

ЛАЛ-тест

№2 2003

Уважаемые коллеги!

Вашему вниманию предлагается очередной номер бюллетеня «ЛАЛ-тест», тема которого «ЛАЛ-тест и испытание на пирогенность в опытах на кроликах – сравнение методов». Это первый тематический номер нашего бюллетеня.

Первая публикация этого номера является переводом статьи Т. Новитского – президента компании Associates of Cape Cod Inc, опубликованная в издаваемом компанией бюллетене «LAL Update» (Novitsky T.J., “BET vs. PT. Non-Endotoxin Pyrogens.” LALUpdate Vol. 20, No.2 (2002). Статья любезно предоставлена автором для публикации в нашем издании.

В этой работе наглядно продемонстрирована возросшая значимость ЛАЛ-теста. Сегодня оценка возможности применения новых методов определения пирогенности in vitro проводится уже в сравнении с ЛАЛ-тестом. Действительно, сейчас этот анализ занял место официального и общепринятого метода, каким в свое время было определение пирогенности in vivo.

Мы попытались также привести краткий обзор достоинств ЛАЛ-теста и разобраться с тем, какие из них оказываются действительно значимыми для системы контроля качества лекарственных средств. Возможно эта статья будет интересна тем, кто сейчас на практике сталкивается с необходимостью выбора между анализом на кроликах и ЛАЛ-тестом.

С уважением, редакционная коллегия бюллетеня «ЛАЛ-тест»

Тест «Бактериальные эндотоксины» и анализ «Пирогенность». Пирогены немикробного происхождения.

Thomas J. Novitsky, Ph.D.

В 1977 году Администрация по контролю лекарственных средств и пищевых продуктов США (FDA) признала ЛАЛ-тест как альтернативу фармакопейному тесту «Пирогенность» <151> (1,2). Признание метода основывалось на серии исследований, в которых была показана прекрасная корреляция результатов ЛАЛ-теста и анализа пирогенности, проводимого на кроликах (3,4,5). Pearson F. и соавт. резюмировали эти результаты следующим образом: «Из нескольких сотен тысяч анализов, проведенных с помощью ЛАЛ-теста, несколько сотен анализов потребовали повторной проверки на кроликах, при этом не было ни одного случая, когда один и тот же препарат проходил бы по ЛАЛ-тесту и не проходил бы на кроликах» (5). Дополнительным преимуществом ЛАЛ-теста явилась его более высокая чувствительность по сравнению с испытанием на пирогенность. Это сделало ЛАЛ-тест реальным средством стадийного контроля в процессе производства лекарственных препаратов. Исследования пригодности ЛАЛ-теста проводились и после его утверждения FDA. В частности, в одном из исследований было показано, что:

1) содержание бактериальных эндотоксинов в лекарственных препаратах, производимых в США, как правило, значительно ниже допустимого предельного уровня (2449 из 2526 проверенных или 97%);

**Перевод статьи подготовлен Ситниковым А.Г. Оригинальная версия статьи опубликована в периодическом бюллетене LAL Update (Novitsky T.J., “BET vs. PT. Non-Endotoxin Pyrogens.” LALUpdate Vol. 20, No.2 (2002); ее можно найти на сайте компании Associates of Cape Cod Inc (<http://www.acciusa.com>). В случае обнаружения каких-либо неточностей или ошибок в переводе просьба сообщить о них в редакционную коллегия нашего бюллетеня.*

2) те из них, которые оказались пирогенными, были приготовлены из природного сырья (17 из 24);

