

recording chamber containing the culture medium and loaded with the Ca^{2+} -sensitive fluoroprobe Fluo 3 or Indo 1 and/or the membrane staining fluoroprobe PKH67 or PKH26 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The Ca^{2+} -sensitive probes were loaded using the acetoxy-methyl derivative Fluo 3-AM or Indo 1-AM (Dojin, Kumamoto) at a concentration of $10 \mu\text{M}$. The membrane probes were dissolved in the loading buffer supplied by the manufacturer and applied to the cells at a final concentration of $5 \mu\text{M}$. Then the coverslips with cells were placed in a chamber on the stage of the inverted microscopes and perfused with the normal culture medium as described above to washout the excess fluorescent probes. In the case of hyposmosis under the Ca^{2+} -free extracellular condition, the cells were treated with Ca^{2+} free solution from 30 min before hyposmosis. All the experiments were performed at 37°C .

Confocal imaging of membrane-labeled MDCK cells was performed with LSM510 as in our previous study (10) or with LSM5 LIVE (Carl Zeiss, Jena, Germany). The cells were excited at 488 or 543 nm from an Ar⁺ laser and the emission at wavelengths between 500 and 530 nm or longer than 560 nm, respectively, was detected by photo multipliers. The data obtained were assembled into three-dimensional or two-dimensional (*x-z*) images. The objective used was Plan-Apocromat 63x/1.4 NA oil immersion (Carl Zeiss).

Changes in intracellular Ca^{2+} concentration of MDCK cells loaded with Indo 1 were determined by epifluorescent microscopy. The microscope was IX-70 (Olympus, Tokyo) and the objective was UApocromat 40x/340 water immersion (Olympus). The cells were excited at 360 nm from a Xenon lamp and the emission bands, 395 to 415 nm and 470 to 490 nm, were separated (W-VIEW system; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu), detected by a high-speed cooled CCD camera (C6790, Hamamatsu Photonics), and ratioed after correction of background fluorescence. (Aquacosmos software, Hamamatsu Photonics) as in our previous studies (11, 12).

The osmolarity of the basic culture medium was 300 mOsm as determined by a freezing point-based osmometer. The NaCl concentration was reduced by 100 mM in the hyposmotic media, whose osmolarity was confirmed to be 100 mOsm. After the cells were equilibrated for 30 min in normal or Ca^{2+} -free medium in the absence or presence of $1 \mu\text{M}$ thapsigargin, the perfusate was changed from to the hyposmotic medium.

All data are expressed as means \pm S.E.M. Data were analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple test, and a *P* value less than 0.05 was considered statistically significant.

The cell membrane was clearly stained with the

fluorescent dye PKH67 and the hyposmosis-induced cell swelling could be visualized in three-dimensional images (Fig. 1A). Simultaneous staining of the cells with PKH26 and Fluo 3 enabled simultaneous measurement of cell volume and cytoplasmic Ca^{2+} (Fig. 1: B and C). Hyposmosis induced a transient increase in cell volume, which peaked at 3–10 min and gradually decreased to the reach initial value within about 20 min. The Fluo 3-fluorescence showed a triphasic change: an initial decrease was followed by a transient increase that peaked at 3–10 min, and finally a sustained decrease was observed. The late decrease in cell volume, as well as the transient rise in Fluo 3-fluorescence, was partly reduced in Ca^{2+} -free extracellular media, and it was abolished by pretreatment of the cells with thapsigargin.

To analyze the changes in cytoplasmic Ca^{2+} and cell volume upon hyposmotic challenge more quantitatively, the Ca^{2+} concentration was measured by epifluorescent microscopy (Fig. 2: A and B) and the ratiometric probe Indo 1, and the cell volume was analyzed from *x-z* sections with confocal microscopy (Fig. 2C). The possible decrease in intracellular Ca^{2+} mentioned above could not be observed in Indo 1-loaded cells (Fig. 2A), which indicates that the observed decrease in Fluo 3-fluorescence could be the result of dye dilution as a result of cell volume increase. The increase in cytoplasmic Ca^{2+} was partially reduced in Ca^{2+} -free extracellular media and was significantly abolished by pretreatment with $1 \mu\text{M}$ thapsigargin. The increase in cell volume after hyposmotic challenge was affected neither by the absence of extracellular Ca^{2+} nor by pretreatment with thapsigargin (Fig. 2C). The volume decrease following the initial swelling was significantly reduced by pretreatment with $1 \mu\text{M}$ thapsigargin ($P < 0.01$) irrespective of the presence or absence of extracellular Ca^{2+} during measurement. The decrease in cell volume expressed as a percentage of the initial increase in each cell was $89.1 \pm 4.1\%$ in control cells, $74.4 \pm 14.9\%$ under Ca^{2+} -free extracellular media, $14.12 \pm 11.2\%$ in thapsigargin-pretreated cells, and $23.3 \pm 7.2\%$ in thapsigargin-pretreated cell under Ca^{2+} -free extracellular media (data from 13–16 cells for each group).

The effect of treatment with Ca^{2+} -free extracellular solution on intracellular releasable Ca^{2+} was evaluated with caffeine. The cells were treated with Ca^{2+} -free extracellular solution for different time periods and then 20 mM caffeine was applied. The caffeine-induced peak Ca^{2+} concentration after treatment with Ca^{2+} -free extracellular solution for 0, 10, 30, and 60 min was 722.0 ± 50.5 , 410.0 ± 65.3 , 262.6 ± 23.7 , and 140.8 ± 23.0 nM (data from 20 cells for each group), respectively.

Application of hyposmotic shock to the MDCK cells

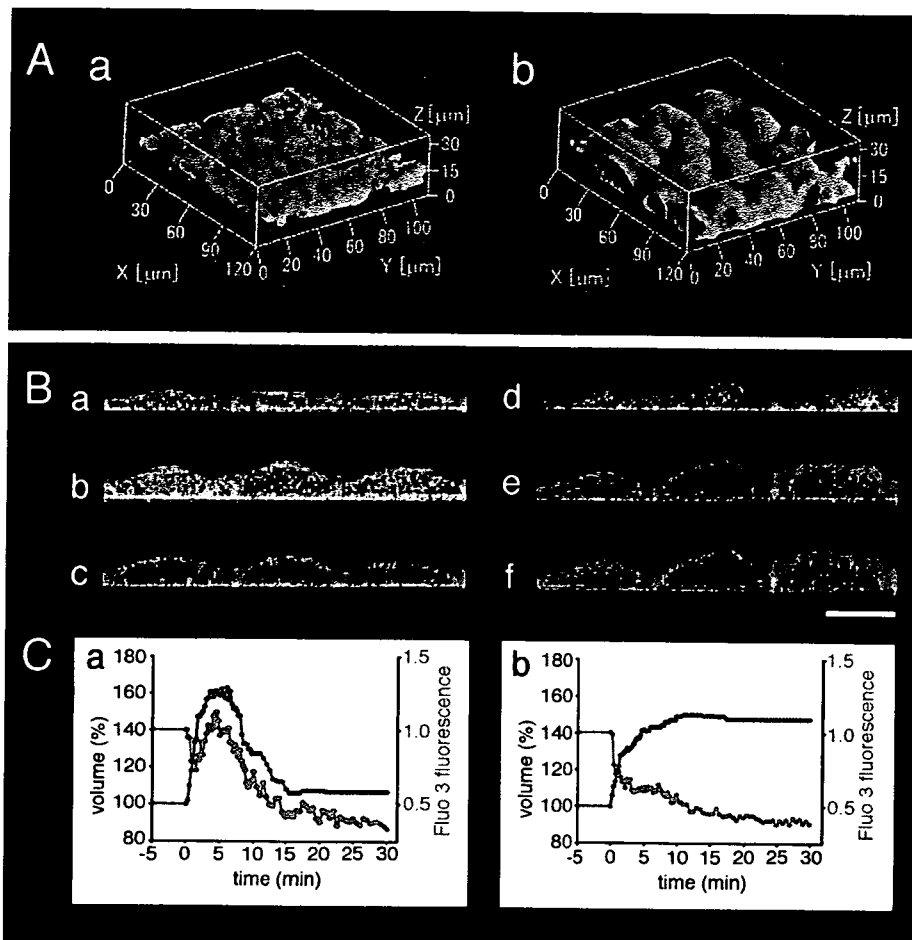


Fig. 1. Changes in cell volume and cytoplasmic Ca²⁺ during hyposmotic shock. **A:** Typical three-dimensional images of MDCK cells under normal osmolarity (a) and at the peak of cell swelling under the hyposmotic condition (b). The cell membrane was stained with PKH67 and excited at 488 nm. Images were obtained with the line-scan mode of LSM5 LIVE. Each x-y image in a single confocal plane was obtained in 56.6 ms, and the distance between confocal planes in the z-direction was 0.6 μm . A total of 52 confocal planes were scanned in 2.9 s to construct each 3-d image. **B:** Typical x-z images of MDCK cells untreated (a, b, c) and pretreated with 1 μM thapsigargin (d, e, f). The images were obtained under normal osmolarity (a, d), at 5 min after hyposmotic shock (b, e), and at 30 min after hyposmotic shock (c, f). The cells were stained with the membrane probe PKH26 and the Ca²⁺ probe Fluo 3 and excited at 543 and 488 nm consecutively under the multi-track mode of LSM510. The fluorescence of PKH26 and Fluo 3 were shown in red and green, respectively, and merged. The horizontal bar indicates 10 μm . **C:** Typical time course of changes in cell volume and cytoplasmic Ca²⁺. The area of the cell in x-z sections was used as an index of cell volume, which was expressed as a percentage of the value under normoxic condition. Fluo 3-fluorescence was also normalized with the value under normal osmolarity (time zero).

