

Fig. 3 ヘパリンナトリウム *N*-アセチル基のプロトン由来¹³C-サテライトピーク (1.937 及び 2.151 ppm), 及び OSCS の *N*-アセチル基のプロトンのシグナル (2.152 ppm)

装置：JEOL JNM-ECA600 (600 MHz). (A) ヘパリンナトリウムのみ (デカップリングなし), (B) 最終濃度 1.0% (w/w) OSCS 添加ヘパリンナトリウム (デカップリングなし), 及び (C) 最終濃度 1.0% (w/w) OSCS 添加ヘパリンナトリウム (デカップリングあり).

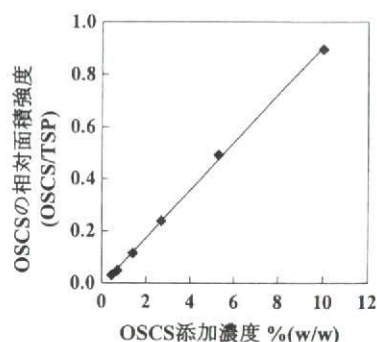


Fig. 4 ¹H-NMRによるOSCSの直線性
ヘパリンナトリウムに最終濃度 0.17~10.0% (w/w) のOSCSを添加したときのTSPのシグナル面積強度に対するOSCSの*N*-アセチル基のプロトンの相対面積強度をプロットした。

Table 1 ¹H-NMRによるOSCS分析の分析能パラメータ

分析能パラメータ	結果
真度 ^a	98.3 % (RSD : 4.63%)
併行精度 ^a	1.6%
特異性	Fig.2 参照
検出限界	0.35 %
定量限界	0.4 %
直線性	Y=0.0909X-0.064 (R ² =0.9991)
範囲	Fig. 4 参照 0.4-10.0 %

^a0.4%OSCSを用いた(n=3).

OSCSを添加したときの回収率は98.3% (RSD: 4.63%)であった (Table 1).

1.4 共同検定

6機関7試験室において、OSCSを最終濃度0.5、1.0及び1.5% (w/w) になるようにヘパリンナトリウムTSP重水溶液に添加し、プロトン共鳴周波数400、500及び600MHzの装置を用いて¹H-NMRを測定した。OSCSの*N*-アセチル基に由来するシグナルは、2.149~2.153ppmの範囲に観察された。各試験室で得られたTSPに対するOSCS

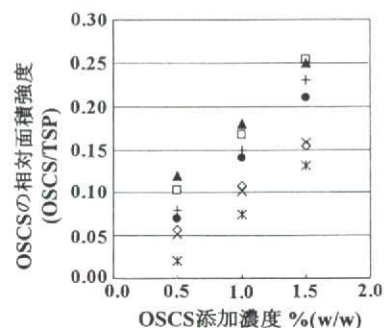


Fig. 5 ¹H-NMRを用いたOSCS限度試験共同検定結果

ヘパリンナトリウムに0.5、1.0、1.5% (w/w) を添加したときのTSPのシグナル面積強度に対するOSCSの*N*-アセチル基のプロトンの相対面積強度。◇, 試験室A; □, 試験室B; ▲, 試験室C; ×, 試験室D; *, 試験室E; ●, 試験室F; +, 試験室G

の *N*-アセチル基の相対シグナル面積強度を Fig. 5 に示す。全試験室で 0.5% 以上の OSCS のシグナルを確認することができたが、一部の試験室では、これ以下の OSCS のシグナルを検出することは難しいと判断された。共同検定結果から、本分析法の検出限界は 0.5% 程度と判断された。共同検定においても、600 MHz の装置を用いた試験室では、¹³C サテライトピークの一部と OSCS の *N*-アセチル基のシグナルが重なることを確認した。

2. DS の分析

2.1 特異性

DS を最終濃度 18.7% (w/w) になるようにヘパリンナトリウム TSP 重水溶液に添加し、500 MHz の装置を用いて ¹H-NMR を測定した。DS の *N*-アセチル基の化学シフトは 2.08 ppm であり、ヘパリンナトリウムの *N*-アセチル基 (化学シフト: 2.05 ppm) と一部重なることが確認された (Fig. 6)。

2.2 検出限界

DS を最終濃度 0.35~18.7% (w/w) になるようにヘパリンナトリウム TSP 重水溶液に添加した溶液を調製し、500 MHz の装置を用いて ¹H-NMR

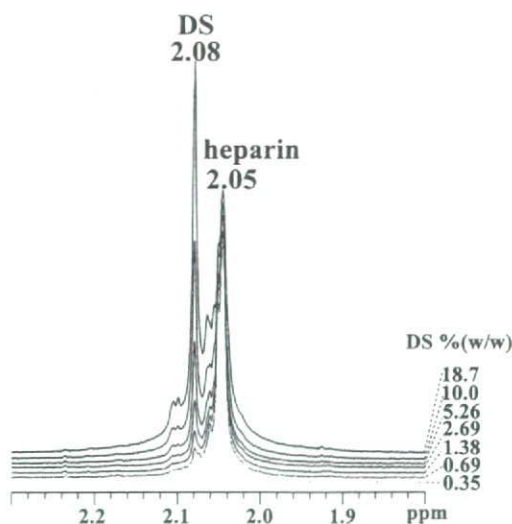


Fig. 6 ヘパリンナトリウム及び DS の *N*-アセチル基のプロトンの化学シフト
0.35~18.7% (w/w) の OSCS をヘパリンナトリウムに添加した。プロトン共鳴周波数: 500 MHz。

を測定したとき、0.35% の DS のシグナルを確認することができた。しかし、それより低い濃度の DS の検出は難しいと思われた (Fig. 6)。

2.3 直線性、範囲、再現性

500 MHz の装置及びピーク形状補正が可能なソフトウェアを用いて、最終濃度 0.35~18.7% (w/w) の DS を添加したヘパリンナトリウム溶液の ¹H-NMR を測定し、DS のシグナル面積強度を TSP に対する相対面積強度で表したとき、0.6~18.7% の範囲で直線性が確認され、その相関係数は 0.9998 であった (Fig. 7)。0.6% の DS を添加したときの併行精度は 1.5% であった。添加回収率は 102.6% (RSD: 3.99%) であった (Table 2)。

2.4 共同検定

6 機関 7 試験室において、最終濃度 1.0, 1.5 及び 2.0% (w/w) の DS を添加したヘパリンナトリウム試料溶液の ¹H-NMR を測定し、TSP に対する DS の *N*-アセチル基の相対シグナル面積強度を求めた (Fig. 8)。500 MHz 以上の装置とピーク形状補正が可能なソフトウェアを用いた試験室では、直線性を確認することができた (試験室 A, C 及び D)。しかし、500 MHz の装置を用いても、ピーク形状補正可能なソフトウェアを使用しない場合、DS のシグナルがヘパリンのシグナルと重なっているため、DS の濃度が見かけ上多く算出されることが明らかとなった。また、400 MHz の装置を用いた試験室では、ヘパリンナトリウムの *N*-アセチル基

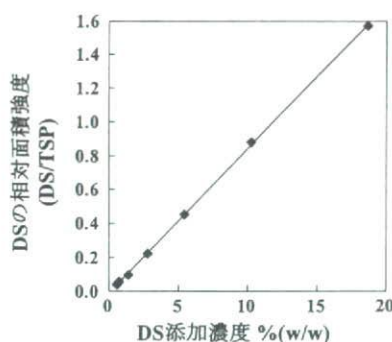


Fig. 7 ¹H-NMR による DS の直線性
ヘパリンナトリウムに 0.35~18.7% (w/w) の DS を添加したときの TSP のシグナル面積強度に対する DS の *N*-アセチル基のプロトンの相対面積強度をプロットした。

Table 2 ¹H-NMRによるDS分析の分析能パラメータ

分析能パラメータ	結果
真度 ^a	102.6% (RSD: 3.99%)
併行精度 ^a	1.5%
特異性	Fig. 6 参照
検出限界	0.35 %
定量限界	0.6 %
直線性	Y=0.08534X-0.0113 (R ² =0.9998)
範囲	Fig. 7 参照 0.6-18.7 %

^a0.6 %DSを用いた(n=3).

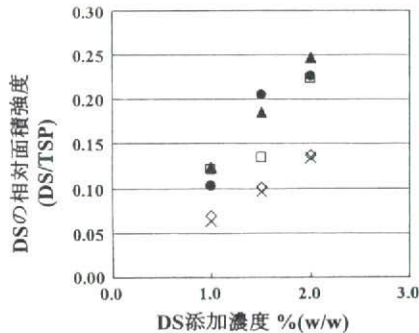


Fig. 8 ¹H-NMRを用いたDS限度試験共同検定結果

ヘパリンナトリウムに1.0, 1.5, 2.0% (w/w) 添加したときのTSPのシグナル面積強度に対するDSのN-アセチル基のプロトンの相対面積強度. ◇, 試験室A; □, 試験室B; ▲, 試験室C; ×, 試験室D; *, 試験室E; ●, 試験室F; +, 試験室G

とDSのN-アセチル基を分離することができなかった。

考 察

1. OSCS

¹H-NMRを用いた分析法は、OSCSに対する特異性が高いこと、また共同検定に参加したすべての機関において、検出限界に近い0.5% (w/w) のOSCSを検出できたことから、ヘパリンナトリウムに混入しているOSCSを対象とした純度試験とし

て、日本薬局方各条に採用することが可能であると判断された。本分析法を用いたときの規格等は以下のように考察された。

1.1 化学シフト

国内6機関7試験室において、OSCSのN-アセチル基は2.149~2.153 ppmに観察されたことから、化学シフトの規格は、2.15 ppmを中心に±0.02 ppmと設定することが適当であると判断された。なお、米国薬局方は、OSCSのN-アセチル基の化学シフトの規格として2.16±0.03 ppmと設定しているが、2008年3月6日に公表された米国FDAのヘパリンナトリウム中の不純物検出法では、2.15±0.02 ppmが採用されている。