3) наиболее часто бактериальными эндотоксинами загрязнены субстанции, а не готовые лекарственные формы (6). Все это не явилось полной неожиданностью, так как ранее в исследованиях пирогенной лихорадки у кроликов – предшественнике фармакопейного анализа «Пирогенность» - было показано, что именно эндотоксины являются причиной «инъекционной лихорадки» (7,8). Таким образом, и накопленный опыт, и экспериментальные данные объективно способствовали замене теста «Пирогенность» на «Бактериальные эндотоксины». Наиболее серьезным возражением против замены пирогенного теста на анализ «Бактериальные эндотоксины» был тот факт, что ЛАЛ-тест более чувствителен, чем кролики. Так же, как и то обстоятельство, что способность ЛАЛ-реактива реагировать с разными эндотоксинами не всегда четко коррелирует с пирогенным ответом. Это объясняется тем, что одни и те же весовые количества бактериальных эндотоксинов, выделенных из разных видов бактерий, вызывают неодинаковый ответ у кроликов. Из-за этого ЛАЛ-тест считался не очень хорошим индикатором «биологической активности» эндотоксинов. Первое опасение было устранено последующими исследованиями, в которых были определены реальные весовые количества стандарта эндотоксина, способные вызвать положительную реакцию у кроликов. Эти исследования завершились формулировкой концепции «Предельного содержания бактериальных эндотоксинов». Второе опасение тоже было преодолено, благодаря предложению использовать Эталонный стандарт эндотоксина (Reference Standard Endotoxin, RSE) и выражать его активность в единицах эндотоксина (ЕЭ). Использование ЛАЛ-теста и принятие RSE были столь успешными, что, начиная с XXI издания Американской Фармакопеи (1985), в монографиях, ранее требующих проведения анализа пирогенности, началась замена этого теста на анализ «Бактериальные эндотоксины» («Bacterial Endotoxin Test», BET <85>). Первой частью статьи, предписывающей проведение этого анализа, была статья на воду для инъекций, которая, без сомнения, является основным ингредиентом практически всех инъекционных растворов и активно используется в производственном процессе. В Американской Фармакопее XXIV издания осталось только 20 монографий, которые предписывают проведение анализа «Пирогенность», для всех остальных инъекционных препаратов предписано испытание «Бактериальные эндотоксины». Вместе с тем известно, что некоторые лекарственные средства могут сами вызывать пирогенную реакцию (т.е.

могут быть отнесены к классу пирогенов, не являющихся эндотоксинами), или процесс их производства может быть причиной попадания пирогенов, не являющихся эндотоксинами. Поэтому FDA до сих пор требует проведения анализа пирогенности на стадии исследования свойств новых инъекционных лекарственных средств.

С точки зрения этого исторического экскурса процедура замены анализа пирогенности на определение бактериальных эндотоксинов выглядит разумной и последовательной. Однако, непосредственные участники этих событий помнят, какие оживленные споры предшествовали принятию ЛАЛ-теста. Естественно, что в этих дискуссиях обсуждались и вопросы пирогенов, не являющихся эндотоксинами. Серьезной проблемой было то обстоятельство, что, не смотря на то, что в большинстве случаев пирогенами оказываются эндотоксины, известны пирогены, не являющиеся эндотоксинами. В книге «Пирогены, эндотоксины, ЛАЛ-тест и депирогенизация» приведен прекрасный обзор пирогенов, не являющихся эндотоксинами (9). Этот список, хотя и несколько устаревший, и сегодня может считаться исчерпывающим. Классы пирогенов, не являющихся эндотоксинами, включают пирогены микробного происхождения (грамположительные бактерии и некоторые их компоненты, вирусы и некоторые их компоненты и грибы и некоторые их компоненты). К немикробным пирогенам относятся некоторые антигены, стероиды, полинуклеотиды и синтетические адьюванты. Надо отметить, что даже наиболее сильные пирогены, не являющиеся эндотоксинами (за исключением глюканов, производных грибов), проявляют во много раз меньшую активность, чем эндотоксины. Например, стафилококковый энтеротоксин считается «потенциальным» пирогеном, но для возникновения пирогенной реакции в тесте на кроликах необходима его концентрация, равная 1 мкг/кг. Это примерно в 20000 раз больше пороговой пирогенной дозы эндотоксина (пороговая пирогенная доза равна 0,5 ЕЭ/кг (~0,05 нг/кг). Это означает, что для лекарственных средств, произведенных в условиях GMP, пирогенная реакция, вызванная возможной стафилококковой контаминацией, практически исключена. Более того, многие микробные компоненты, ранее считавшиеся пирогенами, как было показано позже, оказывались просто загрязнены эндотоксинами. Например, липотейхоевая кислота, ЛТК (*Lipoteichoic acid, LTA*), которая, как было недавно показано, теряет свою способность стимулировать макрофаги после дополнительной очистки (т.е. после удаления липополисахаридов) (10). Совсем недавно *Morath u др.* подвели следующий итог: «Невозможно адекватно оценить способность сырых препаратов липотейхоевой кислоты активировать иммунные

клетки по причине относительно высокого содержания в них бактериальных эндотоксинов» (11). Многие другие «пирогены», упоминаемые ранее, попадают под это определение. Так как эндотоксины вездесущи по своей природе, их легко найти практически во всех продуктах биологического происхождения, даже если их трудно при этом обнаружить химически. Например, грамположительные организмы могут расти на питательных средах, которые, в свою очередь, могут содержать большое количество эндотоксинов. Эти эндотоксины из среды прилипают к клеткам или их компонентам и могут оставаться в качестве загрязнителя, если только не будут предприняты исключительные меры по их удалению.