induced an increase in cell volume followed by a decrease towards the initial value under persistent hyposmolarity, a process known as regulatory volume decrease. The initial swelling was accompanied by an increase in cytoplasmic Ca²⁺ concentration, a phenomenon observed in this cell line by other investigators (6, 7) and also in other cell lines of renal epithelial origin (8). This increase in cytoplasmic Ca²⁺ was partly reduced under Ca²⁺-free extracellular solution. Although the simplest interpretation is that the increase in Ca²⁺ resulted from activation of Ca²⁺ influx across the cell

membrane (6), involvement of intracellular Ca²⁺ release cannot be excluded because treatment of cells with Ca²⁺-free solution often results in depletion of intracellular Ca²⁺ store sites. In fact, the present experiments with caffeine proved that intracellular Ca²⁺ was indeed gradually decreased during treatment with Ca²⁺-free extracellular solution under the present experimental conditions: the releasable intracellular Ca²⁺ was decreased by more than 60% after 30 min. Furthermore, the hyposmosis-induced rise in cytoplasmic Ca²⁺ was completely inhibited by thapsigargin, which is widely

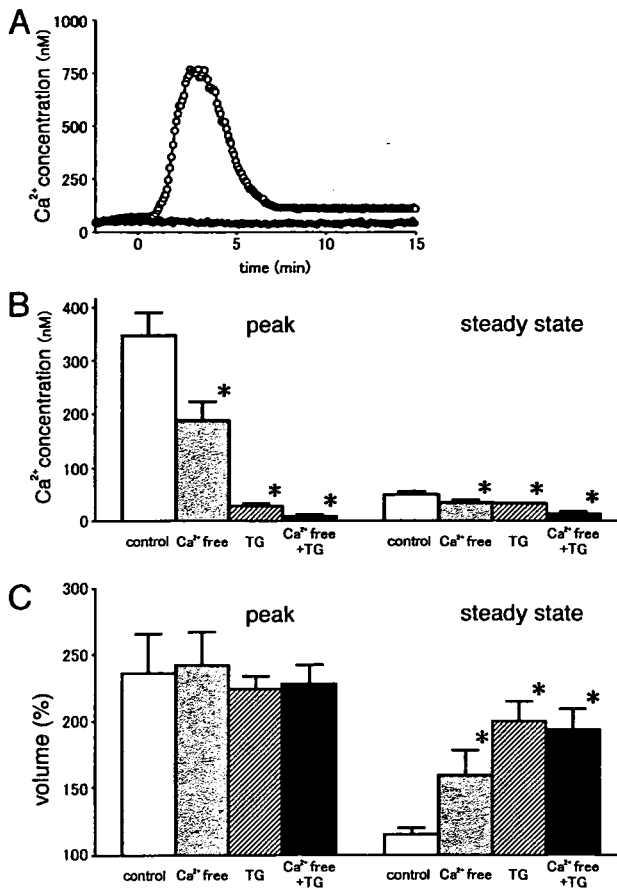


Fig. 2. Cell volume and cytoplasmic Ca²⁺ during hyposmotic shock. **A:** Typical time course of changes in intracellular Ca²⁺ concentration calculated from Indo 1 fluorescence ratio in control cells (open circles) and cells pretreated with 1 μ M thapsigargin (closed circles). Hyposmotic shock was applied at time zero. **B:** Summarized results for the peak and steady state intracellular Ca²⁺ concentration in Indo 1-loaded cells under normal condition (control: open columns), under Ca²⁺-free condition (gray columns), in cells pretreated with thapsigargin (hatched columns), and in cells pretreated with thapsigargin under Ca²⁺-free condition (closed columns). Data are presented as the mean \pm S.E.M. from 25–31 cells. **C:** Summarized results for the peak and steady state cell volume in cells labeled with PKH67 under normal condition (control: open columns), under Ca²⁺-free condition (gray columns), in cells pretreated with thapsigargin (hatched columns), and in cells pretreated with thapsigargin under Ca²⁺-free condition (closed columns). Cell volume was expressed as a percentage of the initial value before hyposmotic shock. Data are presented as the mean \pm S.E.M. from 13–16 cells. Asterisks indicate significant difference from control values, $P < 0.05$.

used as a depleter of the endoplasmic reticulum Ca²⁺ store (Figs. 1 and 2). This indicates that release from intracellular store sites largely contributes to the hyposmosis-induced rise in cytoplasmic Ca²⁺ concentration. Concerning the mechanisms triggering the Ca²⁺ release, one of the possibilities is the IP₃-induced release from the endoplasmic reticulum. Stimulation by agonists

of MDCK cells was reported to result in production of inositol phosphate and release of Ca²⁺ from intracellular stores (13). Translocation of phospholipase C following hyposmotic shock was also observed in MDCK cells, which may be a mechanism to trigger Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum through production of IP₃ (14).

Although the details of the regulatory volume decrease mechanism remains to be investigated, many reports suggest the involvement of osmolyte efflux through potassium and chloride channels. Some researchers postulate that these channels are activated by the decrease in intracellular ionic strength on swelling (15). On the other hand, these ion channels are activated by an increase in intracellular Ca²⁺ concentration. In the present study, the magnitude of the volume decrease under different conditions correlated with the magnitude of the transient increase in cytoplasmic Ca²⁺ concentration. This indicates that the increase in cytoplasmic Ca²⁺ concentration plays a significant role in the regulatory volume decrease following hyposmotic shock in MDCK cells.

In conclusion, the present results suggested that Ca²⁺ released from the intracellular store contributes to the regulatory volume decrease following hyposmotic swelling in MDCK cells.

Acknowledgments

This study was supported in part by a grant-in-aid for Drug Innovation Science Project to T.K. and K.S. from the Japan Health Science Foundation. This study was performed as a part of the project "Research on the molecular mechanisms of appearance of age-related diseases by failure of cell function control system, and their prevention and treatment" by the "Research Center for Aging and Age-related Diseases" established in the Toho University Faculty of Pharmaceutical Sciences.

References

- 1 MacKnight A, Leaf A. Regulation of cellular volume. *Physiol Rev.* 1977;57:510–572.
- 2 Volkl H, Paulmichl M, Lang F. Cell volume regulation in renal cortical cells. *Ren Physiol Biochem.* 1988;11:158–173.
- 3 Takata K, Tajika Y, Matsuzaki T, Aoki T, Suzuki T, Abdouxukur A, et al. Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases: water channel aquaporin-2 of kidney collecting duct cells. *J Pharmacol Sci.* 2004;96:255–259.
- 4 Simmons N. Cultured monolayers of MDCK cells: a novel model system for the study of epithelial development and function. *Gen Pharmacol.* 1982;13:287–291.
- 5 Suzuki C, Iida-Tanaka N, Nishizawa K, Honke K, Matsumoto I, Ishizuka I. [Sulfoglycolipid modifies p38 MAP kinase activation

- by osmotic stress.] *Seikagaku*. 2003;75:781. (abstract in Japanese)
- 6 Rothstein A, Mack E. Volume-activated calcium uptake: its role in cell volume regulation of Madin-Darby canine kidney cells. *Am J Physiol*. 1992;262:C339–C347.
 - 7 Woll E, Ritter M, Haller T, Volkl H, Lang F. Calcium entry stimulated by swelling of Madin-Darby canine kidney cells. *Nephron*. 1996;74:150–157.
 - 8 Yu W, Sokabe M. Hypotonically induced whole-cell currents in A6 cells: relationship with cell volume and cytoplasmic Ca²⁺. *Jpn J Physiol*. 1997;47:553–565.
 - 9 Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Dezaki K, Wang J, Morishima S. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol*. 2001;532:3–16.
 - 10 Kawai H, Suzuki T, Kobayashi T, Sakurai H, Ohata H, Honda K, et al. Simultaneous real-time detection of initiator- and effector-caspase activation by double fluorescence resonance energy transfer analysis. *J Pharmacol Sci*. 2005;97:361–368.
 - 11 Namekata I, Kawanishi T, Iida-Tanaka N, Tanaka H, Shigenobu K. Quantitative fluorescence measurement of cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger by kinetic analysis in stably transfected HEK293 cells. *J Pharmacol Sci*. 2006;101:356–360.
 - 12 Tanaka H, Shimada H, Namekata I, Kawanishi T, Iida-Tanaka N, Shigenobu K. Involvement of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in ouabain-induced inotropy and arrhythmogenesis in guinea-pig myocardium as revealed by SEA0400. *J Pharmacol Sci*. 2007;103:241–246.
 - 13 Aboolian A, Vander Molen M, Nord E. Differential effects of phorbol esters on PGE2 and bradykinin-induced elevation of [Ca²⁺]_i in MDCK cells. *Am J Physiol*. 1989;256:F1135–F1143.
 - 14 Fujii M, Ohtsubo M, Ogawa T, Kamata H, Hirata H, Yagisawa H. Real-time visualization of PH domain-dependent translocation of phospholipase C-delta1 in renal epithelial cells (MDCK): response to hypo-osmotic stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;254:284–291.
 - 15 Nilius B, Prenen J, Voets T, Eggermont J, Droogmans G. Activation of volume-regulated chloride currents by reduction of intracellular ionic strength in bovine endothelial cells. *J Physiol*. 1998;506:353–361.