1.2 限度値

OSCSは、有害事象の原因物質であること、また、製造工程由来物質や目的物質関連物質として混入する可能性がないことから、ヘパリンナトリウム中に検出されるべきではない。したがって、本試験法における規格は、「ヘパリンナトリウム中にOSCSのN-アセチル基に由来するシグナルが検出されないこと」が適当であると考えられる。ただし、共同検定で得られた本試験法の検出限界は0.5%であることから、本試験法は、0.5%程度の限度試験であり、OSCSの含量が0.5%以下であることを保証するものと解釈される。OSCSをより高感度で測定できる試験機関において、2.15±0.02 ppmの範囲にシグナルが観察された場合、そのシグナルの面積強度が0.5%以下に相当すると推定されても、その検体は規格に適合しないと判断すべきと考えられる。

1.3 システム適合性

本試験法は0.5%程度の限度試験であるので、システム適合性において、OSCSの化学シフトだけでなく、分析システムが0.5%のOSCSを検出できることを確認することが重要である。すなわち、0.1 mg/0.6 mLのOSCSが溶解したTSP含有重水溶液に、約20 mgのヘパリンナトリウム試薬を溶解して¹H-NMRを測定したとき、2.02~2.06 ppm及び2.13~2.17 ppmにそれぞれヘパリンとOSCSのN-アセチル基に由来するシグナルが検出されることを確認する必要がある。ここで使用するヘパリンナトリウム試薬は、OSCSが混入していないことを確認したものに限られる。なお、国立衛研によって、日局ヘパリンナトリウム標準品中のOSCSが

検出限界未満であることが確認されているので、日局ヘパリンナトリウム標準品を用いてOSCSが混入していないことを確認した後、そのヘパリンナトリウムをヘパリンナトリウム試薬として用いることは可能である。

1.4 ¹³C サテライトピーク

¹H-NMR スペクトルでは、プロトンとカーボンが直接結合している場合、¹H と ¹³C (天然存在比、約 1.1%) のカップリングにより、プロトンのメインピークの両側に 2 本の ¹³C サテライトピークが観測される。両サテライトピークの化学シフトの間隔 (ppm) は [¹H-¹³C のカップリング定数 (Hz)/¹H 共鳴周波数 (MHz)] で決まることから、ヘパリンの *N*-アセチル基のプロトンが 2.04 ppm に観測される場合、400、500 及び 600 MHz の装置を使用したときの低磁場側の ¹³C サテライトピークは、それぞれ 2.20、2.17、及び 2.15 ppm に観測されることになる (*N*-アセチル基のプロトンの ¹H-¹³C カップリング定数：約 130 Hz)⁹⁾。今回の共同研究でも、600 MHz の装置を用いた場合、¹³C サテライトピークが OSCE の *N*-アセチル基のプロトンシグナルとはほぼ同じ位置に観測されることが確認された。しかし、¹³C サテライトピークは、ヘパリンナトリウムの *N*-アセチル基のメインピークを中心として対称に観察されること、ヘパリンナトリウムの *N*-アセチル基に対するシグナル面積強度の 0.55% であること、また、デカップリングによって消失することから⁹⁾、OSCE 由来のシグナルと識別可能であると思われる。¹³C サテライトピークの可能性があるシグナルが 2.13~2.17 ppm に検出された場合、デカップリングなどにより、OSCE か ¹³C サテライトピークかを確認する必要がある。

1.5 装置の適用範囲

米国薬局方では 500 MHz 以上の装置が採用されているが、国内 6 機関 7 試験室による共同検定の結果、400 MHz の装置でも OSCE とヘパリンのシグナルを分離できること (同程度の特異性)、並びに 0.5% 以上の OSCE を検出できること (同程度の検出限界) が確認された。また、400 MHz の装置を所有している国内メーカーが多いことから、日本薬局方のヘパリンナトリウム純度試験では 400 MHz 以上の装置を採用することが適当であると考えられる。欧州薬局方も 400 MHz の NMR の使用を認めてい

る。本研究では、プロトン共鳴周波数 300 MHz 以下の装置の適用可能性を評価していないので、300 MHz 以下の装置を使用する場合は、今回と同様なバリデーションスタディを実施しなければならない。その結果、同程度の特異性と検出限界が確認できれば、OSCE 分析法として用いることは可能である。なお、最終的な判断が必要となった場合は、400 MHz 以上の装置を用いる必要がある。

2. DS

500 MHz の装置を用いた分析能パラメータ評価では、DS とヘパリンの識別が可能であること、また、0.6~18.7% (w/w) の範囲で直線性があることが確認された。しかし、ピーク形状補正を行わない場合や、400 MHz の装置を用いた場合は、定量性や特異性に問題があることが明らかになった。共同検定の結果から、NMR による DS 分析を日本薬局方の試験法として設定することは適当ではないと判断されるが、各機関において、プロトン共鳴周波数 500 MHz 以上の装置を用い、ピーク形状補正が可能なソフトウェアを用いた場合は、DS の定量試験として利用することは可能であると考えられる。

DS の規制の必要性については、DS はヘパリンとは異なる物質であるので、純度試験として適切に規制するべきであるとする意見と、これまで毒性等の報告がないので、必ずしも純度試験等により規制する必要はないとの意見があり、国際的にも見解が分かれている。今後、国内ヘパリンナトリウムの DS の混入状況について正確に把握した上で、規制が必要か否か検討していく必要がある。その結果、必要と判断された場合は、FDA が提案しているキャピラリー電気泳動法などの NMR 以外の方法を日本薬局方における純度試験法として設定する必要があるだろう。

謝 辞

有益なご助言をいただきました自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター生命環境研究領域、生命分子研究部門加藤晃一教授、国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部鹿庭なほ子室長、独立行政法人医薬品医療機器総合機構早川堯夫顧問及び小嶋茂雄顧問、ヘパリンナトリウムをご供与いただきました日本バルク薬品㈱及びニプロファーマ㈱並

びに日局ヘパリンナトリウム標準品をご供与いただきました(財)日本公定書協会に深く御礼申し上げます。本研究の遂行にご協力いただきました厚生労働省医薬食品局審査管理課鷺田淳専門官、鈴木克之主査、独立行政法人医薬品医療機器総合機構品質管理部基準課上野清美課長、森田収氏、仁後知子氏に感謝いたします。また、有益なご討論をいただいた日本薬局方部会、日本薬局方原案審議委員会生物薬品委員会、FDA、米国薬局方、欧州薬局方、及びヘパリンナトリウム製剤製造会社の関係各位にお礼申し上げます。

本研究の一部は厚生労働省の支援によって行われたものである。

文 献

- 1) <http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/default.htm>.
- 2) Sugahara, K., Yamada, S.: *Trends in Glycoscience and Glycorechnology*, **12**, 321-349 (2000).
- 3) Guerrini, M., Beccati, D., Shriver, Z., *et al.*: *Nat Biotechnol.*, **26**(6), 669-675 (2008).
- 4) Kishimoto, T. K., Viswanathan, K., Ganguly, T., *et al.*: *N. Engl. J. Med.*, **358**(23), 2457-2467 (2008).
- 5) Maruyama, T., Toida, T., Imanari, T., Yu, G., Linhardt, R. J.: *Carbohydr. Res.*, **306**(1-2), 35-43 (1998).
- 6) <http://www.usp.org/hottopics/heparin.html>.
- 7) http://www.edqm.eu/medias/fichiers/Heparin_sodium_monograph_Revised.pdf.
- 8) Montgomery, R. I., Lidholt, K., Flay, N. W., Liang, J., Vertel, B., Lindahl, U., Esko, J. D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **89**(23), 11327-11331 (1992).
- 9) Yamaguchi, H., Shinagawa, M., Shimba, N., Miyano, H., Suzuki, E.: *Yakugaku Zasshi*, **128**(10), 1513-1515 (2008).

ヘパリン純度試験に関する研究 (第2報)

¹H-NMRによるヘパリンカルシウム純度試験に関する研究

橋井 則貴^{*1}, 川崎 ナナ^{*1}, 高倉 大輔^{*1}, 伊藤さつき^{*1},
 福原 潔^{*2}, 品川 麻衣^{*3}, 榛葉 信久^{*3}, 有村 雅敏^{*4},
 辰巳 昌史^{*4}, 奥田 晴宏^{*2}, 山口 照英^{*1}

(受付:平成20年8月14日, 受理:平成20年9月22日)

Studies on the Heparin Purity Test (Part 2)

Study on the Heparin Calcium Purity Test by ¹H-NMR

Noritaka HASHII^{*1}, Nana KAWASAKI^{*1}, Daisuke TAKAKURA^{*1}, Satsuki ITOH^{*1},
 Kiyoshi FUKUHARA^{*2}, Mai SHINAGAWA^{*3}, Nobuhisa SHIMBA^{*3},
 Masatoshi ARIMURA^{*4}, Masashi TATSUMI^{*4},
 Haruhiro OKUDA^{*2} and Teruhide YAMAGUCHI^{*1}

緒 言

ヘパリンカルシウムは、健康なブタの腸から得られるグリコサミノグリカンのカルシウム塩で、ウロン酸 (L-イズロン酸又はD-グルクロン酸) とD-グルコサミンの2糖単位に硫酸エステル基が2~2.5個結合した構造をもつ (Fig. 1A)。抗凝固活性を有し、血液体外循環時における灌流血液の凝固防止 (人工腎臓及び人工心肺等)、汎発性血管内血液凝固症候群の治療、血管カテーテル挿入時の血液凝固の防止、輸血及び血液検査の際の血液凝固の防止、血

栓塞症 (静脈血栓症、心筋梗塞症、肺塞栓症、脳塞栓症、四肢動脈血栓塞栓症、手術中・術後の血栓塞栓症等) の治療及び予防に適応されている。ヘパリンカルシウムは、米国薬局方及び欧州薬局方に収載されているが、我が国においては日本薬局方外医薬品規格2002 (局外規) 収載品目であり、今後日本薬局方第15改正第二追補への収載が予定されている。

2007年11月以降米国及びドイツにおいて、ヘパリンナトリウムを急速大量投与された患者における急激な血圧低下や急性炎症反応が相次いで報告され

^{*1} 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)
 Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1
 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan
^{*2} 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 同上
 Division of Organic Chemistry
^{*3} 味の素㈱ライフサイエンス研究所 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1 (〒210-8681)
 Institute of Life Sciences, Ajinomoto Co., 1-1 Suzuki-cho, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-
 8681, Japan
^{*4} 沢井製薬㈱ 大阪市淀川区宮原 5-2-30 (〒532-0003)
 Sawai Pharmaceutical Co., 5-2-30 Miyahara, Yodogawa-Ku, Osaka 532-0003, Japan
 Corresponding author: Nana Kawasaki, Division of Biological Chemistry and Biologicals, National
 Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan
 E-mail: nana@nihs.go.jp