ЛАЛ-тест после его принятия FDA, Американской, Европейской и Японской Фармакопеями стал первой заменой теста с использованием животных на тест, проводимый *in vitro*. Метод сегодня широко распространен, и накоплено большое количество сведений, подтверждающих, что для лекарственных средств, произведенных в условиях GMP, единственно возможными пирогенами являются эндотоксины. В то же время удивительно, что проблема пирогенов, не являющихся эндотоксинами, бывшая предметом полемики в 80-х годах, до сих пор полностью не снята. Начиная с 1989 года, в литературе стали появляться упоминания о пирогенном тесте *in vitro* (12, 13, 14, 15, 16).

Эти исследования основывались на том факте, что стимулированные эндотоксинами и/или другими пирогенами моноциты человека выделяют эндогенные пирогены (интерлейкин 1В) и цитокины (т.е. IL-6, TNF α и PGE2). Таким образом, используя макрофаги или кровь, содержащую макрофаги человека (объекта воздействия лекарственного средства), можно получить видоспецифичный пирогенный тест. Учитывая, что анализ пирогенности до сих пор существует как способ проверки новых лекарственных средств, появление видоспецифичного пирогенного теста, особенно такого, который не требует использования животных, может только приветствоваться.

Важно отметить, что анализ с использованием моноцитов до сих пор недостаточно охарактеризован и валидирован. Поэтому надежды на то, что он станет фармакопейным анализом, могут оказаться преждевременными. Как и в приведенном ранее примере с контаминированной ЛТК, некоторые данные свидетельствуют о спорности результатов анализа с использованием моноцитов (17).

Наиболее серьезным недостатком этих анализов является отсутствие достоверного стандарта пирогенов неэндотоксинового происхождения. Во всех современных анализах,

проводимых *in vitro*, в качестве стандарта используется эндотоксин. До тех пор, пока не будет консенсуса относительно стандарта (стандартов) пирогенов, не являющихся эндотоксинами, остается неопределенной и пригодность этих методов (включая и определение пирогенности на кроликах, для которого никакого специального стандарта никогда не было нужно). Еще одним слабым местом анализа, основанного на реакции моноцитов, является необходимость свежей цельной крови человека или свежеприготовленной фракции моноцитов. К тому же этому методу, как и всем биологическим анализам, присуща большая вариабельность результатов. Например, при исследовании крови 131 донора среднее содержание эндотоксина составило $0,151 \pm 0,113$ ЕЭ/мл (18). И хотя формула крови 73% доноров из этой группы вообще не содержала эндотоксинов, у определенного числа доноров эндотоксины содержались в определяемых количествах.

Таким образом, вариабельность этого метода обнаружения эндотоксинов еще предстоит определить. При этом нельзя не учитывать врожденную способность крови некоторых доноров нейтрализовать эндотоксин. До тех пор, пока не будут решены эти вопросы, анализ с использованием моноцитов свежей крови человека в лучшем случае останется исследовательским инструментом (19, 20). В литературе есть обнадеживающие свидетельства возможности использования культуры клеток для анализа пирогенности *in vitro*. Но в данном случае, как и с ЛАЛ-тестом, нужна скрупулезная детализация процедуры, гарантирующая поддержание этих систем свободными от эндотоксинов (стекло, культуральная среда, устройства для переноса и т.д.). Наконец, как и предсказывалось экспериментами *Dinarrello u соавт.*, экстракты ЛАЛ-активного материала, если и не вызывают положительный ответ в условиях теста, могут оказаться токсичными для используемых культур клеток (21). Из этого следует необходимость введения положительного контроля испытуемого образца для того, чтобы устранить ложноотрицательные результаты. В отличие от ЛАЛ-теста, где контролем служит эндотоксин, достоверный контроль для пирогенного теста *in vitro* должен быть репрезентативным по отношению ко всем возможным пирогенам, поскольку они могут вызывать реакцию, отличную от той, что вызывают эндотоксины. Также необходимо отметить, что для получения чувствительности, сопоставимой с ЛАЛ-тестом, даже в том случае, когда в качестве «пирогена» используется эндотоксин, типичный пирогенный тест *in vitro* требует предварительного инкубирования в течение 12-24 часов для выделения цитокинов, затем следует определение собственно цитокинов, продолжающееся до 4

часов. Для того, чтобы сохранить живые клетки в течение такого времени, необходим CO₂ инкубатор и предосторожности во избежании загрязнения. В следующих номерах *LALUpdate* будут приведены дополнительные сведения по результатам наших собственных исследований этих методов.

