

Quality Assurance of Combination Products  
– Session Theme A: Latest trends of Endotoxin –

## Notes on Endotoxin Test



Division of Medical Devices  
National Institute of Health Sciences



Division of  
Medical  
Devices

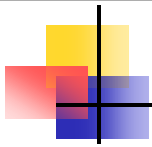
Yuji Haishima  
haishima@nihs.go.jp

## Prefilled Syringe Seminar 2019

### COI Disclosure of Head Presenter

Head Presenter Name: Yuji Haishima

There are no companies in the COI relationship that should be disclosed in relation to the presentation of the subject.



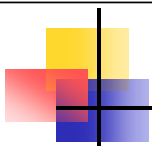
# Today's Topics

- ① Introduction
- ② Overview of Endotoxin Test
  - Principle, Reactivity of Recombinant Reagents, Measurement Procedure, etc.
- ③ General Points to Note of Endotoxin Test
- ④ Summary of Low Endotoxin Recovery (LER)

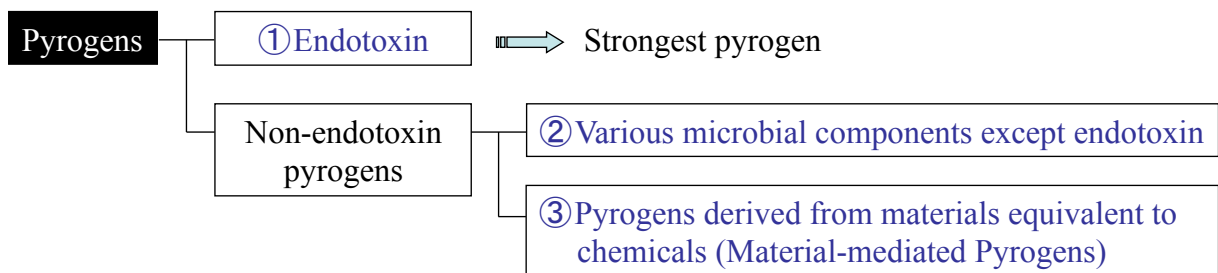
Division of Medical Devices  
National Institute of Health Sciences



Yuji Haishima  
haishima@nihs.go.jp



# Types of pyrogenic substances and fever mechanism



## Mechanism of fever

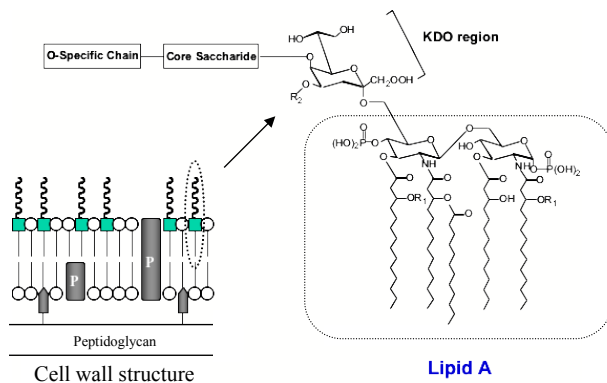
- (1) Substances causing fever via cytokine network → Pyrogens ①, ②
  - (2) Substances acting directly on the central nervous system involved in thermoregulation
  - (3) Uncoupling agent for oxidative phosphorylation
  - (4) Other substances of unknown mechanism for the action
- } → Pyrogen ③

## Detectable pyrogens

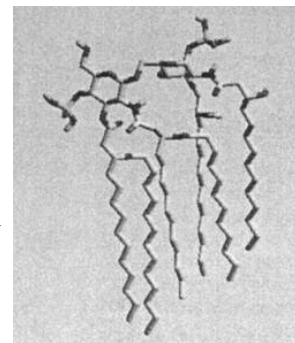
- (1) 【JP】 Pyrogen test using rabbits      Pyrogens ①, ②, ③
- (2) 【JP】 Entotoxin test                      Pyrogen ①
- (3) Human Cell-based Pyrogen Test        Pyrogens ①, ②

# What's endotoxin (Lipopolysaccharide, LPS)?

## Localization site and chemical structure



## 3D structure



## Biological activity

### Living body level

**Febrile**, lethal toxicity, shock, tolerance, local and whole-body Schwartzmann's activity, hypoglycemia, serum iron reduction reaction, adjuvant activity, thromboplastin production, antitumor activity, radiation damage protective ability, adjuvant activity, recurrent bactericidal activity, bone marrow reaction

### Cell level

**Macrophage activation ability**

- Cytokine production
- Chemokine production
- Increased phagocytosis

Mitogen activity  
Cytotoxicity

### Molecular level

**Limulus activity**  
Complement activation ability

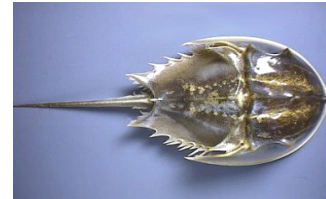
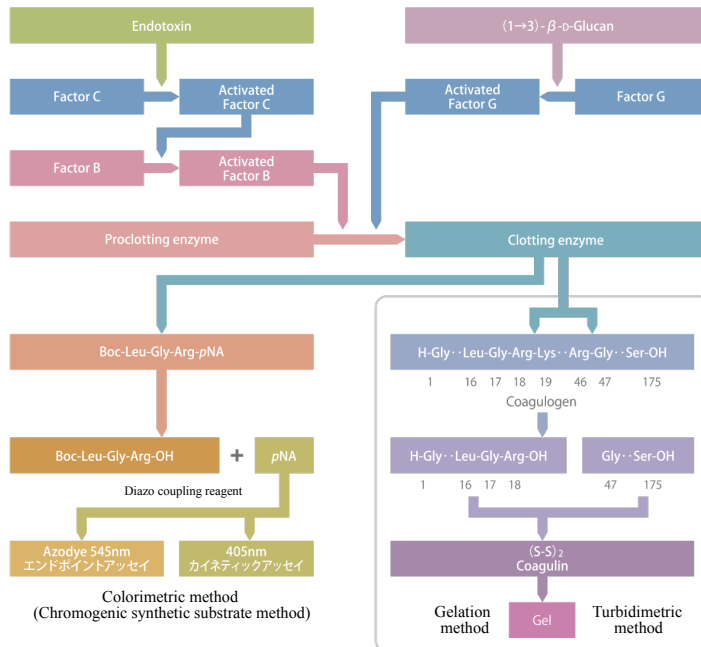
# Endotoxin test of biological products

- Test method: The Japanese Pharmacopoeia general test method endotoxin test method is applied mutatis mutandis.
- Standard endotoxin: Japanese Pharmacopoeia standard endotoxin or equivalent reference endotoxin is used.
- Measurement: **Endotoxin specific reagent**
- Test for interfering factors: Evaluate in consideration of individual characteristics.
- Judgment: Calculated as a relative value to a standard product using a statistical method by **parallel line quantification method**.
- Do not exceed the endotoxin standard value specified in each article of the drug.
- Carried out with quality control of human serum albumin, heated human plasma protein, interferon preparation, and various vaccines, national assays, etc.
- The introduction of the SLP review system eliminated endotoxin test for some vaccines, including pneumococcal vaccines (2015).

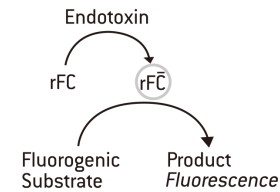
# Principle of endotoxin test

## Schematic of reaction mechanism

Endotoxin can be detected or quantified using lysate reagent (LAL reagent) prepared from horseshoe crab blood cell extract. Because endotoxin activates factors contained in the lysate, the subsequent cascade reaction is activated.



## Recombinant Factor C



The PyroGene™ assay contains a recombinant form of Factor C (rFC), the endotoxin-sensitive protein that initiates the LAL clotting cascade. The rFC enzyme is activated by the binding of endotoxin, the same mechanism as the traditional LAL assay. It works through a single step endpoint assay that measures the enzymatic cleavage of a fluorogenic substrate.

- The kinetic method in kinetic colorimetric method is the highest precision (RSD 2%)
- The reaction time method in kinetic turbidimetric method using Wako Pure Chemical Industries reagent is the most sensitive (0.0005 EU/ml)
- Recombinant reagents other than PyroGene available (EndoZyme, PyroSmart)

Cited from Seikagaku Corporation HP and Lonza Japan HP

# Performance verification of recombinant reagents ①

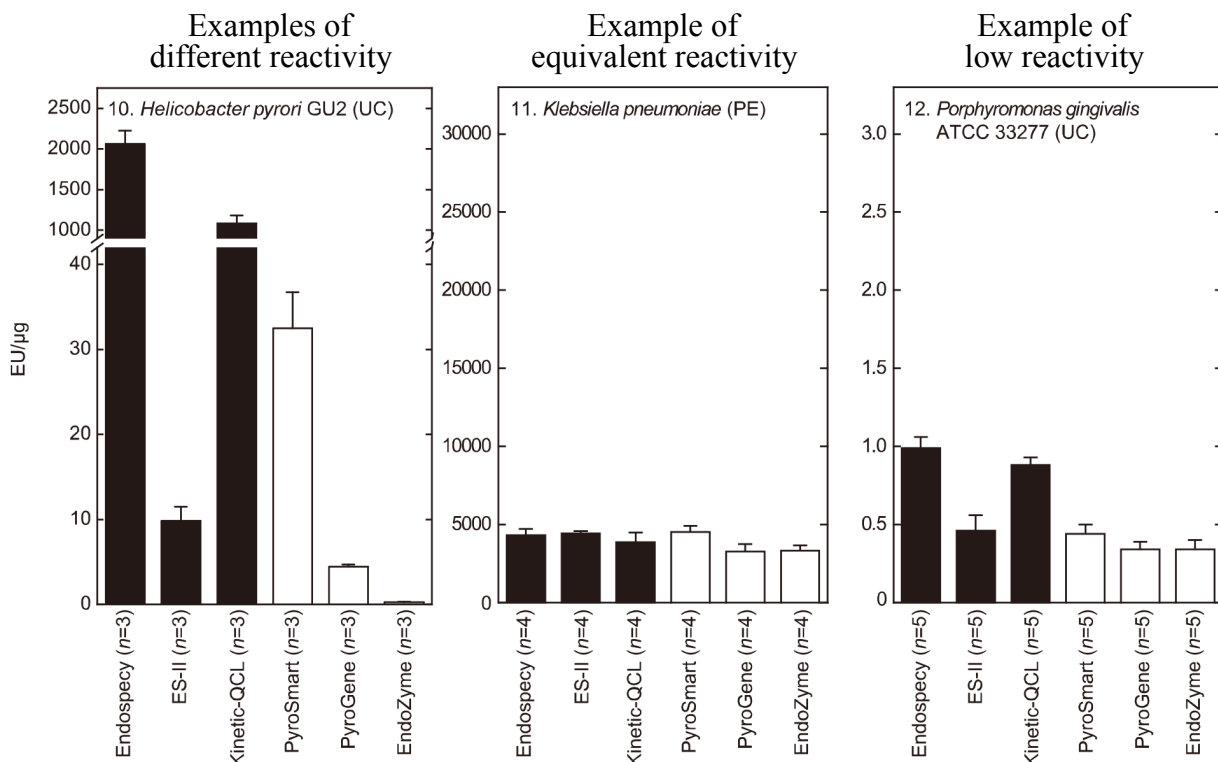
FY2015 / 2016 “Study on test methods of Japanese Pharmacopoeia”

## Collaborative Study on the Bacterial Endotoxins Test Using Recombinant Factor C-based Procedure for Detection of Lipopolysaccharides