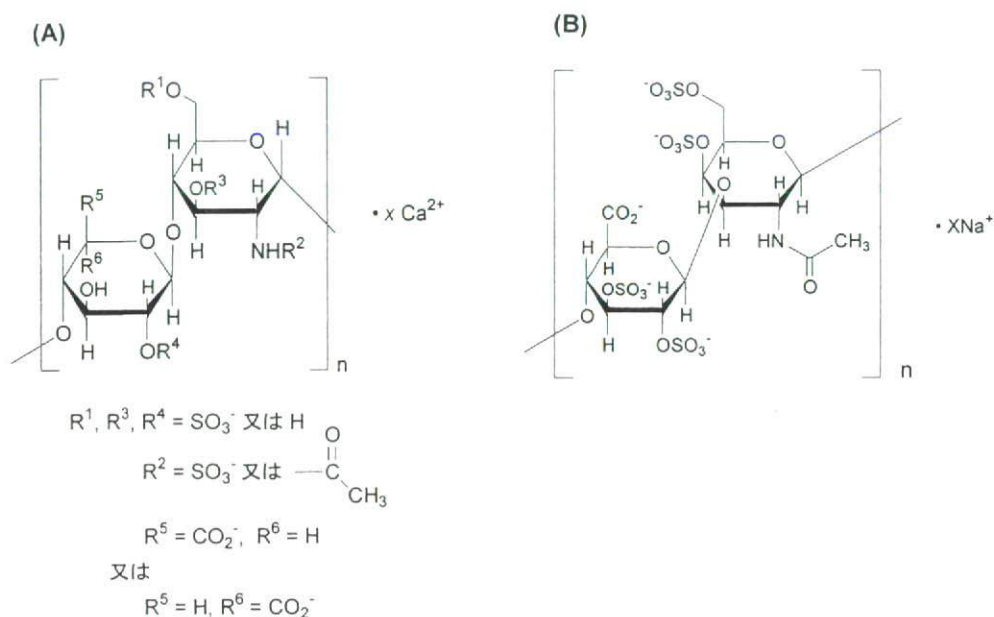


Fig. 1 (A) ヘパリンカルシウム及び (B) OSCS の構造

た。米国食品医薬品庁 (FDA) は、有害事象の原因物質としてヘパリンナトリウムに混入していた過硫酸化コンドロイチン硫酸 (Over-sulfated chondroitin sulfate, OSCS) を特定し (Fig. 1B)^{1,2)}、¹H-NMR 及びキャピラリー電気泳動を用いたヘパリンナトリウム中の OSCS スクリーニング法を公開した³⁾。各国の規制当局及びヘパリン製造メーカーは、直ちに FDA の方法を用いたヘパリンナトリウムの分析を実施し、日本薬局方、米国薬局方及び欧州薬局方も、迅速対応としてヘパリンナトリウム各条における OSCS の限度試験の設定を検討することとなった^{4,5)}。同時に各国では、ヘパリンカルシウムや低分子量ヘパリンナトリウム等に関しても OSCS の限度試験の設定の必要性が検討された^{6,7)}。

本研究は、我が国におけるヘパリンカルシウムの品質・安全性確保を目的として、¹H-核磁気共鳴スペクトル (¹H-NMR) を用いたヘパリンカルシウム中の OSCS 分析法を開発するとともに、局外規各条ヘパリンカルシウム純度試験としての適用可能性を検証したものである。

実験方法

1. 試料

OSCS は日本バルク薬品㈱から供与されたヘパリ

ンナトリウムより弱陰イオン交換カラムを接続した HPLC で精製したものを用いた⁸⁾。ヘパリンカルシウムは味の素㈱及び沢井製薬㈱から供与されたヘパリンカルシウムを使用した。3-トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム-*d*₄ (TSP; 重水素化率, 98%) は、アルドリッチから購入した。重水は重水素化率 99.9~99.96% のものを使用した。

2. 分析条件

ヘパリンカルシウム原薬 20 mg を最終濃度 0.01% (w/v) TSP を含む重水溶液 (TSP 重水溶液) 0.60 mL に溶かして試料溶液とした。この液につき TSP を内部基準物質として日本薬局方一般試験法 NMR <2.21> に従い ¹H-NMR を測定した。温度は 25°C に設定し、スピニングはオフとした。データポイント数は 32,768 とし、スペクトル範囲は DHO のシグナルを中心に ± 6.0 ppm とした。パルス角は 90°、繰り返しパルス待ち時間は 20 秒、ダミースキューンは 4 回とした。ヘパリンの *N*-アセチル基のプロトンのシグナルの S/N 比が 200 以上得られるまで積算した。ウィンドウ関数は指数関数 (Line broadening factor = 0.2 Hz) を用いた。

3. 特異性及び検出感度の評価

ヘパリンカルシウムをTSP重水溶液に溶解してヘパリンカルシウムTSP重水溶液とした(20 mg/0.6 mL)。この液に、最終濃度0.5、1.0、2.0及び10.0% (w/w) OSCSを添加した後、JEOL JNM-ECA 500 (500 MHz)を用いて¹H-NMRを測定した。TSPのシグナル面積強度に対するOSCSの*N*-アセチル基に由来するシグナルの相対面積強度を求めた。

4. 共同検定

国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部、同有機化学部、味の素㈱、沢井製薬㈱が参加した。ここでは試験室を便宜上A~Dと記す(順不同)。試験室AはVarian MERCURY VX 400 (400 MHz)、試験室BはJEOL JNM-ECA 500 (500 MHz)、試験室CはBruker AVANCE 500 (500 MHz)、試験室DはBruker AVANCE 600 (600 MHz)を使用した。

ヘパリンカルシウムTSP重水溶液に、最終濃度0.5及び10% (w/w)となるようにOSCSを添加して試料溶液(20 mg/0.6 mL)とした。この液につき¹H-NMRを測定し、OSCS及びヘパリンカルシウムの*N*-アセチル基のプロトンに由来するシグナルの化学シフト及びS/N比、並びにヘパリンカルシウムの*N*-アセチル基の¹³Cサテライトピークの化学シフトを求めた。

結 果

1. 特異性

プロトン共鳴周波数500 MHzの装置を用いてヘパリンカルシウムの¹H-NMRを測定したとき、ヘパリンカルシウムの*N*-アセチル基に由来するシグナルは、2.05 ppm付近に観測された(Fig. 2A)。次に、ヘパリンカルシウムに1%のOSCSを添加して¹H-NMRを測定したところ、OSCSの*N*-アセチル基に由来するシグナルは2.18~2.19 ppmに観測された(Fig. 2B)。この結果を1% OSCS添加ヘパリンナトリウムのスペクトルと比較したところ、ヘパリンカルシウム中のOSCSの*N*-アセチル基のシグナルは、ピーク形状がブロードで、化学シフトは低磁場側にシフトしていることが確認された(Fig. 2B及び2C)。

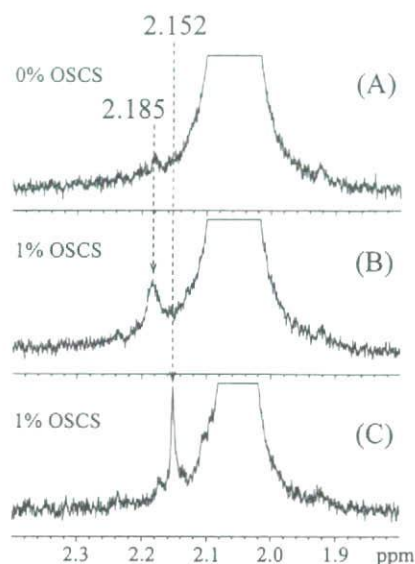


Fig. 2 (A) ヘパリンカルシウム、(B) 1%OSCS添加ヘパリンカルシウム、及び(C) 1%OSCS添加ヘパリンナトリウムの¹H-NMRスペクトル(1.8~2.4 ppm)

2. 検出限界

ヘパリンカルシウムに、ヘパリンナトリウム中のOSCSの検出限界に相当する0.5%のOSCSを添加し、プロトン共鳴周波数500 MHzの装置を用いて¹H-NMRを測定したとき、OSCSの*N*-アセチル基に由来するシグナルは、ヘパリンカルシウムの*N*-アセチル基の¹³Cサテライトピークと重なることが分かった。しかし、0.5% OSCSのシグナル面積強度は、高磁場側に観測される¹³Cサテライトピークのシグナル面積強度に比べて有意に大きいこと、更にデカップリング法により¹³Cサテライトピークを消去して¹H-NMRを測定した場合でも0.5%のOSCSの*N*-アセチル基に由来するシグナル(2.185 ppm)を確認できたことから、0.5%のOSCSは検出可能と判断された(Fig. 3)。

3. 共同検定

プロトン共鳴周波数400 MHz以上の装置を用いて、3機関4試験室において、0.5及び10.0% OSCSを含むヘパリンカルシウムの¹H-NMRを測定したところ、ヘパリンカルシウムとOSCSの*N*-アセチル基に由来するシグナルは、それぞれ2.05 ppm

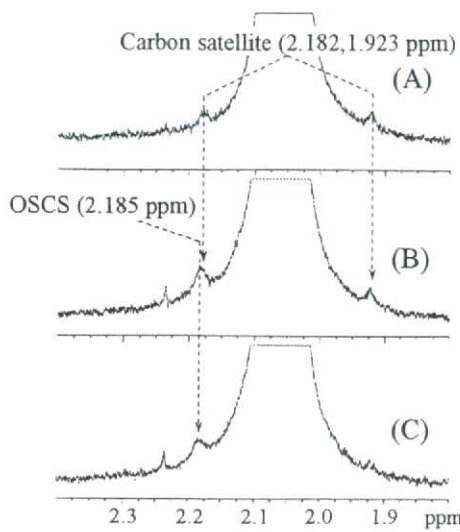


Fig. 3 0.5% OSCS をヘパリンカルシウムに添加したときの OSCS の *N*-アセチル基のシグナル及び ¹³C-サテライトピーク

(A) ヘパリンカルシウムのみ (デカップリングなし), (B) 0.5% OSCS 添加ヘパリンカルシウム (デカップリングなし), 及び (C) 0.5% OSCS 添加ヘパリンカルシウム (デカップリングあり).