Реакция ЛАЛ-реактива с глюканами - производными грибов.

Главным объектом критики ЛАЛ-теста было то, что он не абсолютно специфичен по отношению к эндотоксинам. Сегодня известно, что производные грибов - (1→3)-β-D-глюканы способны вызывать реакцию ЛАЛ-реактива (в зависимости от состава реактива) в количествах, равных пикограммам (*LAL UPDATE, Vol. 19, No. 3, November 2001*). Хотя до сих пор не ясно, все ли глюканы, вызывающие реакцию ЛАЛ-реактива, являются пирогенами, т.е. способны вызывать выделение цитокинов при попадании в кровь высших животных или при введении в специфические культуры клеток. Очевидно, что большинство (1→3)-β-D-глюканов потенциально биологически активны, и они могут считаться загрязнителями лекарственного средства или поверхности медицинского изделия, изготовленного по правилам GMP. Поэтому можно считать удачным то, что ЛАЛ-реактив, содержащий факторы свертывания С и G, способен обнаружить наиболее распространенные загрязнители, являющиеся производными бактерий или грибов. С практической стороны сегодня достаточно легко дифференцировать положительные результаты ЛАЛ-теста, вызванные глюканами и/или эндотоксинами, используя новые продукты компании Associates of Cape Code.

ЛАЛ и анализ пирогенности *in vitro* для обнаружения эндотоксинов.

В настоящее время в большинстве работ, в которых описывается анализ пирогенности *in vitro*, в качестве пирогенов используются эндотоксины. Поэтому результаты очень легко сравнить с фармакопейным анализом «Бактериальные эндотоксины». Несмотря на то, что ЛАЛ-тест превосходит все описанные анализы пирогенности *in vitro* в части чувствительности, специфичности, быстроты и простоты исполнения, стоимости и воспроизводимости, все же упоминаются три пункта, по которым пирогенный тест *in vitro* может превосходить ЛАЛ-тест. Это следующее: 1) видоспецифичность, т.е. человек, кролики, крысы и т.д.; 2) защита мечехвостов - в виду снижения количества анализов, проводимых методом ЛАЛ-тест, меньше потребуется мечехвостов для производства ЛАЛ-реактива; и 3) новые методы дают возможность обнаружить эндотоксины на поверхности изделия медицинского назначения. Первый пункт не вызывает возражений, но необходимо иметь в виду, что концепция пороговой пирогенной дозы очень консервативна. Так,

несмотря на относительность «активности» разных стандартов эндотоксина при воздействии их на разные виды животных, имеется много литературных данных, подтверждающих, что лекарство/изделие, прошедшее валидированный ЛАЛ-тест, не является пирогенным ни для человека, ни для животных. В действительности, пирогенность эндотоксинов для человека, выраженная в единицах RSE, как было показано, идентична пирогенной дозе кроликов (22). Можно согласиться и со вторым пунктом, хотя надо заметить, что производство ЛАЛ-реактива не является определяющим для популяции мечехвостов. Животные, предназначенные для биомедицинского использования (т.е. для производства ЛАЛ-реактива), по давно сложившейся практике возвращаются в естественную среду обитания. Компанией Associates of Cape Cod ведется активная разработка таких методов проведения анализов, в которых используется меньше ЛАЛ-реактива (например, новая система Pygos Kinetix, использующая ЛАЛ-реактив в количествах, вдвое меньших, чем в обычных анализах). Также компания занимается разработкой синтетических компонентов, которые будут использоваться при проведении анализа. В дополнение к этому компания разработала и предлагает искусственную приманку, приготовленную из продуктов переработки плазмы мечехвостов, которую можно использовать при ловле рыбы вместо мечехвостов. И, наконец, наиболее интересный - третий пункт. Утверждается, что анализ пирогенности *in vitro* является более точным, так как возможно проведение инкубирования в контакте с изделием для обнаружения эндотоксина, который может быть адсорбирован на поверхности изделия. Действительно, принятая процедура определения содержания эндотоксинов для изделий медицинского назначения с помощью ЛАЛ-теста предполагает анализ смыва, в который могут перейти не все эндотоксины, адсорбированные на поверхности (в худшем случае их вообще нельзя перевести в раствор). В то же время в литературе описаны и прекрасно работают методы проведения ЛАЛ-теста *in situ*, т.е. анализ, в котором изделия инкубируются непосредственно в контакте с ЛАЛ-реактивом (23, 24). Недавно компания АСС завершила исследования смывов с имплантантов, приготовленных обычным порядком, в которых эндотоксины не обнаруживались, но которые вызывали реакцию ЛАЛ-реактива при инкубировании *in situ*, т.е. инкубировались с ЛАЛ-реактивом. Мы собираемся привести подробное описание этого метода в ближайшем будущем. Хочется надеяться, что FDA признает преимущества техники *in situ* для некоторых имплантантов и примет соответствующие правила.

