ЕЭ / мл}$$

Нестандартные предельные значения эндотоксина

- Противоопухолевые

- Предел эндотоксина =

$$\frac{K}{M} \times \frac{7 \text{ кг}}{1.8 \text{ м}^2}$$

- K= макс. Допустимая доза эндотоксина 5ЕЭ/кг/час
- M= макс. Чел. доза (на м²)

- Радиофармацевтические

- Предел эндотоксина = 175ЕЭ/V

- V= макс. доза isotope expiration

Вычисление степени разведения

- При разведении образца для преодоления влияния интерферентных факторов эндотоксин, содержащийся в образце, соответственно тоже разводится
- В итоге концентрация эндотоксина снижается до уровня, не определяемого методом. Вследствие это необходимо рассчитать:
 - максимальное допустимое разведение
 - или
 - Минимальную допустимую концентрацию

Максимальное допустимое разведение

- Рассчитывается максимальное допустимое разведение
- Применяется термин лямбда λ :
 - Заявленная чувствительность лизата для гел-тромб теста
 - Нижний стандарт для количественных анализов
- максимальное допустимое разведение =

Предел эндотоксинов

Лямбда

Пример расчета максимального допустимого разведения (МДР)

- Гель-тромб
- Чувствительность лизата 0.06
- Предел эндотоксина для продукта 3.0 ЕЭ/мл

$$\text{МДР} = \frac{3.0 \text{ ЕЭ/мл}}{0.06 \text{ ЕЭ/мл}}$$

- МДР = 1:50

- Кинетический хромогенный
- Нижний стандарт 0.005
- Предел эндотоксина для продукта 3.0 ЕЭ/мл

$$\text{МДР} = \frac{3.0 \text{ ЕЭ/мл}}{0.005 \text{ ЕЭ/мл}}$$

- МДР = 1:600

Пример расчета максимального допустимого разведения (МДР)

- Дифенин натрия
 - Максимальная доза: 15 мг/кг
 - Чувствительность лизата: 0.005 ЕЭ/мл
 - Концентрация (активность) препарата: 50 мг/мл

$$\text{МДР} = \frac{50 \text{ мг/мл} \times 5.0 \text{ ЕЭ/кг}}{0.005 \text{ ЕЭ/мл} \times 15 \text{ мг/кг}}$$

МДР = 3,333.33 или 3,300 для удобства

Минимальная допустимая концентрация (МДК)

- Степень разведения продукта можно выразить в МДК
- Данная величина как правило применяется когда предел эндотоксинов выражен в ЕЭ/мг
- $\text{МДК} = \frac{\text{Предел эндотоксина/мг}}{\lambda}$ (как и в случае с МДР)

Минимальная допустимая концентрация

- МДК определяется следующим образом:

$$\text{МДК} = \lambda \text{ М} / \text{К}$$

- Где:
 - λ = чувствительность лизата или нижний стандарт
 - М = максимальная человеческая доза
 - К = 5.0 ЕЭ/кг

Примеры МДК

- Циклофосфамид

- Макс. доза: 25.0 мг/кг

- Лизат: гель-тромб с чувствительностью 0.125 ЕЭ/мл

- Расчет:

$$\frac{\text{МДК} = 25.0 \text{ мг/кг} \times 0.125 \text{ ЕЭ/мл}}{5.0 \text{ ЕЭ/кг}}$$

