

USP Forum, 41(5) 2015 年 9 月 In-Process Revision:

〈1228.3〉 Depyrogenation by Filtration

ろ過による脱パイロジェン

BRIEFING (背景説明)

〈1228.3〉 Depyrogenation by Filtration.

The General Chapters—Microbiology Expert Committee proposes this new general chapter as an addition to the Depyrogenation (1228) family of chapters. Production of parenteral products requires not only sterile manufacturing but also processes that prevent harmful levels of pyrogens. Effective destruction or removal of pyrogens, or depyrogenation, depends on the product that has been manufactured and the proposed method of removal and/or destruction. Liquid products can be depyrogenated through filtration. This chapter provides an overview of that process and the various approaches and technologies used to complete it.

USP の「General Chapters—Microbiology Expert Committee」は、この新たな章である〈1228.3〉“Depyrogenation by Filtration”を、一般情報の Depyrogenation (1228) のファミリーとして加えることを提案する。注射剤の製造は無菌的に製造するのみならず、パイロジェン（発熱性物質）の有害なレベルになることを防ぐことも必要である。パイロジェンの効果的な破壊あるいは除去、または脱パイロジェンは、製造される製品、およびパイロジェンの除去及び（又は）破壊の提案される方法に依存する。この章は、それを達成するために使用するプロセスおよび各種のアプローチおよび技術の概観を提供する。

(GCM: R. Tirumalai.)

Correspondence Number—C161851

Comment deadline: November 30, 2015

Add the following:

(1228.3) DEPYROGENATION BY FILTRATION

目 次

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCTION (はじめに)..... | 2 |
| 2. TECHNOLOGIES USED FOR DEPYROGENATION BY FILTRATION (ろ過による脱パイロに使用する技術) | 3 |
| 2.1 Microporous Membrane Filtration (マイクロポーラス・メンブランろ過)..... | 3 |
| 2.2 Reverse Osmosis (逆浸透圧) | 4 |
| 2.3 Ultrafiltration (限外ろ過) | 6 |
| 2.4 Charge-Modified Depth Filters (荷電処理ディプス型フィルター) | 8 |
| 2.5 Activated Carbon Depth Filters (活性炭ディプス型フィルター) | 12 |
| 2.6 Membrane Adsorbers (メンブラン型吸着剤)..... | 13 |
| 3. VALIDATION (バリデーション) | 15 |

1. INTRODUCTION (はじめに)

Endotoxins are lipopolysaccharides from the cell walls of Gram-negative bacteria. Endotoxins are responsible for making up the majority of pyrogens, which must be removed from pharmaceutical products including injectable biologics. There are many factors to be considered when designing a depyrogenation filtration process for solutions containing proteins and peptides: type of target protein and its concentration; electrolyte concentration; pH and buffer system; protein molecular weight and isoelectric point (pI); filtration parameters (e.g., flow rate); and interactions with other components causing aggregation. In general, a combination of these factors determines the most effective depyrogenation method.

エンドトキシンはグラム陰性菌の細胞壁に由来するリポ多糖体(lipopolysaccharides)である。エンドトキシンは大部分の発熱性物質(pyrogens)に関与しており、注射用の生物学的製剤を含む医薬品から除去しなければならない物質である。たん白質およびペプチドを含む溶液の脱パイロろ過工程(depyrogenation filtration process)を設計する場合は、次のような考慮すべき多くの因子が存在している。:

- ターゲットとなるたん白質のタイプとその濃度;
- 電解質濃度(electrolyte concentration);

- ・ pH と緩衝システム (pH and buffer system) ;
- ・ たん白質の分子量と等電点 (isoelectric point : pI)
- ・ ろ過のパラメータ (例えば、流速)
- ・ 凝集 (aggregation) の原因となる他の成分との相互作用

一般的に、上記の因子を組み合わせたことが、最も効果的な脱パイロ法を決定するものとなる。

Depyrogenation of liquids may be accomplished by means of filtration through various types of filter media including microporous membranes, reverse osmosis (RO) membranes, ultrafilters, charge-modified depth filters, activated carbon, and membrane absorbers. Depyrogenation filtration processes are not intended to remove microorganisms from a process stream; however, by their nature, filters selected for use in depyrogenation processes may also be capable of retaining many types of microorganisms.