Литература.

1. Federal Register 42:57749, November 4, 1977.
2. USP XXIV. United States Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville, MD. (2000).
3. Müller-Calgan, H., "Experiences with comparative examinations for pyrogens by rabbit pyrogen test versus the LAL test." In Watson S. W., Levin, J. & Novitsky T.J. (Eds.), *Endotoxins and Their Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test*. Alan R. Liss, Inc., New York, NY, pp.343-356 (1982).
4. Hochstein, H.D., "The LAL test versus the rabbit pyrogen test for endotoxin detection." *Pharmaceutical Technol.* 1:124-129 (1987).
5. Pearson, F.C. III, M.E. Weary, and R. Dabbah, "A corporate approach to in-process and end-product testing with the LAL assay for endotoxin." In Watson S. W., Levin, J. & Novitsky T.J. (Eds.), *Endotoxins and Their Detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test*. Alan R. Liss, Inc., New York, NY, pp.231-246 (1982).
6. Twohy, C.W., A. P. Duran, and T. Munson, "Endotoxin contamination of parenteral drugs and radiopharmaceuticals as determined by the Limulus amebocyte lysate method." *J. Parenteral Sci. Technol.* 38:190-201 (1984).
7. Seibert, F.B., "Pyrogens from an historical viewpoint." *Transfusion* 3:245-249 (1963).
8. Seibert, F.B., "Fever-producing substance found in some distilled waters." *Am. J. Physiol.* 64:90-104 (1923).
9. Pearson, F.C. III, *Pyrogens. Endotoxins, LAL Testing, and Depyrogenation. Advances in Parenteral Sciences/2*, Marcel Dekker, Inc. New York (1985).
10. Gao, J.J., Q. Xue, E.G Zuvanich, K. R. Haghi, and D.C. Morrison. Commercial preparations of lipoteichoic acid contain endotoxin that contributes to activation of mouse macrophages in vitro. *Infection and Immunity* 69:751-757 (2001).
11. Morath, S., A. Geyer, I. Spreitzer, C. Hermann, and T. Hartung. Structural decomposition and heterogeneity of commercial lipoteichoic acid preparations. *Infection and Immunity.* 70:938-944, (2002).
12. Hartung, T., S. Fennrich, A. Wendel, "Detection of endotoxins and other pyrogens by human whole blood." *J. Endotoxin Res.* 6:184 (2000).
13. Hartung, T., A. Wendel, "Detection of pyrogens using human whole blood." *In Vitro Toxicol.* 9:353-359 (1996).
14. Wendel, A., and T. Hartung, "Test for determining pyrogenic effect of a material." *United States Patent* 5,891,728 (1999).
15. Poole, S., S. Selkirk, B. Rafferty, A. Meager, R. Thorpe, and A. Gearing, "Assay of pyrogenic contamination in pharmaceuticals by cytokine release." *Pharmeuropa* 1:17-18 (1989).
16. Flint, O. "Editorial. Prize for new in vitro test." *In Vitro Toxicol.* 9:341(1996).
17. Wang, E., P.F. Jørgensen, M. Almlöf, C. Thiernemann, S.J. Foster, A.O. Aasen, and R. Solberg, "Peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* induce tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 (IL-6), and IL-10 production in both T cells and monocytes in a human whole blood model." *Infection and Immunity* 68:3965-3970 (2000).
18. Ketchum, P.A., J. Parsonnet, L.S. Stotts, T.J. Novitsky, B. Schlain, D.W. Bates, Investigators of the AMCC SEPSIS Project. Utilization of a chromogenic Limulus amebocyte lysate blood assay in a multi-center study of sepsis. *J. Endotoxin Res.* 4:9-16 (1997).
19. Warren, H.S., T.J. Novitsky, P.A. Ketchum, P.F. Roslansky, S. Kania, and G.R. Siber. Neutralization of bacterial lipopolysaccharides by human plasma. *J. Clin. Microbiol.* 22:590-595 (1985).
20. Warren, H.S., T.J. Novitsky, P. Martin, P.F. Roslansky, and G.R. Siber. Endotoxin neutralizing capacity of sera from different patient populations assessed by the Limulus lysate test. In *Detection of Bacterial Endotoxins with the Limulus Amebocyte Lysate Test*. Alan R. Liss, Inc., New York, NY, pp.341-348 (1987).
21. Pearson, F.C., J. Bohon, W. Lee, G. Bruszer, M. Sagona, R. Dawe, G. Jakubowski, D. Morrison, and C. Dinarello. Comparison of chemical analyses of hollow-fiber dialyzer extracts. *Artificial Organs* 8:291-298 (1984).
22. Hochstein, H.D., E.A. Fitzgerald, F.G. McMahon, and R. Vargas. Properties of US Standard Endotoxin (EC-5) in human male volunteers. *J. Endotoxin Res.* 1:52-56 (1994).
23. Ragab, A.A., R. VanDeMotte, S.A. Lavish, V.M. Goldberg, J.T. Ninomiya, C.R. Carlin, and E.M. Greenfield. Measurement and removal of adherent endotoxin from titanium particles and implant surfaces. *J. Orthopaedic Res.* 17:803-809 (1999).
24. Harris, N.S., and R. Feinstein. The LAL-bead assay for endotoxin. In *Biomedical Application of the Horseshoe Crab (Limulidae)*, Alan R. Liss, New York, pp. 265-274 (1979).