$$\text{МДК} = 0.625 \text{ мг/мл}$$

Проверка интерференции

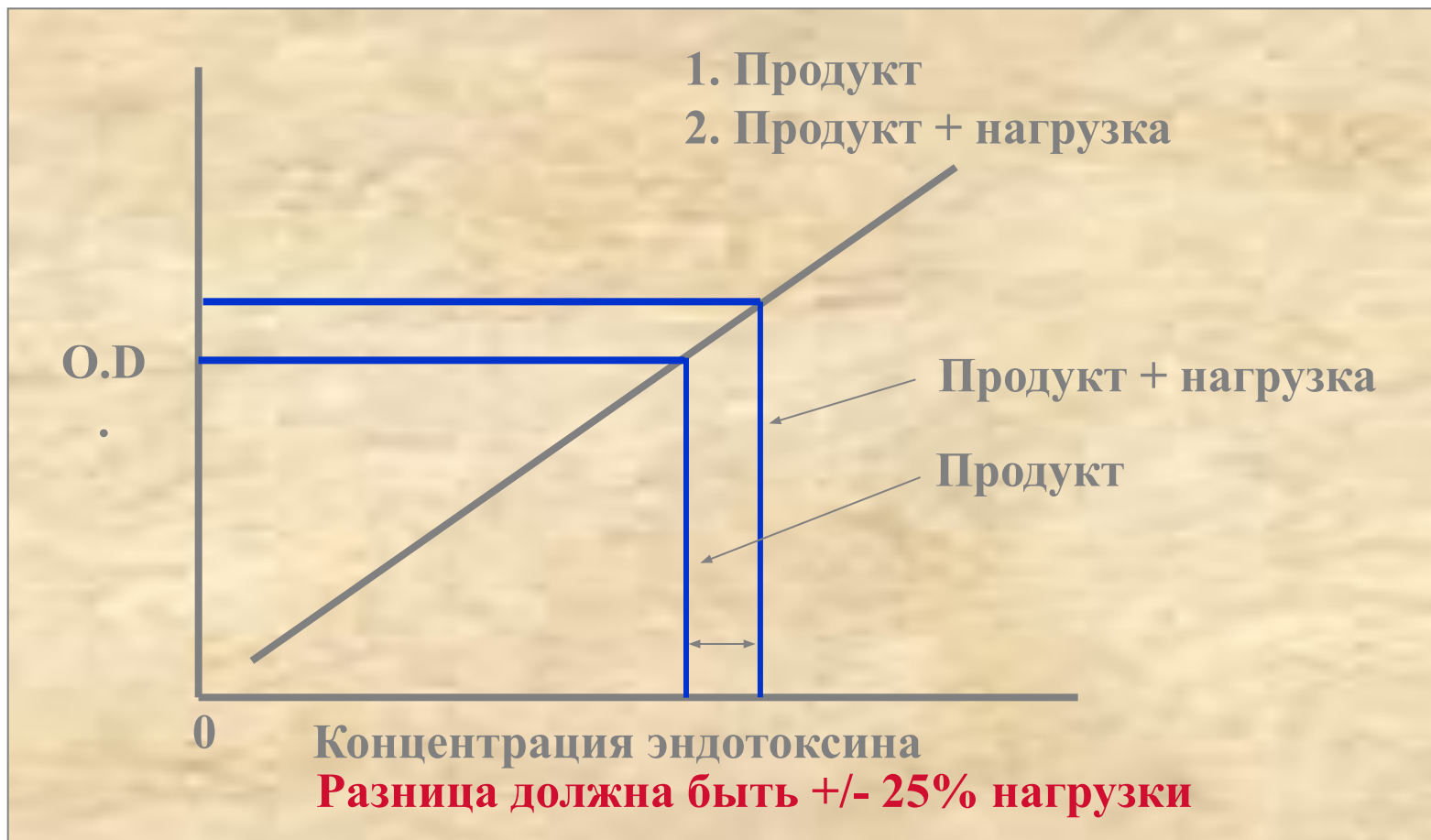
- Следующим шагом валидации является тестирование интерференции продукта при тесте
- Интерференция может вызвать завышение (усиление) или занижение (ингибирование) результатов
- Валидационные тесты часто называют тестами ингибирования / усиления
- Примеры:

Тест ингибирования / усиления

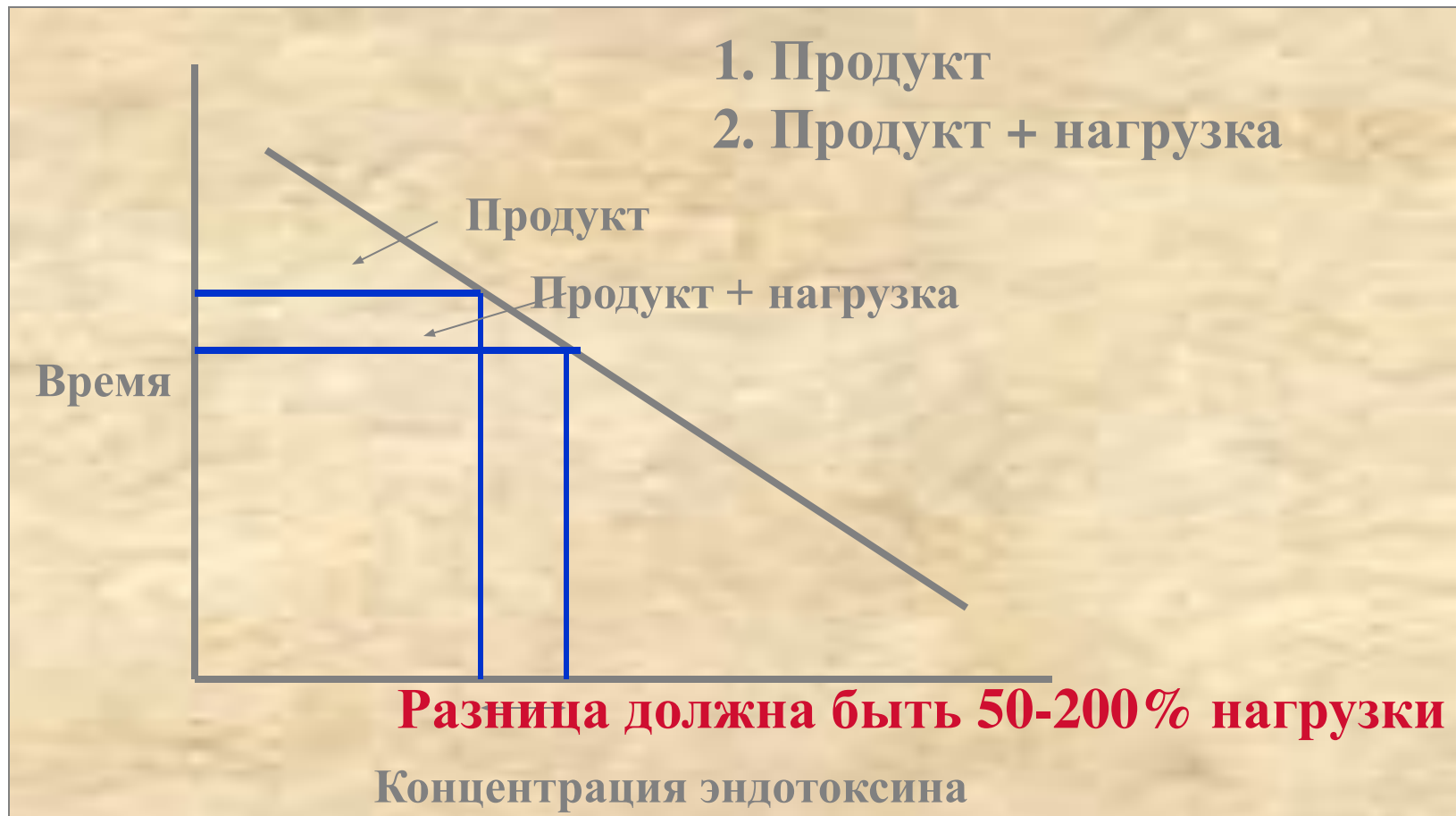
(Гель-тромб метод)



Тест ингибирования / усиления (хромогенный метод конечной точки)



Тест ингибирования / усиления количественный метод



Стандартная кривая продукта

Как правило применяется для наиболее сложных продуктов!





После валидации...

Рутинное тестирование



Требования к рутинному тестированию

- Гель-тромб метод
 - 3 образца из партии
 - в 2 экземплярах
 - В диапазоне МДР
 - Положительный контроль продукта
 - Отрицательный контроль

Требования к рутинному тестированию

- Количественные методы конечной точки
 - 3 образца из партии
 - в 2 экземплярах
 - В диапазоне МДР
 - Положительный контроль продукта: 4λ
 - Отрицательный контроль
 - Стандарт с каждым тестом
 - Линейность: $R > |0.980|$

Требования к рутинному тестированию

- Количественные кинетические методы
 - 3 образца из партии
 - в 2 экземплярах
 - В диапазоне МДР
 - Положительный контроль продукта: РФС (пределы прохождения и непрохождения)
 - Отрицательный контроль
 - Стандарт с каждым тестом
 - Линейность: $R > |0.980|$

Граница прохождения/непрохождения

$$PFC = \frac{\text{Предельное значение эндотоксина}}{\text{разведение}}$$

Если: PFC меньше либо равен 1.0 тогда нагрузка 0.5
ЕЭ/мл

Если: PFC больше 1.0 тогда нагрузка 5.0 ЕЭ/мл

Пример RFS

Предельное значение эндотоксина
= 0.5 ЕЭ/мл

Разведение = 1/10

RFS = $\frac{0.5}{10} = 0.05$ нагрузка 0.5 ЕЭ/мл

Предельное значение эндотоксина = 75 ЕЭ/мл

Разведение = 1/25

RFS = $\frac{75}{25} = 3.0$ нагрузка 5.0 ЕЭ/мл



Изделия медицинского назначения

Особый случай



Изделия медицинского назначения

- В случае с изделиями медицинского назначения эндотоксин необходимо извлечь или смыть
- Следовательно процедура тестирования изделий медицинского назначения включает шаг элюирования
- Элюентом как правило является ЛАЛ-реагентной воды, в которой выдерживается продукт в течение часа при 37°C