Miscibility of Nifedipine and Hydrophilic Polymers as Measured by ^1H -NMR Spin–Lattice Relaxation

Yukio ASO,^{*a} Sumie YOSHIOKA,^a Tamaki MIYAZAKI,^a Tohru KAWANISHI,^a Kazuyuki TANAKA,^b Satoshi KITAMURA,^b Asako TAKAKURA,^c Takashi HAYASHI,^c and Noriyuki MURANUSHI^c

^aNational Institute of Health Sciences; 1–18–1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158–8501, Japan; ^bAstellas Pharma Inc.; 180 Ozumi, Yaizu, Shizuoka 425–0072, Japan; and ^cShionogi & Co., Ltd.; 2–1–3 Kuise, Terajima, Amagasaki, Hyogo 660–0813, Japan. Received April 19, 2007; accepted June 4, 2007; published online June 5, 2007

The miscibility of a drug with excipients in solid dispersions is considered to be one of the most important factors for preparation of stable amorphous solid dispersions. The purpose of the present study was to elucidate the feasibility of ^1H -NMR spin–lattice relaxation measurements to assess the miscibility of a drug with excipients. Solid dispersions of nifedipine with the hydrophilic polymers poly(vinylpyrrolidone) (PVP), hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) and α,β -poly(*N*-5-hydroxypentyl)-*L*-aspartamide (PHPA) with various weight ratios were prepared by spray drying, and the spin–lattice relaxation decay of the solid dispersions in a laboratory frame (T_1 decay) and in a rotating frame ($T_{1\rho}$ decay) were measured. $T_{1\rho}$ decay of nifedipine–PVP solid dispersions (3 : 7, 5 : 5 and 7 : 3) was describable with a mono-exponential equation, whereas $T_{1\rho}$ decay of nifedipine–PHPA solid dispersions (3 : 7, 4 : 6 and 5 : 5) was describable with a bi-exponential equation. Because a mono-exponential $T_{1\rho}$ decay indicates that the domain sizes of nifedipine and polymer in solid dispersion are less than several nm, it is speculated that nifedipine is miscible with PVP but not miscible with PHPA. All the nifedipine–PVP solid dispersions studied showed a single glass transition temperature (T_g), whereas two glass transitions were observed for the nifedipine–PHPA solid dispersion (3 : 7), thus supporting the above speculation. For nifedipine–HPMC solid dispersions (3 : 7 and 5 : 5), the miscibility of nifedipine and HPMC could not be determined by DSC measurements due to the lack of obviously evident T_g . In contrast, ^1H -NMR spin–lattice relaxation measurements showed that nifedipine and HPMC are miscible, since $T_{1\rho}$ decay of the solid dispersions (3 : 7, 5 : 5 and 7 : 3) was describable with a mono-exponential equation. These results indicate that ^1H -NMR spin–lattice relaxation measurements are useful for assessing the miscibility of a drug and an excipient in solid dispersions.

Key words miscibility; solid dispersion; spin diffusion; spin–lattice relaxation time; amorphous

Preparing solid dispersions of a poorly soluble drug with water-soluble polymers is a promising method for improving the dissolution characteristics and bioavailability of the drug. Miscibility between a drug and a polymer is considered to be one of the most important factors for obtaining stable solid dispersions.¹⁾

Miscibility of a drug with a polymer is usually evaluated by differential scanning calorimetry (DSC).^{2–6)} When a solid dispersion shows a single glass transition temperature (T_g) between the T_g values of the drug and the polymer, the drug and the polymer are considered to be miscible within the detection limit of DSC.⁷⁾ This method is applicable to a solid dispersion when T_g of the drug and the polymer can be detected clearly, and the temperature ranges of the base line shift due to glass transition do not overlap each other.

The interaction parameter χ of the Flory–Huggins equation provides a measure of miscibility.^{8,9)} Crowley and Zograf measured the water vapor sorption isotherm of indomethacin solid dispersions with PVP and reported that the estimated interaction parameter χ between indomethacin and PVP was greater than 0.5, indicating that indomethacin and PVP are immiscible in terms of χ value.⁸⁾ Although this method is excellent in being able to provide a quantitative measure of miscibility, it may be difficult to apply to unstable amorphous drugs, which crystallize during measurement of water vapor sorption.

A method that can be used as an alternative to DSC or measurement of the interaction parameter χ is analysis of the ^1H spin–lattice relaxation process of solid dispersions, which

has been reported in the fields of polymer alloy and polymer blends. If two polymers are miscible, the relaxation decay of the mixture is describable by a mono-exponential equation, whereas if they are not miscible, relaxation decay is describable by a bi-exponential equation.^{10,11)}

In this paper, the feasibility of ^1H spin–lattice relaxation measurements for evaluating the miscibility of a drug and polymers in solid dispersions was studied. Nifedipine solid dispersions with PVP, HPMC and α,β -poly(*N*-5-hydroxypentyl)-*L*-aspartamide (PHPA) were used as model solid dispersions, and the miscibility measured by ^1H -NMR was compared with that measured by DSC. The dissolution profiles of nifedipine from PVP solid dispersions were compared with those from PHPA solid dispersions to discuss the effects of miscibility on the dissolution rate of nifedipine.

Theory ^1H spin–lattice relaxation rates of respective spins in a solid are usually averaged by a process called spin diffusion. Spin diffusion is the equilibration process of polarizations of spins at different local sites through mutual exchange of magnetization. ^1H spin–lattice relaxation decay for a single-phase solid is describable by a mono-exponential equation with a relaxation rate that is averaged by spin diffusion. When a solid consists of two phases, the spin–lattice relaxation decay is describable by a mono-exponential or a bi-exponential equation depending on both the domain size of each phase and the effective diffusion length (L). L is expressed as follows:

$$L = \sqrt{6Dt} \quad (1)$$

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: aso@nihs.go.jp

where D is the spin diffusion coefficient, and t is the diffusion time. D is a function of the distance between neighboring proton spins and spin-spin relaxation time (T_2), and is reported to be approximately $10^{-12} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ for organic polymers. Typical spin-lattice relaxation time in a laboratory frame (T_1) and that in a rotating frame ($T_{1\rho}$) are of the order of 1 s and 10 ms, respectively. When these values for t were inserted in Eq. 1, effective diffusion lengths of approximately 50 nm and 5 nm were obtained for T_1 and $T_{1\rho}$, respectively. Depending on the domain size of each phase in a solid, the following 3 cases can be expected: (1) when the domain is smaller than about 5 nm, both the spin-lattice relaxation decay patterns in a laboratory frame (T_1 decay) and in a rotating frame ($T_{1\rho}$ decay) are describable by a mono-exponential equation; (2) when the domain size is about 5 to 50 nm, the $T_{1\rho}$ decay pattern is describable by a bi-exponential equation, whereas the T_1 decay pattern is describable by a mono-exponential equation; and (3) when the domain size is larger than about 50 nm, both the T_1 and $T_{1\rho}$ decay patterns are describable by a bi-exponential equation. When the $T_{1\rho}$ decay is describable by a mono-exponential equation, the solid can be considered as a single phase within the detection limit of NMR. T_1 and $T_{1\rho}$ decay thus provide information on miscibility of a drug and a polymer excipient.¹¹⁾

Experimental

Materials Nifedipine (N-7634), PVP (PVP-40) and HPMC (H-3785) were purchased from Sigma (Newcastle, DE, U.S.A.). PHPA was synthesized via polycondensation of L-aspartic acid.¹²⁾ Phenobarbital was obtained from sodium phenobarbital (Wako Pure Chemical Ind., Osaka) by neutralization and subsequent re-crystallization from acetone solutions as described previously.¹³⁾ Other chemicals used were of reagent grade. Nifedipine solid dispersions with PVP, HPMC and PHPA were prepared by a solvent evaporation method using a model GS-310 spray dryer (Yamato, Tokyo, Japan). Drying conditions are summarized in Table I. The solid dispersions obtained were confirmed to be amorphous from microscopic observation under polarized light. Although the drying conditions were not optimized, 50 to 90% of the solid dispersions were obtained. Amorphous nifedipine was prepared by melting and subsequent rapid cooling as reported previously.¹⁴⁾

DSC T_g of nifedipine-PVP and nifedipine-HPMC solid dispersions was measured by modulated temperature DSC using a model 2920 differential scanning calorimeter and a refrigerator cooling system (TA Instruments, Newcastle, DE, U.S.A.). The modulated temperature program used was a modulation amplitude of $\pm 0.5^\circ\text{C}$, a modulation period of 100 s and an underlying heating rate of $1^\circ\text{C}/\text{min}$. For nifedipine-HPMC solid dispersions, T_g was measured at a scanning rate of $20^\circ\text{C}/\text{min}$ using a conventional heating program. Temperature calibration of the instrument was carried out using indium.