付近及び 2.18~2.19 ppm に観測された (Table 1). 400, 500 及び 600 MHz の装置を用いたときの低磁場側の ¹³C サテライトピークの化学シフトは, それぞれ 2.212, 2.180~2.182 及び 2.157~2.158 ppm

であった. ¹³C サテライトピークと OSCS のシグナルが重ならない 400 及び 600 MHz を用いた試験室では, 0.5% の OSCS を検出可能と判断した. 500 MHz を用いた 2 試験室はいずれも ¹³C サテライトピークと OSCS のシグナルが重なることを確認したが, 0.5% の OSCS は検出可能と判定した.

考 察

ヘパリンナトリウム純度試験と同様の分析条件により, OSCS を添加したヘパリンカルシウムの ¹H-NMR を測定したところ, ヘパリンと OSCS の *N*-アセチル基に由来するシグナルが 2.04~2.05 ppm 及び 2.18~2.19 ppm と離れた位置に観察された. また, ヘパリンナトリウムの場合と同様に 0.5% の OSCS を検出できることが確認された. これらの結果から, ¹H-NMR は, ヘパリンカルシウム中の OSCS の限度試験として応用可能であることが示唆された.

ヘパリンカルシウム中の OSCS の *N*-アセチル基のシグナルの化学シフトの規格として, 米国薬局方では, ヘパリンナトリウムと同様の 2.13~2.19 ppm が設定されている. しかし, 日本国内 3 機関 4 試験室による共同検定の結果, ヘパリンカルシウム中の OSCS の *N*-アセチル基のシグナルは 2.183~2.187 ppm に低磁場シフト (ヘパリンナトリウム, 2.15 ppm 付近) することが明らかになった. また, ヘパリンナトリウム中の OSCS に比べて, ヘパリ

Table 1 ¹H-NMR によるヘパリンカルシウム中の OSCS の限度試験の共同検定結果

機関 (装置 MHz)	OSCS (%)	ヘパリンの <i>N</i> -アセチル基		OSCS の <i>N</i> -アセチル基		¹³ C-サテライト ピーク (ppm)
		(ppm)	S/N	(ppm)	S/N	
A (400)	0.5	2.054	982	2.185	18	1.893 及び 2.212
	10	2.052	942	2.184	132	1.893 及び 2.212
B (500)	0.5	2.053	285	2.183	5 ^a	1.923 及び 2.182
	10	2.052	291	2.185	64	1.923 及び 2.182
C (500)	0.5	2.051	287	2.180	5 ^a	1.921 及び 2.180
	10	2.051	218	2.184	74	1.921 及び 2.180
D (600)	0.5	2.052	1848	2.187	18	1.943 及び 2.158
	10	2.052	1442	2.184	525	1.943 及び 2.157

^a ¹³C サテライトピークを含む

ンカルシウム中のOSCSのシグナルはブロードであることが確認された。したがって、我が国におけるヘパリンカルシウム中のN-アセチル基に由来するシグナルの化学シフトの規格は、幅をもたせた2.13~2.23 ppmとすることが適当であろうと判断された。

OSCSの限度値は、OSCSが有害事象の原因物質であること、製造工程や環境から混入する可能性はないこと、及び目的物質関連物質として混入する可能性もないことから、「2.13~2.23 ppmにOSCSに由来するシグナルを認めないこと」が適当であると考えられる。これは、ヘパリンナトリウム同様、検出限界0.5%程度の限度試験であることを意味する。したがって、システムの検出感度が0.5% OSCSを検出するのに十分であることを確認することが重要である。すなわち、OSCSのTSP重水溶液(0.1 mg/0.6 mL)にOSCSを含まないヘパリンカルシウムを添加して¹H-NMRを測定したとき、2.02~2.06 ppmと2.13~2.23 ppmにそれぞれヘパリン及びOSCSのN-アセチル基に由来するシグナルが検出されることを確認する必要がある。500 MHzの装置を用いた場合は、¹³CサテライトピークがOSCSのN-アセチル基と同じ位置に検出されることが明らかになったが、デカップリングにより¹³Cサテライトピークか否かを確認する必要がある⁹⁾。

謝 辞

ヘパリンナトリウムをご供与いただきました日本

バルク薬品㈱に深く御礼申し上げます。本研究遂行にご協力いただきました厚生労働省医薬食品局審査管理課鷺田淳専門官、鈴木克之主査、独立行政法人医薬品医療機器総合機構品質管理部基準課上野清美課長、森田 収氏、仁後知子氏にお礼申し上げます。

本研究の一部は厚生労働省の支援によって行われたものである。

文 献

- 1) Guerrini, M., Beccati, D., Shriver, Z., *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **26**(6), 669-675 (2008).
- 2) Kishimoto, T. K., Viswanathan, K., Ganguly, T., *et al.*: *N. Engl. J. Med.*, **358**(23), 2457-2467 (2008).
- 3) <http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/default.htm>.
- 4) http://www.edqm.eu/medias/fichiers/Heparin_sodium_monograph_Revised.pdf.
- 5) <http://www.usp.org/hottopics/heparin.html>.
- 6) <http://www.usp.org/pdf/EN/USPNF/revisionBulletinHeparinCalcium.pdf>.
- 7) http://www.edqm.eu/medias/fichiers/Heparin_calcium_monograph_Revised.pdf.
- 8) Montgomery, R. I., Lidholt, K., Flay, N. W., *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **89**(23), 11327-11331 (1992).
- 9) Yamaguchi, H., Shinagawa, M., Shimba, N., Miyano, H., Suzuki, E.: *Yakugaku Zasshi*, **128**(10), 1513-1515 (2008).

Near-Infrared Analysis of Protein Secondary Structure in Aqueous Solutions and Freeze-Dried Solids

KEN-ICHI IZUTSU, YASUTO FUJIMAKI, AKIKO KUWABARA, YUKIO HIYAMA, CHIKAKO YOMOTA, NOBUO AOYAGI

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

Received 20 September 2005; revised 19 December 2005; accepted 19 December 2005

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/jps.20580

ABSTRACT: Near-infrared spectroscopy (NIR) of various proteins (bovine serum albumin, lysozyme, ovalbumin, γ -globulin, β -lactoglobulin, myoglobin, cytochrome-*c*) was investigated as a possible analytical method of the protein secondary structure in various physical states. The spectra of proteins in aqueous solutions (transmission mode, solvent-compensated) and those in freeze-dried solids (nondestructive diffuse reflection mode) showed several bands at similar frequencies in the combination (4000–5000 cm^{-1}) and first overtone (5600–6600 cm^{-1}) spectral regions. The normalized second-derivative near-infrared spectra of proteins in aqueous solutions suggested that some bands indicated α -helix (4090, 4365–4370, 4615, and 5755 cm^{-1}) and β -sheet (4060, 4405, 4525–4540, 4865, and 5915–5925 cm^{-1}) structures. The proteins mostly maintained spectra characteristic of their native structure after freeze-drying, although some reductions in α -helical structure and increase in unordered or β -sheet structures were observed. The near-infrared analysis also showed β -sheet formation of heat-treated BSA in aqueous solutions and in subsequently freeze-dried solids. The present results thus indicated that the nondestructive near-infrared analysis can be used for the investigation of dehydration-induced changes in protein secondary structures. © 2006 Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmacists Association *J Pharm Sci* 95:781–789, 2006

Keywords: freeze-drying; near-infrared spectroscopy; protein structure; protein formulation; stability

INTRODUCTION

Freeze-drying is a popular method of ensuring the shelf-life stability of therapeutic proteins that are not sufficiently stable in aqueous solutions.^{1–3} The limited mobility of proteins in freeze-dried solids significantly reduces the structural and chemical changes that are significant in aqueous solutions, whereas various physical stresses to which proteins are exposed during the freezing and dehydration processes often alter their structure from the native-state conformation in original solutions. Maintaining the native conformation of a protein in a freeze-dried solid is important in the development of stable formula-

tions, because the induced structural changes often lead to protein aggregation between the exposed hydrophobic regions upon re-hydration as well as faster chemical reactions during the storage.^{4,5} The secondary structure of proteins in aqueous solutions and in freeze-dried solids is usually examined by Fourier transform infrared (FT-IR) analysis of the amide I region.^{6–8} Optimizing the excipients in order to maintain the native protein conformation is becoming a standard procedure in the design of freeze-dried formulations.²

Near-infrared spectroscopy (NIR) is the focus of increased attention, as it is among the most valuable nondestructive and noninvasive analytical methods that can be used for product quality control (e.g., process analytical technology; PAT) in the food and pharmaceutical industries.^{9,10} Several modes of measurement, including transmission and diffuse

Correspondence to: Ken-ichi Izutsu (Telephone: 81-33700-1141 (ext.229); Fax: 81-33707-6950; E-mail: Izutsu@nihs.go.jp)

Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 95, 781–789 (2006)

© 2006 Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmacists Association

 WILEY
InterScience®
DISCOVER SOMETHING GREAT

JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, VOL. 95, NO. 4, APRIL 2006

781

reflection, provide the spectral data of samples in different physical states. The nondestructive analytical methods are expected to be of particular value in the investigation of the physical and chemical characteristics of freeze-dried amorphous solid formulations with a high tendency toward vapor absorption and component crystallization.^{11,12} Nondestructive near-infrared analysis of the residual water content,^{13,14} component crystallinity,¹⁵ and molecular interactions¹⁶ in freeze-dried solid have been reported to date.