液体の脱パイロは、各種のろ材 (filter media) を通過させての、ろ過により達成される。ろ材としては、次のようなものが含まれる。:

- ・ マイクロポーラス・メンブラン (microporous membranes) ;
- ・ 逆浸透圧 (reverse osmosis ; RO) メンブラン ;
- ・ 限外ろ過フィルター (ultrafilters) ;
- ・ 荷電処理ディプス型フィルター ;
- ・ 活性炭 (activated carbon) ;
- ・ メンブラン型吸着剤 (membrane absorbers)

脱パイロろ過プロセスは、プロセスの流れ (process stream) からの微生物の除去を意図していない。 ; しかし、その性質によって、脱パイロプロセス用に選択されたフィルターは、多くのタイプの微生物を捕集することも出来る。

2. TECHNOLOGIES USED FOR DEPYROGENATION BY FILTRATION

(ろ過による脱パイロに使用する技術)

2.1 Microporous Membrane Filtration (マイクロポーラス・メンブランろ過)

Microporous membranes (typically with pore size or retention ratings between 1.0 and 0.1 μm) can be very effective in removing intact bacteria via size exclusion and adsorption within flow pathways. The use of microporous membranes on a freshly prepared solution to be filtered can effectively prevent bacterial proliferation in the solution, along with any potential subsequent endotoxin

formation. Endotoxin, however, is composed of fragments of bacterial cell wall, often $<0.025 \mu\text{m}$ (1) that may easily penetrate most bacteria-retentive membrane filters. These negatively charged particles with endotoxin activity can be removed via adsorption by positively charged membranes (2). Adsorption of endotoxin has also been shown by hydrophobic membranes, where it is thought that a hydrophobic interaction occurs between the Lipid A core and hydrophobic sites on the membrane flow path surfaces (3). Reduction or removal of endotoxin activity by adsorption to microporous membranes can be dependent on flow rate, pH, concentration, and fluid and membrane surface properties. Once the effective binding capacity of the membrane approaches saturation under applied conditions, remaining endotoxin will pass through the membrane.

マイクロポーラス・メンブラン(一般的には、 $0.1 \sim 1.0 \mu\text{m}$ の孔径(pore size)あるいは捕集等級(retention ratings)を持つ)は、流路(flow pathways)内のサイズに基づく排除(size exclusion)と吸着(adsorption)によって、完全な形状を持つ細菌(intact bacteria)の除去を非常に効率よく行うことが出来る。ろ過を行う溶液を新たに調製して、すぐにマイクロポーラス・メンブランでろ過することは、その溶液での微生物の増殖を効果的に防ぐと共に、微生物の生長によって起こって来るエンドトキシン形成の可能性をも効果的に防ぐものである。しかしながら、エンドトキシンは、細菌細胞壁の断片(fragments)からなりたっており、しばしばその大きさは $<0.025 \mu\text{m}$ (文献 1)であり、この大きさは多くの細菌捕集用のメンブラン・フィルターを容易に通過することが出来る。それらの粒子はエンドトキシン活性を有していて、かつマイナスに荷電しているために、プラスに荷電したメンブラン(positively charged membranes)によって、吸着を通して除去することが出来る(文献 2)。疎水性メンブラン(hydrophobic membranes)によるエンドトキシンの吸着(adsorption)も立証されており、この場合はメンブランの流路表面の疎水性部位(hydrophobic sites on the membrane flow path surfaces)と Lipid A コア(core)の間に、疎水性の相互作用が生じると考えられている(文献 3)。マイクロポーラス・メンブランの吸着によるエンドトキシン活性の低減または除去は、流速(flow rate)、pH、濃度、および液体とメンブラン表面の性質(fluid and membrane surface properties)に依存すると考えられている。そのメンブランの有効結合容量(effective binding capacity)が、ひとたび、その適用される条件の下で飽和(saturation)に到達したのであれば、残りのエンドトキシンは、そのメンブランを通過してしまう。

2.2 Reverse Osmosis (逆浸透圧)

RO membranes are the tightest membranes in size separation. They can separate dissolved salts and sugars from water. Pyrogens, and essentially everything else, are removed from water via size exclusion. RO systems are operated most efficiently at high pressure (200-1000 psi) to overcome osmotic pressure. RO

membrane rating or tightness is measured and expressed with retention or rejection of marker salts such as sodium chloride or magnesium sulfate.

RO メンブランは、緊密に詰まったメンブラン(tightest membranes)であり、サイズによる分離(size separation)に基づくものである。それらのメンブランは、水から、溶解している塩類および糖類を分離することが出来る。パイロジェン、およびそれに本質的にそれに類する物質は、サイズに基づく排除(size exclusion)により、水から除去される。RO システムは、浸透圧(osmotic pressure)に打ち勝てるような高い圧力(200-1000 psi)で、最も効率良く運転される。RO メンブランの公称値あるいは緻密性(RO membrane rating or tightness)は、塩化ナトリウム(sodium chloride)あるいは硫酸マグネシウム(magnesium sulfate)の様なマーカー塩類(marker salts)の保持または排除(retention or rejection)で測定され、かつ表現される。

RO membranes may be composites (thin film coated on top of ultrafiltration membranes) or cast as a single layer (cellulose acetate type). Configuration of RO membrane modules can be flat sheet, tubular, or hollow fiber. All commercially available RO membranes are polymeric, and most are of a spiral-wound, flat-sheet format.

