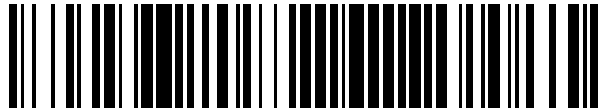


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 487**

51 Int. Cl.:

G01N 33/579 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2006 E 06747008 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 1887360**

54 Título: **Método de ensayo para endotoxina**

30 Prioridad:

30.05.2005 JP 2005157345

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

12.05.2015

73 Titular/es:

**DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)
3-5-1, Nihonbashi Honcho Chuo-ku
TOKYO 103-8426, JP**

72 Inventor/es:

SHIOZAKI, TETSUYA

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 535 487 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de ensayo para endotoxina

5 **Campo técnico**

La presente invención se relaciona con un método de ensayo para endotoxina.

10 **Técnica anterior**

Es sabido que la contaminación con pirógenos en una solución para inyección puede causar síntomas, tales como pirexia y escalofríos. Con objeto de prevenir la contaminación con pirógenos, se ha empleado convencionalmente la prueba de pirógenos en los procedimientos para la preparación o el control de calidad de las soluciones para inyección para detectar pirógenos. Sin embargo, la prueba requiere mucho tiempo y trabajo y es muy complicada (véase el Documento no de patente 1).

Se sabe que el pirógeno está principalmente compuesto por endotoxina, que constituye la pared celular de las bacterias gram-negativas. Para la detección y cuantificación de la endotoxina derivada de bacterias gram-negativas, se conocen métodos de ensayo de endotoxinas basados en el principio de coagulación de extractos de glóbulos sanguíneos (lisados) del cangrejo herradura (tal como *Limulus polyphemus* o *Tachypleus tridentatus*) con endotoxina (véase el Documento no de patente 2). Últimamente, dichos métodos de ensayo para endotoxina son utilizados con más frecuencia para la detección de pirógenos que los métodos de ensayo de pirógenos.

[Documento no de patente 1] Comentario de la Farmacopea Japonesa, Decimocuarta Edición, Hirokawa Publishing Co. 2001 B-493

[Documento no de patente 2] Comentario de la Farmacopea Japonesa, Decimocuarta Edición, Hirokawa Publishing Co. 2001 B-63

EP 0.731.354 A1 se relaciona con un método de ensayo de una sustancia reactiva con reactivo de límulus y con el problema de la selección de dos diferentes longitudes de onda de la luz que permitan una determinación sensible y precisa sin resultar afectada por sustancias interferentes. US 4.273.557 se relaciona con un procedimiento de lisado de límulus para determinar endotoxinas en productos tales como emulsiones lipídicas que tienden a interferir con la reacción.

35 **Divulgación de la invención**

Problemas que la invención ha de resolver

La presente invención proporciona un método capaz de detectar y cuantificar endotoxinas en una muestra en la que no se pueden detectar o cuantificar con precisión endotoxinas derivadas de bacterias gram-negativas mediante el método descrito en el Documento no de patente 2.

Medios para resolver los problemas

45 Como resultado de estudios intensivos por parte de los presentes inventores, se ha visto que el anterior problema es resuelto llevando a cabo una prueba de endotoxina mediante el uso de un reactivo de lisado, en donde se añade el reactivo de lisado a una muestra en presencia de albúmina y/o globulina, y se ha completado la presente invención.

50 Por consiguiente, la presente invención se relaciona con un nuevo método de ensayo de endotoxinas y con un procedimiento para preparar una inyección que tiene una concentración de endotoxinas inferior a un límite de especificación, según se define en las reivindicaciones, y también se relaciona con lo siguiente.

(1) Un método de ensayo de endotoxinas consistente en añadir un reactivo de lisado a una solución o dispersión de un derivado de camptotecina, timiperona o un derivado de taxano en presencia de albúmina y/o globulina, según se define en la reivindicación 1.

(2) El método de ensayo según (1), donde la albúmina y/o globulina es seroalbúmina humana.