Достоинства ЛАЛ-теста, как средства контроля качества лекарственных средств.

Неугодова Н.П., Долгова Г.В., Ситников А.Г.

ЛАЛ-тест неизбежно сравнивается с проверкой пирогенности на кроликах и, как правило, сравнение это оказывается в пользу ЛАЛ-теста. К очевидным достоинствам метода относят:

- чувствительность метода к бактериальным эндотоксинам, которая превышает чувствительность кроликов;
- возможность количественного выражения содержания бактериальных эндотоксинов;
- возможность быстрого получения результата;
- высокую специфичность по отношению к бактериальным эндотоксинам;
- хорошую воспроизводимость результатов анализа;
- экономическую выгоду, особенно при массовом использовании метода;
- выполнение требований «3Rs» (reduction, refinement, replacement), приводящее к сокращению количества лабораторных животных.

Как это не парадоксально, некоторые очевидные преимущества метода не используются, а некоторые способны вызывать совершенно необоснованное беспокойство. В этой связи интересно подробно рассмотреть практические достоинства ЛАЛ-теста, как метода контроля качества лекарственных препаратов. Возможно, это поможет сделать осознанный выбор в пользу одного из двух методов, не разделяя их на хороший и плохой, а выбирая наиболее подходящий. Пожалуй, основными показателями, влияющими на выбор, являются высокая чувствительность, возможность получения количественного результата, быстрота получения результата и относительная дешевизна метода.

Высокая чувствительность ЛАЛ-теста

Высокая чувствительность ЛАЛ-теста по отношению к бактериальным эндотоксинам является наиболее частым аргументом, который приводят в его пользу. Как правило, указывается, что метод в сотни раз более чувствителен анализа на кроликах. Это не совсем так. В действительности реальная или практическая чувствительность метода зависит от чувствительности ЛАЛ-реактива, используемого в анализе. В случае реактива для гель-тромб теста её стандартные значения составляют диапазон от 0,25 ЕЭ/мл до 0,03 ЕЭ/мл. Кролики способны регистрировать концентрации бактериальных эндотоксинов, примерно равные 0,5 ЕЭ/мл, что соответствует «пороговой пирогенной дозе»,

равной 5 ЕЭ/кг, следовательно, практическая чувствительность ЛАЛ-теста превышает чувствительность кроликов всего в 10-15 раз. Такая чувствительность достаточна для гарантированного определения содержания бактериальных эндотоксинов в инфузионных растворах, где предельная концентрация БЭ должна быть наиболее низкой. Для большинства же инъекционных препаратов чувствительность эта даже оказывается избыточной, так как для лекарственных средств, вводимых в малых объемах, могут быть приемлемы концентрации бактериальных эндотоксинов, соответствующие 50 ЕЭ/мл и более.

Необходимо отметить, что потенциальная чувствительность метода действительно очень высока. Инструментальные методы позволяют регистрировать концентрации эндотоксинов до 0,001 ЕЭ/мл. Тем не менее, на сегодняшний день и в США, и в Европе наиболее распространенным является все-таки гель-тромб тест, на долю которого приходится более 50% всех проводимых анализов. Инструментальные же методы оказываются привлекательными не столько из-за своей чувствительности, сколько из-за возможности автоматизации процессов проведения анализа и учета результатов.