NMR T_1 decay and $T_{1\rho}$ decay were measured using a model JNM-MU25 pulsed NMR spectrometer (JEOL DATUM, Tokyo, Japan). The inversion recovery pulse sequence was used to measure T_1 decay. $T_{1\rho}$ decay was measured in a spin locking field of 10 G. All measurements were carried out at 27°C .

X-Ray Powder Diffraction X-Ray powder diffraction patterns of solid dispersions were obtained using a model RINT-TTR II X-ray diffractometer (Rigaku Denki, Tokyo) with $\text{CuK}\alpha$ radiation (50 kV, 300 mA) at a scanning rate of $4^\circ\text{C}/\text{min}$ from $2\theta = 5^\circ$ to 40° .

Nifedipine Dissolution Profile Nifedipine-PVP (3:7) and nifedipine-HPMA (3:7) solid dispersions containing 100 mg of nifedipine were made into disks with a diameter of 2 cm at a pressure of 20 kN. Each disk was mounted on the rotor of the dissolution apparatus and the side surface of the disk was covered with a Teflon film. The sample was rotated at a rate of 100 rpm in 900 ml of distilled water at 37°C . The amount of nifedipine dissolved was measured using a model DM-3100 solution monitor (Otsuka Electronics, Tokyo).

Results and Discussion

Figure 1 shows typical T_1 and $T_{1\rho}$ decay patterns for the

Table I. Conditions of Spray Drying

Drug	Polymer	Solvent ^{a)}	Outlet temperature (°C)	Atomizer gas (l/min)	Feeding rate (ml/min)
Nifedipine-HPMA					
0	10	A	68	7	5
3	7	A	68	7	3
4	6	A	68	7	3
5	5	A	68	7	3
Phenobarbital-HPMA					
3	7	A	68	7	3
Nifedipine-PVP					
0	10	A	90	9	10
3	7	A	90	9	10
5	5	A	90	9	10
7	3	A	68	7	3
Nifedipine-HPMC					
0	10	B	38	11	3
3	7	B	38	11	2
5	5	B	38	11	2
7	3	B	38	11	4

a) Solvent A, ethanol; solvent B, ethanol- CH_2Cl_2 (1:1). Flow rate of drying gas was adjusted to $0.5 \text{ m}^3/\text{min}$.

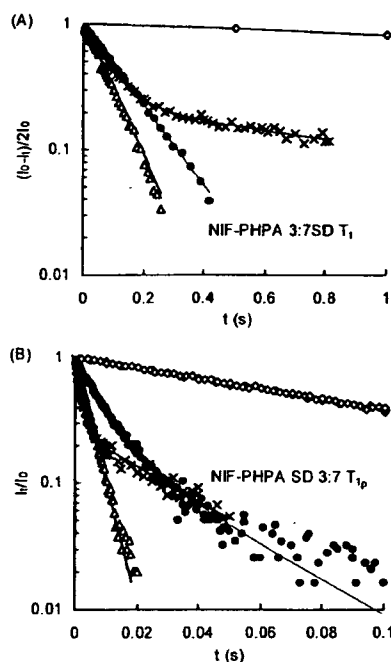


Fig. 1. T_1 (A) and $T_{1\rho}$ (B) Decay Patterns for Amorphous Nifedipine (\diamond), Amorphous PHPA (\triangle), Physical Mixture (\times) and Solid Dispersions (\bullet) of Nifedipine and PHPA

solid dispersion and the physical mixture of nifedipine and PHPA (3:7). T_1 and $T_{1\rho}$ decay patterns were mono-exponential for both amorphous nifedipine and PHPA. The T_1 and $T_{1\rho}$ values of nifedipine were 5.0 s and 104 ms, respectively, and those of PHPA were 0.084 s and 4.4 ms, respectively. The physical mixture of nifedipine and PHPA (3:7) exhibited bi-exponential T_1 and $T_{1\rho}$ decay with the relaxation time of each component, indicating that the particle sizes of nifedipine and PHPA in the physical mixture are much larger than the effective diffusion length (approximately 5 nm and 50 nm for $T_{1\rho}$ and T_1 decay, respectively). In contrast to the physical

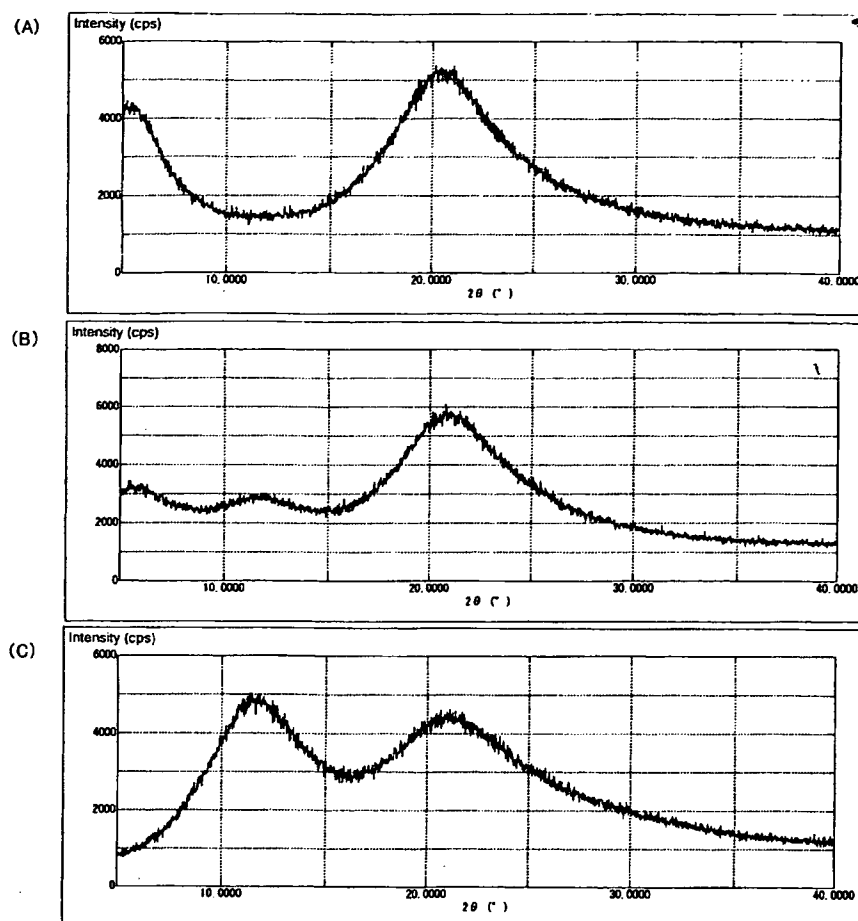


Fig. 2. Powder X-Ray Diffraction Patterns of PHPA (A), Nifedipine-PHPA (3:7) (B) and Nifedipine-PVP Solid Dispersions (3:7) (C)

mixture, the solid dispersion (3:7) showed mono-exponential T_1 decay, whereas bi-exponential $T_{1\rho}$ decay. These results indicate that nifedipine and PHPA are immiscible and that domains 5 to 50 nm in size are present in the solid dispersion. The nifedipine-PHPA solid dispersions (4:6 and 5:5) and the phenobarbital-PHPA solid dispersions (3:7) also exhibited bi-exponential $T_{1\rho}$ decay (data not shown). Figure 2 shows powder X-ray diffraction patterns of the nifedipine-PHPA and nifedipine-PVP solid dispersions. The observed halo pattern indicates that nifedipine in the PHPA dispersions is amorphous at the detection limit of powder X-ray diffractometry.

DSC data supported the contention that nifedipine and PHPA are immiscible. Figure 3 shows typical DSC traces for nifedipine-PHPA solid dispersions. The nifedipine-PHPA solid dispersion (3:7) showed glass transition at approximately 50 °C, corresponding to the T_g of amorphous nifedipine, and at approximately 75 °C, indicating that there are both an amorphous nifedipine phase and an amorphous nifedipine-PHPA phase in the solid dispersion. These DSC data indicate that amorphous nifedipine and PHPA are partially immiscible at this weight ratio. For the nifedipine-PHPA solid dispersion (5:5), T_g of the amorphous nifedipine-PHPA phase was not clearly observed because of the detection limit of DSC, suggesting that $^1\text{H-NMR}$ relaxation measurements can detect immiscibility of drugs and polymers more sensi-

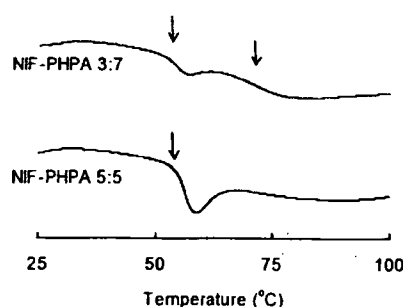


Fig. 3. DSC Traces for Nifedipine-PHPA Solid Dispersions
Arrows represent T_g .

tively than DSC. DSC data suggest that the nifedipine-PHPA solid dispersion (3:7) consists of pure amorphous nifedipine phase and amorphous nifedipine-PHPA phase. NMR data may support this speculation. As shown in Fig. 1B, initial $T_{1\rho}$ decay of the solid dispersion was slower than that of the physical mixture or pure PHPA. This slow relaxation rate of the solid dispersion may indicate that the relaxation rate of PHPA protons was decreased by spin diffusion with nifedipine protons existing near PHPA molecules; in other words, nifedipine-PHPA phase is considered to exist in the solid dispersion. The effect of weight ratios on the $T_{1\rho}$ decay of nifedipine-PHPA solid dispersions needs to examine in order