(3) El método de ensayo según (1) o (2), donde el derivado de camptotecina es clorhidrato de irinotecán.

(4) Un procedimiento para preparar una inyección que contiene un principio farmacéuticamente activo y que tiene una concentración de endotoxina inferior a un límite de especificación, que comprende una etapa de cribado consistente en: añadir un reactivo de lisado a una solución o dispersión del principio farmacéuticamente activo en presencia de albúmina y/o globulina y determinar la presencia o ausencia de endotoxina, según se define en la reivindicación 6.

(5) Un procedimiento para preparar una inyección que contiene un derivado de camptotecina, timiperona o un derivado de taxano y que tiene una concentración de endotoxina inferior a un límite de especificación, que comprende una etapa de cribado consistente en: añadir un reactivo de lisado a una solución o dispersión del derivado de camptotecina, timiperona o el derivado de taxano en presencia de albúmina y/o globulina y

determinar la presencia o ausencia de endotoxina, según se define en la reivindicación 7.

(6) El procedimiento según (4) o (5), donde la albúmina y/o globulina es seroalbúmina humana.

(7) El procedimiento según (5) o (6), donde el derivado de camptotecina es clorhidrato de irinotecán.

5 Efecto de la invención

Como resulta evidente por los Ejemplos que se describirán más adelante, el método de ensayo de la presente invención hace posible detectar y cuantificar la endotoxina derivada de bacterias gram-negativas en una muestra en la que no se puede detectar o cuantificar con precisión la endotoxina mediante los métodos de ensayo convencionales. Según la presente invención, se pueden llevar a cabo la preparación y el control de calidad de una inyección sin usar pruebas de pirógenos complicadas, y se puede disponer de un procedimiento para preparar una inyección que tiene una concentración de endotoxina inferior a un límite de especificación. Además, como se puede detectar el pirógeno sin emplear una prueba de pirógenos en conejos, la presente invención es deseable desde la perspectiva de la protección animal.

15 Mejor modo de realización de la invención

En la presente invención, se hace que una muestra (una solución o dispersión de un principio farmacéuticamente activo) reaccione con un reactivo de lisado en presencia de albúmina y/o globulina y se detecta y cuantifica la reacción entre la endotoxina de la muestra y el reactivo de lisado.

Como ejemplos de la albúmina y/o globulina según la presente invención, se pueden incluir las obtenidas purificando o purificando parcialmente el plasma sanguíneo o el suero sanguíneo y sustancias que contienen albúmina y/o globulina como componente. De tales albúminas y globulinas, se prefieren las derivadas del suero sanguíneo humano. Como ejemplos de las sustancias que contienen albúmina y/o globulina como componente, se pueden incluir fracciones de COHN, fracciones de albúmina y fracciones de globulina obtenidas por electroforesis, plasma congelado fresco comercial (v.g., los de Japanese Red Cross Society), proteína plasmática humana calentada (v.g., las de NIHON PHARMACEUTICAL CO., LTD.), seroalbúmina humana (v.g., las de Japanese Red Cross Society, Mitsubishi Pharma Corporation o Baxter Limited) e inmunoglobulina humana (v.g., las de Japanese Red Cross Society, Mitsubishi Pharma Corporation o Baxter Limited). En la presente invención, se prefiere la seroalbúmina humana desde el punto de vista de la sensibilidad de detección de la endotoxina.