RO メンブランは、複合材として構成されている(薄いフィルムが、限外ろ過膜の上面にコートされている)か、単一の層としてキャスト(cast)されている(cellulose acetate タイプ)。RO メンブラン・モジュールの形状は、フラット・シート(flat sheet)、チューブ状(tubular)、あるいはホローファイバー(hollow fiber)とすることが出来る。市販の RO メンブランの何れもが重合体(polymeric)であり、その多くはスパイラル型のフラット・シート形式(spiral-wound, flat-sheet format)となっている。

RO systems are not intended to remove all bacteria, and because they are run at ambient temperatures, microbiological contamination is a concern. Ultraviolet (UV) light may be used in the system downstream from the RO units to control microbiological contamination.

RO システムは細菌を全て除去することを意図したものではないので、それらを成行き温度(ambient temperatures)で運転すると、微生物学的汚染が懸念される。微生物汚染を制御するため、RO 装置の(水製造設備の)システム下流側に紫外線(ultraviolet (UV) light)を使用することが出来る。

2.3 Ultrafiltration (限外ろ過)

Ultrafiltration (UF) is a process whereby a fluid is passed through membranes with pore sizes nominally between about 1 and 100 nm under pressure. The filters are usually not rated by the pore size but by the molecular weight cut-off (MWCO). The methods to determine the MWCO vary by the manufacturer and usually involve measuring passage of molecules of a certain size, such as a solution of mixed dextrans, polyethylene glycol, or proteins to assign a numerical rating (4).

限外ろ過 (Ultrafiltration ;UF) は、加圧下で、約 1~100 nm の公称孔径(pore sizes nominally)を持つメンブランに、液体を通過させるプロセスである。これらのフィルターは通常、孔径を公称するのではなく、分子量のカットオフ (molecular weight cut-off ;MWCO) によって表わされる。MWCO を測定する方法は、その製造業者によって異なるが、通常は、数値的な順位づけ(to assign a numerical rating)のために、ある大きさを持つ分子の溶液を通過させ、その分子測定することに依っている。それらの分子としては、混合したデキストラン(mixed dextrans)、ポリエチレン・グリコール (polyethylene glycol)、たん白質 (proteins) がある(文献 4)。

UF membranes are usually polymeric porous structures, manufactured from a range of materials, most commonly regenerated cellulose or polyether sulfone, but also ceramics. UF membranes may be produced as flat sheet, hollow fibers, or ceramic tubes.

UF メンブランは、通常、重合した多孔質の構造を持っており、広範囲の材質から製造されるが、その多くは、一般的には再生セルロース (regenerated cellulose) 、あるいはポリエチル・スルホン (polyether sulfone)であるが、セラミックもまた使われる。UF メンブランは、フラット・シート (flat sheet)、ホローファイバー (hollow fibers)、あるいはセラミック・チューブ (ceramic tubes)として製造される。

UF is generally operated in tangential/cross flow mode, which separates the starting (feed) solution into two components: permeate (the portion of solution going through the membrane) and retentate (the concentrated solution that is passed over the membrane). UF membranes need to be encased in a suitable integral device to enable practical operation. Heat sealing, over-molding, and resin-potting are all used to assemble membrane devices and ensure integral flow paths. Ceramic tubes are sealed by gaskets within tubular cylinders.

UF は一般的に tangential/cross flow mode (訳注: 適当な日本語が無いが「接線/交叉液流方式」とする。多くの場合は音訳されている) で運転されており、これは、出発 (供給) 溶液を 2 つの要素、すなわち透過 (permeate: メンブランを通過する溶液部分) と残留液 (retentate ; メンブラン上を通過して濃縮されてゆく液) へと、分離する。UF メンブランは、実用的な操作を可能とするためには、適切な統合化された装置 (suitable integral device) に収納されることが必要となる。メンブラン装置を組み立てるため、そして統合化された流の径路 (integral flow paths) を保証するために、何れの場合にもヒート・シール (heat sealing)、オーバー・モルディング (over-molding: 外側被覆)、および樹脂盛り (resin-potting) が使用される。セラミック・チューブは、チューブ状のシリンダー内にガスケットを入れてシールする。

It is generally assumed that the basic subunit of lipopolysaccharide (LPS) is about 10-20 kDa (5). Membranes of 6-10 kDa cut-off are often used for depyrogenation by size exclusion. However, monomeric LPSs are rarely found in solution because of their poor solubility in water. LPS is usually present in aggregated forms, such as vesicles ranging in molecular weight from 300 to 1000 kDa. Thus, endotoxin can be successfully removed by higher flux membranes, with MWCOs of 30-100 kDa (6).