Recently, Bai and colleagues¹⁷ reported that nondestructive NIR can be applied to study the secondary structure of proteins in freeze-dried model formulations. Proteins different in their secondary structure compositions give different near-infrared spectra.¹⁸ Combining NIR spectroscopy with band-narrowing techniques (e.g., second-derivative, deconvolution) has allowed the assignment of some protein absorption bands to certain secondary structures.¹⁹ For example, dried protein solids show certain bands suggestive of α -helix (4369, 4604 cm^{-1}) and β -sheet (4323, 4417, 4525–4535 cm^{-1}) structures.^{19,20} NIR has also indicated reduction in the α -helix structure and a concomitant increase in the β -sheet structure of particular proteins (e.g., albumin, lysozyme) exposed to higher temperatures.^{21–23} Although the native-state protein conformations in physiological solutions are subject to change in the process of dehydration, most of the spectra/structure correlation studies carried out to date have employed the spectra of dehydrated proteins and data from the literature regarding the native-state protein structures.¹⁹

The purpose of the present study was to determine the feasibility of nondestructive NIR measurement for the purpose of analyzing protein secondary structures in freeze-dried solid formulations. The near-infrared spectra of seven proteins were obtained in aqueous solutions (transmission mode) and in freeze-dried solids (diffuse reflection mode). The relationships between the spectra and the protein structures in different physical states are discussed.

MATERIALS AND METHODS

Materials

All proteins and other chemicals employed in this study were obtained from the following commercial sources: bovine serum albumin, horse heart myoglobin, bovine milk β -lactoglobulin, chicken

egg albumin: ovalbumin and bovine γ -globulin (Sigma Chemical, St. Louis, MO); egg white lysozyme (Seikagaku Kogyo, Tokyo, Japan); and horse heart cytochrome-c and sodium hydrogen phosphates (Wako Pure Chemical Industry, Osaka, Japan). The proteins in sodium phosphate buffer solution (20 mM, pH 7.0) were dialyzed against the corresponding buffers, centrifuged at 1500g for 10 min, and filtered through 0.22 μm PVDF filters (Millipore, Bedford, MA).

Near-Infrared and Mid-Infrared Spectroscopy

Near-infrared spectroscopy was performed at room temperature (25°C) using a Bruker MPA FT-NIR system with OPUS software. The absorbance of aqueous protein solution (200 mg/mL, 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0) in a synthesized quartz cell with a 0.5 mm light path length (GL Sciences, Tokyo, Japan) was obtained in the transmission mode. The spectra of the freeze-dried protein solids were obtained in the diffuse reflection mode by directing the light upward from the bottom of the vials with an integrating sphere (PbS detector). Signals within the 12000–4000 cm^{-1} range were obtained in 256 scans at spectral resolution of 2 cm^{-1} . The spectra of proteins in the aqueous solutions were obtained by subtracting the corresponding buffer solution spectra, using subtraction factors that minimized the water absorption bands. The second derivative spectra (Savitzky-Golay method, 25 data points smoothing) were vector-normalized in two wavenumber regions (4000–5000, 5600–6600 cm^{-1}). FT-IR analysis of proteins was performed using a Bomen MB104 spectrophotometer as described previously.²⁴ The mid-infrared spectra of the proteins in aqueous solutions were obtained at 20 mg/mL.

Freeze-Drying of Proteins

Aliquots (2 mL) of the protein solutions (50 mg/mL protein in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0) in flat-bottom glass vials (21 mm diameter, borosilicate glass) were frozen by immersion in liquid nitrogen. The vials were placed on polytetrafluoroethylene film (thickness: 80 μm) on a shelf of a freeze-drier (Freezevac 1C, Tozai Tsusho, Tokyo) in order to reduce the ratio of heat transfer. The samples were freeze-dried under a vacuum without shelf temperature control for 24 h, and then were kept at 35°C for 12 h. The effects of the initial solution conditions on the

freeze-dried solids spectra were investigated at various protein concentrations (5–200 mg/mL) and volumes (0.5–5 mL). The freeze-dried solids were subjected to the near-infrared measurements conducted within 48 h of the sample preparation.

Heat-Treatment of the Protein Solutions

Bovine serum albumin and γ -globulin solutions (100 mg/mL in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0) in the optical cell were subjected to NIR measurements prior to and after heat-treatment at 80°C for 5 min. Some protein solutions (50 mg/mL in glass vials) were also heat-treated (80°C for 5 min) before being subjected to freeze-drying. Thermal analysis of the protein solutions was performed with a differential scanning calorimeter (DSC Q-10, TA Instruments, New Castle, DE). Aliquots (10 μ L) of the protein solutions (100 mg/mL) in hermetic aluminum cells were scanned from the room temperature to 90°C at 5°C/min.

RESULTS

Figure 1 shows the near-infrared spectra of BSA in an aqueous solution and in a freeze-dried solid. The aqueous BSA solution (200 mg/mL in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0) showed large water absorption bands at 5185 cm^{-1} (OH stretch and HOH deformation combination; approx. absorbance: 2.4) and 6895 cm^{-1} (OH stretch first

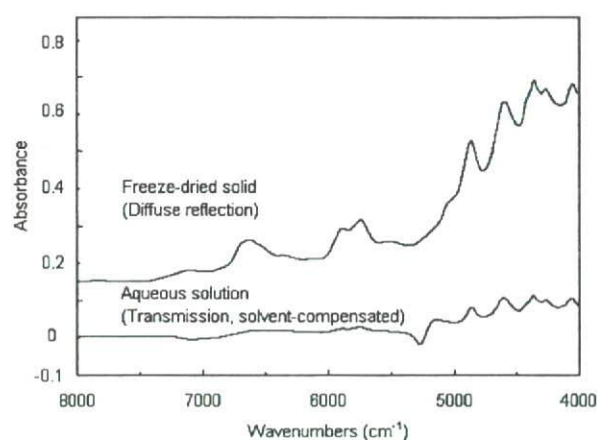


Figure 1. Near-infrared spectra of BSA in aqueous solution (200 mg/mL, solvent-compensated) and in a freeze-dried solid obtained by transmission and diffuse reflection modes, respectively.

overtone; approx. absorbance: 0.7) in a cell with a light path length of 0.5 mm (data not shown).^{25,26} The protein (200 mg/mL BSA) slightly reduced intensities of these water-related bands, which were shifted to lower frequencies by 3 and 10 cm^{-1} , with respect to those of the buffer solution. The spectrum of BSA in the aqueous solution was obtained by calculation of the difference between the transmission of the protein solution and that of the corresponding buffer, including a subtraction factor (0.862) that minimized the water bands. The solvent-compensated BSA spectrum showed a number of bands with peaks at 4061, 4268, 4368, 4606, 4862, 5753, 5888, 6368, and 6568 cm^{-1} . These band positions were in agreement with the reported vibration bands of various protein functional groups.^{27,28} The solvent-compensated BSA spectrum also showed two combinations of a gap and a peak in the water-related band regions (5100–5300 and 6800–7100 cm^{-1}), which were probably due to the protein-induced shift of the water absorption bands.²⁹

The near-infrared spectra of the freeze-dried BSA obtained in diffuse reflection mode showed much larger absorbances.¹⁷ The spectra of the protein in aqueous solution and in freeze-dried solid showed bands at similar positions, except in the water-related band regions. No apparent band suggestive of residual water in the freeze-dried solid was observed. Freeze-drying of BSA from initial solutions containing more than a certain protein concentration (<50 mg/mL) and volume (<1.5 mL) in the glass vials resulted in apparently identical diffuse reflection spectra (data not shown).

Figures 2 and 3 show the vector-normalized second-derivative near-infrared spectra of seven proteins in aqueous solutions. The two frequency regions corresponded to various combination (4000–5000 cm^{-1}) and first overtone (5600–6600 cm^{-1}) vibrations of protein functional groups.^{27,30} The spectra of proteins in aqueous solutions were obtained using the subtraction factors (0.848–0.862) to compensate for water absorption. Spectra of BSA and γ -globulin in aqueous solutions showed increasing absorption intensity in increasing the protein concentrations (data not shown). They gave constant normalized second-derivative spectra in solutions above a certain protein concentration (100 mg/mL).

The proteins examined here possess various secondary structure compositions.^{31,32} Some proteins are composed largely of α -helix (cytochrome-c: approximately 40%; myoglobin: 75%; BSA: 67%)

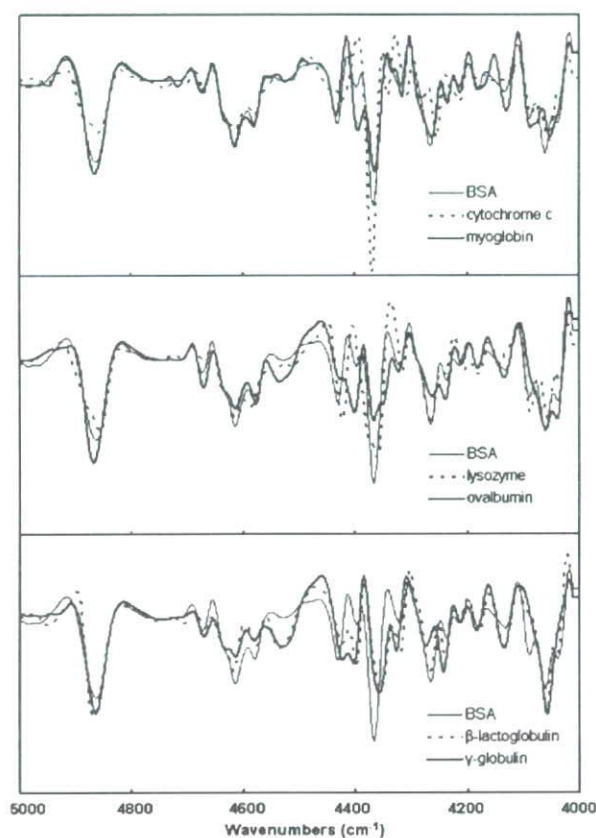


Figure 2. Normalized second-derivative solvent-compensated NIR spectra of proteins in aqueous solutions (4000–5000 cm^{-1}).

and almost no β -sheet structures.³³ Egg white lysozyme contains some α -helices (30–40%) and smaller ratio of β -sheets (less than 10%). On the other hand, β -lactoglobulin consists of β -sheets (approximately 40%) and a smaller portion of α -helix structure (approx. 10%). γ -Globulin, which consists primarily of immunoglobulin G, contains 60–70% β -sheet and almost no α -helix structure.^{34–36} The spectral derivation employed here emphasized differences between the proteins examined. The relationship between the normalized second-derivative spectra and the structural information indicated that some bands were suggestive of proteins with particular secondary structures.^{19,37} Some proteins composed primarily of β -sheet structures (γ -globulin, β -lactoglobulin) showed high-intensity bands at 4060, 4405, 4525–4540, 4865, and 5915–5925 cm^{-1} .^{19,20} Proteins rich in α -helix structure (cytochrome-*c*, myoglobin, lysozyme, BSA) were shown to have high-intensity bands at 4090, 4365–4370, 4615, and 5755 cm^{-1} . Ovalbumin, which contains a similar ratios