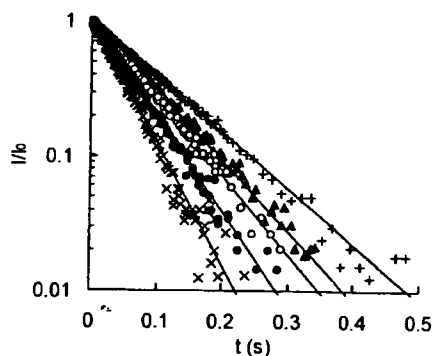


Fig. 4. $T_{1\rho}$ Decay Patterns for Nifedipine (+), PVP (x), and Nifedipine-PVP Solid Dispersions of 7:3 (▲), 5:5 (○), and 3:7 (●)

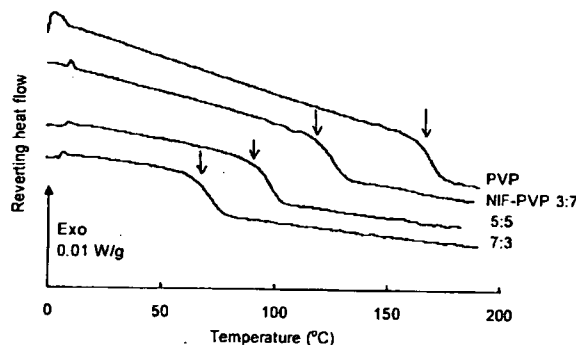


Fig. 5. DSC Traces for Nifedipine-PVP Solid Dispersions
Arrows represent T_g .

to confirm the phase structure of the solid dispersion, since the molecular mobility of PHPA may differ from that of pure PHPA.

In contrast to PHPA, PVP and nifedipine in the solid dispersions (3:7, 5:5 and 7:3) were considered to be miscible from $T_{1\rho}$ relaxation and DSC measurements. Figure 4 shows typical $T_{1\rho}$ decay of the solid dispersions. All the solid dispersions studied exhibited mono-exponential $T_{1\rho}$ decay, whereas physical mixtures of amorphous nifedipine and PVP (3:7, 5:5 and 7:3) exhibited bi-exponential decay (data not shown). Figure 5 shows DSC traces for the nifedipine-PVP solid dispersions. A single glass transition was observed for all of the solid dispersions studied. These data indicate that nifedipine and PVP are miscible at the detection limit of NMR and DSC.

For nifedipine-HPMC solid dispersions, the miscibility of nifedipine and HPMC could not be assessed from T_g measurements. As shown in Fig. 6, base line shift due to glass transition was not obvious for the nifedipine-HPMC solid dispersions (3:7 and 5:5). In contrast to DSC measurements, $T_{1\rho}$ relaxation measurements clearly indicated that nifedipine is miscible with HPMC in the solid dispersions. As shown in Fig. 7, all the nifedipine-HPMC solid dispersions studied showed mono-exponential $T_{1\rho}$ decay. In contrast to the solid dispersions, physical mixtures of amorphous nifedipine and HPMC (3:7, 5:5 and 7:3) exhibited bi-exponential decay (data not shown). These data indicate that NMR can detect miscibility of a drug and an excipient more sensitively than DSC.

Figure 8 shows the dissolution profile of nifedipine from

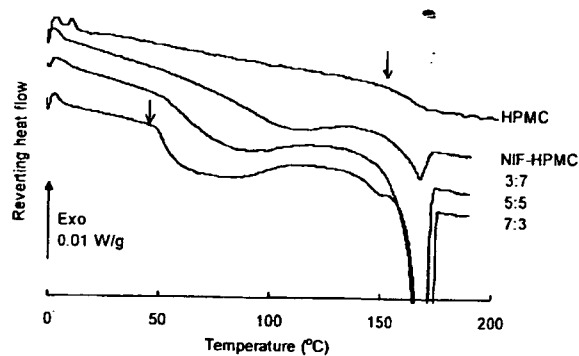


Fig. 6. DSC Traces for Nifedipine-HPMC Solid Dispersions
Arrows represent T_g .

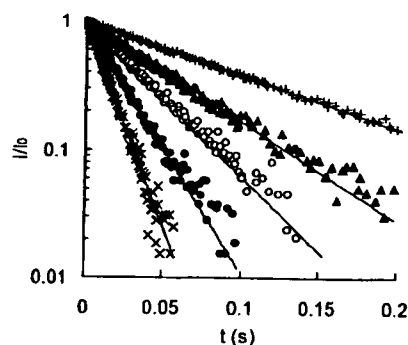


Fig. 7. $T_{1\rho}$ Decay Patterns for Nifedipine (+), HPMC (x), and Nifedipine-HPMC Solid Dispersions of 7:3 (▲), 5:5 (○), and 3:7 (●)

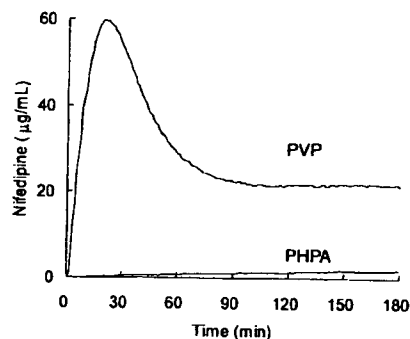


Fig. 8. Dissolution Profiles of Nifedipine from Solid Dispersions with PVP and PHPA

solid dispersions with PVP and PHPA. The nifedipine-PVP solid dispersion exhibited rapid dissolution of nifedipine with super-saturation. In contrast, only a minimal amount of nifedipine was dissolved from the nifedipine-PHPA solid dispersion.

In conclusion, ^1H -NMR spin-lattice relaxation measurements were found to be useful for assessing the miscibility of a drug and excipients in solid dispersions, especially, when T_g is not clearly detected by DSC. The lower miscibility of PHPA than that of PVP and HPMC with hydrophobic drugs is considered due to the more hydrophilic nature of PHPA.

Acknowledgements A part of this work was supported by a Grant-in-aid for Research on Publicly Essential Drugs and Medical Devices from The Japan Health Sciences Foundation.

References

- 1) Forster A., Hemenstall J., Tucker I., Rades T., *Int. J. Pharm.*, **226**, 147–161 (2001).
- 2) Lu Q., Zografi G., *Pharm. Res.*, **15**, 1202–1206 (1998).
- 3) Khougaz K., Clas S. D., *J. Pharm. Sci.*, **89**, 1325–1334 (2000).
- 4) Tong P., Zografi G., *J. Pharm. Sci.*, **90**, 1991–2004 (2001).
- 5) Vasanthavada M., Tong W. Q., Joshi Y., Kislalioglu M. S., *Pharm. Res.*, **21**, 1598–1606 (2004).
- 6) Shmeis R. A., Wang Z., Krill S. L., *Pharm. Res.*, **21**, 2025–2030 (2004).
- 7) Kaplan D. S., *J. Appl. Polym. Sci.*, **20**, 2615–2629 (1976).
- 8) Crowley K. J., Zografi G., *J. Pharm. Sci.*, **91**, 2150–2165 (2002).
- 9) Marsac P. J., Shamblin S. L., Taylor L. S., *Pharm. Res.*, **23**, 2417–2426 (2006).
- 10) Cheung M. K., *Polymer*, **41**, 1469–1474 (2000).
- 11) Asano A., Takegoshi K., "Solid State NMR of Polymers," Chap. 10, ed. by Ando I., Asakura T., Elsevier, Amsterdam, 1998, pp. 351–414.
- 12) Giammona G., Carlisi B., Plazzo S., *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **25**, 2813–2818 (1987).
- 13) Kato Y., Watanabe F., *Yakugaku Zasshi*, **98**, 639–648 (1978).
- 14) Aso Y., Yoshioka S., Kojima S., *J. Pharm. Sci.*, **89**, 408–416 (2000).