National Institute of Health Sciences, Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science Society of Japan, Japan Food Research Laboratories, M Labs Inc., bioMérieux Japan Ltd., Seikagaku Corporation, Lonza Japan Ltd., FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

Type	No.	Origin	Existing lysate reagent CV				Recombinant reagent CV			All reagents CV	
			Endospey	ES-II	Kinetic-QCL	Between reagents	PyroSmart	PyroGene	EndoZyme		Between reagents
LPS	1	Escherichia coli O55 (phenol/water extraction)	6%	7%	15%	41%	1%	3%	7%	25%	30%
	2	Escherichia coli O111 (phenol/water extraction)	5%	4%	5%	21%	6%	2%	10%	21%	19%
	3	Escherichia coli O55 (ultracentrifugation)	13%	39%	34%	79%	9%	22%	21%	39%	54%
	4	Escherichia coli O111 (ultracentrifugation)	14%	0%	27%	75%	1%	11%	12%	15%	44%
	5	Escherichia coli O113 (ultracentrifugation)	13%	8%	25%	92%	13%	22%	12%	16%	53%
	6	Escherichia coli O150 (ultracentrifugation)	4%	3%	17%	80%	1%	1%	5%	69%	102%
	7	Porphyromonas gingivalis ATCC 33277	1%	7%	7%	42%	1%	2%	5%	20%	56%
	8	Salmonella minnesota 1114	1%	12%	13%	76%	1%	24%	8%	42%	82%
	9	Salmonella minnesota R595	116%	61%	127%	66%	105%	127%	132%	18%	41%
	10	Pseudomonas aeruginosa PA01	7%	15%	25%	122%	10%	13%	2%	13%	67%
	11	Helicobacter pylori GU2	25%	34%	14%	1970%	26%	5%	11%	1081%	3197%
	12	Proteus vulgaris OX2	2%	2%	18%	8%	8%	10%	14%	6%	9%
	13	Campylobacter jejuni Penner O:19	3%	10%	4%	19%	0%	1%	70%	26%	24%
	14	Escherichia coli O128:B12	29%	12%	35%	14%	28%	19%	13%	33%	30%
	15	Escherichia coli J5	21%	8%	24%	151%	32%	9%	5%	52%	106%
	16	Salmonella enterica serotype typhimurium	3%	11%	8%	8%	7%	20%	11%	9%	14%
	17	Pseudomonas aeruginosa 10	3%	4%	20%	138%	8%	1%	3%	75%	118%
	18	Klebsiella pneumoniae	26%	2%	39%	3%	31%	25%	2%	15%	12%
	19	Burkholderia cepacia	2%	59%	5%	28%	36%	55%	26%	119%	76%
NOE	20	Serratia marcescens approx. 600 EU/mL	3%	2%	20%	12%	11%	5%	11%	114%	80%
	21	Ralstonia pickettii approx. 300 EU/mL	4%	5%	19%	30%	14%	6%	12%	121%	72%
	22	Enterobacter cloacae approx. 1400 EU/mL	1%	1%	20%	22%	2%	5%	14%	118%	74%
	23	Escherichia coli (3% nutrient broth) approx. 700 EU/mL	10%	6%	23%	8%	6%	8%	1%	46%	28%
	24	Pseudomonas aeruginosa approx. 8000 EU/mL	17%	3%	16%	32%	6%	8%	5%	17%	23%
	25	Pond (Yamato Takada City, Nara) 100~500 EU/mL	8%	7%	4%	23%	7%	2%	6%	46%	60%
	26	Amata river (Yamatotakada City, Nara) 100~500 EU/mL	4%	6%	7%	14%	0%	2%	7%	40%	31%
	27	Nagase river (Higashi Osaka City, Osaka) 100~500 EU/mL	8%	6%	22%	22%	9%	6%	0%	57%	70%
	28	Septic tank for household drainage (Nara) 100~500 EU/mL	19%	5%	9%	22%	2%	9%	4%	34%	36%
	29	Mineral water (Oku Oyama natural water) 0.2~0.3 EU/mL	29%	28%	32%	11%	23%	15%	25%	84%	96%
	30	Tap water (PMRJ) 10~20 EU/mL	50%	77%	68%	30%	48%	43%	52%	191%	142%

## Performance verification of recombinant reagents ②

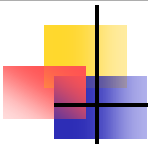


## Summary on performance verification of recombinant reagents

- Recombinant reagents show similar reactivity to existing lysate reagents
- The calibration curve of the recombinant reagent shows the same correlation coefficient between different laboratories
- Recombinant reagents have the advantage of quality control because there is less lot-to-lot error
- Use recombinant reagents after performing reproducibility and robustness tests using pharmaceuticals

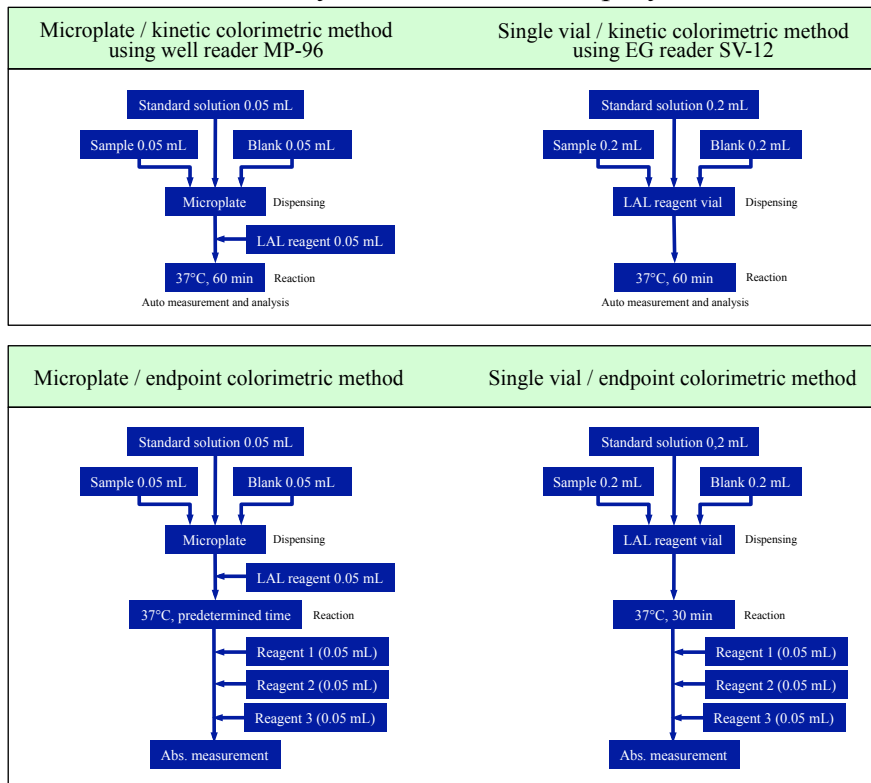
### Reference

1. Kikuchi, Y. *et al.*, Collaborative Study on the Bacterial Endotoxins Test Using Recombinant Factor C-based Procedure for Detection of Lipopoly-saccharides. *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science* **48** (4), 252-260 (2017) .
2. Kikuchi, Y. *et al.*, Collaborative Study on the Bacterial Endotoxins Test Using Recombinant Factor C-based Procedure for Detection of Lipopoly-saccharides, Part 2. *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science* **49** (10), 706-718 (2018) .

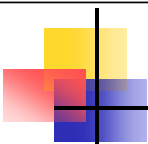


# Example of endotoxin test protocol

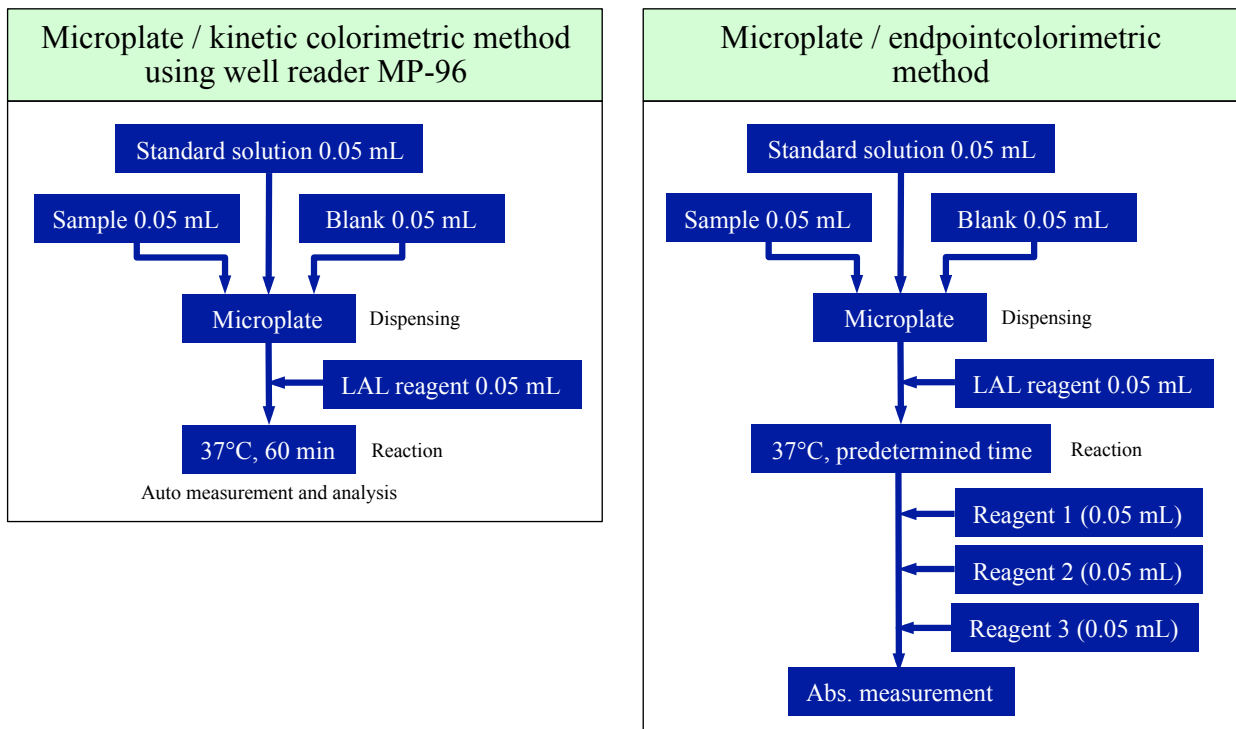
## Protocol of Pyrochrome and Endospecy series



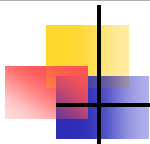
Cited from Seikagaku Corporation HP



# Example of endotoxin test protocol



Cited from Seikagaku Corporation HP



# Endotoxin test

# Summary of optical quantification methods

Cited from Seikagaku Corporation HP

## 日本薬局方におけるエンドトキシン試験法：光学的定量法

### 概要

日本薬局方におけるエンドトキシン試験法を実施するに際して、比色法または比濁法の精度と有効性を保証するため、予備試験として検量線の信頼性確認試験および反応干渉因子試験を行う必要があります。

### 予備試験

**■検量線の信頼性確認試験**  
ライゼート試薬は各ロットにつき、使用する前に、また試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときに行います。

### 操作法

用いるライゼート試薬に規定されているエンドトキシンの濃度範囲で、少なくとも3種の濃度のエンドトキシン標準溶液を調製し、これら各濃度につき3回以上測定して検量線を作成します。