リポ多糖類 (lipopolysaccharide ; LPS) の基本的なユニットは、約 10~20 kDa であると考えられている (文献 5)。サイズに基づく排除 (size exclusion) による脱パイロとして、しばしば、カットオフの分子量が 6-10 kDa のメンブランが使用される。しかしながら、単量体の LPSs (monomeric LPSs) が、溶液中に稀にみられることがある。これはその単量体の LPSs が、水への溶解性が貧弱なためである。LPS は通常は、凝集した形態 (aggregated forms) で存在している。そのような小胞 (vesicles) は、分子量が 300 ~1000 kDa にわたっている。それゆえ、エンドトキシンは 30-100 kDa の MWCOs をもつ高流量メンブラン (higher flux membranes) で、上手く除去することが出来る (文献 6)。

Adsorption, in addition to size exclusion, also can be a mechanism of endotoxin removal by UF. Several hollow-fiber membrane materials have been evaluated, and the best removal was obtained with more hydrophobic membranes. Endotoxin removal was correlated to the degree of endotoxin adsorption on the membranes in an equilibrium experiment (7).

サイズに基づく排除 (size exclusion) に加えて、吸着 (adsorption) もまた、UF にるエンドトキシン除去のメカニズムとなっている。幾つかのホローファイバーのメンブラン材質について評価がされており、最も良いエンドトキシンの除去は、より疎水性の高いメンブランで得られた。エンドトキシン除去は、平衡状態とした実験 (equilibrium experiment) では、そのメンブランのエンドトキシンの吸着程度 (degree of endotoxin adsorption) に比例した (文献 7)。

UF has been used successfully to depyrogenate small molecule drugs, buffers, electrolytes, antibiotics, and antifungal agents (8). UF is generally not recommended for endotoxin removal from solutions containing larger molecules such as proteins.

UF は、少量の低分子医薬品 (small molecule drugs)、緩衝液 (buffers)、電解質 (electrolytes)、抗生物質 (antibiotics)、および抗菌剤 (antifungal agents) を脱ピロするために、上手く使用されている (文献 8)。UF は一般的に、たん白質のような大型の分子を含む溶液からエンドトキシンを除去には推奨されるものではない。

2.4 Charge-Modified Depth Filters (荷電処理ディプス型フィルター)

Depth filters exhibit two primary clarification mechanisms because of their structural and chemical composition: size exclusion, either through sieving or entrapment; and adsorption, either through electrokinetic (positive zeta potential) or hydrophobic interactions.

ディプス型フィルターは、その構造的および化学的な構成により、2つの主要な浄化機構 (clarification mechanisms) を示す。すなわち「サイズに基づく排除 (size exclusion) ; これは篩 (sieving) 作用またはトラップメント (entrapment) による」と「吸着; これは等電点 (electrokinetic ; ポジティブなゼータ電位 positive zeta potential) あるいは疎水性の相互作用 (hydrophobic interactions) による」である。

Size exclusion of particles is a function of the tortuous flow path through the media as well as the depth or length of the flow path in relation to the size distribution of the contaminate loading, e.g., cellular debris, including LPS from cell walls and hard particles. Depth filtration efficiency depends on many factors, including the filter media characteristics, materials of construction, e.g., cellulose, filter aids, binding resins—the fluid characteristics, e.g., viscosity, dirt load, cell debris, temperature—as well as the particle characteristics: solid/hard, pleomorphic, proteinaceous, colloidal. Electrokinetic adsorption is attributed to the resin binders and filter aids that impart a net-positive charge, positive zeta potential, to the filter medium. Adsorption is a complex mechanism that will vary based on a combination of parameters including positive zeta potential, hydrophobic adsorption, particle surface charge, pH, and ionic strength of process fluids.

This positive zeta potential can remove negatively charged particles smaller than the nominal rating of the depth filter medium. The adsorptive mechanism results in high removal efficiencies for fine particles, colloidal and cellular materials, e.g., bacterial endotoxins, nucleic acids, and removal of negatively charged trace contaminants, whereas the depth medium porosity influences operating parameters such as pressure differentials, flow rates, dirt load capacity, and throughput.