En la presente invención, un objeto es una muestra en la que no se puede detectar o cuantificar la endotoxina por métodos de ensayo convencionales. El método de ensayo habitual se refiere aquí al método de ensayo descrito en el Documento no de patente 2 y a métodos de ensayo substancialmente similares al mismo. El método descrito en el Documento no de patente 2 es substancialmente el mismo que los métodos descritos en la Farmacopea de los Estados Unidos, en la Farmacopea Europea, en JIS y en los Requerimientos Mínimos para Productos Biológicos. Como ejemplos de la muestra objeto, se incluyen derivados de camptotecina, timiperona y derivados de taxano. Los derivados de camptotecina son derivados que tienen un esqueleto de camptotecina y se conocen generalmente como agentes anticancerosos. Como ejemplos de derivados de camptotecina conocidos, se pueden incluir el clorhidrato de irinotecán, el clorhidrato de nogitecán, el rubitecán, el lurtotecán, la 9-aminocamptotecina y derivados descritos en la Publicación Internacional N° WO98/07727, la Publicación Internacional N° WO98/015573, la Publicación Internacional N° WO99/17804, la Publicación Internacional N° WO99/011646 y la Patente Japonesa Abierta al Público N° 10-72467. Los derivados de taxano son derivados que tienen un esqueleto de baccatina y se conocen generalmente como agentes anticancerosos. Como ejemplos de derivados de taxano conocidos, se incluyen paclitaxel, docetaxel hidrato, (2R,3S)-3-(terc-butoxicarbonilamino)-3-(3-fluoro-2-piridil)-2-hidroxiopropionato de (-)-(1S,2S,3R,4S,5R,8R,9S,10R,13S)-4-acetoxi-2-benzoiloxi-9,10-[[1S]-2-(dimetilamino)etilideno]x-5,20-epoxi-1-hidroxitax-11-en-13-ilo y derivados descritos en la Patente Japonesa Abierta al Público N° 7-149779, la Publicación Nacional de la Solicitud Internacional N° 8-508497, la Patente Japonesa Abierta al Público N° 9-12578 y la Publicación Internacional N° WO96/01259. Se puede usar cualquiera de las sustancias anteriores en el método de ensayo de endotoxinas de la presente invención y en el procedimiento de la presente invención para preparar una inyección que tiene una concentración de endotoxina inferior a un límite de especificación.

En la presente invención, cuando la muestra (principio farmacéuticamente activo) no está en forma de solución o dispersión, es necesario preparar una muestra en forma de solución o dispersión utilizando un solvente apropiado (v.g., solución de ensayo para prueba de endotoxinas, agua para inyección, suero fisiológico, solución de Ringer o un tampón). La concentración de la solución o dispersión de la muestra (principio farmacéuticamente activo) y la cantidad de albúmina y/o globulina que se ha de añadir a la solución o dispersión de la muestra pueden ser apropiadamente examinadas y determinadas. Por ejemplo, cuando la muestra es clorhidrato de irinotecán, se puede preparar una solución o dispersión de la muestra mediante un método conocido. De manera alternativa, se puede usar un producto comercial que tenga una concentración de clorhidrato de irinotecán de 20 mg/ml (Topotecin injection (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), Campto injection (Yakult Honsha Co., Ltd.)), y se puede determinar su razón de dilución o concentración apropiada según el método descrito en el Documento no de patente 2. En la presente divulgación, preferiblemente se diluye una solución de clorhidrato de irinotecán de 20 mg/ml 100 veces o más, y hasta una concentración a la que se pueda detectar la endotoxina a nivel del límite de especificación, preferiblemente hasta 3.000 veces o menos. Sin embargo, la razón de dilución no se limita a ésta.

5 Cuando la muestra (principio farmacéuticamente activo) es un derivado de taxano, se puede preparar una solución o dispersión de la misma mediante un método conocido. De manera alternativa, se puede usar un producto comercial que contenga paclitaxel a una concentración de 5 mg/ml como derivado de taxano (Taxol injection (Bristol-Myers K.K.)) o un producto comercial que contenga docetaxel hidrato a una concentración de 40 mg/ml (Taxotere injection (Sanofi-Aventis K.K.)), y se puede determinar su razón de dilución o concentración apropiada según el método descrito en el Documento no de patente 2. Cuando el derivado de taxano es (2R,3S)-3-(terc-butoxicarbonilamino)-3-(3-fluoro-2-piridil)-2-hidroxiopropionato de (-)-(1S,2S,3R,4S,5R,8R,9S,10R,13S)-4-acetoxi-2-benzoiloxi-9,10-[(1S)-2-(dimetilamino)etilidenoxi]-5,20-epoxi-1-hidroxitax-11-en-13-ilo, preferiblemente se diluye una solución de 2 mg/ml del mismo 16 veces o más, y hasta una concentración a la que se pueda detectar la endotoxina a nivel del límite de especificación, preferiblemente de 1 a 200 veces o menos. Sin embargo, la razón de dilución no se limita a ésta.