### 判定

作成した検量線について、直線回帰分析を行い、相関係数 $r$ を求め、その絶対値 $|r|$ が0.995以上であることを確認します。

### ■反応干渉因子試験

反応干渉因子試験は、試料溶液について反応を促進または阻害する因子の有無を調べる試験です。本試験は、試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときにも行います。

### 操作法

表1に従い、A、B、CおよびD液を調製して、試験を行います。

表1

液	エンドトキシン濃度	添加液	試験管またはウェルの数
A*	0	試料溶液	2以上
B*	検量線の中点濃度**	試料溶液	2以上
C**	3濃度以上	エンドトキシン試験用液	各濃度、2以上
D**	0	エンドトキシン試験用液	2以上

\*1 試料溶液のみ(試料溶液のエンドトキシン濃度範囲)、最大有効希釈数を知らない範囲で検出することがある。  
 \*\* Aと同等量で検出された試料溶液で、検量線の中点またはその付近のエンドトキシン濃度になるように標準エンドトキシンを添加した試料。  
 \*\* 検量線の信頼性確認で用いる各濃度のエンドトキシン標準溶液(検量線作成用)  
 \*\* 検量線用、エンドトキシン試験用液のみ。

### 【最大有効希釈数について】

最大有効希釈数は(試料溶液中に存在する反応干渉因子の影響を希釈により回避できるとき、許容される試料溶液の最大の希釈倍数)を次によって求めます。

$$\text{最大有効希釈数} = \frac{\text{エンドトキシン規格値}}{\lambda} \times \text{試料溶液の濃度}$$

### エンドトキシン規格値

検体量に基づいて規定されており、K/Mに等しくなります。ただし、Kは発熱を誘起するといわれる体重1kg当たりのエンドトキシンの量(EU/kg)であり、Mは検体量mg当たり1時間以内に発生する注射剤の最大量です。

試料溶液の濃度：試料溶液の濃度の単位は、

エンドトキシン規格値が

質量当たり(EU/mg)で規定されている場合はmg/mL

当量当たり(EU/mEq)で規定されている場合はmEq/mL

生物学的単位当たり(EU/単位)で規定されている場合は単位/mL

質量当たり(EU/mg)で規定されている場合はmg/mLです。

すなわち、エンドトキシン規格値に試料溶液の濃度を乗じることにより、試料溶液1mL当たりのエンドトキシン規格値(EU/mL)が算出され、これを検量線の最小エンドトキシン濃度( $\lambda$ , EU/mL)で除することにより最大有効希釈数が求められます。

### 回収率の算出方法

B液で測定されたエンドトキシン濃度とA液で測定されたエンドトキシン濃度の差に基づいて、B液の添加エンドトキシン濃度に対するエンドトキシンの回収率を計算します。

$$\text{回収率(\%)} = \frac{\text{B液エンドトキシン濃度} - \text{A液エンドトキシン濃度}}{\text{B液の添加エンドトキシン濃度}} \times 100$$

### 判定

回収率が50~200%の範囲にあるとき、反応干渉因子は試料溶液に存在しないと判定します。

### ▶▶ 試験適合要件

- C液で作成した検量線の相関係数 $|r|$ が0.995
- D液：設定されている空試験の検量線を越えないが、または検出限界未満である

### ■定量

### 操作法

表1に示すA、B、CおよびD液を調製し、予備試験：反応干渉因子試験に準じて操作します。

### エンドトキシン濃度の算出方法

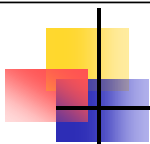
C液で作成した検量線を用い、A液の平均エンドトキシン濃度を算出します。

### ▶▶ 試験適合要件

- C液で作成した検量線の相関係数 $|r|$ が0.995
- B液で測定されたエンドトキシン濃度とA液で測定されたエンドトキシン濃度の差に基づいて、B液の添加エンドトキシン濃度に対するエンドトキシンの回収率は50~200%の範囲にある
- D液：設定されている空試験の検量線を越えないが、または検出限界未満である

### 判定

A液の平均エンドトキシン濃度に基づき、被験試料のエンドトキシンの濃度(EU/mL、EU/mg、EU/mEqまたはEU/単位)を求め、その値が医薬品各品に規定されたエンドトキシン規格を満たすとき、被験試料はエンドトキシン試験に適合とします。



# Endotoxin test

# Summary of optical quantification methods

Cited from Seikagaku Corporation HP

## 日本薬局方 ● Overview

### 概要

日本薬局方におけるエンドトキシン試験法を実施するに際して、比色法または比濁法の精度と有効性を保証するため、予備試験として検量線の信頼性確認試験および反応干渉因子試験を行う必要があります。

### 予備試験

**■検量線の信頼性確認試験**  
ライゼート試薬は各ロットにつき、使用する前に、また試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときに行います。

### 操作法

用いるライゼート試薬に規定されているエンドトキシンの濃度範囲で、少なくとも3種の濃度のエンドトキシン標準溶液を調製し、これら各濃度につき3回以上測定して検量線を作成します。

### 判定

作成した検量線について、直線回帰分析を行い、相関係数 $r$ を求め、その絶対値 $|r|$ が0.995以上であることを確認します。

### ■反応干渉因子試験

反応干渉因子試験は、試料溶液について反応を促進または阻害する因子の有無を調べる試験です。本試験は、試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときにも行います。

### 操作法

表1に従い、A、B、CおよびD液を調製して、試験を行います。

表1

液	エンドトキシン濃度	添加液	試験管またはウェルの数
A*	0	試料溶液	2以上
B*	検量線の中点濃度**	試料溶液	2以上
C**	3濃度以上	エンドトキシン試験用液	各濃度、2以上
D**	0	エンドトキシン試験用液	2以上

\*1 試料溶液のみ(試料溶液のエンドトキシン濃度範囲)、最大有効希釈数を知らない範囲で検出することがある。  
 \*\* Aと同等量で検出された試料溶液で、検量線の中点またはその付近のエンドトキシン濃度になるように標準エンドトキシンを添加した試料。  
 \*\* 検量線の信頼性確認で用いる各濃度のエンドトキシン標準溶液(検量線作成用)  
 \*\* 検量線用、エンドトキシン試験用液のみ。

### 【最大有効希釈数について】

最大有効希釈数は(試料溶液中に存在する反応干渉因子の影響を希釈により回避できるとき、許容される試料溶液の最大の希釈倍数)を次によって求めます。

$$\text{最大有効希釈数} = \frac{\text{エンドトキシン規格値}}{\lambda} \times \text{試料溶液の濃度}$$

### エンドトキシン規格値

検体量に基づいて規定されており、K/Mに等しくなります。ただし、Kは発熱を誘起するといわれる体重1kg当たりのエンドトキシンの量(EU/kg)であり、Mは検体量mg当たり1時間以内に発生する注射剤の最大量です。

試料溶液の濃度：試料溶液の濃度の単位は、

エンドトキシン規格値が

質量当たり(EU/mg)で規定されている場合はmg/mL

当量当たり(EU/mEq)で規定されている場合はmEq/mL

生物学的単位当たり(EU/単位)で規定されている場合は単位/mL

質量当たり(EU/mg)で規定されている場合はmg/mLです。

すなわち、エンドトキシン規格値に試料溶液の濃度を乗じることにより、試料溶液1mL当たりのエンドトキシン規格値(EU/mL)が算出され、これを検量線の最小エンドトキシン濃度( $\lambda$ , EU/mL)で除することにより最大有効希釈数が求められます。

### ■定量

### 操作法

表1に示すA、B、CおよびD液を調製し、予備試験：反応干渉因子試験に準じて操作します。

### エンドトキシン濃度の算出方法

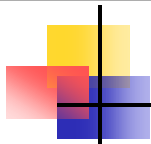
C液で作成した検量線を用い、A液の平均エンドトキシン濃度を算出します。

### ▶▶ 試験適合要件

- C液で作成した検量線の相関係数 $|r|$ が0.995
- B液で測定されたエンドトキシン濃度とA液で測定されたエンドトキシン濃度の差に基づいて、B液の添加エンドトキシン濃度に対するエンドトキシンの回収率は50~200%の範囲にある
- D液：設定されている空試験の検量線を越えないが、または検出限界未満である

### 判定

A液の平均エンドトキシン濃度に基づき、被験試料のエンドトキシンの濃度(EU/mL、EU/mg、EU/mEqまたはEU/単位)を求め、その値が医薬品各品に規定されたエンドトキシン規格を満たすとき、被験試料はエンドトキシン試験に適合とします。



# Endotoxin test

## Summary of optical quantification methods

Cited from Seikagaku Corporation HP

### 日本薬局方におけるエンドトキシン試験法：光学的定量法

#### 概要

日本薬局方におけるエンドトキシン試験法を実施するに際して、比色法または比濁法の精度と有効性を保証するため、予備試験として検量線の信頼性確認試験および反応干渉因子試験を行う必要があります。

#### 予備試験

■ 検量線の信頼性確認試験  
ライゼート試薬は各ロットにつき、使用するときに必ず行います。

#### 操作法

用いるライゼート試薬に規定されているエンドトキシン濃度につき3回以上測定し、

#### 判定

作成した検量線について、直線回帰分析を行

#### ■ 反応干渉因子試験

反応干渉因子試験は、試料溶液について反応本試験は、試験結果に影響を及ぼす可能性が予

#### 操作法

表に従い、A、B、CおよびD液を調製して、

#### 表1

液	エンドトキシン濃度	添加液
A*	0	試料液
B*	検量線の中点濃度**	試料液
C*	3濃度以上	エンドトキシン
D*	0	エンドトキシン

\* 試料溶液のみ(試料溶液のエンドトキシン濃度未知)、最大有効濃度で検定された試料溶液で、検量線の中点濃度以下の濃度で検定される。

\*\* 検量線の信頼性確認試験で用いる標準濃度のエンドトキシン濃度。

\*\*\* 検量線、エンドトキシンの信頼性確認試験。

#### 【最大有効濃度について】

最大有効濃度は、(試料溶液中に存在する反応物)を定量的に検出する濃度です。

最大有効濃度 = エンドトキシン濃度 × 試料溶液の濃度

エンドトキシン濃度：検量線に基づいて規定されており、K/Mに等しくなります。ただし、Kは検量線が検出する濃度の1kg当たりのエンドトキシンの量 (EU/kg) であり、Mは検量線が検出する濃度の1kg以内の検出する試料の最大量です。

試料溶液の濃度：試料溶液の濃度の単位は、

エンドトキシン濃度の単位は、

検量線が検出する濃度 (EU/mg) で規定されている場合はmg/mL、

検量線が検出する濃度 (EU/mL) で規定されている場合は単位/mL、

検量線が検出する濃度 (EU/mL) で規定されている場合は単位/mLです。

すなわち、エンドトキシン濃度の検出濃度の濃度を乗じることにより、試料濃度1mL当たりのエンドトキシン濃度 (EU/mL) が算出され、これを検量線の最小エンドトキシン濃度 (A、EU/mL) で除することにより最大有効濃度が求められます。

#### 回収率の算出方法

目標で測定されたエンドトキシン濃度と実際に測定されたエンドトキシン濃度の差に基づいて、目標の添加エンドトキシン濃度に対するエンドトキシンの回収率を計算します。

### Preliminary test

#### The test for confirming the reliability of calibration curve

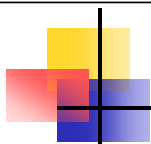
The lysate reagent is estimated for each lot before use, and when there are changes in the test conditions that may affect the test results.

#### Measurement method

Prepare standard endotoxin solutions **at least 3 concentrations** within the concentration range specified in the lysate reagent, and measure at each of these concentrations **3 times or more** to create a standard curve.