粒子のサイズに基づく排除は、ろ材の間を通る非常に複雑な流路の機能による。これはろ材の性質による外に、汚染している負荷物質（細胞由来の残骸物；細胞壁からの LPS およびハードパーティクル (hard particles) も含まれる）との関連する形での流路の深さと長さも係っている。ディプス型のろ過効率、次のような多くの因子に左右される。

- ろ材の特性 (filter media characteristics) ;
- (ディプス型フィルターを) 構成している物質、例えば、セルロース、ろ過助剤、結合用樹脂と被ろ過液間の特性 (binding resins—the fluid characteristics)。例えば、粘度、汚れ度合い (dirt load)、細胞由来のデブリス (cell debris)、温度。 ; その他に
- 粒子特性 (particle characteristics) : 固形/ハード (solid/hard)、多形性 (pleomorphic)、たん白質性 (proteinaceous)、膠状 (colloidal)。

運動電位吸着 (electrokinetic adsorption) は、樹脂バインダー (resin binders) およびろ過助剤 (filter aids) によるものであり、これらは、ろ材に対して正味の正電荷 (net-positive charge、ポジティブなゼータ電位 positive zeta potential) を与える。吸着は複雑なメカニズムに依っており、複数のパラメータの組み合わせに基づいて大きく変わるであろう。そのようなパラメータには、ポジティブなゼータ電位 (positive zeta potential)、疎水性の吸着 (hydrophobic adsorption)、粒子の表面電荷 (particle surface charge)、pH、およびプロセス液体のイオン強度 (ionic strength of process fluids) がある。このポジティブなゼータ電位は、ディプス型のフィルター・メディアの公称孔径よりも小さな、ネガティブに荷電した粒子を除去することが出来る。吸着メカニズム (adsorptive mechanism) は、微細な粒子 (fine particles)、コロイド状および細胞由来の物質（例えば、バクテリアル・エンドトキシン、核酸）の非常に高い除去効率と、それにネガティブに荷電した痕跡量の汚染物の除去を生じる。その一方で、ディプス型の媒体の孔径 (depth medium porosity) は、差圧、流速、ダーティ物質の負荷 (dirt load capacity)、および処理量 (throughput) のような運転パラメータに影響する。

Most cellulose-based depth filters contain a filter aid to enhance particle retention and flow characteristics. Filter aids are available in various particle sizes and levels of purity. Common filter aids include diatomaceous earth, perlite (volcanic origin), carbon (natural sources), and silica- and/or metallic-based materials.

多くのセルロースベースのディプス型フィルターは、過助剤(filter aid)を含んでおり、これは粒子保持と流量特性 (flow characteristics) を高める。ろ過助剤は、各種の粒子サイズおよび純度レベルが利用可能である。一般的なる過助剤としては、珪藻土(diatomaceous earth)、パーライト(perlite, 火山起原 volcanic origin)、カーボン(carbon, 天然由来 natural sources)および、シリカ性の物質や(および/または) 金属性-の物質(silica- and/or metallic-based materials)が含まれる。

The cartridges and capsule configurations are constructed of primarily polypropylene and other common elastomers and polymers, e.g., nylon, polycarbonate, polysulfone. Depth filters are available in standard filter cartridge/capsule configurations; lab-scale discs (47 mm/90 mm), flat stock sheets, lenticular cartridges (stacked discs), and capsules.

カートリッジおよびカプセルの構造部分(configurations)は、主としてポリプロピエレンおよび他の一般的なエラストマー(*)およびポリマー(例えば、ナイロン、ポリカーボネイト、ポリスルホン)から構成されている。ディプス型フィルターは、次のような形態で入手が可能である。:

- ・標準的なフィルターカートリッジ/カプセルの形態
- ・ラボスケールのディスク(47 mm/90 mm)
- ・フラットなストックシート(flat stock sheets)
- ・レンズ状カートリッジ(lenticular cartridges ;stacked discs)
- ・カプセル(capsules)

*: 訳注 加熱すると溶け、常温でゴム弾性を示す高分子物質(英辞郎より)

In general, the charge-modified depth filters showed lower endotoxin breakthrough levels at charge exhaustion as compared to charge-modified membrane filters.

一般的に、荷電処理のディプス型フィルターは、荷電処理型のメンブレン・フィルターと比較して、荷電に基づく排除(charge exhaustion)では、エンドトキシンの通過(endotoxin breakthrough)より低いものであった。

Membranes demonstrated total endotoxin breakthrough once the charge capacity of the membrane is saturated. Generally, charge-modified depth filter media demonstrate lower endotoxin unit (EU) levels that increase slowly at the point of first endotoxin detection as compared to membranes that exhibit complete breakthrough.