К сожалению, высокая чувствительность метода является осязательным психологическим барьером. Она порождает беспокойство, связанное с возможной выбраковкой продукции. Но с большой долей уверенности можно сказать, что эти страхи присутствуют всегда там, где только начинается переход к ЛАЛ-тесту. И всегда они оказываются беспочвенными. Практический опыт показывает, что производство, у которого не возникает проблем с качеством продукции при проверке на кроликах, без труда воспринимает новый метод.

Возможность количественной оценки содержания бактериальных эндотоксинов

ЛАЛ-тест позволяет определить реальное содержание бактериальных эндотоксинов в лекарственном препарате. Использование гель-тромб теста позволяет выяснить, насколько это содержание меньше установленной величины. Точное определение концентрации эндотоксинов, в том случае, если она больше предельно допустимой величины, представляется делом нецелесообразным. Тем более интересно то, что наиболее распространенным способом фармакопейного анализа является качественный гель-тромб тест, проводимый по принципу «все или ничего». В подавляющем большинстве случаев точное определение содержания БЭ в испытуемом лекарственном препарате просто не нужно.

Возможность количественного определения содержания бактериальных

эндотоксинов оказывается очень полезной при организации постадийного контроля производства. Для установления норм «тревоги» и «действия» необходима количественная оценка концентраций, значительно меньших, чем допустимые для готовых форм.

Быстрота получения результатов

Результаты анализа могут быть получены за 1,5 - 2 часа. Это безусловное достоинство. Однако, контроль качества готовых лекарственных форм предполагает комплексную процедуру, в которой определение содержания бактериальных эндотоксинов не является единственным анализом. В эту процедуру входит и проверка стерильности, которая занимает несколько суток. Поэтому оперативность ЛАЛ-теста не является системообразующим фактором.

Возможность оперативного получения результата приобретает совершенно иное значение в ситуации, когда требуется проверка субстанций, воды для приготовления растворов и других компонентов, используемых на разных стадиях производства. Это позволяет использовать в производстве вспомогательные ингредиенты, не содержащие бактериальные эндотоксины в количествах, которые способны повлиять на качество готовой лекарственной формы.

Дешевизна метода по сравнению с анализом на кроликах

В зарубежной литературе аргумент дешевизны нового метода по сравнению с анализом на кроликах не вызывал споров уже в начале 80-х годов, когда только начинался переход к ЛАЛ-тесту. Сегодня, пожалуй, и у нас споры по этому поводу стихли. И хотя основной реактив достаточно дорог, в условиях крупных производств его стоимость не может считаться серьезным препятствием к введению метода. Не менее важно и то, что метод прост, не требует особых подготовительных работ и специального помещения, а также большого числа сотрудников. Для крупных предприятий, которые уже имеют в своей структуре виварии, вопрос перехода на новый метод может стоять не очень остро. Для нового же производства выбор практически однозначно делается в пользу ЛАЛ-теста. Ведь для вновь организуемого вивария необходимы:

- получение разрешения СЭС, ветеринарных и других служб на строительство вивария;
- подготовка проекта вивария, который должен соответствовать современным требованиям GLP;
- строительство с подведением необходимых инженерных коммуникаций;
- оснащение вивария необходимым оборудованием;

- обучение и подготовка специалистов для работы с животными в соответствии с правилами GLP;
- приобретение кондиционных животных, кормов, подстилочного материала и т.п.;
- заключение договоров на вывоз и утилизацию биологических отходов и мусора.

Необходимо также учесть, что в обслуживании животных и при проведении испытаний препаратов на пирогенность участвует значительно большее число работников, чем при постановке ЛАЛ-теста. И становится очевидным, что затраты на проведение теста «Пирогенность» не идут ни в какое сравнение с затратами на организацию рабочего места для проведения испытаний с помощью ЛАЛ-теста.

Практически все перечисленные достоинства метода в полной мере проявляются в ситуации контроля качества производства в целом, включая внутрипроизводственный контроль, статистическую обработку результатов и т.д. Благодаря ЛАЛ-тесту становится возможным контролировать не только конечный продукт, но и ингредиенты, входящие в его состав. И в этом случае, высокая чувствительность метода позволяет выставлять нормы «тревоги» для каждого из компонентов, что дает возможность прогнозировать конечный результат производственного процесса. Безусловным достоинством метода является то, что он легко поддается стандартизации, поэтому можно добиться хорошей воспроизводимости результатов. Статистическая обработка большого количества данных может помочь сделать выводы об общей динамике качества в зависимости от различных, не всегда очевидных причин. В качестве дополнительного плюса можно отметить, что контроль на промежуточных стадиях позволяет не только поднять качество, но и во время обнаружить потенциальный брак и принять меры до того момента, когда исправить уже ничего нельзя. Забракованная серия - это потеря времени, материалов и пр.