Изделия медицинского назначения

- Пределы для изделий медицинского назначения недавно изменились
- Экстракция или элюирование являлись основой для определения эндотоксинов при объеме элюирования 40 мл на изделие
- Прежний предел был основан на 0.5 ЕЭ/мл в суммарном экстракте

Изделия медицинского назначения

- Прежний предел определял диапазон 3-10 единиц но при этом не разрешалось разведение экстракта
- В случае если изделие было слишком велико для смыва 40 мл, данный объем вызывал вопросы
- Предел эндотоксинов достаточно низкий по сравнению с парентеральными препаратами, однако суммирование экстрактов в какой-то мере это компенсирует

Изделия медицинского назначения

- Изделия медицинского назначения
 - USP 23, приложение 1
 - Выборка мин. 3 и макс. 10 изделий
 - Определите объем для смыва в зависимости от размера и конфигурации изделия:
 - K=допустимое количество эндотоксина на изделие
 - N=количество тестируемых изделий
 - V= общий объем экстракционного раствора

$$\frac{K \times N}{V}$$

Изделия медицинского назначения

- Изделия медицинского назначения
 - USP 23, приложение 1
 - пределы:
 - 20.0 ЕЭ/изделие
 - 2.15 ЕЭ/изделие для изделий цереброспинального контакта
 - В новой монографии описан расчет МДР для элюата

Руководство ЕР

- В руководствах FDA и ЕР существовал ряд отличий
- Исходные руководства были сходны, однако имелись различия и разночтения, что вызывало вопросы
- Новый гармонизированный текст устраняет различия



Контролирующие органы

Краткая характеристика



FDA

- Департамент службы здравоохранения Department of Public Health Service и одна из старейших организаций защиты прав потребителей США
- В 1977 опубликовано тестирование эндотоксинов (№ 42 FR 57749), заменяющий тест на кроликах.
- Опубликованные документы о ЛАЛ-тесте:
 - Руководство по валидации ЛАЛ-теста как теста на эндотоксины в парентеральных препаратах для человека и животных, биопродуктах и изделиях медицинского назначения -Guidelines validation of LAL test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, Biological products, and medical devices. Dec 1987.
 - Временное руководство по препаратам для человека и животных и биопродуктам - Interim Guidance for human and veterinary drug products and Biologicals. July 1991.

Фармакопея США

- Основана в 1820
- Поправки публикуются на Фармакопейном форуме
- ЛАЛ-тест описан как биологический тест в разделе <85> USP 23 NF как тест бактериологических эндотоксинов, введен в действие в 1995.

Европейская Фармакопея

- Основана в 1964
- Интегрирована в Европейский департамент качества медицинских препаратов European Department for the Quality of Medicines(EDQM) , май 1994.
- EP содержит описание более 250 общих аналитических методов, на которых основаны спецификации монографий. Данные тесты могут быть биологическими, физическими, др.



Гармонизация документов

Новый гармонизированный текст



Международная гармонизация

- Are we singing a pleasant tune?



гармонизировать

- По Вебстеру «гармонизировать»:
 - “согласовывать, слаживать”
- в 2000 опубликован и вступил в силу
новый текст в Приложении 2 к USP24-NF
19

Гармонизированный документ

- Появился в результате сотрудничества США, Европы и Японии
- На основе 4 документов:
 - Тест на бактериальные эндотоксины USP, EP и JP
 - Руководство FDA
- А также Руководство EP

Фармакопейные статьи

- Что описано в фармстатьях ?
- Что не описано ?
- Облегчит ли это ЛАЛ-тест?