メンブタン (訳注: メンブタン型のフィルター) は、そのメンブタンの荷電キャパシティが飽和したならば、完全なエンドトキシソ通過 (total endotoxin breakthrough) が起こることが証明されている。一般的に、荷電処理ディプス型のフィルターのろ材は、低いエンドトキシソ単位 (EU) レベルを持つことが証明されており、これは、完全なエンドトキシソ通過 (complete breakthrough) を示すメンブタンと比較して、最初のエンドトキシソ検出時点で、ゆっくりとした増加が見られる。 (訳注: 下線部は訳文の検討が必要である)

Benefits of charge-modified depth filters include removal of bacterial endotoxin [4-5 log reduction value (LRV)] (9-11), DNA fragments, host cell protein, reduction of viruses, and economical throughput with low extractable levels. System flow rate determinations are necessary to optimize residence time to maximize adsorptive capture. This parameter is especially important for the removal of colloids and endotoxins.

荷電処理のディプス型フィルターの便益 (benefits) は、バクテリアル・エンドトキシソの除去 [4 ~5 log reduction value (LRV)] (文献 9-11) や、DNA 断片 (DNA fragments) や宿主細胞たん白質 (host cell protein) の減少、ビールスの減少、および低い抽出物レベルでの経済的な処理量 (economical throughput) が含まれる。システムの流速 (system flow rate) の測定は、吸着による捕捉 (adsorptive capture) を最大にするために、滞留時間 (residence time) を最適化するために必要である。このパラメータは、コロイドおよびエンドトキシソの除去に関して、特に重要である。

Cellulosic depth filters commonly contain extractable Limulus amoebocyte lysate (LAL)-reactive materials that are often determined to be β -1,3-glucans. β -1,3-Glucans activate an alternative LAL pathway, Factor G. The activation of Factor G by β -1,3-glucans will induce the proclotting enzyme, causing a non-endotoxin-positive LAL result (or enhanced result). To reduce the risk of β -1,3-glucan extractables from cellulosic depth filters, it is important to follow the recommended rinse conditions of the specific depth filter. An alternative to reduce the effects of β -1,3-glucans is to select LAL reagents tolerant of β -glucans or to add a β -glucan blocking buffer to LAL samples.

セルロース製のディプス型フィルターは、一般的に、Limulus amoebocyte lysate (LAL) に反応する抽出性の物質を含んでいる。この物質はしばしば β -1,3-glucans であることが測定されている。 β -1,3-glucans は、別の LAL 経路 (alternative LAL pathway) である Factor G を活性化する。 β -1,3-glucans による Factor G の活性化は、proclotting enzyme を誘導し、エンドトキシソ以外による LAL の陽性の試験結果 (または、増幅された結果; enhanced result) の原因となる。セルロー製のディプス型フィルターから抽出される β -1,3-glucan のリスクを減少させるために、

各ディプス型フィルターの推奨されるリンス条件を守ることが重要である。 β -1,3-glucans の影響を減少させるための別の方法は、 β -glucans に耐性のある LAL 試薬を選定するか、あるいは LAL のサンプルに対して β -glucan blocking buffer を加えることである。

To some users, the most important attribute of charge-modified depth filters is their effectiveness as prefilters. In more difficult filtrations, such as those containing colloids, bacteria, or endotoxins, the user can realize substantial cost savings.

一部のユーザーにとっては、荷電処理ディプス型フィルターの最も重要な特性は、プレフィルターとしてのその有効性である。コロイド(colloids)、細菌あるいはエンドトキシンを含むより困難なる過においては、ユーザーは、かなりのコスト削減を実現できる。

2.5 Activated Carbon Depth Filters (活性炭ディプス型フィルター)

Depth filtration, using activated carbon as a filter aid adsorbent, removes color, odor, and bacterial endotoxins and nucleic acids. Activated carbon is derived from organic materials, e. g., peat, wood, coconut, bone, lignite coal. The microstructure of the carbon contains millions of pores that create a highly adsorptive material with a vast internal effective surface area as compared to polymeric microporous structures. These carbon filter aids are typically activated by steam or chemical treatment such as acid. Although highly effective in reducing endotoxin (4-5 log reduction) and other undesirable contaminants, active carbon may, because of this highly adsorptive characteristic, remove other process components and target molecules due to this nonspecific adsorption property. The high loading capacity and strong adsorptive attributes make activated carbon depth filtration an attractive alternative to conventional filtration methods or addition of bulk carbon, where care must be taken to remove fine carbon particulates in the effluent.