Сравнивая два метода анализа - «Пирогенность» и «Бактериальные эндотоксины» можно сказать, что каждый из методов имеет свои недостатки и свои достоинства. Параллельное сравнение методов позволяет сделать очевидный вывод: если производство надежно контролируется с помощью теста, проводимого на кроликах, то переход к ЛАЛ-тесту не сопровождается серьезными проблемами с качеством продукции.

Сегодня оба метода считаются альтернативными, и в отдельных случаях возможно одновременное включение обоих методов в ФСП. Смысл такого состояния дел заключается в возможности испытания лекарственного средства на пирогенность в том случае, если проведение

ЛАЛ-теста невозможно. Например, при проведении независимого контроля готовой серии в контрольно-аналитической лаборатории, не располагающей базой для проведения ЛАЛ-теста. В такой ситуации можно провести анализ «Пирогенность». Надо иметь в виду, что это единственная трактовка понятия «альтернативные анализы» в том виде, в котором оно существует сегодня. Другие варианты, например, перепроверка одного метода другим в случае получения неудовлетворительных результатов по одному из них, являются неприемлемыми. При обнаружении превышения содержания БЭ в препарате, даже если испытание на пирогенность удовлетворяет требованиям ФСП, препарат бракуют. Фармацевтическое предприятие, включившее оба метода в ФСП, отвечает за удовлетворительные результаты по каждому из них. Очевидно, что надолго сохранять такую взаимозаменяемость методов не имеет никакого смысла. Эти промежуточные решения при всей их внешней привлекательности так и остаются промежуточными.

Параллельное сосуществование обоих методов в условиях одного производства нецелесообразно. Так, введение ЛАЛ-теста для внутрипроизводственного контроля делает нецелесообразным для готового продукта контроль по показателю «Пирогенность». В том же случае, если в качестве главного метода все-таки остается

проверка пирогенности, то высокие характеристики ЛАЛ-теста оказываются невостребованными.

Введение новых правил посерийной сертификации лекарственных средств и повышение требований к оснащенности сертифицированных контрольно-аналитических лабораторий будут объективно способствовать включению этого метода в практику их работы. Это должно привести к тому, что понятие «альтернативные методы» станет буквальным: производитель лекарственного средства будет выбирать для ФСП метод, более подходящий для данного препарата и производства. На этом альтернативность решения собственно и исчерпывается. Далее лекарственное средство будет проверяться одним, предписанным в ФСП методом. Это соответствует принципу, принятому во всем мире: «Все инъекционные лекарственные препараты необходимо контролировать с помощью ЛАЛ-теста, и только те из них, для которых этот контроль невозможен, в экспериментах на кроликах».

В этом номере мы впервые коснулись вопроса замены анализа «Пирогенность» на анализ «Бактериальные эндотоксины». Правилам включения метода в ФСП, вопросам альтернативности методов будет посвящен один из следующих номеров нашего бюллетеня.

«ЛАЛ-тест» - периодический бюллетень для специалистов, работающих в области фармации, медицины и биологии. Бюллетень зарегистрирован в Министерстве РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций. Свидетельство о регистрации № 77-16115 от 11.08.03 г.

При перепечатке материалов ссылка на бюллетень «ЛАЛ-тест» обязательна.

Контактная информация, справки и вопросы:

Тел. (095) 517-40-37

E-mail: LALNews@Limulustest.ru

Редакционная коллегия бюллетеня «ЛАЛ-тест»:

Ситников А. Г.

Неугодова Н.П.

Долгова Г.В.

Главный редактор: Ситников А.Г.

Ответственный за выпуск: к.б.н. Долгова Г.В.

Подписано к печати: 10.09.2002 г.

Формат: А₄; Бумага: 115 г/м²; Печать: Офсет; Объем: 8 стр.; Тираж: 200 экземпляров.

Издатель: ООО «Центр по биотехнологии, медицине и фармации» Россия, Москва, 113105, ул. Нагатинская, За.

Тел./факс: (095) 111-51-55. Лицензия на издательскую деятельность: Код 221 Серия ИД № 00274

Типография: ООО «Соверо-принт», Москва.