#### Judgment

Perform linear regression analysis on the created calibration curve, determine the correlation coefficient  $r$ , and confirm that **its absolute value  $|r|$  is 0.980 or higher.**



# Endotoxin test

## Summary of optical quantification methods

Cited from Seikagaku Corporation HP

### 日本薬局方におけるエンド

#### 概要

日本薬局方におけるエンドトキシン試験法のため、予備試験として検量線の信頼性確認

#### 予備試験

■ 検量線の信頼性確認試験  
ライゼート試薬は各ロットにつき、使用するときに必ず行います。

#### 操作法

用いるライゼート試薬に規定されているエンドトキシン濃度につき3回以上測定し、

#### 判定

作成した検量線について、直線回帰分析を行

#### ■ 反応干渉因子試験

反応干渉因子試験は、試料溶液について反応を促進または阻害する因子の有無を調べる試験です。本試験は、試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときにも行います。

#### 操作法

表に従い、A、B、CおよびD液を調製して、

#### 表1

液	エンドトキシン濃度	添加液
A*	0	試料液
B*	検量線の中点濃度**	試料液
C*	3濃度以上	エンドトキシン
D*	0	エンドトキシン

\* 試料溶液のみ(試料溶液のエンドトキシン濃度未知)、最大有効濃度で検定された試料溶液で、検量線の中点濃度以下の濃度で検定される。

\*\* 検量線の信頼性確認試験で用いる標準濃度のエンドトキシン濃度。

\*\*\* 検量線、エンドトキシンの信頼性確認試験。

#### 【最大有効濃度について】

最大有効濃度は、(試料溶液中に存在する反応物)を定量的に検出する濃度です。

最大有効濃度 = エンドトキシン濃度 × 試料溶液の濃度

エンドトキシン濃度：検量線に基づいて規定されており、K/Mに等しくなります。ただし、Kは検量線が検出する濃度の1kg当たりのエンドトキシンの量 (EU/kg) であり、Mは検量線が検出する濃度の1kg以内の検出する試料の最大量です。

試料溶液の濃度：試料溶液の濃度の単位は、

エンドトキシン濃度の単位は、

検量線が検出する濃度 (EU/mg) で規定されている場合はmg/mL、

検量線が検出する濃度 (EU/mL) で規定されている場合は単位/mL、

検量線が検出する濃度 (EU/mL) で規定されている場合は単位/mLです。

### Test for interfering factors

Test for interfering factors is performed to confirm whether the promoters or inhibitors of LAL reagent are present in sample solution or not. This test is also conducted when there are changes in test conditions that may affect the test results.

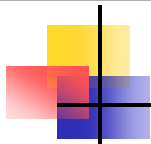
#### Measurement method

Prepare and test solutions A, B, C and D according to Table 1.

#### エンドトキシン濃度の算出方法

Solution	Conc. of endotoxin	Additive solution	No. of test tube or well
A	0	Sample solution	> 2
B	Midpoint conc. of calibration curve	Sample solution	> 2
C	> 3 points	LRW	> 2 for each conc.
D	0	LRW	> 2





# Endotoxin test

## Summary of optical quantification methods

Cited from Seikagaku Corporation HP

**日本薬局方におけるエンドトキシン試験法：光学的定量法**

**概要**  
日本薬局方におけるエンドトキシン試験法を実施するに際して、比色法または比濁法の精度と有効性を保証するため、予備試験として検量線の信頼性確認試験および反応干渉因子試験を行う必要があります。

**予備試験**  
**■検量線の信頼性確認試験**  
ライゼート試薬は各ロットにつき、使用する前に、また試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときに行います。

**操作法**

**回収率の算出方法**  
B液で測定されたエンドトキシン濃度とA液で測定されたエンドトキシン濃度の差に基づいて、B液の添加エンドトキシン濃度に対するエンドトキシンの回収率を計算します。

$$\text{回収率 (\%)} = \frac{\text{B液エンドトキシン濃度} - \text{A液エンドトキシン濃度}}{\text{B液の添加エンドトキシン濃度}} \times 100$$

**判定**  
回収率が50～200%の範囲にあるとき、反応干渉因子は試料溶液に存在しないと判定します。

▶▶ 試験適合要件

### Calculation method of recovery rate

$$\text{Recovery rate (\%)} = \frac{\text{Endotoxin conc. of solution B} - \text{Endotoxin conc. of solution A}}{\text{Endotoxin conc. spiked to solution B}} \times 100 =$$

### Judgment

When the recovery rate is in **the range of 50 to 200%**, it is judged that interfering factors is not present in the sample solution.

**最大有効希釈倍数** (試料溶液中に存在する反応干渉因子の影響を希釈により回避できるとき、許容される試料溶液の最大の希釈倍数) を次式によって求めます。

$$\text{最大有効希釈倍数} = \frac{\text{エンドトキシン規格値}}{\text{試料溶液の濃度}}$$

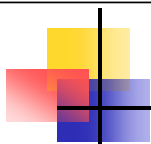
**エンドトキシン規格値**  
取引量に基づいて規定されており、K/Mに等しくなります。ただし、Kは発熱を誘起するといわれる体重1kg当たりのエンドトキシンの量 (EU/kg) であり、Mは体重増加当たり1時間以内に致死する注射剤の最大量です。

**試料溶液の濃度** 試料溶液の濃度の単位は、  
エンドトキシン規格値が  
質量当たり (EU/mg) で規定されている場合はmg/mL  
当量当たり (EU/mEq) で規定されている場合はEq/mL  
生物学的単位当たり (EU/単位) で規定されている場合は単位/mL  
質量当たり (EU/mg) で規定されている場合はmg/mLです。

すなわち、エンドトキシン規格値に試料溶液の濃度を乗じることにより、試料溶液1mL当たりのエンドトキシン規格値 (EU/mL) が算出され、これを検量線の最小エンドトキシン濃度 (A, EU/mL) で除することにより最大有効希釈倍数が求められます。

**判定**  
回収率が50～200%の範囲にあるとき、反応干渉因子は試料溶液に存在しないと判定します。

▶▶ 試験適合要件  
●検量線作成時の検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980  
●検量線：設定されている空白試験の検量線を超えないが、または検量線未満である



# Endotoxin test

## Summary of optical quantification methods

Cited from Seikagaku Corporation HP

**日本薬局方におけるエンドトキシン試験法：光学的定量法**

**概要**  
日本薬局方におけるエンドトキシン試験法を実施するに際して、比色法または比濁法の精度と有効性を保証するため、予備試験として検量線の信頼性確認試験および反応干渉因子試験を行う必要があります。

**予備試験**  
**■検量線の信頼性確認試験**  
ライゼート試薬は各ロットにつき、使用する前に、また試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときに行います。

**操作法**  
用いるライゼート試薬に規定されているエンドトキシンの濃度範囲で、少なくとも3種の濃度のエンドトキシン標準溶液を調製し、これら各濃度につき3回以上測定して検量線を作成します。

**判定**  
作成した検量線について、直線回帰分析を行い、相関係数rを求め、その絶対値 |r| が0.980以上であることを確認します。

**回収率の算出方法**  
B液で測定されたエンドトキシン濃度とA液で測定されたエンドトキシン濃度の差に基づいて、B液の添加エンドトキシン濃度に対するエンドトキシンの回収率を計算します。

$$\text{回収率 (\%)} = \frac{\text{B液エンドトキシン濃度} - \text{A液エンドトキシン濃度}}{\text{B液の添加エンドトキシン濃度}} \times 100$$

**判定**  
回収率が50～200%の範囲にあるとき、反応干渉因子は試料溶液に存在しないと判定します。

▶▶ 試験適合要件  
●検量線作成時の検量線の相関係数：|r| ≥ 0.980  
●検量線：設定されている空白試験の検量線を超えないが、または検量線未満である

### Quantification

#### Operation method

Prepare solutions A, B, C and D (Table 1), and operate according to “test for interfering factors” in the preliminary test.

#### Calculation method of endotoxin concentration

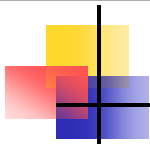
Calculate the average endotoxin concentration of solution A using the calibration curve prepared with solution C.

#### Test conformance requirements

- Correlation coefficient of calibration curve prepared with solution C:  $|r| \geq 0.980$
- Based on the difference between the endotoxin concentration measured in solutions B and, the recovery rate of endotoxin relative to the endotoxin concentration spiked to solution B is **in the range of 50 to 200%**
- Solution D: **Do not exceed the limit value of blank test or less than the limit of detection**

#### Judgment

Determine the endotoxin concentration (EU/mL, EU/mg, EU/mEq or EU/unit) of the test sample based on the average endotoxin concentration of solution A. Test samples are considered to be compatible with endotoxin test when the result conforms to the endotoxin limit specified in each article of JP.



# Notes on endotoxin test ①

Cited from Seikagaku Corporation HP

## About the utensils

Sterilize the glass and heat resistant utensils used for the test at 250 °C for 30 minutes at least . In addition, when using plastic products such as microplate and micropipette tips, use products that have been confirmed not to detect endotoxin and that they do not interfere with endotoxin testing.

## About LAL reagent water (LRW)

Use “water for injection”, "water for injection (in a container)" or any other water described in the pharmaceutical articles of JP that is free of endotoxin at a concentration above the detection limit of the lysate reagent and suitable for the endotoxin test.

## About preparation of standard endotoxin stock solution

Prepare standard endotoxin stock solution by dissolving endotoxin standard JP with LAL reagent water.

### 【Preparation method】

1. Remove the metal cap and rubber stopper with tweezers so as not to contaminate reagents and top of JPSE vial.
2. Add the LAL reagent water at the dose described in the package insert to reach 10,000 EU / mL.
3. Cap with rubber stopper, wrap Parafilm around lid, seal and stir with test tube mixer for 5 minutes.
4. Stock the stock solution at 2-8 °C or less until use. Use within 14 days after dissolution. When not using immediately, fix and seal with Parafilm over rubber stopper.



# Notes on endotoxin test ②

Cited from Seikagaku Corporation HP

## ■ 最大有効希釈倍数について

最大有効希釈倍数とは、試料溶液中に存在する反応干渉因子の影響を希釈により回避できるとき、許容される試料溶液の最大の希釈倍数のことをいいます。

### 1. 医薬品各条にエンドトキシン規格値が規定されている場合

$$\text{最大有効希釈倍数 (MVD)} = \frac{\text{エンドトキシン規格値} \times \text{試料溶液の濃度}}{\lambda}$$

試料溶液の濃度：試料溶液の濃度の単位は、  
 エンドトキシン規格値が  
 質量当たり (EU/mg) で規定されている場合はmg/mL  
 当量当たり (EU/mEq) で規定されている場合はmEq/mL  
 生物学的単位当たり (EU/単位) で規定されている場合は単位/mL  
 容量当たり (EU/mL) で規定されている場合はmL/mL となります。

$\lambda$ ：ゲル化法の場合はライセート試薬の表示感度 (EU/mL)  
 比濁法または比色法の場合は検量線の最小エンドトキシン濃度 (EU/mL)

### 2. 医薬品各条にエンドトキシン規格値が規定されていない場合

$$\text{最大有効希釈倍数 (MVD)} = \frac{K / M \times \text{試料溶液の濃度}}{\lambda}$$

エンドトキシン規格値：  
 注射剤のエンドトキシン規格値は、投与量に基づいて規定されており、K/Mに等しくなります。  
 ただし、Kは発熱を誘起するといわれる体重1kg当たりのエンドトキシンの量 (EU/kg) であり、投与経路による区分に基づき、以下のように設定されます。

投与経路	K (EU/kg)
静脈内	5.0
静脈内：放射性医薬品	2.5
脊髄腔内	0.2
その他の投与経路	5.0

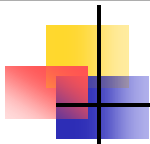
また、Mは体重1kg当たり1回に投与される注射剤の最大量です。ただし、注射剤が頻回または持続的に投与される場合、Mは1時間以内に投与される注射剤の最大総量です。

注1) 質量または単位に基づいて投与する製剤では、主薬の表示量を基準としてエンドトキシン規格値を設定する。

注2) 成人の体重1kgあたりの最大投与量を算出するとき、成人の平均体重として60kgを用いる。

注3) 体重1kgあたり的小児投与量がその成人投与量よりも多いときは、小児投与量に基づいてエンドトキシン規格値を設定する。

$\lambda$ ：ゲル化法の場合はライセート試薬の表示感度 (EU/mL)  
 比濁法または比色法の場合は検量線の最小エンドトキシン濃度 (EU/mL)



# Notes on endotoxin test ②

Cited from Seikagaku Corporation HP

## ■ 最大有効希釈倍数について

最大有効希釈倍数とは、試料溶液中に存在する反応干渉因子の影響を希釈により回避できるとき、許容される試料溶液の最大の希釈倍数のことをいいます。

### ■ About the Maximum Valid Dilution (MVD)

MVD is the maximum allowable dilution factor of a sample solution at which the endotoxin limit can be determined, when the effects of interfering factors present in the sample solution can be avoided by dilution.