15 Cuando la muestra (principio farmacéuticamente activo) es timiperona, se puede preparar una solución o dispersión de la misma mediante un método conocido. De manera alternativa, se puede usar un producto comercial que tenga una concentración de timiperona de 2 mg/ml (Tolopelon injection (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.)), y se puede determinar la razón de dilución o concentración apropiada de la misma según el método descrito en el Documento no de patente 2. En la presente divulgación, preferiblemente se diluye una solución de timiperona de 2 mg/ml más de 8 veces, y hasta una concentración a la que se pueda detectar la endotoxina a nivel del límite de especificación, preferiblemente 9.600 veces o menos. Sin embargo, la razón de dilución no se limita a ésta.

20 En la prueba de endotoxinas según la presente invención, se puede ajustar el pH de la solución o dispersión de la muestra a un valor de 6,0 a 8,0.

25 En la presente invención, la cantidad de albúmina y/o globulina que se ha de añadir es apropiadamente examinada y determinada considerando la concentración de la solución o dispersión de la muestra como se ha descrito anteriormente, y preferiblemente se añaden de 0,5 a 50 partes en peso de albúmina y/o globulina a 1 parte en peso de la muestra. Cuando la muestra es un derivado de camptotecina, preferiblemente se añaden de 1 a 50 partes en peso de albúmina y/o globulina a 1 parte en peso del derivado de camptotecina. Cuando la muestra es timiperona, preferiblemente se añaden de 0,5 a 7 partes en peso de albúmina y/o globulina a 1 parte en peso de timiperona. Cuando la muestra es un derivado de taxano, preferiblemente se añaden de 0,08 a 0,3 partes en peso de albúmina y/o globulina a 1 parte en peso del derivado de taxano.

30 Además, la concentración de albúmina y/o globulina que se ha de añadir a la solución o dispersión de la muestra es preferiblemente inferior a la concentración a la que actúan como inhibidor de la reacción entre lisado y endotoxina.

35 El reactivo de lisado según la presente divulgación puede ser una sustancia que contenga extractos de glóbulos sanguíneos (lisado) de cangrejo de herradura (tal como *Limulus polyphemus* o *Tachypleus tridentatus*). Dicho reactivo que puede ser usado en la presente invención puede ser adquirido de Daiichi Pure Chemicals, Co., Ltd., Wako Pure Chemical Industries, Ltd. o SEIKAGAKU CORPORATION, por ejemplo. Aunque el reactivo de lisado puede ser usado en una cantidad como se describe en el manual de instrucciones del reactivo de lisado o de los dispositivos de medición, la cantidad no se limita a ella.

45 Para la medición de endotoxinas en la presente invención, se puede usar cualquier método, siempre que la reacción entre endotoxina y el reactivo de lisado pueda ser detectada y cuantificada. Por ejemplo, se puede realizar la medición según el método descrito en el Documento no de patente 2. Como métodos de ensayo de endotoxinas conocidos, se incluyen las técnicas de gel-coágulos, que se basan en la formación de gel por reacción de un reactivo de lisado con endotoxina, las técnicas turbidimétricas, que se basan en el cambio de turbidez del reactivo de lisado durante la formación del gel, y las técnicas cromogénicas, que se basan en el desarrollo de color provocado por la hidrólisis de un substrato sintético debido a la reacción entre endotoxina y un reactivo de lisado. Sin embargo, se puede usar cualquier método en la presente invención sin ninguna limitación particular.

50 Para la medición de la endotoxina, se pueden usar dispositivos de medición de endotoxina comerciales, que pueden ser adquiridos de CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC., Wako Pure Chemical Industries, Ltd. y SEIKAGAKU CORPORATION, por ejemplo.