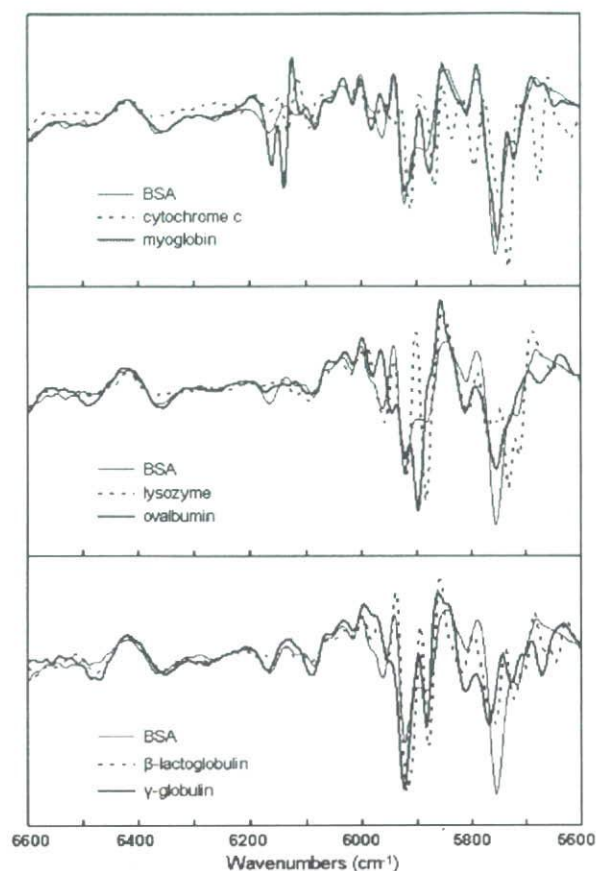


Figure 3. Normalized second-derivative solvent-compensated NIR spectra of proteins in aqueous solutions (5600–6600 cm^{-1}).

(approx. 30%) of α -helix and β -sheet structures³¹ was found to have both of these features. Myoglobin did not precisely follow these expected trends, displaying a low intensity band at 4370 cm^{-1} .

Figures 4 and 5 shows the near-infrared spectra of various proteins in aqueous solutions and in freeze-dried solids in the 4000–5000 and 5600–6600 cm^{-1} regions. Each protein largely maintained the spectrum characteristic of its native structure when freeze-dried; however, certain changes were common among some of the proteins examined. For example, freeze-drying of cytochrome-*c*, myoglobin, BSA, and lysozyme was associated with a reduction of the putative α -helix band intensity at 4090 cm^{-1} in the combination region. Freeze-drying of α -helical proteins also altered the shape of a large band observed at 4370 cm^{-1} . The intensities and positions of the resulting bands varied among the proteins studied. The second-derivative spectra of the freeze-dried proteins except for that of lysozyme showed

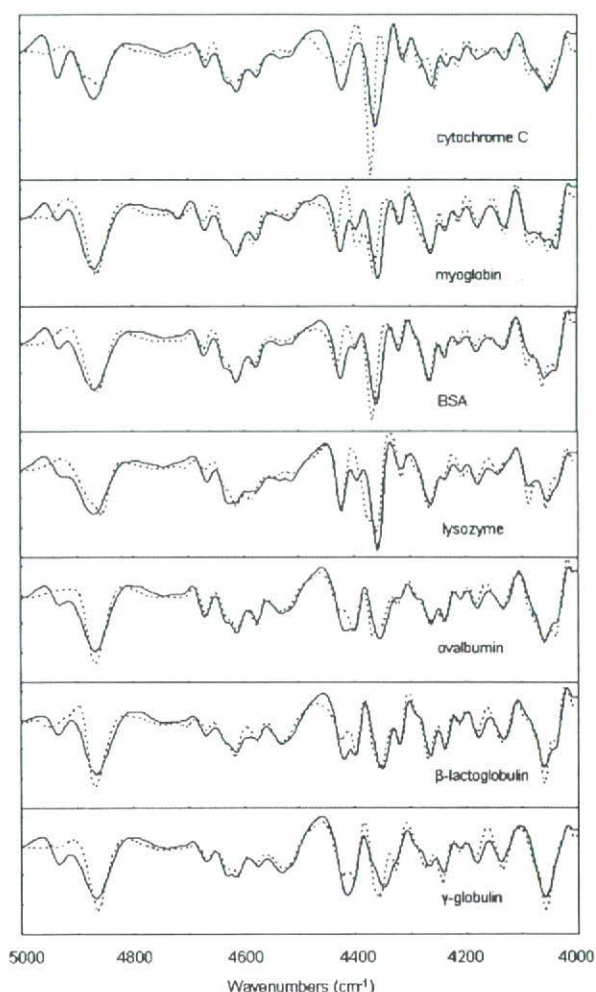


Figure 4. Normalized second-derivative NIR spectra of proteins in aqueous solutions (---) and freeze-dried solids (—) ($4000\text{--}5000\text{ cm}^{-1}$).

increased intensity of a band at $4415\text{--}4420\text{ cm}^{-1}$. The band was attributed to unordered (2265 nm : 4415 cm^{-1}) and β -sheet (2264 nm : 4416 cm^{-1}) structures.¹⁹ In the first overtone region (Fig. 5), various freeze-dried proteins also showed a large band at approximately 5725 cm^{-1} , with concomitant reduction of the neighboring putative α -helix band at approximately 5755 cm^{-1} . Freeze-dried cytochrome-*c* showed higher overall absorbance and accompanying noise that rendered spectral analysis difficult in the region above 5000 cm^{-1} (data not shown). FT-IR analysis of protein amide I region (BSA, lysozyme, ovalbumin, β -lactoglobulin, γ -globulin) showed broader bands in area-normalized second-derivative spectra of the freeze-dried solids (KBr tablet) compared to those

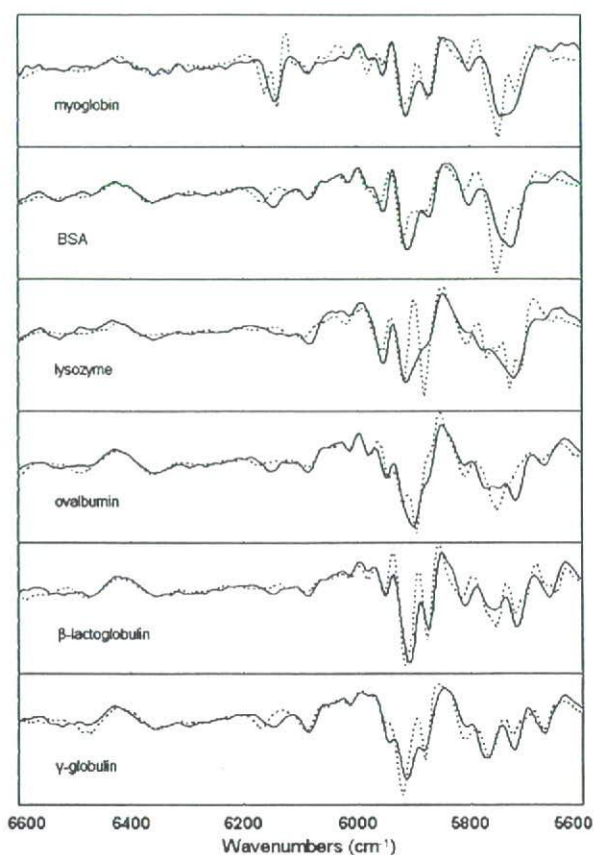


Figure 5. Normalized second-derivative NIR spectra of proteins in aqueous solutions (---) and freeze-dried solids (—) ($5600\text{--}6600\text{ cm}^{-1}$).

of the aqueous solutions, indicating reported secondary structure perturbations (Fig. 6).^{6,7,24}

The effect of thermally induced protein structural changes on the near-infrared spectra were investigated with the proteins in aqueous solutions, and in subsequently freeze-dried solids. Figure 7 shows the normalized second-derivative near-infrared spectra of BSA and γ -globulin (100 mg/mL) in aqueous solutions prior to or after a heat-treatment at 80°C . The protein solution changed into a soft gel (BSA) or white suspension (γ -globulin) with the heat-treatment. Thermal analysis of the protein solutions showed broad endotherm peaks at temperatures of approximately 60°C (BSA) and 78°C (γ -globulin), which was strongly suggestive of thermal unfolding during the heat-treatment (data not shown). The heat-treated BSA solution showed a small reduction in the intensity of a possible α -helix band (4090 cm^{-1}) and a concomitant increase in a putative β -sheet band (4525 cm^{-1}), but most of

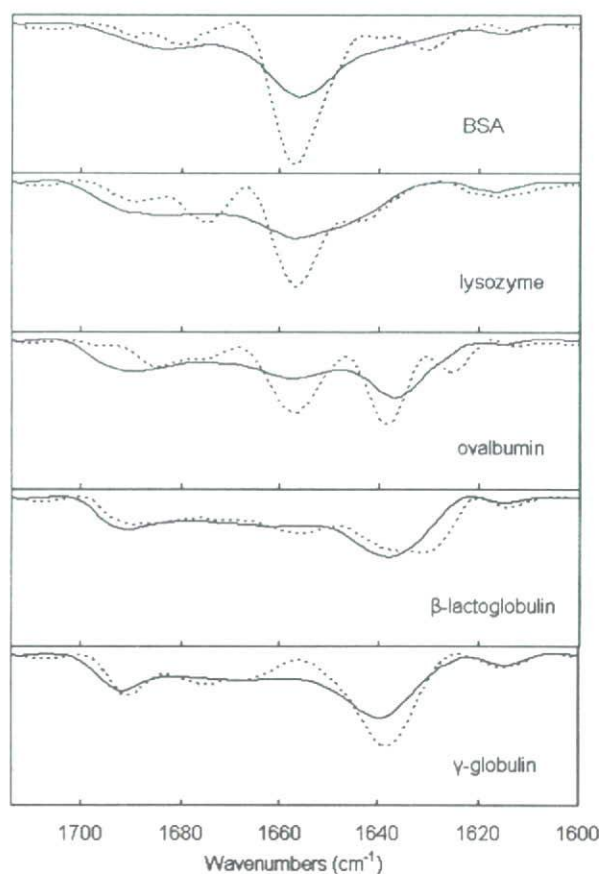


Figure 6. Area-normalized second-derivative infrared spectra in the amide I region of several proteins in aqueous solutions (---) and freeze-dried solids (—).

the other bands observed in the native protein were maintained. These results were suggestive of intra- or intermolecular β -sheet formation of the thermally unfolded BSA molecules at the elevated temperature and/or in the subsequent cooling.^{28,33,35} In contrast, the heat-treatment of a β -sheet-rich protein (γ -globulin) was not found to alter the spectrum of the native protein in the aqueous solution.