生物学的単位当たり (EU/単位) で規定されている場合は単位/mL  
容量当たり (EU/mL) で規定されている場合はmL/mL となります。

λ : ゲル化法の場合はライセート試薬の表示感度 (EU/mL)  
比濁法または比色法の場合は検量線の最小エンドトキシン濃度 (EU/mL)

#### 2. 医薬品各条にエンドトキシン規格値が規定されていない場合

$$\text{最大有効希釈倍数 (MVD)} = \frac{K / M \times \text{試料溶液の濃度}}{\lambda}$$

エンドトキシン規格値:

注射剤のエンドトキシン規格値は、投与量に基づいて規定されており、K/Mに等しくなります。

ただし、Kは発熱を誘起するといわれる体重1kg当たりのエンドトキシンの量 (EU/kg) であり、投与経路による区分に基づき、以下のように設定されます。

投与経路	K (EU/kg)
静脈内	5.0
静脈内：放射性医薬品	2.5
脊髄腔内	0.2
その他の投与経路	5.0

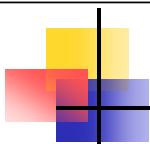
また、Mは体重1kg当たり1回に投与される注射剤の最大量です。ただし、注射剤が頻回または持続的に投与される場合、Mは1時間以内に投与される注射剤の最大総量です。

注1) 質量または単位に基づいて投与する製剤では、主薬の表示量を基準としてエンドトキシン規格値を設定する。

注2) 成人の体重1kgあたりの最大投与量を算出するとき、成人の平均体重として60kgを用いる。

注3) 体重1kgあたり的小児投与量がその成人投与量よりも多いときは、小児投与量に基づいてエンドトキシン規格値を設定する。

λ : ゲル化法の場合はライセート試薬の表示感度 (EU/mL)  
比濁法または比色法の場合は検量線の最小エンドトキシン濃度 (EU/mL)



# Notes on endotoxin test ②

Cited from Seikagaku Corporation HP

## ■ 最大有効希釈倍数について

最大有効希釈倍数とは、試料溶液中に存在する反応干渉因子の影響を希釈により回避できるとき、許容される試料溶液の最大の希釈倍数のことをいいます。

### 1. When the endotoxin limit is specified in each article of JP

#### 1. 医薬品各条にエンドトキシン規格値が規定されている場合

$$\text{最大有効希釈倍数 (MVD)} = \frac{\text{エンドトキシン規格値} \times \text{試料溶液の濃度}}{\lambda}$$

試料溶液の濃度: 試料溶液の濃度の単位は、

エンドトキシン規格値が

質量当たり (EU/mg) で規定されている場合はmg/mL

当量当たり (EU/mEq) で規定されている場合はmEq/mL

生物学的単位当たり (EU/単位) で規定されている場合は単位/mL

容量当たり (EU/mL) で規定されている場合はmL/mL となります。

λ : ゲル化法の場合はライセート試薬の表示感度 (EU/mL)  
比濁法または比色法の場合は検量線の最小エンドトキシン濃度 (EU/mL)

### 2. When the endotoxin limit is not specified in each article of JP

#### 2. 医薬品各条にエンドトキシン規格値が規定されていない場合

$$\text{最大有効希釈倍数 (MVD)} = \frac{K / M \times \text{試料溶液の濃度}}{\lambda}$$

エンドトキシン規格値:

注射剤のエンドトキシン規格値は、投与量に基づいて規定されており、K/Mに等しくなります。

ただし、Kは発熱を誘起するといわれる体重1kg当たりのエンドトキシンの量 (EU/kg) であり、投与経路による区分に基づき、以下のように設定されます。

投与経路	K (EU/kg)
静脈内	5.0
静脈内：放射性医薬品	2.5
脊髄腔内	0.2
その他の投与経路	5.0

また、Mは体重1kg当たり1回に投与される注射剤の最大量です。ただし、注射剤が頻回または持続的に投与される場合、Mは1時間以内に投与される注射剤の最大総量です。

注1) 質量または単位に基づいて投与する製剤では、主薬の表示量を基準としてエンドトキシン規格値を設定する。

注2) 成人の体重1kgあたりの最大投与量を算出するとき、成人の平均体重として60kgを用いる。

注3) 体重1kgあたり的小児投与量がその成人投与量よりも多いときは、小児投与量に基づいてエンドトキシン規格値を設定する。

λ : ゲル化法の場合はライセート試薬の表示感度 (EU/mL)  
比濁法または比色法の場合は検量線の最小エンドトキシン濃度 (EU/mL)

## Notes on endotoxin test ②

Cited from Seikagaku Corporation HP

### ■ 最大有効希釈倍数について

最大有効希釈倍数とは、試料溶液中に存在する反応干渉因子の影響を希釈により回避できるとき、許容される試料溶液の最大の希釈倍数のことをいいます。

1. 医薬品各条にエンドトキシン規格値が規定されている場合	Intended route of administration	K (EU/kg)
最大有効希釈倍数 (MVD) = $\frac{K / M \times \text{試料溶液の濃度}}{\lambda}$ <small>試料溶液の濃度：試料溶液のエンドトキシン規格値が質量当たり (EU/mg) で、当量当たり (EU/mEq) で、生物学的単位当たり (EU/容量当たり (EU/mL) で、λ：ゲル化法の場合はライソゲル法または比色法の最低検出濃度の最小エンドトキシン濃度 (EU/mL)</small>	Intravenous	5.0
	Intravenous, for radiopharmaceuticals	2.5
	Intraspinal	0.5
	Other routes of administration	5.0

### 2. 医薬品各条にエンドトキシン規格値が規定されていない場合

$$\text{最大有効希釈倍数 (MVD)} = \frac{K / M \times \text{試料溶液の濃度}}{\lambda}$$

エンドトキシン規格値：

注射剤のエンドトキシン規格値は、投与量に基づいて規定されており、K/Mに等しくなります。

ただし、Kは発熱を誘起するといわれる体重1kg当たりのエンドトキシンの量 (EU/kg) であり、投与経路による区分に基づき、以下のように規定されています。

投与経路	K / M × conc. of sample solution
静脈内	λ
静脈内：放射性医薬品	
脊髄腔内	0.5
その他の投与経路	5.0

K : a threshold pyrogenic dose of endotoxin per kg body mass (EU/kg)

M : equal to the maximum bolus dose of product per kg body mass (adult weight: 60kg)

λ : the labeled lysate reagent sensitivity in the gel-clot techniques (EU/mL) or the lowest point used (EU/mL) in the standard regression curve of the turbidimetric or chromogenic techniques

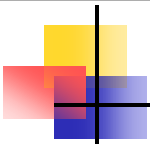
## Notes on endotoxin test ③

### Factors affecting the reactivity of LAL reagents

- Temperature, pH, salt concentration
- Surfactant, protease (especially trypsin), protease inhibitor
- High concentration of protein, polysaccharide, EDTA 4Na

### Factors affecting endotoxin activity

- Chemical structure and heterogeneity of lipid A (replacement rate of acyl and phosphate groups, etc.)
- Solubility
  - Polysaccharide side chain (O-specific chain) length of endotoxin
  - Salt form: Triethylamine salt > Na salt, free form > Mg, Ca salt
  - Micelle formation
  - Aggregation and adsorption (redispersion before measurement)
- Binding to proteins and other substances
  - Antimicrobial peptides (ex. CAP18) and polymyxin B bind to endotoxin and neutralize the activity
- Storage temperature and period (decomposition by self acidity)

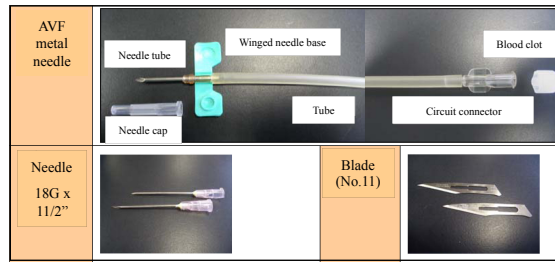


## Notes on endotoxin test ④

### As a quantitative test

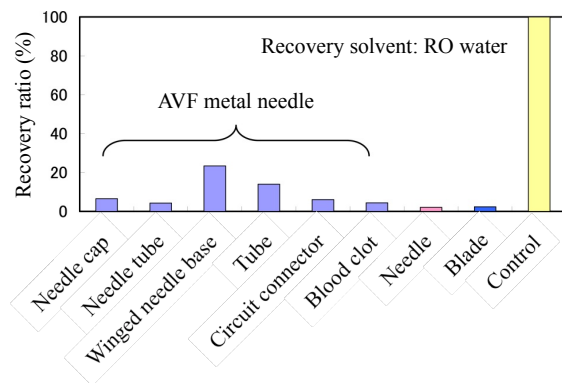
- (1) Quantify within the range of the calibration curve
- (2) Calibration of plate reader
  - Evaluate the error between wells by SD or RSD (n = 6), but not the mean value

### Additive recovery test to medical devices



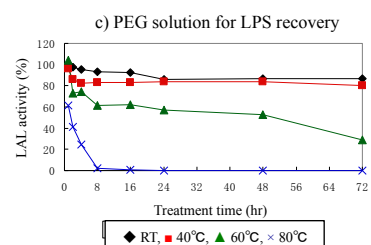
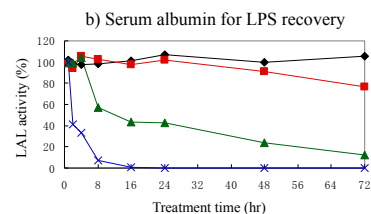
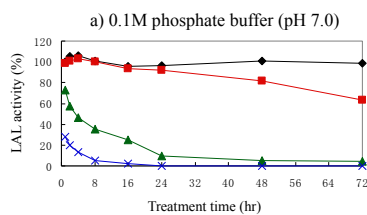
### Alternative solvents applicable to medical devices

- (1) Plastic: EDTA, PEG / Tween 60 / EDTA (0.004% / 0.01% / 0.5 mM), human serum albumin solution
- (2) Metal: EDTA solution
- (3) Hydroxyapatite: HCl < EDTA solution
- (4) Collagen: HCl < purified collagenase / HCl
- (5) Chitin and chitosan: hydrochloric acid