55 La reacción es preferiblemente llevada a cabo a una temperatura de 30 a 40°C, en particular a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

60 El método de ensayo de endotoxinas de la presente invención es empleado en un procedimiento para preparar una inyección a partir de una muestra (principio farmacéuticamente activo) o para su control de calidad. En otras palabras, el método de ensayo de endotoxinas de la presente invención hace posible la valoración de la presencia o ausencia de endotoxina, y, al disponer de una etapa de cribado para la determinación de la presencia o ausencia de endotoxina, se puede preparar una solución o dispersión que tiene una concentración de endotoxina inferior al límite de especificación. Por consiguiente, la presente invención hace posible la preparación de una inyección que tiene una concentración de endotoxina inferior al límite de especificación.

65 La presente invención puede ser aplicada a cualquier forma de inyecciones, incluyendo inyecciones acuosas, inyecciones oleosas e inyecciones liofilizadas. En general, se determina el límite de especificación de endotoxina en

una inyección como sigue, en base a la vía de administración e independientemente de la forma de inyección.

$$\text{Límite de endotoxina} = K/M$$

5 El valor de K significa la cantidad de endotoxina (UE (unidad de endotoxina)/kg) por 1 kg de peso corporal que se considera que provoca fiebre. En base a la vía de administración de una inyección, K=5 en el caso de una inyección intravenosa, K=2,5 en el caso de una inyección intravenosa (agente radiofarmacéutico) y K=0,2 en el caso de una inyección intratecal. El valor de M significa la cantidad máxima de una inyección administrada por 1 kg de peso corporal en una hora. Se describen los detalles en la Sección F-20, "4. Determinación del límite de endotoxina", de los Comentarios de la Farmacopea Japonesa, Decimocuarta Edición, Hirokawa Publishing Co., 2001.

15 La presente invención puede ser aplicada a un procedimiento de producción o para el control de calidad de un producto farmacéutico en el que no se puede detectar la endotoxina mediante el método descrito en el Documento no de patente 2 y al que se pueden añadir albúmina y/o globulina para resolver el problema. Por consiguiente, la muestra objeto del método de ensayo y el procedimiento de la presente divulgación no necesitan limitarse sólo a derivados de camptotecina, timiperona y derivados de taxano como se ha ejemplificado anteriormente.

Ejemplos

20 La presente invención será descrita haciendo referencia a los Ejemplos que se dan a continuación, pero la presente invención no se limita a ellos.

Ejemplo 1

25 [Reactivo]

(1) Muestra

30 Se usó una inyección de clorhidrato de irinotecán (concentración: 20 mg/ml, Topotecin injection (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.)) apropiadamente diluida con agua para inyección.

(2) Endotoxina (de aquí en adelante ET)

35 Se usó ET estándar de control (derivada de *E.coli* cepa 055:B5) apropiadamente diluida con agua para inyección.

(3) Solución de seroalbúmina humana (de aquí en adelante HSA)

Se usó una solución de seroalbúmina humana (2%) apropiadamente diluida con agua para inyección.

40 (4) Reactivo de lisado

Se usó Pyrogent 5000 (Daiichi Pure Chemicals, Co., Ltd.) disuelto en un tampón de disolución (Daiichi Pure Chemicals, Co., Ltd.).

45 [Procedimiento]

50 Se diluyó la muestra con agua para inyección y se añadió ET a la misma a una concentración predeterminada. Después de añadirle una cantidad apropiada de la solución de HSA y del reactivo de lisado y de agitar, se midió la concentración de ET de la solución usando un dispositivo de medición de endotoxina (Toxinometer ET-301 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)) para determinar el índice de recuperación de ET que se había añadido.

[Resultado]

55 Los resultados son mostrados en la Tabla 1 y la Tabla 2. Como se muestra en la Tabla 1, en la solución clorhidrato de irinotecán (concentración: 20 mg/ml) diluida apropiadamente, no se detectó ET usando una prueba de endotoxinas convencional, mientras que el índice de recuperación de ET mejoró y la prueba de endotoxinas fue realizada eficazmente añadiendo de 1 a 50 partes en peso de HSA a 1 parte en peso de clorhidrato de irinotecán.