The effects of heat-treatment on the spectra of subsequently freeze-dried BSA (50 mg/mL in the initial solution) are also shown in Figure 7. The freeze-drying of BSA showed that the large β -sheet band (4525 cm^{-1}), which was induced with heat-treatment of the solution, had been retained. Retention of the altered secondary structure was consistent with freeze-drying of a thermally denatured α -helical protein (cytochrome-*c*).¹⁷ The prior heat-treatment had no effect on the second-derivative spectra of freeze-dried γ -globulin, as

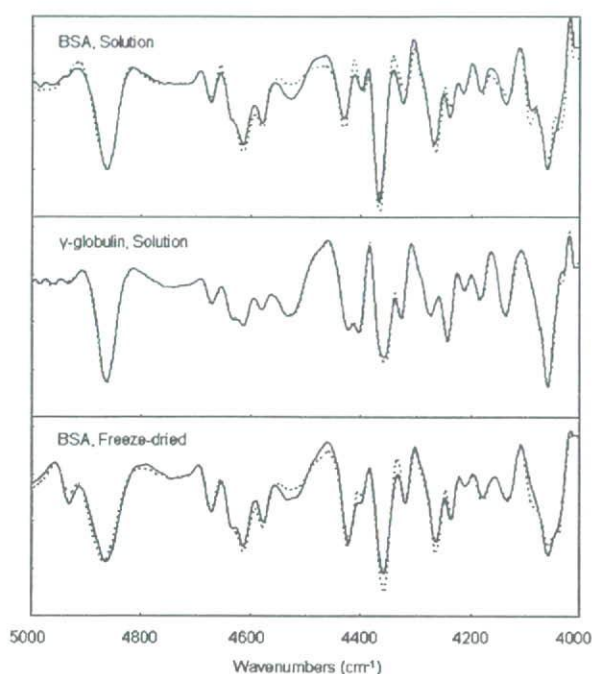


Figure 7. Normalized second-derivative NIR spectra of BSA and γ -globulin in aqueous solutions and freeze-dried solids with (—) or without (---) a heat-treatment at 80°C for 5 min.

was also observed with this protein in aqueous solution (data not shown). These results indicated that NIR measurements enable the detection of structural changes in particular proteins in aqueous solutions and in freeze-dried solids.

DISCUSSION

Near-infrared spectroscopy was found to provide relevant information regarding the secondary structure of proteins in aqueous solutions and in the freeze-dried solids. The appropriate elimination of water absorption, which has two large band peaks at 5185 and 6895 cm^{-1} ,²⁵ is a major hindrance to obtain the near-infrared spectra of proteins in aqueous solutions. The subtraction factors used here to eliminate water absorption bands (0.848 – 0.862 in 200 mg/mL protein solutions) were considered reasonable with respect to the reported variations in the partial specific volume of proteins in aqueous solutions (approx. 0.70 – 0.75 mL/g).^{38,39} The small shift in water band peaks and the uneven regions in the solvent-compensated spectra were suggestive of certain

protein-induced changes in the interactions between water molecules.^{25,29,40}

The near-infrared spectra in the combination region (4000–5000 cm^{-1}) and in the first overtone region (5600–6600 cm^{-1}) differed slightly between proteins, primarily due to differences in the amino acid compositions and higher-order structure of these proteins.^{18–20,27} Each band in the spectra has been assigned to a vibration arising from a particular functional group in the proteins (e.g., CH, OH, and NH).^{25,27} Mathematical band narrowing enabled the detailed investigation of the spectra/structure relationship. The normalized second-derivative near-infrared spectra of seven proteins in aqueous solution showed some bands suggestive of α -helix and β -sheet structures.^{17,20} Some of the bands indicative of α -helix (4365–4370, 4615 cm^{-1}) and β -sheet (4405, 4525–4540 cm^{-1}) structures were consistent with the reported assignments.¹⁹ Each individual protein secondary structure exhibits a characteristic hydrogen-bonding pattern between the amino acid residues, which is expected to result in a small but equivocal difference in band position and intensity.⁴¹ Heat-induced changes in the protein (BSA) spectra observed here indicated that NIR enables the detection of structural differences between proteins with identical amino acid compositions. Whether the heat-treatment of γ -globulin induced intermolecular β -sheet structures remains unclear. Although the present study was focused on the relationship between the near-infrared spectra and the α -helix and/or β -sheet structures of certain proteins, other secondary structures (e.g., turn, 3_{10} helix, unordered structures) and the chemical components (e.g., heme) are also expected to exert an influence on the near-infrared spectra. It should be also significant to distinguish the intra- and intermolecular β -sheet structure in the NIR spectra to detect possible structure change and aggregation of proteins exposed to various physical stresses. Analysis of more proteins and peptides, as well as careful data processing will be necessary for the further assignment of near-infrared bands to particular secondary structures.

Freeze-drying of the proteins induced a number of characteristic changes in the normalized second-derivative near-infrared spectra in comparison to those of the native proteins in aqueous solutions, including increases in putative unordered or β -sheet structure bands at 4420 cm^{-1} , and decreases in α -helix bands at 4090 cm^{-1} . Minor changes in the β -sheet band at 4525 cm^{-1} were

suggestive of an increase in unordered structures, rather than β -sheet formation in the dried-solid samples. The dehydration-induced changes in the NIR spectra indicated a perturbation of the native protein structure, as has also been reported in FT-IR studies of these proteins.^{6,7} NIR analysis of several proteins freeze-dried with or without stabilizing excipients (e.g., sucrose) suggested dehydration-induced structural perturbation similar to the present results,¹⁷ whereas direct comparison of the data was not possible due to the different processing methods. Various proteins lose some of their native secondary structure upon freeze-drying in the absence of certain stabilizers; this process often leads to irreversible protein aggregation between exposed hydrophobic regions upon re-hydration of samples.² Contributions of other plausible reasons for the spectral changes (e.g., different methods of measurement, reduced hydration levels, etc.) and possible quantitative analysis of the secondary structure are important topics that need further study for elucidation.

The present results suggested that diffuse-reflection NIR can be used for the analysis of protein secondary structures in pharmaceutically relevant freeze-dried solids. Thus far, NIR has been expected to provide only limited information regarding protein secondary structure due to the relatively weak and overlapping signals obtained in this method. Various excipients should also affect the spectra. In spite of these limitations, the nondestructive analysis of dried solids is expected to provide several advantages not necessarily achievable in other spectroscopic methods (e.g., FT-IR, FT-Raman). For example, the use of nondestructive analysis avoids possible vapor absorption or structural changes of proteins in the process of KBr tablet preparation required for FT-IR analysis.^{11,12} Simultaneous analysis of the secondary structures of proteins and other physicochemical parameters^{13–16} can be achieved via this approach. In addition, this method can potentially be used in the quality control of production lines.⁴² Further studies of the methods of measurement, the data processing procedures, the effect of excipients, and the factors that affect the data, are still needed to improve the quality and increase the quantity of available information.

ACKNOWLEDGMENTS

The present study was supported by the Japan Health Sciences Foundation (KH31029).