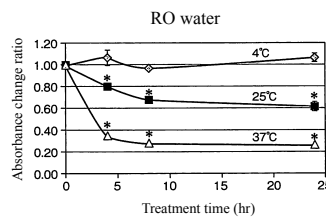


## Notes on endotoxin test ⑤

### JPSE 10 EU/mL



### JPSE 0.025 EU/mL

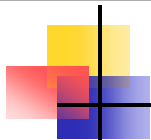


### Heat stability of endotoxin

- (1) At high concentrations, activity decreases at 40 °C or higher
- (2) At low concentrations, the activity may be halved by 24 hours even at room temperature

### Solutions

- (1) Prepare test solution before use
- (2) Keep refrigerated when storing
- (3) Redisperse before measurement if stored

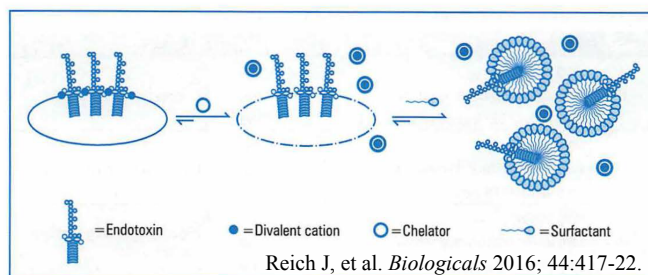
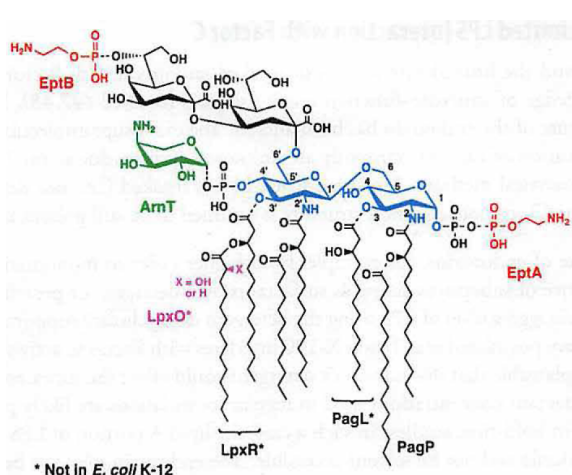


# Notes on endotoxin test ⑥

Chen, J., Low Endotoxin Recovery in Common Biologics Products.

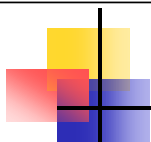
Presented at PDA 8th Annual Global Conference on Pharmaceutical Microbiology, Bethesda, MD, (2013).

- When endotoxin is added to certain biological products in coexistence of surfactant (ex. polysorbate) and sodium citrate or sodium phosphate, the recovery rate of endotoxin decreases (LER phenomenon)
- Rabbit fever was detected in one of the samples in which the LER phenomenon was observed



- Detectable amount of endotoxin decreases in hold-time study
- It exhibits different behavior depending on temperature, pH, salt concentration, LAL reagent, endotoxin purity and the structure, etc.

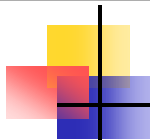
Cited from PDA Technical Report No.82



## PDA Technical Report No.82 / LER Case Study

RSE: Reference Standard Endotoxin, CSE: Control Standard Endotoxin, NOE: Naturally Occurring Endotoxin

No.	Summary	No.	Summary
1	<p><b>Low Concentration PS20 Caused LER Reaction in the Presence of Monoclonal Antibody Product</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Low concentrations of PS20 (0.006%) and mAb alone do not cause LER</li> <li>• If both are used together, LER occurs depending on mAb concentration</li> <li>• <b>CSE causes LER but not NOE</b></li> </ul>	2	<p><b>Mapping LER Effect in In-Process Stages of Purification</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Risk assessment method at each manufacturing stage of pharmaceuticals exhibiting LER</li> <li>• LAL test is conducted according to the guidelines etc.</li> <li>• Perform only the necessary tests</li> <li>• <b>Use NOE</b></li> </ul>
3	<p><b>Use of Purified and Nonpurified Endotoxins in Hold-time Studies</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Both purified endotoxin and NOE can cause LER</b></li> <li>• More influenced by culture conditions than purity of endotoxin (Mg<sup>2+</sup>, temp.)</li> <li>• <b>Recommend use of RSE</b></li> </ul>	4	<p><b>Factors Affecting Low Endotoxin Recovery</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• LER based on citric acid/PS20 is affected by temperature, pH and salt concentration</li> <li>• LER is reduced by low temperature, low pH and salt concentration conditions</li> <li>• Recommended sample dilution with 2 mM MgSO<sub>4</sub></li> </ul>
5	<p><b>Comparison of Different Methods Used for Calculation of Percentile Endotoxin Recovery from LPS-Spiked Biological Therapeutic Products</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• The amount of LPS recovered from LRW is excellent as a negative control for Hold-time study</li> </ul>	6	<p><b>Lipopolysaccharide Masking and Resolution of Low Endotoxin/ Lipopolysaccharide Recovery (LER/LLR) in a Citrate Buffer Monoclonal Antibody containing Polysorbate and Chelating Agent</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• CSE spiked to mAb (25 mg / mL, pH 6.0) containing 20 mM citric acid, 150 mM sodium chloride, 20 mM DPTA, 0.025% PS80 causes LER</li> <li>• <b>NOE does not raise LER</b></li> <li>• The LER is improved by diluting the sample 10- or 20-fold with 100 mM Tris / 50 mM MgSO<sub>4</sub> or 25 mM Tris / 12.5 mM MgSO<sub>4</sub> before 10 min of the test</li> </ul>
7	<p><b>Evaluation of an Endotoxin Demasking Protocol</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Created a protocol using Endo-RS Kit as a solution for LER</li> <li>• Recommended test temperature at 21°C or higher</li> </ul>	8	<p><b>Strategy to investigate and overcome LER driven by protein</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Certain biologics containing no PS causes LER phenomenon</li> <li>• Variation in every measurement is avoided by reverse study changed the addition time of LPS</li> <li>• The LER is eliminated by conducting the test at 2-8 °C</li> </ul>
9	<p><b>LER Case Study for a Monoclonal Antibody</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• mAb/EDTA/PS80 causes LER in RSE and CSE <b>but not in NOE</b></li> <li>• mAb alone does not cause LER</li> <li>• RSE and CSE cause LER in EDTA/histidine/trehalose buffer (pH 5.5) (causal substances: EDTA, histidine)</li> <li>• PS80 (pH 5.5) improves CSE recovery (slightly inhibited at 0.5%)</li> <li>• Pretreatment of dispersant, divalent cation, acid or base is all ineffective</li> <li>• LER intensity differs depending on the type of LAL reagent</li> </ul>	10	<p><b>Endotoxin Recovery Studies with a Biologic Formulated with Citrate and Polysorbate 20</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Preparation X containing citric acid and PS80 causes LER of CSE, but not at the drug substance level containing no these additives</li> <li>• <b>NOE isolated from plant does not occur LER</b></li> <li>• The difference in LER behavior between CSE and NOE is considered to be derived from the difference in LPS structure</li> <li>• Evaluate at an early stage that does not cause LER (process control)</li> </ul>
11	<p><b>No LER Effect in a Sodium Phosphate, Polysorbate 80 Formulation Matrix</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• RSE spiked to protein (5 mg/mL, pI 3.8-5.4) containing sodium phosphate/PS80/mannitol buffer (25 mM/0.0325%/13%, pH 6.2) does not occur LER even when stored at room temperature</li> </ul>	12	<p><b>Lack of LER Phenomenon in A Therapeutic Protein Biologic with Known LER-Causing Ingredients</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• CSE spiked to NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH 6.0) containing human glycoprotein (pI 6.4-7.5), 20 mM L-histidine, and 0.01% PS20 does not occur LER</li> </ul>



# PDA Technical Report No.82 / LER Case Study

RSE: Reference Standard Endotoxin, CSE: Control Standard Endotoxin, NOE: Naturally Occurring Endotoxin

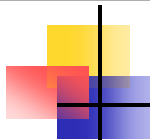
No.	Summary	No.	Summary
1	<p><b>Low Concentration PS20 Caused LER Reaction in the Presence of Monoclonal Antibody Product</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Low concentrations of PS20 (0.006%) and mAb alone do not cause LER</li> <li>If both are used together, LER occurs depending on mAb concentration</li> <li>CSE causes LER but not NOE</li> </ul>	2	<p><b>Mapping LER Effect in In-Process Stages of Purification</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Risk assessment method at each manufacturing stage of pharmaceuticals exhibiting LER</li> <li>LAL test is conducted according to the guidelines etc.</li> <li>Perform only the necessary tests</li> <li>Use NOE</li> </ul>
3	<p><b>Use of Purified and Nonpurified Endotoxins in Hold-time Studies</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Both purified endotoxin and NOE can cause LER</li> <li>More influenced by culture conditions than purity of endotoxin (Mg<sup>2+</sup>, temp.)</li> <li>Recommend use of RSE</li> </ul>	4	<p><b>Factors Affecting Low Endotoxin Recovery</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>LER based on citric acid/PS20 is affected by temperature, pH and salt concentration</li> <li>LER is reduced by low temperature, low pH and salt concentration conditions</li> <li>Recommended sample dilution with 2 mM MgSO<sub>4</sub></li> </ul>
5	<p><b>Comparison of Different Methods Used for Calculation of Percentile Endotoxin Recovery from LPS-Spiked Biological Therapeutic Products</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>The amount of LPS recovered from LRW is excellent as a negative control for Hold-time study</li> </ul>	6	<p><b>Lipopolysaccharide Masking and Resolution of Low Endotoxin/ Lipopolysaccharide Recovery (LER/LLR) in a Citrate Buffer Monoclonal Antibody containing Polysorbate and Chelating Agent</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>CSE spiked to mAb (25 mg / mL, pH 6.0) containing 20 mM citric acid, 150 mM sodium chloride, 20 mM DPTA, 0.025% PS80 causes LER</li> <li>NOE does not raise LER</li> <li>The LER is improved by diluting the sample 10- or 20-fold with 100 mM Tris / 50 mM MgSO<sub>4</sub> or 25 mM Tris / 12.5 mM MgSO<sub>4</sub> before 10 min of the test</li> </ul>
7	<p><b>Evaluation of an Endotoxin Demasking Protocol</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Created a protocol using Endo-RS Kit as a solution for LER</li> <li>Recommended test temperature at 21°C or higher</li> </ul>	8	<p><b>Strategy to investigate and overcome LER driven by protein</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Certain biologics containing no PS causes LER phenomenon</li> <li>Variation in every measurement is avoided by reverse study changed the addition time of LPS</li> <li>The LER is eliminated by conducting the test at 2-8 °C</li> </ul>
9	<p><b>LER Case Study for a Monoclonal Antibody</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>mAb/EDTA/PS80 causes LER in RSE and CSE but not in NOE</li> <li>mAb alone does not cause LER</li> <li>RSE and CSE cause LER in EDTA/histidine/trehalose buffer (pH 5.5) (causal substances: EDTA, histidine)</li> <li>PS80 (pH 5.5) improves CSE recovery (slightly inhibited at 0.5%)</li> <li>Pretreatment of dispersant, divalent cation, acid or base is all ineffective</li> <li>LER intensity differs depending on the type of LAL reagent</li> </ul>	10	<p><b>Endotoxin Recovery Studies with a Biologic Formulated with Citrate and Polysorbate 20</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Preparation X containing citric acid and PS80 causes LER of CSE, but not at the drug substance level containing no these additives</li> <li>NOE isolated from plant does not occur LER</li> <li>The difference in LER behavior between CSE and NOE is considered to be derived from the difference in LPS structure</li> <li>Evaluate at an early stage that does not cause LER (process control)</li> </ul>
11	<p><b>No LER Effect in a Sodium Phosphate, Polysorbate 80 Formulation Matrix</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>RSE spiked to protein (5 mg/mL, pI 3.8-5.4) containing sodium phosphate/ PS80/mannitol buffer (25 mM/0.0325%/13%, pH 6.2) does not occur LER even when stored at room temperature</li> </ul>	12	<p><b>Lack of LER Phenomenon in A Therapeutic Protein Biologic with Known LER-Causing Ingredients</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>CSE spiked to NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH 6.0) containing human glycoprotein (pI 6.4-7.5), 20 mM L-histidine, and 0.01% PS20 does not occur LER</li> </ul>