[Tabla 1]

60

Concentración de HSA (mg/ml)		Índice de recuperación de ET (%)					
		0	0,2	0,5	1	2	4
Concentración de clorhidrato de irinotecán (mg/ml)	2	Se volvió blanco (precipitación del principio farmacéutico)					
	0,2	53,4	121,2	100,6	98,6	66,3	36,6
	0,02	54,4	102,2	92,9	87,7	64,2	33,3

5 Cuando se añadió HSA a una concentración del 0,1% en base al resultado mostrado en la Tabla 1, el índice de recuperación de ET mejoraba significativamente cuando se diluía la solución de clorhidrato de irinotecán (concentración: 20 mg/ml) de 100 a 3.000 veces y la prueba de endotoxina fue realizada eficazmente, como se muestra en la Tabla 2, por lo que la prueba de endotoxina tuvo éxito. Según el Documento no de patente 2, la prueba es efectiva cuando el índice de recuperación de ET está en el rango del 50 al 200%.

[Tabla 2]

Razón de dilución (veces)	100	500	1.000	2.000	3.000
Concentración de clorhidrato de irinotecán (mg/ml)	0,2	0,04	0,02	0,01	0,007
Concentración de HSA (mg/ml)	1				
Índice de recuperación de ET (%)	100,5	141,3	123,9	109,2	91,2

10 Ejemplo 2

15 Se diluyeron apropiadamente tres lotes de inyecciones de clorhidrato de irinotecán (de Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., nombre del producto: Topotecin injection) y se añadieron 5 partes en peso de HSA a 1 parte en peso de clorhidrato de irinotecán. Se detectó la ET del mismo modo que en el Ejemplo 1 para determinar el índice de recuperación de ET que se había añadido. Los resultados son mostrados en la Tabla 3.

[Tabla 3]

Concentración de clorhidrato de irinotecán (mg/ml)		0,2	0,04	0,02	0,01
Razón de dilución (veces)		100	500	1.000	2.000
Concentración de HSA (mg/ml)		1	0,2	0,01	0,005
Índice de recuperación de ET (%)	Lote A	74,7	90,7	103,3	97,6
	Lote B	84,4	105,2	107,2	94,1
	Lote C	95,8	125,3	144,5	111,4

20 Como resulta evidente por la Tabla 3, el índice de recuperación de ET era muy bueno. Por lo tanto, se ha conseguido el control del procedimiento de preparación y de la calidad de la inyección de clorhidrato de irinotecán, y se pudo disponer de un procedimiento para preparar una inyección de clorhidrato de irinotecán que tiene una concentración de ET inferior al límite de especificación.

25 Ejemplo 3

[Reactivo]

(1) Muestra

30 Se añadió agua para inyección a timiperona y se disolvió la timiperona añadiéndole una cantidad apropiada de una solución de 0,1 mol/ml de ácido clorhídrico, para preparar una solución de 2 mg/ml de timiperona. Se diluyó apropiadamente y se utilizó la solución de timiperona.

35 (2) ET

Se usó ET estándar de control (derivada de *E.coli* UKT-B) apropiadamente diluida con agua para inyección.

(3) Solución de HSA

40 Se usó una solución de seroalbúmina humana (2%) apropiadamente diluida con agua para inyección.

(4) Reactivo de lisado

45 Se usó Limulus HS-J Test Wako (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) disuelto en un tampón Tris-HCl para la detección de ET (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

[Procedimiento]

50 Se diluyó la muestra con agua para inyección y se le añadió ET a una concentración predeterminada. Después de añadirle la solución de HSA a una concentración del 0,01% y el reactivo de lisado y de agitar, se midió la concentración de ET de la solución usando un dispositivo de medición de endotoxinas (Toxinometer ET-201 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)), para determinar el índice de recuperación de ET que se había añadido. Se realizó el experimento del mismo modo que como se ha descrito anteriormente, excepto por ajustar el pH o añadir citrato de sodio para eliminar los factores de interferencia con la reacción en la prueba de endotoxina en lugar de añadir la

55

solución de HSA.