平成 17 年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告**

—バイオ医薬品の日局収載環境の整備に関する研究—

川 西 徹*

目 的

バイオ医薬品（細胞培養医薬品及び遺伝子組換え医薬品）の日局各条への収載は、14局におけるヒトインスリン（遺伝子組換え）に始まり、15局では更に3品目（セルモロイキン（遺伝子組換え）、テセロイキン（遺伝子組換え）、注射用テセロイキン（遺伝子組換え））が収載され、更に近々に収載が予定される品目は10品目以上にのぼる。しかし、今後バイオ医薬品の各条収載を円滑に進める上で、検討すべき課題が浮かび上がっている。その一つは、原案作成要領の整備である。現在収載案の作成にあたって参照している「15局作成要領」は、主として化学医薬品の収載案作成を目的としたものである。そのため、バイオ医薬品の各条収載案の作成ガイドとしては不十分な部分があり、長時間の各条審議が必要とされる原因の一つとなっている。したがって、早急に「バイオ医薬品の日局収載にあたっての作成要領」を整備することが望まれる。

そこで本研究は15局局方収載生物薬品原案作成にあたった担当会社の担当者を対象に、15局作成要領の問題点を調査し、15局作成要領の修正・追加が必要と考えられるポイントをまとめるとともに、その対応案を検討した。

研究 方法

15局局方収載生物薬品の原案作成にあたった9社の作成担当者を対象に、15局原案作成要領の生物薬品に関連した部分において、問題点、わかりにくかった点、補うべき点等について、意見を収集した。

これらの指摘をまとめるとともに、16局原案作成要領作成にあたって、改訂すべき点をまとめ、考察した。

研究結果及び考察

1. 指摘された問題点

回答は、6社の担当者から得ることができた。以下がそのまとめである。

1.1 構造式について

既収載の生物薬品の中には、純度が低いもの、あるいは有効成分が混合物からなるものが少なくなかった。しかし今後収載が予定されるバイオ医薬品のほとんどは、純度は極めて高く、有効成分の物理化学的性質、化学構造等の特性解析は相当程度になされており、構造情報の記載が求められる。しかし多様な物質が対象となるとともに、分子多様性を示す製品も多いため、従来作成要領には、その記載法は明確に示されていなかった。この点について、3社からの指摘があり、特に構造式及び分子式・分子量の記載方法を明記するようという要望、N末、C末などに多様性を有するたん白質の場合の表記法の検討、糖たん白質の分子量の表記法に関する記載法の規準、糖鎖構造の表記法に関する意見が寄せられた。

1.2 基原・本質について

生物薬品においては、原薬においても化学構造式からその本質を表現することが困難なものが多かった。このようなものについては、基原、本質及び薬理作用を記載することによって医薬品を定義してきた。しかし医薬品の種類が多種、多様にわたるため、

* 国立医薬品食品衛生研究所 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)

** 本研究は、平成 17 年度日本公定書協会の「日本薬局方の試験法に関する研究」により行ったものである。

基原、本質の記載法については明確にされていなかった。この点に、2社からの指摘があり、その記載法を例示するように要望が出された。

1.3 含量規格について

生物薬品ではバイオアッセイを用いる場合も多く、少数第一位までの%表記は困難という指摘がなされた。

1.4 試験法について

1.4.1 試験法の記載の簡略化

たん白質性医薬品の一般試験法として14局第1追補においてSDSポリアクリルアミド電気泳動法(SDS-PAGE法)、14局第2追補においてたん白質定量法、アミノ酸分析法、ペプチドマップ法、等電点電気泳動法、キャピラリー電気泳動法が収載された。これに伴い、たん白質定量法、SDS-PAGE法、アミノ酸分析法、ペプチドマップ法、等電点電気泳動法については簡略した記載でも可とするよう、要望が出された。

その他、ウェスタンブロット法などのたん白質分析に一般的に使用される試験の場合、あるいはバイオアッセイ法、ELISA法の場合のように検量線について多次回帰、4-パラメータなどで解析方法が非常に複雑な場合については、簡略な記載でも可とするような要望が出された。

また分析機器に依存するところが大きい、アミノ酸分析計、気相シーケンサー、糖鎖電気化学検出器等では、詳細な分析条件を記載するのではなく、機器の機能を特定するような記載(例えば、アミノ酸分析計における各種アミノ酸の分離度等)でも可とするよう要望が出された。

1.4.2 生物薬品特有の試験法の記載例の例示

各種電気泳動法、アミノ酸分析法、ペプチドマップ法、糖鎖マップ法などについては、記載例の作成の要望が出された。

1.4.3 製造工程由来不純物等の記載法

特にバイオ医薬品については、製造方法が異なると不純物が相当程度異なることから、製造工程由来不純物については各条試験法で一律に規定せず、製品に応じて承認申請時に個別に審査する方法が合理的と考えられる項目が少なくない。また各条に規定される規格試験によるのではなく、工程管理試験によってコントロールする方が品質管理法として合理的な場合も少なくない。このようなケースを想定し

て、15局通則11において「医薬品各条において「別に規定する」とあるのは、薬事法に基づく承認の際に規定することを示す」となっており、「別に規定する」として規格試験法や規格を各条に規定する必要はないとされてきた。しかし、その規準が明確でないので、特に純度試験関係で、宿主細胞や異種たん白質の設定の要否、具体的に規定すべきもの、「別に規定する」でよいもの等に関し、考え方を明記するように要望が出された。

1.4.4 平行線検定・力価

生物薬品の力価については“平行線検定”を行うべきものが多いが、“平行線検定”が日局では定義されていないため、これらの計算方法について詳細に備考に記載する必要が生じている。そこでEP/USPと同様に“平行線検定”を定義してほしいという要望が出された。

1.5 生物薬品と化学薬品との規格設定の違いについて

生物薬品においては原薬にエンドトキシンを設定する必要があるが、その場合、日局参考情報の他に実測値も考慮して設定すべきとされてきた。この点を明記するように要望が出された。

1.6 試薬・試液

生物薬品の試験に特有の試薬(血清・酵素・抗体等)の記述範囲について明確にできないか、あるいは試験に用いるキット製品について、記載案(どこまで略記するか)を作成要領に明確にするよう、3社から要望が出された。

2. 作成要領の改訂に関する検討、考察

2.1 構造式の表記について

15局で収載された品目の各条においては、ペプチド及びたん白質性医薬品のアミノ酸配列については、3文字法を採用してきた。今後収載される構造の複雑なたん白質も考慮し、3文字法(概ね20アミノ酸残基以下)以外にも、1文字法(概ね21アミノ酸残基以上)の表記も可とすることが適当と考えられた。更に、構造式の表記法について、ペプチド性医薬品、ペプチド性医薬品及びたん白質性医薬品(ヘテロドマー)、ペプチド性医薬品及びたん白質性医薬品(ホモダイマー)、糖たん白質性医薬品にわけて例示することが適当と考えられた。

分子式及び分子量については、糖たん白質性医薬

品はたん白質部分の分子量・分子式のみを記載し、糖鎖を含めた分子量（概数）は基原に記載することが適当と考えられた。更に、ペプチド性医薬品、ペプチド性及びたん白質性医薬品、糖たん白質性医薬品に分けて、記載例を示すことが適当と考えられた。

2.2 基原・本質について

たん白質性医薬品の有効成分については、化学構造式のみでは本質が表現できないものが少なくない。更に糖たん白質のように翻訳後修飾などにより分子多様性を示すものもある。したがって、15局ではこれら医薬品は、製造方法に関する情報（構造遺伝子の由来や、製造に用いられる細胞基質の由来、遺伝子組換え法によって製造される場合は遺伝子導入法等）を記載することによって定義する方法が取られてきた。そこで基原・本質の記載については、15局の各条審議で合意が得られつつあった記載法を具体的に例示することが適当と考えられた。原薬が水溶液の場合、「水溶液」と明記すること、規格試験に分子量の項がある場合は、その規格値を明記することとする。また分子量の項がない場合では、遺伝子組換え医薬品の場合構造遺伝子の由来を記載し、遺伝子組換え糖たん白質性医薬品については、宿主細胞の種類を記載することとする。更に、ペプチド性医薬品、たん白質性医薬品、糖たん白質性医薬品、遺伝子組換え医薬品、多糖類等に分けて例示することが適当と考えられた。

2.3 含量規格について

たん白質性医薬品の含量規格の例示では、化学薬品原薬には例がないたん白質性医薬品溶液についての含量規格の記載例を示すことが適当と考えられた。

2.4 試験法の記載について

14局追補においてSDS-PAGEが参考情報に収載されて以来、主としてたん白質性医薬品を対象とする6つの試験法が局方参考情報に収載された。本研究において、これら参考情報を参照することで、試験法の簡略記載を要望する声が寄せられた。更にこれら試験法をもとに、作成要領へ記載例を作成するように要望する声が寄せられた。しかしながら、これらの試験法は参考情報であり、主として試験の原理、一般的試験方法及び注意事項の記述が主な内容となっている。また、生物薬品の場合対象物質によって、具体的試験内容は変わる場合が少なくない。したがって、これら参考情報へ収載された試験法を

基に簡略記載することは、必ずしも適当ではなく、また記載例を作成するのも時期尚早と考えられた。ただし、近々の対応としては、各条での実績が生まれ、局方での経験が蓄積され、一般試験法収載が可能となった試験法は、一般試験法への収載を図ることが適切と考えられた。その候補としては、SDS-PAGE、たん白質定量法あるいはペプチドマップ法などがあげられよう。

次に、製造工程由来不純物等の記載方法の一般原則の記載についてであるが、「別に規定する」の定義についての追加説明を、作成要領に追加することが適当と考えられた。生物薬品、とりわけバイオ医薬品の多くは、ICH-Q6Bガイドラインに記されているように、規格及び試験法によるばかりでなく、製造工程の工程管理を組み合わせることによって、医薬品の品質の一定性が図られるようになっている。このような製品については、製品規格によって品質の一定性確保を図る局方への収載品にあたって、工程管理試験をどのように記載するかについてはこれからの大きな課題と考えられる。14局から「別に規定する」という記載方法が採用された理由の一つはそこにある。ただし、各条に表現されたそれぞれの意味については、局方ユーザーには理解しにくいのも確かであろう。生物薬品の製造工程に関して考慮すべき一般的事項については、今後局方の参考情報に解説を収載することが必要と思われる。更にそれとあわせて、「別に規定する」の一般原則の解説の収載についても、今後検討すべき課題となろう。