# PDA Technical Report No.82 / LER Case Study

RSE: Reference Standard Endotoxin, CSE: Control Standard Endotoxin, NOE: Naturally Occurring Endotoxin

No.	Summary	No.	Summary
1	<p><b>Low Concentration PS20 Caused LER Reaction in the Presence of Monoclonal Antibody Product</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Low concentrations of PS20 (0.006%) and mAb alone do not cause LER</li> <li>If both are used together, LER occurs depending on mAb concentration</li> <li>CSE causes LER but not NOE</li> </ul>	2	<p><b>Mapping LER Effect in In-Process Stages of Purification</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Risk assessment method at each manufacturing stage of pharmaceuticals exhibiting LER</li> <li>LAL test is conducted according to the guidelines etc.</li> <li>Perform only the necessary tests</li> <li>Use NOE</li> </ul>
3	<p><b>Use of Purified and Nonpurified Endotoxins in Hold-time Studies</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Both purified endotoxin and NOE can cause LER</li> <li>More influenced by culture conditions than purity of endotoxin (Mg<sup>2+</sup>, temp.)</li> <li>Recommend use of RSE</li> </ul>	4	<p><b>Factors Affecting Low Endotoxin Recovery</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>LER based on citric acid/PS20 is affected by temperature, pH and salt concentration</li> <li>LER is reduced by low temperature, low pH and salt concentration conditions</li> <li>Recommended sample dilution with 2 mM MgSO<sub>4</sub></li> </ul>
5	<p><b>Comparison of Different Methods Used for Calculation of Percentile Endotoxin Recovery from LPS-Spiked Biological Therapeutic Products</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>The amount of LPS recovered from LRW is excellent as a negative control for Hold-time study</li> </ul>	6	<p><b>Lipopolysaccharide Masking and Resolution of Low Endotoxin/ Lipopolysaccharide Recovery (LER/LLR) in a Citrate Buffer Monoclonal Antibody containing Polysorbate and Chelating Agent</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>CSE spiked to mAb (25 mg / mL, pH 6.0) containing 20 mM citric acid, 150 mM sodium chloride, 20 mM DPTA, 0.025% PS80 causes LER</li> <li>NOE does not raise LER</li> <li>The LER is improved by diluting the sample 10- or 20-fold with 100 mM Tris / 50 mM MgSO<sub>4</sub> or 25 mM Tris / 12.5 mM MgSO<sub>4</sub> before 10 min of the test</li> </ul>
7	<p><b>Evaluation of an Endotoxin Demasking Protocol</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Created a protocol using Endo-RS Kit as a solution for LER</li> <li>Recommended test temperature at 21°C or higher</li> </ul>	8	<p><b>Strategy to investigate and overcome LER driven by protein</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Certain biologics containing no PS causes LER phenomenon</li> <li>Variation in every measurement is avoided by reverse study changed the addition time of LPS</li> <li>The LER is eliminated by conducting the test at 2-8 °C</li> </ul>
9	<p><b>LER Case Study for a Monoclonal Antibody</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>mAb/EDTA/PS80 causes LER in RSE and CSE but not in NOE</li> <li>mAb alone does not cause LER</li> <li>RSE and CSE cause LER in EDTA/histidine/trehalose buffer (pH 5.5) (causal substances: EDTA, histidine)</li> <li>PS80 (pH 5.5) improves CSE recovery (slightly inhibited at 0.5%)</li> <li>Pretreatment of dispersant, divalent cation, acid or base is all ineffective</li> <li>LER intensity differs depending on the type of LAL reagent</li> </ul>	10	<p><b>Endotoxin Recovery Studies with a Biologic Formulated with Citrate and Polysorbate 20</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Preparation X containing citric acid and PS80 causes LER of CSE, but not at the drug substance level containing no these additives</li> <li>NOE isolated from plant does not occur LER</li> <li>The difference in LER behavior between CSE and NOE is considered to be derived from the difference in LPS structure</li> <li>Evaluate at an early stage that does not cause LER (process control)</li> </ul>
11	<p><b>No LER Effect in a Sodium Phosphate, Polysorbate 80 Formulation Matrix</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>RSE spiked to protein (5 mg/mL, pI 3.8-5.4) containing sodium phosphate/ PS80/mannitol buffer (25 mM/0.0325%/13%, pH 6.2) does not occur LER even when stored at room temperature</li> </ul>	12	<p><b>Lack of LER Phenomenon in A Therapeutic Protein Biologic with Known LER-Causing Ingredients</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>CSE spiked to NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH 6.0) containing human glycoprotein (pI 6.4-7.5), 20 mM L-histidine, and 0.01% PS20 does not occur LER</li> </ul>



# PDA Technical Report No.82 / LER Case Study

RSE: Reference Standard Endotoxin, CSE: Control Standard Endotoxin, NOE: Naturally Occurring Endotoxin

No.	Summary	No.	Summary
1	<p><b>Low Concentration PS20 Caused LER Reaction in the Presence of Monoclonal Antibody Product</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Low concentrations of PS20 (0.006%) and mAb alone do not cause LER</li> <li>If both are used together, LER occurs depending on mAb concentration</li> <li>CSE causes LER but not NOE</li> </ul>	2	<p><b>Mapping LER Effect in In-Process Stages of Purification</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Risk assessment method at each manufacturing stage of pharmaceuticals exhibiting LER</li> <li>LAL test is conducted according to the guidelines etc.</li> <li>Perform only the necessary tests</li> <li>Use NOE</li> </ul>
3	<p><b>Use of Purified and Nonpurified Endotoxins in Hold-time Studies</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Both purified endotoxin and NOE can cause LER</li> <li>More influenced by culture conditions than purity of endotoxin (Mg<sup>2+</sup>, temp.)</li> <li>Recommend use of RSE</li> </ul>	4	<p><b>Factors Affecting Low Endotoxin Recovery</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>LER based on citric acid/PS20 is affected by temperature, pH and salt concentration</li> <li>LER is reduced by low temperature, low pH and salt concentration conditions</li> <li>Recommended sample dilution with 2 mM MgSO<sub>4</sub></li> </ul>
5	<p><b>Comparison of Different Methods Used for Calculation of Percentile Endotoxin Recovery from LPS-Spiked Biological Therapeutic Products</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>The amount of LPS recovered from LRW is excellent as a negative control for Hold-time study</li> </ul>	6	<p><b>Lipopolysaccharide Masking and Resolution of Low Endotoxin/ Lipopolysaccharide Recovery (LER/LLR) in a Citrate Buffer Monoclonal Antibody containing Polysorbate and Chelating Agent</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>CSE spiked to mAb (25 mg / mL, pH 6.0) containing 20 mM citric acid, 150 mM sodium chloride, 20 mM DPTA, 0.025% PS80 causes LER</li> <li>NOE does not raise LER</li> <li>The LER is improved by diluting the sample 10- or 20-fold with 100 mM Tris / 50 mM MgSO<sub>4</sub> or 25 mM Tris / 12.5 mM MgSO<sub>4</sub> before 10 min of the test</li> </ul>
7	<p><b>Evaluation of an Endotoxin Demasking Protocol</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Created a protocol using Endo-RS Kit as a solution for LER</li> <li>Recommended test temperature at 21°C or higher</li> </ul>	8	<p><b>Strategy to investigate and overcome LER driven by protein</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Certain biologics containing no PS causes LER phenomenon</li> <li>Variation in every measurement is avoided by reverse study changed the addition time of LPS</li> <li>The LER is eliminated by conducting the test at 2-8 °C</li> </ul>
9	<p><b>LER Case Study for a Monoclonal Antibody</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>mAb/EDTA/PS80 causes LER in RSE and CSE but not in NOE</li> <li>mAb alone does not cause LER</li> <li><b>RSE and CSE cause LER in EDTA/histidine/trehalose buffer (pH 5.5) (causal substances: EDTA, histidine)</b></li> <li>PS80 (pH 5.5) improves CSE recovery (slightly inhibited at 0.5%)</li> <li>Pretreatment of dispersant, divalent cation, acid or base is all ineffective</li> <li>LER intensity differs depending on the type of LAL reagent</li> </ul>	10	<p><b>Endotoxin Recovery Studies with a Biologic Formulated with Citrate and Polysorbate 20</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Preparation X containing citric acid and PS80 causes LER of CSE, but not at the drug substance level containing no these additives</li> <li>NOE isolated from plant does not occur LER</li> <li>The difference in LER behavior between CSE and NOE is considered to be derived from the difference in LPS structure</li> <li>Evaluate at an early stage that does not cause LER (process control)</li> </ul>
11	<p><b>No LER Effect in a Sodium Phosphate, Polysorbate 80 Formulation Matrix</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>RSE spiked to protein (5 mg/mL, pl 3.8-5.4) containing sodium phosphate/ PS80/mannitol buffer (25 mM/0.0325%/13%, pH 6.2) does not occur LER even when stored at room temperature</li> </ul>	12	<p><b>Lack of LER Phenomenon in A Therapeutic Protein Biologic with Known LER-Causing Ingredients</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>CSE spiked to NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH 6.0) containing human glycoprotein (pl 6.4-7.5), 20 mM L-histidine, and 0.01% PS20 does not occur LER</li> </ul>

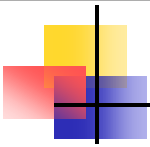


# PDA Technical Report No.82 / LER Case Study

RSE: Reference Standard Endotoxin, CSE: Control Standard Endotoxin, NOE: Naturally Occurring Endotoxin