ろ過助剤的吸着剤(filter aid adsorbent)のような活性炭を使用するディプス型のろ過(depth filtration)は、着色(color)、臭気(odor)、およびバクテリアル・エンドトキシン(bacterial endotoxins)と核酸(nucleic acids)を除去する。活性炭は、有機性の物質、例えば泥炭(peat)、木材(wood)、ココナツ(coconut)、骨(bone)、亜炭コークス(lignite coal)に由来する。活性炭の微細構造は、数百万の微細な孔を持っており、この孔は、重合体の微細な孔を持つ構造と比較して、巨大な内在性の有効表面積(vast internal effective surface area)を持つ、極めて吸着性の高い材質からつくられている。これらの活性炭のろ過助剤は一般的に、蒸気、または酸のような化学的処理によって活性化される。エンドトキシン

の低減 (4~5 log reduction) 、および他の好ましくない物質の低減において、非常に大きな有効性を持っているにも関わらず、活性炭は、この非常に高い吸着性のために、この非特異的な吸着性によって、他のプロセス成分およびターゲット分子を除去してしまう。この高い付着物保持キャパシティ (loading capacity) と強い吸着特性 (adsorptive attributes) は、活性炭によるディプス型ろ過を、従来からのろ過方法やバルク状態の活性炭の添加という方法に対する魅力的な代替手段としている。その一方で、流出液 (effluent) 中の微細な活性炭粒子の除去に気を付けなければならない。

2.6 Membrane Adsorbers (メンブラン型吸着剤)

When the target protein in the solution is in the same molecular weight range as that of the endotoxins (10-20 kDa for endotoxin monomers), the target proteins cannot be separated by UF. Ion exchange chromatography is the most common depyrogenation method for proteins; however, it has some drawbacks, which limit its usefulness as a depyrogenation step. This includes handling and usage problems such as packing, channeling, low flow rates, long regeneration times, compressibility, and limited chemical stability.

溶液中のターゲットとするたん白質が、エンドトキシンと同じ分子量範囲 (エンドトキシン・モノマー (endotoxin monomers) に対しては 10-20 kDa) にある場合には、そのターゲットとするたん白質を UF により分離することは出来ない。たん白質に関してはイオン交換クロマトグラフィ (ion exchange chromatography) が最も一般的な脱パイロ方法である。 ; しかしながら、それは脱パイロのステップとしてのその有用性に制限を加えるような、多少の難点がある。この難点には、次のような取扱いと使用の問題がある。 : パッキング (packing)、チャネリング (channeling) 、例流量 (low flow rates)、再生時間の長時間化 (long regeneration times)、圧縮性 (compressibility) および安定性の低下 (limited chemical stability)。

Charge-modified membrane adsorbers with ion exchange ligands functionalized on the membrane surface can provide the required performance needed for depyrogenation from the laboratory up to process scale. Generally, two strategies can be used for removal of endotoxin from solutions with such membrane adsorber devices. Using the strong basic anion exchanger of quaternary amine (Q) type in a buffer with pH lower than the pI of the protein, endotoxin will bind to the charged membrane substrate, and protein will pass through the membrane (negative chromatography). Alternatively, a strong acidic ion exchanger type S also can be used with a buffer pH lower than the pI of the protein. In this case, the endotoxin will pass through, and the protein will

be bound to the charged membrane substrate, which can be subsequently eluted using appropriate buffers in the next step.

メンブタン表面に機能化したイオン交換リガンド (ligands : 配位体) を持つ荷電処理メンブタン吸着剤は、ラボの規模からプロセス規模までの脱パイロに必要な性能を提供することが出来る。一般的に、そのようなメンブタン吸着剤機器で、溶液からのエンドトキシンを除去するには、2つの戦略を使用することが出来る。 :

- ① たん白質の pI (等電点) よりも低い pH を持つ緩衝液中の第四級アミン(Q)の強塩基性陰イオン交換体(strong basic anion exchanger)を使用すると、エンドトキシンは荷電したメンブタン基質に強く結合するので、たん白質をそのメンブタンに通過させることが出来る (negative chromatography) ;
- ② もう一つは、強酸性イオン交換体(strong acidic ion exchanger) type S を、たん白質の pI (等電点) よりも低い緩衝液の pH でも使用することが出来る。この場合、エンドトキシンは通過し、たん白質は荷電したメンブタン基質上に結合する。この結合したたん白質は、次の段階で適切な緩衝液を使用して、溶出させることが出来る。

Such membrane adsorbers have been used as validated endotoxin clearance steps in downstream processing of monoclonal antibody (mAb) or recombinant protein manufacturing. Typical log reduction values (LRVs) reported are >4 (12) based on lab scale testing.