なお、平行線検定の局方での定義については、作成要領における課題というより、局方の参考情報等への収載がより相応しい対応と考えられ、これも同様に今後の局方改訂の課題の一つとなると思われる。

2.5 生物薬品と化学薬品との規格設定の違い

生物薬品の場合、エンドトキシン試験を原薬に設定する例が少なくない。参考情報のエンドトキシン規格設定値は、エンドトキシンの安全性に関して今まで得られた情報をもとに、最終製剤について定められた数値である。したがって、参考情報の設定値は、生物薬品原薬の規格値として必ずしも適当ではなく、個別には実測値をも考慮した規格値設定が合理的な場合が少なくない。このことを、作成要領の「エンドトキシン試験の設定」に説明することが適当と考えられたが、一方、局方原薬にエンドトキシ

ン試験を設定する必要性についても再度検討が必要かもしれない。

2.6 試薬・試液の記載について

生物薬品の試薬・試液についての記載範囲、あるいはキット製品の記載方法については、各条間に違いが大きく、今回の作成要領については、定まった方針をたてるに至らなかった。次回以降の検討課題としたい。

結 論

16局各条原案作成要領の生物薬品を対象とした

部分の改訂のための調査を行い、問題点を整理、改訂すべきポイントを考察した。その結果、主として、構造式、分子式及び分子量、基原・本質の記載方法の整理を進めることができた。

謝 辞

本研究において、作成要領の問題点のアンケートにご協力をいただいた各社の各条原案作成担当者の皆様に感謝します。作成要領の改訂の具体的な作業は、生物薬品委員会において行われた。ただし、本報告の考察内容に関する責任は、筆者にある。

参考資料： 第16改正日本薬局方原案作成要領 生物薬品関係の改訂部分の抜粋

3.6 構造式

構造式は、「WHO 化学構造式記載ガイドライン (The graphic representation of chemical formulae in the publications of international nonproprietary names (INN) for pharmaceutical substances (WHO/Pharm/95.579)」、<http://www.who.int/medicinedocs/collect/edmweb/pdf/h1807e/h1807e.pdf>」を指針に作成する。

ペプチド及びたん白質性医薬品のアミノ酸配列は、3文字（概ね20アミノ酸残基以下）又は1文字（概ね21アミノ酸残基以上）で表記する。また、ジスルフィド結合及び翻訳後修飾等の構造情報も明記する。ペプチド及びたん白質性医薬品については、通例、次のように記載する。

【例1】 ペプチド性医薬品

Glu-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Lue-Gln-Asn

Glu1, ピログルタミン酸

【例2】 ペプチド性医薬品及びたん白質性医薬品（ヘテロダイマー）

A 鎖

OHC-MIVEQCCTSI CSLYQLENYA CGEAGFFTPE G-NH₂

B 鎖

GIVEQCIIYVL LENYIALYQL PVCQHLGSH LVAAK

B 鎖：K35, プロセシング（部分的）

【例3】 ペプチド性医薬品及びたん白質性医薬品（ホモダイマー）

APAERCELAA ALAGLAFFAP RGYSLGNWVC AEPQGGSOC VEHDCFALYP
 AAKFESNFNT QATNRNTDGS TDYGILQINS GPATFLNASQ ICDGLRGHLM
 RWWCNDGRTP GSRNLCNIPC SALLSSDITA TVRSSVAADA ISLLLNGDGG
 SVNCAKKIVS DGNMNAWVA WRNRCKGTDV QLPPGCGDPK RLGPLRGFQW
 QAWIRGRLV FPATCRPLAV GAWDESVENG GCEHACNAIP GAPRCQAGP
 AALQADGRSC TASATQSCND LCEHFCVNP DQPGSYSCMC ETGYRLAADQ
 HRCEVDVDCI LEPSPCQRC VNTQGGFECH CYPNYDLVDG ECVPEVDPFC
 RANCEYQCP LNQTSYLCVC AEGFAPIPHE PHRCQMFQNO TACPADCQPN
 TQASCSCPEG YILDDGFICT DIDECENGGF CSGVCTNLPG TFECIGPDK

C245, 分子間ジスルフィド結合 ; N322, ヒドロキシアスバラギン

[例4] 糖たん白質性医薬品

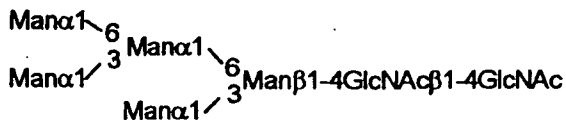
たん白質部分

APAERCELAA ALAGLAFFPAP RGYSLGNWVC AEPQPGGSQC VEHDCFALYP
 AAKFESNFNT QATNRNTDGS TDYGILQINS GPATFLNASQ ICDGLRGHLM
 RWWCNDGRTP GSRNLCNIPC SALLSSDITA TVRSSVAADA ISLLLNGDGG
 SVNCAKKIVS DNGMNAWVA WRNRCKGTDV QLPPGCGDPK RLGPLRGFOW
 QAWIRGRLV FPATCRPLAV GAWDESVENG GCEHACNAIP GAPRCQCAGP
 AALQADGRSC TASATQSCND LCEHFCVNP DQPGSYSCMC ETGYRLAADQ
 HRCEDVDDCI LEPSPCQRC VNTQGGFECH CYPNYDLVDG ECVPEVDPFC
 RANCEYQCQP LNQTSYLCVC AEGFAPIPHE PHRCQMFQNO TACPADCDPN
 TQASCSCPEG YILDDGFICT DIDECENGGF CSGVCTNLPG TFECIGPDK

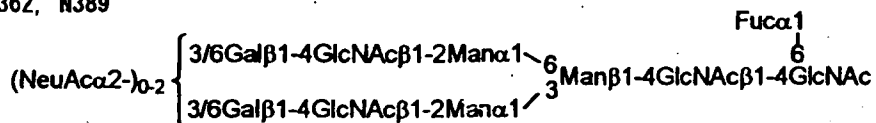
N87, N362, 及び T436, 糖鎖結合 ; N389, 糖鎖結合 (部分的) ;
 S285, グルコシル化 ; N322, ヒドロキシアスバラギン

糖鎖部分

N87



N362, N389



T436

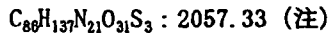


3.7 分子式及び分子量 (組成式及び式量)

3.7.5 生物薬品の分子式と分子量の記載

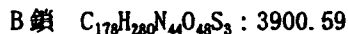
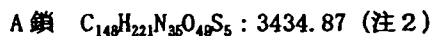
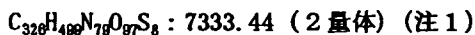
ペプチド性医薬品及びたん白質性医薬品については、その分子式及び分子量を記載する。糖たん白質性医薬品については、たん白質部分の分子式・分子量のみを記載し、糖鎖を含めた分子量(概数)は基原に記載する。ペプチド性医薬品、たん白質性医薬品及び糖たん白質性医薬品は、通例、次のように記載する。

[例] ペプチド性医薬品 (3.6 例1の場合)



注 N末端, C末端, 及び側鎖は非解離状態で計算する。また, Glu1 はピログルタミン酸として計算する。

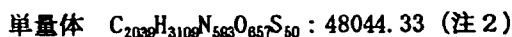
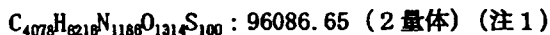
[例] ペプチド性及びたん白質性医薬品 (3.6 例2の場合)



注1 N末端, C末端, 及び側鎖は非解離状態で計算する。分子内及び分子間ジスルフィド結合は結合した状態で計算する。A鎖 M1 はホルミルメチオニンとして計算する。A鎖 T31 はグリシンアミドとして計算する。また, B鎖 K35 は結合しているものとして計算する。

注2 分子内ジスルフィド結合は結合した状態で計算する。分子間ジスルフィド結合は還元型として計算する。

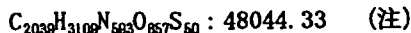
[例] ペプチド性及びたん白質性医薬品 (3.6 例3の場合)



注1 ¹⁵N末端, C末端, 及び側鎖は非解離状態で計算する。N322 はヒドロキシアスパラギンとして計算する。分子内及び分子間ジスルフィド結合は結合した状態で計算する。

注2 分子内ジスルフィド結合は結合した状態で計算する。分子間ジスルフィド結合は還元型として計算する。

[例] 糖たん白質性医薬品 (3.6 例4の場合)



注 N末端, C末端, 及び側鎖は非解離状態で計算する。N322 はヒドロキシアスパラギンとして計算する。

分子内ジスルフィド結合は結合した状態で計算する。N87, 362, 389, T436 及び S285 には糖が結合していないものとして計算する。

3.9.1 基原の記載

生物薬品においては、水溶液の場合は、水溶液であることを明記する。分子量については、規格試験法に分子量の項がある場合は、その規格値を記載する。分子量には幅があってもよい(例:○~△)。分子量の項がない場合で、不純物等が多く混在するなどの理由により分子量を測定できない場合は、理論分子量を記載してもよい。遺伝子組換え医薬品の場合は、構造遺伝子の由来を記載する。また、遺伝子組換え糖たん白質性医薬品については、細胞の種類を明記する。遺伝子組換え医薬品を含む生物薬品は、次のように記載する。