[Resultado]

5 Los resultados son mostrados en la Tabla 4 y en la Tabla 5.

[Tabla 4]

Razón de dilución (veces)		8	16	32	64	128	256	512
Índice de recuperación de ET (%)	Adición de HSA	Se volvió blanco	96	100	91	82	-	-
	Sin adición de HSA	37	40	44	62	59	50	35

10

[Tabla 5]

Razón de dilución (veces)		1	10	100	1.000
Índice de recuperación de ET (%)	Ajuste del pH	102*	17	32	38
	Adición de citrato de sodio	-	17	20	40

*: Falso positivo debido a la precipitación de la timiperona

15

Como se muestra en la Tabla 4, cuando se añadieron de 0,5 a 7 partes en peso de HSA a 1 parte en peso de timiperona, el índice de recuperación de ET mejoraba significativamente y la prueba de endotoxina fue realizada eficazmente cuando se diluyó la solución de 2 mg/ml de timiperona 16 veces o más. Sin embargo, la prueba de endotoxina no tuvo éxito con el ajuste del pH o la adición de citrato de sodio, que se conocen como método de eliminación de factores de interferencia con la reacción.

Ejemplo 4

20

[Reactivo]

(1) Muestra

25

Se añadieron cantidades apropiadas de agua para inyección y una solución de 0,1 mol/ml de ácido clorhídrico a (2R,3S)-3-(terc-butoxicarbonilamino)-3-(3-fluoro-2-piridil)-2-hidroxiopropionato de (-)-(1S,2S,3R,4S,5R,8R,9S,10R,13S)-4-acetoxi-2-benzoiloxi-9,10-[(1S)-2-(dimetilamino)etilidenoxi]-5,20-epoxi-1-hidroxitax-11-en-13-ilo (de aquí en adelante compuesto A) para preparar una solución de 2 mg/ml de compuesto A. Se diluyó apropiadamente la solución de compuesto A con agua para inyección y se utilizó.

30

(2) ET

Se usó el patrón de referencia USP EC-6 (SEIKAGAKU CORPORATION).

35

(3) Solución de HSA

Se usó una solución de seroalbúmina humana (2%) apropiadamente diluida con agua para inyección.

40

(4) Reactivo de lisado

Se usó un reactivo de lisado incluido en el kit Kinetic-QCL (Daiichi Pure Chemicals, Co., Ltd.).

[Procedimiento]

45

Se diluyó la muestra con agua para inyección y se le añadió ET a una concentración predeterminada. Después de añadirle una cantidad apropiada de la solución de HSA y el reactivo de lisado y de agitar, se midió la concentración de ET de la solución usando un dispositivo de medición de endotoxinas (ELx 808 Reader (Daiichi Pure Chemicals, Co., Ltd.)) para determinar el índice de recuperación de ET que se había añadido.

50

[Resultado]

55

Los resultados son mostrados en la Tabla 6. En la solución de compuesto A (concentración: 2 mg/ml) apropiadamente diluida, no se detectó ET usando una prueba de endotoxinas convencional, mientras que mejoró el índice de recuperación de ET y se llevó a cabo la prueba de endotoxinas eficazmente añadiendo de 0,08 a 0,3 partes en peso de HSA a 1 parte en peso del compuesto A.

[Tabla 6]

Razón de dilución (veces)	4	8	16	32			64
Concentración de compuesto A (mg/ml)	0,5	0,25	0,125	0,0625			0,0312
Concentración de HSA (mg/ml)	0	0	0	0	0,02	0,01	0,005
Índice de recuperación de ET (%)	0	0	15	23	87	84	78

Aplicabilidad industrial

5 Tal como se indica expresamente en los Ejemplos antes descritos, el método de ensayo de endotoxinas de la presente invención hace posible detectar y cuantificar la endotoxina derivada de bacterias gram-negativas en una muestra en la que no se puede detectar o cuantificar con precisión la endotoxina por métodos de ensayo convencionales.