No.	Summary	No.	Summary
1	<p><b>Low Concentration PS20 Caused LER Reaction in the Presence of Monoclonal Antibody Product</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Low concentrations of PS20 (0.006%) and <b>mAb alone do not cause LER</b></li> <li>If both are used together, LER occurs depending on mAb concentration</li> <li>CSE causes LER but not NOE</li> </ul>	2	<p><b>Mapping LER Effect in In-Process Stages of Purification</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Risk assessment method at each manufacturing stage of pharmaceuticals exhibiting LER</li> <li>LAL test is conducted according to the guidelines etc.</li> <li>Perform only the necessary tests</li> <li>Use NOE</li> </ul>
3	<p><b>Use of Purified and Nonpurified Endotoxins in Hold-time Studies</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Both purified endotoxin and NOE can cause LER</li> <li>More influenced by culture conditions than purity of endotoxin (Mg<sup>2+</sup>, temp.)</li> <li>Recommend use of RSE</li> </ul>	4	<p><b>Factors Affecting Low Endotoxin Recovery</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>LER based on citric acid/PS20 is affected by temperature, pH and salt concentration</li> <li>LER is reduced by low temperature, low pH and salt concentration conditions</li> <li>Recommended sample dilution with 2 mM MgSO<sub>4</sub></li> </ul>
5	<p><b>Comparison of Different Methods Used for Calculation of Percentile Endotoxin Recovery from LPS-Spiked Biological Therapeutic Products</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>The amount of LPS recovered from LRW is excellent as a negative control for Hold-time study</li> </ul>	6	<p><b>Lipopolysaccharide Masking and Resolution of Low Endotoxin/ Lipopolysaccharide Recovery (LER/LLR) in a Citrate Buffer Monoclonal Antibody containing Polysorbate and Chelating Agent</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>CSE spiked to mAb (25 mg / mL, pH 6.0) containing 20 mM citric acid, 150 mM sodium chloride, 20 mM DPTA, 0.025% PS80 causes LER</li> <li>NOE does not raise LER</li> <li>The LER is improved by diluting the sample 10- or 20-fold with 100 mM Tris / 50 mM MgSO<sub>4</sub> or 25 mM Tris / 12.5 mM MgSO<sub>4</sub> before 10 min of the test</li> </ul>
7	<p><b>Evaluation of an Endotoxin Demasking Protocol</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Created a protocol using Endo-RS Kit as a solution for LER</li> <li>Recommended test temperature at 21°C or higher</li> </ul>	8	<p><b>Strategy to investigate and overcome LER driven by protein</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Certain biologics containing no PS causes LER phenomenon</b></li> <li>Variation in every measurement is avoided by reverse study changed the addition time of LPS</li> <li>The LER is eliminated by conducting the test at 2-8 °C</li> </ul>
9	<p><b>LER Case Study for a Monoclonal Antibody</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>mAb/EDTA/PS80 causes LER in RSE and CSE but not in NOE</li> <li><b>mAb alone does not cause LER</b></li> <li>RSE and CSE cause LER in EDTA/histidine/trehalose buffer (pH 5.5) (causal substances: EDTA, histidine)</li> <li>PS80 (pH 5.5) improves CSE recovery (slightly inhibited at 0.5%)</li> <li>Pretreatment of dispersant, divalent cation, acid or base is all ineffective</li> <li>LER intensity differs depending on the type of LAL reagent</li> </ul>	10	<p><b>Endotoxin Recovery Studies with a Biologic Formulated with Citrate and Polysorbate 20</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Preparation X containing citric acid and PS80 causes LER of CSE, but not at the drug substance level containing no these additives</li> <li>NOE isolated from plant does not occur LER</li> <li>The difference in LER behavior between CSE and NOE is considered to be derived from the difference in LPS structure</li> <li>Evaluate at an early stage that does not cause LER (process control)</li> </ul>
11	<p><b>No LER Effect in a Sodium Phosphate, Polysorbate 80 Formulation Matrix</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>RSE spiked to <b>protein (5 mg/mL, pl 3.8-5.4)</b> containing sodium phosphate/ <b>PS80/mannitol buffer (25 mM/0.0325%/13%, pH 6.2) does not occur LER even when stored at room temperature</b></li> </ul>	12	<p><b>Lack of LER Phenomenon in A Therapeutic Protein Biologic with Known LER-Causing Ingredients</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>CSE spiked to NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH 6.0) containing <b>human glycoprotein (pl 6.4-7.5), 20 mM L-histidine, and 0.01% PS20 does not occur LER</b></li> </ul>



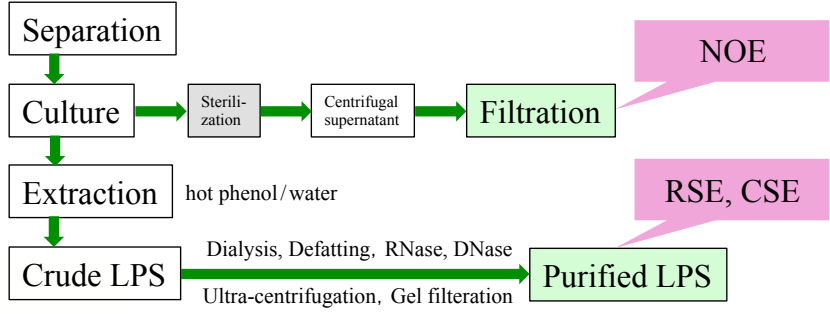
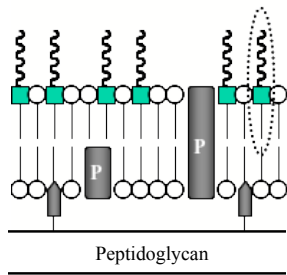
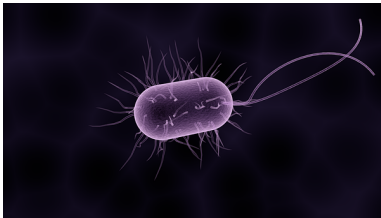


# Summary on LER phenomenon

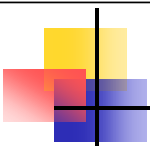
It is necessary to respond individually at present, because the mechanism and solution are still unknown

- Effect of chelating agent / polysorbate
- Effect of temperature: lower LER at lower temperatures
- Influence of the chemical structure of endotoxin
- Effect of LAL reagent type
- Effects of endotoxin purity: RSE/CSE vs NOE
- Effects of polysorbate and histidine: pos. vs neg.
- Effects of protein: alone vs need additives
- Effects of dispersant, divalent cation, pH, salt concentration: effective vs invalid

Gram negative bacteria



Work described in Case Study #3, "Use of Purified and Non-purified Endotoxins in Hold-time Studies", has shown that **masking susceptibility depends on the bacterial species and that culture conditions do affect the masking susceptibility of endotoxins**. Additionally, this work demonstrated that **isolation methods do not alter the primary structure of the lipid A profiles** (i.e., lipid A profiles from NOEs are similar to their highly purified counterparts); however, **the supramolecular structures of endotoxin may be influenced by the preparation method**. (PDA Technical Report No.82)

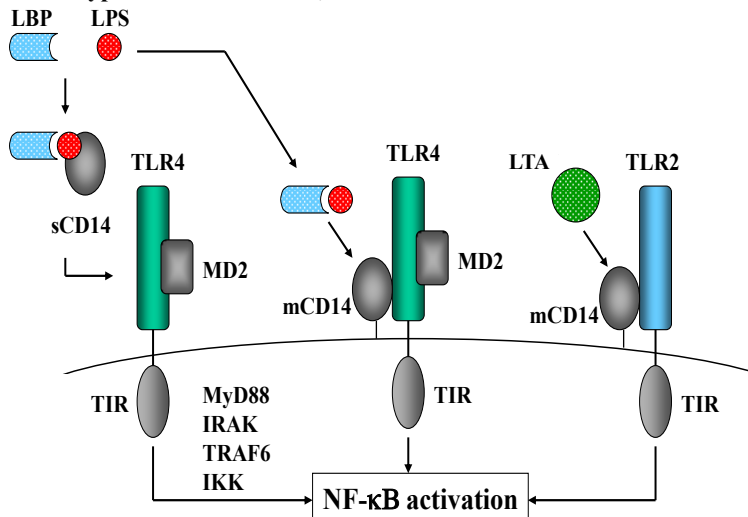


# Receptor for microbial component and intracellular signal transduction mechanism

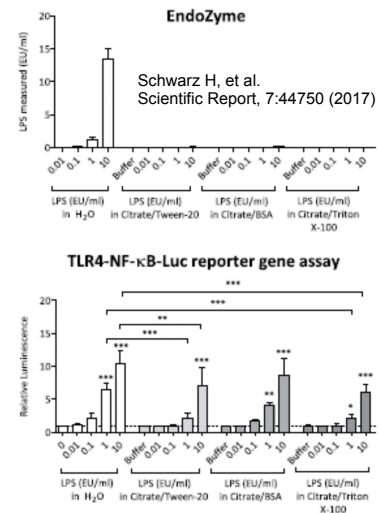
## Toll-Like Receptor (TLR) family

- Major role of immune response to microbial components
- 10 types in human (TLR1-10)
- 12 types in mice (TLR1-9, TLR11-13)

- TLR1/2, 2/6: LTA, LP, etc.
- TLR3: Viral double-stranded RNA
- TLR4: LPS
- TLR5: Bacterial flagellin
- TLR7,8: Small synthetic antiviral molecule, RNA
- TLR9: CpG DNA

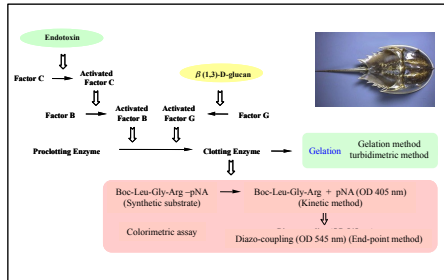


Induction of inflammatory cytokines such as IL-1, IL-6, TNF $\alpha$

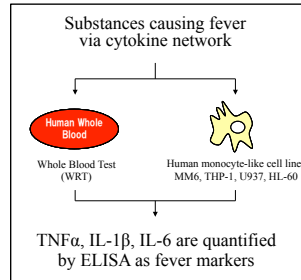


# Currently available pyrogen tests

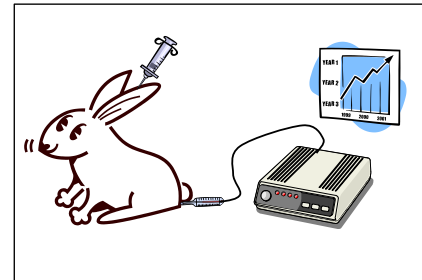
## Endotoxin test



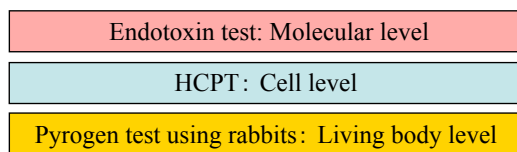
## HCPT



## Pyrogen test using rabbits



Each test method has different measurement principles and has unique characteristics



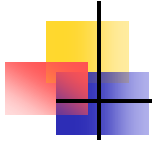
It is important to select the appropriate test method for the test purpose

- Want to assess the pyrogenicity of living body level?
- Evaluation of microbial contamination?
- Does it contain physiologically active substances?
- Does not contain inhibitors?
- Is there any problem with extraction efficiency?
- Quantitative test or limit test?
- What is the cost performance?



## 【Conclusion】 Notes on data pretation

- Purpose of endotoxin control: Prevent contamination of endotoxin in medicine at the manufacturing, storage and distribution stages.
- Some drugs have an enhancing action on biological activity of endotoxin, including fever activity. (Interferon, blood products, actinomycin D, etc.)
- Endotoxin limit is set as the minimum amount to induce fever reaction based on experimental data of healthy human.
- Endotoxin limit should be set in consideration of the toxicity to the patient who is the subject of medication, and it is necessary to consider the safety including individual differences.
- The sensitivity to endotoxin is increased in patients with severe diseases including sepsis and immune dysfunction.
- The endotoxin test enables high sensitivity, high accuracy, simple and rapid measurement. However, it is not valid for non-endotoxin pyrogen tests.
- If necessary, use alternative methods such as HCPT (MAT).
- It is suggested that certain biologics and other samples exhibit LPR phenomenon in endotoxin test.
- In that case, it should be considered regarding implementation of time-hold study with endotoxin-spiked samples, and solutions for LER phenomenon.. If necessary, also consider performing pyrogen test using a rabbit.



At the end of presentation

---

**Thank you for your attention !**

Division of Medical Devices  
National Institute of Health Sciences



Division of  
Medical  
Devices

Yuji Haishima  
haishima@nihs.go.jp