そのようなメンブタン吸着剤は、モノクロナール抗体(monoclonal antibody ; mAb)あるいは、組み換えたん白質(recombinant protein) の製造の下流側工程(downstream processing)でのエンドトキシン・クリアランス・ステップをバリデートするために使用されている。代表的な対数減少値(log reduction values ; LRVs)は、ラボスケールの試験に基づき、>4 (4未満) と報告されている(文献 12)。

Another solution is to use mixed-mode membrane adsorbers exhibiting both anionic and hydrophobic chemistries. Endotoxins (hydrophobic and negatively charged) tightly bind onto the membrane surfaces. By adjusting the concentration of salt or pH appropriately, proteins flow through the mixed-mode membrane adsorber by charge repulsion, while endotoxins remain bound. Mixed-mode membrane adsorbers allow the depyrogenation of protein solution or buffers with higher concentrations of salt (e.g., 100-500 mM) than with the Q adsorber. Such membrane adsorbers have been used as validated endotoxin clearance steps in downstream processing of mAb or recombinant protein manufacturing. Typical LRVs reported are in the 3-4 range based on lab scale testing.

その他の溶液には、陰イオン性(anionic)および疎水性(hydrophobic)の両方の化学的挙動を示す混合様式のメンブレン吸着剤(mixed-mode membrane adsorbents)が使用される。エンドトキシン(疎水性でかつ、マイナスに荷電している)は、メンブレン基質に強く結合する。塩濃度および pH を適切に調整することで、たん白質は荷電反発(charge repulsion)により、混合様式のメンブレン吸着剤から流れ出すが、エンドトキシンは結合した状態で残る。混合様式のメンブレン吸着剤は、Q 吸着剤でよりも高い塩濃度(例えば、100~500 mM)で、たん白質溶液または緩衝液の脱パイロが可能である。そのようなメンブレン吸着剤は、mAb(モノクローナル抗体; monoclonal antibody)または組み換えたん白質(recombinant protein)の製造の下流側のエンドトキシン・クリアランスをバリデートするために使用されている。報告されている代表的な LRVs は、ラボスケールの試験に基づけば、3~4 の範囲である。

3. VALIDATION (バリデーション)

See Depyrogenation (1228) for a comprehensive discussion of depyrogenation process validation and the use of endotoxin standards.

脱パイロプロセスのバリデーションおよびエンドトキシン標準品の使用に関する広汎な議論は、Depyrogenation (脱パイロプロセス) (1228) を参照のこと。

4. REFERENCES

1. Sawada Y, Fujii R, Igami I, Kawai K, Kamiki T, Niwa A. Removal of endotoxin from water by microfiltration through a microporous polyethylene hollow-fiber membrane. *Appl Environ Microbiol.* 1986; 51(4):813-820.
2. Bononi I, Balatti V, Gaeta S, Tognon M. Gram-negative bacterial lipopolysaccharide retention by a positively charged new-generation filter. *Appl Environ Microbiol.* 2008;4(20):6470-6472.
3. PDA Technical Report No. 7, (TR 7) Depyrogenation: technical report. Philadelphia: Parenteral Drug Association; 1985.
4. Zydney AL, Xenopoulos A. Improving dextran tests for ultrafiltration membranes: effect of device format. *J Membr Sci.* 2007;291(1-2):180-190.
5. Magalhães PO, Lopes AM, Mazzola PG, Rangel-Yaqui C, Penna TC, Pessoa A Jr. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. *J Pharm Sci.* 2007;10(3):388-404.

6. Williams KL. Depyrogenation validation, pyroburden, and endotoxin removal. In: Williams KL, editor. Endotoxins: pyrogens, LAL testing, and depyrogenation, 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2007:301-328.
7. Yamamoto C, Kim ST. Endotoxin rejection by ultrafiltration through high-flux, hollow fiber filters. J Biomed Mater Res. 1996;32(3):467-471.
8. Magalhães PO, Pessoa A. Lipopolysaccharide, LPS removal, depyrogenation. In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology. New York: John Wiley & Sons; 2010.
9. PDA Technical Report No. 45, Vol. 62(S-2). Filtration of liquids using cellulose-based depth filters. Philadelphia: Parenteral Drug Association; 2008.
10. Hou KC, Zaniewski R. Depyrogenation by endotoxin removal with positively charged depth filter cartridge. J Pharm Sci Technol. 1990;44(4):204-209.
11. Gerba CP, Hou K. Endotoxin removal by charge-modified filters. Appl Environ Microbiol. 1985;50(6):1375-1377.
12. Clutterbuck A, Kenworthy J, Liddell J. Endotoxin reduction using disposable membrane adsorption technology in cGMP manufacturing. BioPharm Int. 2007;20(5):24-31.

5. APPENDIX

5.1 Additional References

McCullough KZ. Structuring a depyrogenation study. In: McCullough KZ, editor. The bacterial endotoxins test: a practical guide. River Grove, IL: Davis Healthcare International, LLC; 2011.

Mandaro RM. Chapter 5. Charge-modified depth filters: cationic-charge-modified nylon filters. In: Meltzer TH, editor. Filtration in the pharmaceutical industry. New York: Marcel Dekker; 1986. 2S (USP39)

(2015年10月10日 邦訳)