10 Según la presente invención, se pueden conseguir un procedimiento de preparación y un control de calidad de una inyección sin utilizar una complicada prueba de pirógenos, y se puede disponer de un procedimiento para preparar una inyección que tiene una concentración de endotoxinas inferior al límite de especificación.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de ensayo de endotoxinas consistente en añadir un reactivo de lisado a una solución o dispersión de un derivado de camptotecina, timiperona o un derivado de taxano en presencia de albúmina y/o globulina, donde dicho derivado de camptotecina tiene un esqueleto de camptotecina y donde dicho derivado de taxano tiene un esqueleto de baccatina.
2. El método de ensayo según la reivindicación 1, donde la albúmina y/o globulina es seroalbúmina humana.
- 10 3. El método de ensayo según la reivindicación 1 ó 2, donde dicho derivado de camptotecina es seleccionado entre clorhidrato de irinotecán, clorhidrato de nogitecán, rubitecán, lurtotecán y 9-aminocamptotecina.
- 15 4. El método de ensayo según la reivindicación 1 ó 2, donde dicho derivado de camptotecina es clorhidrato de irinotecán.
- 20 5. El método de ensayo según la reivindicación 1 ó 2, donde dicho derivado de taxano es seleccionado entre paclitaxel, docetaxel hidrato y (2R,3S)-3-(terc-butoxicarbonilamino)-3-(3-fluoro-2-piridil)-2-hidroxiopropionato de (-)-(1S,2S,3R,4S,5R,8R,9S,10R,13S)-4-acetoxi-2-benzoiloxi-9,10-[(1S)-2-(dimetilamino)etilidenoxi]-5,20-epoxi-1-hidroxitax-11-en-13-ilo.
- 25 6. Un procedimiento para preparar una inyección que contiene un principio farmacéuticamente activo y que tiene una concentración de endotoxina inferior a un límite de especificación, que comprende una etapa de cribado consistente en: añadir un reactivo de lisado a una solución o dispersión del principio farmacéuticamente activo en presencia de albúmina y/o globulina, valorar la presencia o ausencia de endotoxina y preparar una solución o dispersión que tiene una concentración de endotoxina inferior al límite de especificación.
- 30 7. Un procedimiento para preparar una inyección que contiene un derivado de camptotecina, timiperona o un derivado de taxano y que tiene una concentración de endotoxina inferior a un límite de especificación, que comprende una etapa de cribado consistente en: añadir un reactivo de lisado a una solución o dispersión del derivado de camptotecina, de la timiperona o del derivado de taxano en presencia de albúmina y/o globulina, valorar la presencia o ausencia de endotoxina y preparar una solución o dispersión que tiene una concentración de endotoxina inferior al límite de especificación, donde dicho derivado de camptotecina tiene un esqueleto de camptotecina y donde dicho derivado de taxano tiene un esqueleto de baccatina.
- 35 8. El procedimiento según la reivindicación 7, donde dicho derivado de camptotecina es seleccionado entre clorhidrato de irinotecán, clorhidrato de nogitecán, rubitecán, lurtotecán y 9-aminocamptotecina.
- 40 9. El procedimiento según la reivindicación 7, donde el derivado de camptotecina es clorhidrato de irinotecán.
- 45 10. El procedimiento según la reivindicación 7, donde dicho derivado de taxano es seleccionado entre paclitaxel, docetaxel hidrato y (2R,3S)-3-(terc-butoxicarbonilamino)-3-(3-fluoro-2-piridil)-2-hidroxiopropionato de (-)-(1S,2S,3R,4S,5R,8R,9S,10R,13S)-4-acetoxi-2-benzoiloxi-9,10-[(1S)-2-(dimetilamino)etilidenoxi]-5,20-epoxi-1-hidroxitax-11-en-13-ilo.
11. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, donde la albúmina y/o globulina es seroalbúmina humana.