[例] ペプチド性医薬品 (3.6 例1の場合)

「本品は、〈健康な〉××(種)の△△(細胞、組織又は臓器等)から得た18個のアミノ酸残基からなるポリペプチド(分子量△△)である。本品は、〈(ホルモン、酵素、サイトカイン、増殖因子、ワクチン、抗体、血液凝固因子又は阻害剤等)で〉○○活性を有する。」

「本品は、合成された18個のアミノ酸残基からなるポリペプチド(分子量△△)である。本品は、〈(ホルモン、酵素、サイトカイン、増殖因子、ワクチン、抗体、血液凝固因子又は阻害剤等)で〉○○等の作用を有する。」

[例] ペプチド性及びたん白質性医薬品 (3.6 例2の場合)

「本品の本質は、〈健康な〉××(種)の△△(細胞、組織又は臓器等)から得た31個のアミノ酸残基からなるA鎖1分子、及び35個のアミノ酸残基からなるB鎖1分子から構成される◇◇(ポリペプチド又はたん白質)(分子量△△)である。本品は、水溶液である。本品は、〈(ホルモン、酵素、サイトカイン、増殖因子、ワクチン、抗体、血液凝固因子又は阻害剤等)で〉○○活性を有する。」

[例] ペプチド性及びたん白質性医薬品 (3.6 例3の場合)

「本品は、〈健康な〉××(種)の△△(細胞、組織又は臓器等)から得た449個のアミノ酸残基からなるサブユニット2分子から構成される◇◇(ポリペプチド又はたん白質)(分子量△△)である。本品は、〈(ホルモン、酵素、サイトカイン、増殖因子、ワクチン、抗体、血液凝固因子又は阻害剤等)で〉○○作用を有する。」

[例] 糖たん白質性医薬品 (3.6 例4の場合)

「本品の本質は、〈健康な〉××(種)の△△(細胞、組織又は臓器等)から得た449個のアミノ酸残基からなる糖たん白質(分子量約△△)である。本品は、水溶液である。本品は、〈(ホルモン、酵素、サイトカイン、増殖因子、ワクチン、抗体、血液凝固因子、又は阻害剤等)で〉○○活性を有する。」

[例] 遺伝子組換えペプチド性及びたん白質性医薬品

「本品の本質は、××の遺伝子(cDNA又はゲノムDNA等)を導入した組換え体で産生される○○個のアミノ酸残基からなる◇◇(ポリペプチド又はたん白質)(分子量△△)である。本品は、水溶液である。本品は、○○活性を有する。」

[例] 遺伝子組換え糖たん白質性医薬品

「本品の本質は、××の遺伝子(cDNA又はゲノムDNA等)を導入した◇◇細胞で産生される○○個のアミノ酸残基からなる糖たん白質(分子量約△△)である。本品は、水溶液である。本品は、○○作用を有する。」

[例] 遺伝子組換え糖たん白質性医薬品 (アミノ酸置換型)

「本品の本質は、\$鎖#番目の△(アミノ酸)を▽ (アミノ酸)に置換した××をコードする遺伝子(cDNA又はゲノムDNA等)を導入した◇◇細胞で産生される○○個のアミノ酸残基からなる糖たん白質(分子量約△△)である。本品は、水溶液である。本品は、□□活性を有する。」

[例] 遺伝子組換え糖たん白質性医薬品 (融合型)

「本品の本質は、××(1から#番目)及び** (#+1から##番目)をコードする遺伝子(cDNA又はゲノムDNA等)を導入した◇◇細胞で産生される○○個のアミノ酸残基からなる糖たん白質(分子量約△△)である。本品は、水溶液である。本品は、□□活性を有する。」

[例] 遺伝子組換え糖たん白質性医薬品 (融合型 抗体医薬品)

「本品の本質は、××の&&部(例:相補性決定部)及び**の\$\$部(例:定常部及びフレームワーク部)をコードする遺伝子(cDNA又はゲノムDNA等)を導入した◇◇細胞で産生される○○個のアミノ酸残基からなるH鎖2分子及び○○個のアミノ酸残基からなるL鎖2分子から構成される糖たん白質(分子量約△△)である。本品は、水溶液である。本品は、□□活性を有する。」

[例] 遺伝子組換えたん白質性医薬品 (修飾型)

「本品の本質は、××の遺伝子(cDNA又はゲノムDNA等)を導入した組換え体で産生される○○個のアミノ酸残基からなるたん白質(分子量△△)の▽残基に1分子の◎◎(例:ポリエチレングリコール)が共有結合した修飾たん白質(分子量▲▲)である。本品は、水溶液である。本品は、□□活性を有する。」

[例] 多糖類

「本品は、〈健康な〉××(種)の△△(細胞、組織、又は臓器等)から〈得た▲▲(例:ヘパリンナトリウム)の◇◇分解によって得た○○及び◇◇(単糖)からなる◎◎(例:グリコサミノグリカン、低分子量ヘパリン)(分子量約△△)である。本品は、□□活性を有する。」

3.10 成分の含量規定**3.10.1 原薬の記載**

原薬は、通例、次のように記載する。

[例] たん白質性医薬品 (溶液)

「本品は定量するとき、1mL当たり○~○mgのたん白質を含み、たん白質1mg当たり×単位以上を含む」

3.18 製剤試験**3.18.1.2 エンドトキシン試験の設定**

エンドトキシン規格値は、日本薬局方参考情報「エンドトキシン規格値の設定」に基づいて設定する。ただし、たん白質性医薬品の原薬でエンドトキシン試験を設定する必要がある場合には、参考情報に加え必要に応じて実測値も考慮すること。

3.23 その他

3.23.2 「別に規定する」の定義

各条原案作成時には必要な試験項目と規格値を設定する。

しかしながら、原案審議委員会の審議を経て、1.1.2にあるように、生物薬品等の工程由来不純物、残留溶媒、経口固形製剤の溶出性などにみられるように、同一品目であっても製法が異なること等によって、一定の品質の保証に必要な値を画一的に設定することが極めて困難な場合や知的所有権の一部で保護されるべき内容等については、規格値の設定は行わず、「別に規定する」と記載し、適切かつ柔軟な各条規格とすることができる。

「別に規定する」とは、薬事法に基づく製造販売承認書中の規格値として別途規定されていることを意味する。

なお、法に基づく承認審査において設定する必要がないと判断され、承認書に規定されない場合も含む。

Wide-Ranging Molecular Mobilities of Water in Active Pharmaceutical Ingredient (API) Hydrates as Determined by NMR Relaxation Times

SUMIE YOSHIOKA, YUKIO ASO, TSUTOMU OSAKO, TORU KAWANISHI

National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Received 10 October 2007; revised 27 November 2007; accepted 28 November 2007

Published online ? ? ? ? in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/jps.1294&

ABSTRACT: In order to examine the possibility of determining the molecular mobility of hydration water in active pharmaceutical ingredient (API) hydrates by NMR relaxation measurement, spin–spin relaxation and spin–lattice relaxation were measured for the 11 API hydrates listed in the Japanese Pharmacopeia using pulsed ^1H -NMR. For hydration water that has relatively high mobility and shows Lorentzian decay, molecular mobility as determined by spin–spin relaxation time (T_2) was correlated with ease of evaporation under both nonisothermal and isothermal conditions, as determined by DSC and water vapor sorption isotherm analysis, respectively. Thus, T_2 may be considered a useful parameter which indicates the molecular mobility of hydration water. In contrast, for hydration water that has low mobility and shows Gaussian decay, T_2 was found not to correlate with ease of evaporation under nonisothermal conditions, which suggests that in this case, the molecular mobility of hydration water was too low to be determined by T_2 . A wide range of water mobilities was found among API hydrates, from low mobility that could not be evaluated by NMR relaxation time, such as that of the water molecules in pipemidic acid hydrate, to high mobility that could be evaluated by this method, such as that of the water molecules in ceftazidime hydrate.

© 2007 Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmacists Association *J Pharm Sci* 9999:1–11, 2007
Keywords: NMR relaxation time; dynamics; hydrate; DSC; water vapor sorption isotherm

INTRODUCTION

Correlations between chemical stability and molecular mobility have been demonstrated for various amorphous pharmaceuticals in the solid state.¹ Furthermore, the chemical stability of active pharmaceutical ingredient (API) hydrates is suggested to be correlated with the molecular mobility of water of hydration present in the crystalline structure.^{2,3}

Water molecules in API hydrates exhibit a variety of physical states,^{4,5} suggesting a range of molecular mobilities; water molecules incorporated into rigid crystalline structures may have low molecular mobility, whereas less rigid structures contain water molecules with greater mobility. Hydration water plays an important role in determining the physical characteristics—such as solubility⁶ and flowability—of the API hydrate. Therefore, an understanding of the physical properties of hydration water, such as molecular mobility, is critical in the formulation of API hydrates.

The molecular mobility of water in solids may be determined by various methods, such as dielectric relaxation spectroscopy⁷ and FT-Raman

Correspondence to: Sumie Yoshioka (Telephone: 81-3-3700-8547; Fax: 81-3-3707-6950; E-mail: yoshioka@nihs.go.jp)

Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 9999, 1–11 (2007)
© 2007 Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmacists Association