Пределы и стандарты

- Калькуляция предела эндотоксина такая как в EP по λ и без λ 'm' (уст. термин)
- Расчет максимального допустимого разведения остался таким же, однако определение λ находится в описании раствора С в таблице 4
- Стандарты эндотоксина гармонизированы

Одобрённые методы

- Гель-тромб:
 - Гель-тромб тест предела
 - Гель-тромб анализ
- Фотометрические методы:
 - Турбидиметрический конечной точки
 - Хромогенный конечной точки
 - Кинетический турбидиметрический
 - Кинетический хромогенный

Арбитраж

- В случае споров по-прежнему применяется гель-тромб, если иное не указано в монографии
- Данный текст является основой ЛАЛ методик для различных препаратов, с оговоркой что гель-тромб метод подходит не для всех препаратов

Гель-тромб метод

- Испытание на соответствие Confirmation Test требует один флакон лизата
- Четыре стандарта на 2λ , λ , 0.5λ и 0.25λ и отрицательный контроль анализируются в четырех репликатах
- Чувствительность лизата считается подтвержденной если среднее геометрическое не менее 0.5λ и не более 2λ

Гель-тромб метод

- Тест на интерферентные факторы требует 2λ , λ , 0.5λ и 0.25λ стандарты приготовленные в ЛАЛ-реагентной воде и в образце (не превышая МДР)
- стандарты в ЛАЛ-реагентной воде анализируются в двух репликатах и в образце анализируются в четырех репликатах
- стандарты в ЛАЛ-реагентной воде должны подтвердить λ
- Чувствительность лизата в образце должна быть не менее 0.5λ и не более 2λ

Гель-тромб тест предела

Самый простой ЛАЛ-тест – требуется только 8 пробирок

Раствор	Концентрация эндотоксина / раствор в который добавляется эндотоксин	Репликаты
A	Нет/разведенный раствор образца	2
B	2 λ разведенный раствор образца	2
C	2 λ ЛАЛ реагентная вода	2
D	ЛАЛ реагентная вода	2

Гель-тромб метод

Существуют трудности метода. Только в образец самой высокой концентрации добавляется эндотоксин

Раствор	Концентрация эндотоксина / раствор в который добавляется эндотоксин	Растворитель	Фактор разведения	Исходная концентрация эндотоксина	Репликаты
А	Нет/разведенный раствор образца	ЛАЛ вода	1	-----	2
			2	-----	2
			4	-----	2
			8	-----	2
В	2 lambda в растворе образца	----	1	2 lambda	2
С	2 lambda в ЛАЛ реагентной воде	ЛАЛ вода	1	2 lambda	2
			2	lambda	2
			4	0.5 lambda	2
			8	0.25 lambda	2
Д	нет / ЛАЛ реагентная вода	----	----	-----	2

Фотометрические методы

- Четыре фотометрических метода сгруппированы под одним заголовком
- Предварительным требованием является верификация стандартной кривой и тестирование интерферентных факторов
- Для верификации стандартной кривой анализируются минимум 3 концентрации. Коэффициент корреляции должен быть ≥ 0.980 (-0.980)

Фотометрические методы

Раствор	Концентрация эндотоксина	Раствор в который добавляется эндотоксин	Репликаты
A	Нет / раствор образца	Образец	2
B	Средняя концентрация стандартной кривой	Образец	2
C	Минимум три концентрации	ЛАЛ вода	2
D	Нет / ЛАЛ вода	ЛАЛ вода	2

Для того чтобы тест считался не имеющим интерферентности Восстановление должно быть 50% до 200% известной Концентрации эндотоксина

Гармонизированный текст

- Термин контрольный стандарт эндотоксина CSE более не применяется, применяется термин «стандарт»
- FDA признает сертификат анализа производителя лизата, что ожидается и в будущем
- Нет определенных требований по применению лицензированного лизата

Гармонизированный текст

- Отсутствует детализация методов расчета для фотометрических методик
- Единственное требование к коэффициенту корреляции ≥ 0.980 (-0.980)
- В USP и EP отсутствует запрещение применения техник улучшения стандартной кривой, например Powercurve™

Соотношение с руководством FDA

- Важно помнить что документы USP и EP относятся к одному тесту
- Данные документы не включают:
 - Промышленные испытания для релиза продукта на рынок
 - Отбор проб
 - Повторные испытания
 - в EP изделия медицинского назначения

Руководства

- Скорее всего руководство FDA будет еще применяться какое-то время
- FDA планирует выпустить поправки (планируется с 1993 !)
- Противоречивые предварительные руководства EP отменены

Выводы

- Гармонизированный текст является полной регуляторной основой для ЛАЛ-тестирования
- Фармакопейные документы нацелены на описание единого контрольного теста
- Руководство FDA скорее всего так и останется единственным руководством для промышленных испытаний для релиза продукта на рынок и повторных испытаний