REFERENCES

- Akers MJ, Vasudevan V, Stickelmeyer M. 2002. Formulation development of protein dosage forms. *Pharm Biotechnol* 14:47–127.
- Carpenter JF, Chang BS, Garzon-Rodriguez W, Randolph TW. 2003. Rational design of stable lyophilized protein formulations: Theory and practice. *Pharm Biotechnol* 13:109–133.
- Costantino HR, Pikal MJ, editors. 2004. Lyophilization of biopharmaceuticals. Arlington: American Association of Pharmaceutical Scientists.
- Chang BS, Beauvais RM, Dong A, Carpenter JF. 1996. Physical factors affecting the storage stability of freeze-dried interleukin-1 receptor antagonist: Glass transition and protein conformation. *Arch Biochem Biophys* 331:249–258.
- Li B, O'meara MH, Lubach JW, Schowen RL, Topp EM, Munson EJ, Borchardt RT. 2005. Effects of sucrose and mannitol on asparagine deamidation rates of model peptides in solution and in the solid state. *J Pharm Sci* 94:1723–1735.
- Dong A, Prestrelski SJ, Allison SD, Carpenter JF. 1995. Infrared spectroscopic studies of lyophilization- and temperature-induced protein aggregation. *J Pharm Sci* 84:415–424.
- Prestrelski SJ, Arakawa T, Carpenter JF. 1993. Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization. II. Structural studies using infrared spectroscopy. *Arch Biochem Biophys* 303:465–473.
- Souillac PO, Middaugh CR, Rytting JH. 2002. Investigation of protein/carbohydrate interactions in the dried state. 2. Diffuse reflectance FTIR studies. *Int J Pharm* 235:207–218.
- Blanco M, Coello J, Iturriaga H, MasPOCH S, de la Pezuela C. 1998. Near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical industry. *Analyst* 123:135R–150R.
2004. Guidance for industry: PAT, A framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing, and quality assurance. Food and Drug Administration.
- Chan HK, Ongpipattanukul B, Au-Yeung J. 1996. Aggregation of rhDNase occurred during the compression of KBr pellets used for FTIR spectroscopy. *Pharm Res* 13:238–242.
- van de Weert M, Haris PI, Hennink WE, Crommelin DJ. 2001. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein conformation: Effect of sampling method and stress factors. *Anal Biochem* 297:160–169.
- Kamat MS, Lodder RA, DeLuca PP. 1989. Near-infrared spectroscopic determination of residual moisture in lyophilized sucrose through intact glass vials. *Pharm Res* 6:961–965.
- Savage M, Torres J, Franks L, Masecar B, Hotta J. 1998. Determination of adequate moisture content for efficient dry-heat viral inactivation in lyophilized factor VIII by loss on drying and by near infrared spectroscopy. *Biologicals* 26:119–124.
- Bai SJ, Rani M, Suryanarayanan R, Carpenter JF, Nayar R, Manning MC. 2004. Quantification of glycine crystallinity by near-infrared (NIR) spectroscopy. *J Pharm Sci* 93:2439–2447.
- Izutsu K, Fujimaki Y, Kuwabara A, Aoyagi N. 2005. Effect of counterions on the physical properties of L-arginine in frozen solutions and freeze-dried solids. *Int J Pharm* 301:161–169.
- Bai S, Nayar R, Carpenter JF, Manning MC. 2005. Noninvasive determination of protein conformation in the solid state using near infrared (NIR) spectroscopy. *J Pharm Sci* 94:2030–2038.
- Sadler AJ, Horsch JG, Lawson EQ, Harmatz D, Brandau DT, Middaugh CR. 1984. Near-infrared photoacoustic spectroscopy of proteins. *Anal Biochem* 138:44–51.
- Robert P, Devaux MF, Mouhous N, Dufour E. 1999. Monitoring the secondary structure of proteins by near-infrared spectroscopy. *Appl Spectrosc* 53:226–232.
- Miyazawa M, Sonoyama M. 1998. Second derivative near infrared studies on the structural characterisation of proteins. *J Near Infrared Spectrosc* 6:253–257.
- Wu Y, Czarnik-Matuszewicz B, Murayama K, Ozaki Y. 2000. Two-dimensional near-infrared spectroscopy study of human serum albumin in aqueous solutions: Using overtones and combination modes to monitor temperature-dependent changes in the secondary structure. *J Phys Chem B* 104:5840–5847.
- Navea S, de Juan A, Tauler R. 2003. Modeling temperature-dependent protein structural transitions by combined near-IR and mid-IR spectroscopies and multivariate curve resolution. *Anal Chem* 75:5592–5601.
- Cho RK, Lee JH, Ahn JJ, Ozaki Y, Iwamoto M. 1995. The applicability of near-infrared reflectance spectroscopy for determining solubility and digestibility of heated protein under high pressure. *J Near Infrared Spectrosc* 3:73–79.
- Izutsu K, Kojima S. 2002. Excipient crystallinity and its protein structure-stabilizing effect during freeze-drying. *J Pharm Pharmacol* 54:1033–1039.
- Shenk JS, Jerome J, Workman J, Westerhaus MO. 2001. Application of NIR spectroscopy to agricultural products. In: Burns DA, Ciurczak EW, editors *Handbook of Near-infrared Analysis*. New York: Marcel Dekker. pp 419–471.
- Murayama K, Czarnik-Matuszewicz B, Wu Y, Tsenkova R, Ozaki Y. 2000. Comparison between conventional spectral analysis methods, chemometrics, and two-dimensional correlation spectroscopy in the analysis of near-infrared spectra of protein. *Appl Spectrosc* 54:978–985.

27. Wang J, Sowa MG, Ahmed MK, Mantsch HH. 1994. Photoacoustic near-infrared investigation of homopolypeptides. *J Phys Chem* 98:4748–4755.
28. Yuan B, Murayama K, Wu Y, Tsenkova R, Dou X, Era S, Ozaki Y. 2003. Temperature-dependent near-infrared spectra of bovine serum albumin in aqueous solutions: Spectral analysis by principal component analysis and evolving factor analysis. *Appl Spectrosc* 57:1223–1229.
29. Vandermeulen DL, Ressler N. 1980. A near-infrared analysis of water-macromolecule interactions: Hydration and the spectra of aqueous solutions of intact proteins. *Arch Biochem Biophys* 199:197–205.
30. Hazen KH, Arnold MA, Small GW. 1998. Measurement of glucose and other analytes in undiluted human serum with near-infrared transmission spectroscopy. *Anal Chim Acta* 371:255–267.
31. RCSB Protein Data Bank.
32. Dong A, Huang P, Caughey WS. 1990. Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra. *Biochemistry* 29:3303–3308.
33. Murayama K, Tomida M. 2004. Heat-induced secondary structure and conformation change of bovine serum albumin investigated by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* 43:11526–11532.
34. Giacomelli CE, Bremer MG, Norde W. 1999. ATR-FTIR study of IgG adsorbed on different silica surfaces. *J Colloid Interface Sci* 220:13–23.
35. van Stokkum IH, Linsdell H, Hadden JM, Haris PI, Chapman D, Bloemendal M. 1995. Temperature-induced changes in protein structures studied by Fourier transform infrared spectroscopy and global analysis. *Biochemistry* 34:10508–10518.
36. Buchner J, Rudolph R. 1991. Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)* 9:157–162.
37. Liu Y, Cho R-K, Sakuri K, Miura T, Ozaki Y. 1994. Studies on spectra/structure correlations in near-infrared spectra of proteins and polypeptides. Part I: A marker band for hydrogen bonds. *Appl Spectrosc* 48:1249–12554.
38. Arakawa T. 1986. Calculation of the partial specific volumes of proteins in concentrated salt, sugar, and amino acid solutions. *J Biochem* 100:1471–1475.
39. Gekko K, Kimoto A, Kamiyama T. 2003. Effects of disulfide bonds on compactness of protein molecules revealed by volume, compressibility, and expansibility changes during reduction. *Biochemistry* 42:13746–13753.
40. Murayama K, Yamada K, Tsenkova R, Wang Y, Ozaki Y. 1998. Determination of human serum albumin and γ -globulin in a control serum solution by near-infrared spectroscopy and partial least squares regression. *Fresenius J Anal Chem* 362:155–166.
41. van de Weert M, Hering JA, Haris PI. 2005. Fourier transform infrared spectroscopy. In: Jiskoot W, Crommelin D, editors. *Methods for structural analysis of protein pharmaceuticals*. Arlington: American Association of Pharmaceutical Scientists. pp 131–166.
42. Brulls M, Folestad S, Sparen A, Rasmuson A. 2003. In-situ near-infrared spectroscopy monitoring of the lyophilization process. *Pharm Res* 20:494–499.

後発医薬品の品質評価法の現状

国立医薬品食品衛生研究所 薬品部

四方田千佳子

CHIKAKO YOMOTA

Drug Division, National Institute of Health Sciences

はじめに

わが国の医療保険制度の破綻を防ぐために、医療制度の改革が叫ばれている。その医療費抑制に向けた施策として、後発医薬品(generic drugs)の普及、使用の促進が大きな柱となっている。後発医薬品は、新薬(innovator drugs)の特許が切れた後に、その医薬品と有効成分が同じで、含量、剤形、効能・効果、用法・用量がすべて同じものを他社が販売する医薬品で、申請にあたっては、毒性試験や薬理試験等を要求されず、より簡易な手続きにより承認されるため、その薬価は先発医薬品よりも低く抑えられている。平成16年社会医療診療行為別調査結果¹⁾によると、わが国の後発医薬品の使用状況は若干上昇傾向にあるものの、諸外国に比べ後発医薬品のシェアは低い(図1)。わが国の後発医薬品が、より安心し

て消費者に受け入れられるためには、先発医薬品に対して、有効性・安全性が同等であるという保証が重要である。そのためには、品質規格という理化学的な同等性、臨床的な効力の同等性(生物学的同等性)が担保されなくてはならない。

平成5年に報告された「21世紀の医薬品に関する在り方懇談会」に端を発し、平成10年より、旧厚生省安全課は、後発医薬品の先発医薬品との同等性を保証するため、わが国独自の品質再評価プロジェクトを立ち上げた。ここでは、継続されてきた後発医薬品の品質評価法の流れを述べるとともに、わが国の医療用医薬品品質情報集(通称、オレンジブック)における再評価の対象医薬品、再評価の進捗状況、今後対応すべき問題点についてまとめてみたい。

1. 新規承認申請時における後発医薬品の生物学的同等性の確保

後発医薬品の申請時に添付すべき生物学的同等性の資料に関しては、昭和55年5月に当時の厚生省薬務局より、「生物学的同等性に関する試験基準」(旧ガイドライン)が出されている。その後、平成9年12月に厚生省医薬局より「後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドラインについて」が出され、平成13年5月のマイナーチェンジを経て、現在のガイドライン(同等性ガイドライン)となっている。

旧ガイドラインが出される前は、動物試験による血中薬物濃度の比較等で後発医薬品を承認していた。しかし、医薬品のバイオアベイラビリティが、動物とヒトで一致しないことが広く知られるようになり、旧ガイドラインでは、原則としてヒトでの生物学的同等性試験が必要とされた。さらに、その後の同等性ガイドラインの特徴は、溶出試験を生物学的非同等性を防ぐための有効な試験法と位置付け、基本的には、先発医薬品の標準製剤と

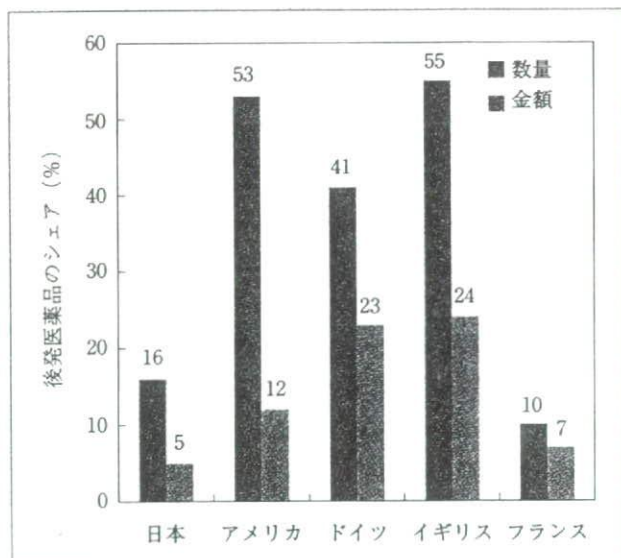


図1 各国の後発医薬品のシェア

出典：日本；医薬工業協議会 米；Generic pharmaceutical association 英、独、仏；European generic medicines association
ただし、日本、イギリスは2003年度、他は2004年度の数値を示している。