

## 第14章 バイオ後続品の開発における品質・安全性・有効性評価の留意点と承認申請

山口照英\*

### 1 はじめに

2000年に入って多くの第1世代のバイオ医薬品の特許が切れたことや、2010年から2020年にかけて抗体医薬品をはじめとする第2世代の多くのバイオ医薬品の特許が切れることを受けて、バイオ後続品/バイオシミュラー開発の機運が高まり、化学薬品の後発品と同様に、先行バイオ医薬品のコピーが製造可能とする考えが出されてきた。しかし、化学薬品とバイオ医薬品の本質的な特性の違いから、先発品のコピー（同一製品）を製造するという発想は妥当ではなく、むしろ先発品とは同一ではないものの高い類似性を持ち、有効性・安全性の観点から先行バイオ医薬品と同等と見なせる医薬品が開発可能と考えるのがコンセンサスとなってきた<sup>1-3)</sup>。

一般に、細胞培養技術や組換えDNA技術を用いて製造されるバイオ医薬品は、非常に複雑な構造を持ち、かつその品質特性は極めて多様な分子から構成されていることから、品質特性の一定性を担保するためには製法の恒常性や頑健性が非常に重要である。さらに製法の微妙な差異が製品の品質に大きな影響を与えることも知られており、かつどの程度品質特性へ影響するのかを予測することが困難である。このために、製法の恒常性を担保するために、製造に用いる生産基材（細胞）や組換えDNA技術を用いて製造する際の遺伝的安定性の評価のためのガイドラインやその製法変更に関するガイドラインが作成されている。さらに、バイオ医薬品特有の課題であるウイルス等の感染性因子に対する安全性確保のため、ICHガイドラインに加え我が国独自に策定された上乗せの基準も設定されている。一方、バイオ医薬品の製造方法は非常に複雑な工程からなるために、先行バイオ医薬品の情報無しに、その製法を同一にすることは、事実上不可能である。そのため、製法の異なるバイオ後続品の開発に当たってどのように先行バイオ医薬品と類似性の高い製品を恒常的に製造するかが大きな課題となる。

EUでは既にエリスロポエチンやヒト成長ホルモン、顆粒球コロニー刺激因子などのバイオシミュラーが承認（表1）されており、わが国でも2009年にヒト成長ホルモンのバイオ後続品が承認されている。また、承認申請中や開発中の製品も多くある。バイオ後続品の開発は、先進国の

\* Teruhide Yamaguchi 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 部長

先端バイオ医薬品の評価技術

表1 欧米でのバイオシミラー製品の承認状況 (2009年12月)

INN	先行品	後続品	EMEA	FDA
Somatropin	Genotropin	Omnitrope	2006	2006
Somatropin	Humatrope	Valtropin	2006	2007
Epoetin alfa	Eprex/Erypo	Binocrit	2007	—
Epoetin alfa	Eprex/Erypo	Epoetin alfa hexal	2007	—
Epoetin alfa	Eprex/Erypo	Abseamed	2007	—
Epoetin alfa	Eprex/Erypo	Silapo	2008	—
Epoetin alfa	Eprex/Erypo	Retacrit	2008	—
Filgrastim	Neupogen	Tevagrastim	2008	—
Filgrastim	Neupogen	Ratiograstim	2008	—
Filgrastim	Neupogen	Biograstim	2008	—
Filgrastim	Neupogen	Filgrastim ratiopharm	2008	—

みならず経済発展が著しいブラジル、インド、中国などのBRICs諸国や開発途上国でも活発化しており、かつグローバル化していくことが予測される。このようなバイオ後続品の品質・安全性・有効性を担保していくために各国ではガイドラインの作成や規制的枠組み作りが行われている。特にEUでは品質、非臨床試験、臨床試験のガイドラインに加えて、個々の製品の非臨床試験や臨床試験に関する個別ガイドライン<sup>4-10)</sup>も作成し、その開発を積極的に進めている様に見受けられる。またWHOは、2009年秋にバイオ後続品/バイオシミラー製品のガイドライン<sup>11, 12)</sup>を発表しており、米国においては議会でバイオ後続品の承認要件に関する議論が続けられている。我が国では、2009年3月に「バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保の要件についての指針」が発出されている<sup>13-16)</sup>。バイオ後続品は化学薬品の後発品とは異なるコンセプトに基づいて開発されること、また先行バイオ医薬品の経験を生かすことにより非臨床試験や臨床試験のデータの一部が代用できるとされる点など、各国のガイドラインで共通する点もある一方で、参照する先行バイオ医薬品の要件などでは違いが見られる。

本稿では、2009年3月4日に出された「バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための指針」(薬食発第0304004)に基づいて、バイオ後続品の開発において、その品質・安全性・有効性を担保していくための要件について概説するとともに、承認申請に当たってどのようなデータを得ておくべきかについても触れてみたい。さらに、開発に当たってどのような戦略が想定されるのかについても紹介する。

## 2 バイオ後続品指針について

バイオ後続品指針では、バイオ後続品を「国内で既に新有効成分含有医薬品として承認されたバイオテクノロジー応用医薬品（以下「先行バイオ医薬品」という）と同等／同質の品質、安全性、有効性を有する医薬品として、異なる製造販売業者により開発される医薬品」と定義し、その開発は「安全性及び有効性について、先行バイオ医薬品との比較から得られた同等性／同質性を示すデータ等に基づき開発できる」とした。すなわち、バイオ後続品は国内で既に承認を受けている先行バイオ医薬品が市販されており、独自に実施すべき試験に加えて、先行バイオ医薬品を参照しながら、品質のみならず、非臨床試験や臨床試験を通じて、先行バイオ医薬品との同等性・同質性を示すことにより開発が可能であると結論している。

バイオ後続品指針の策定に当たっては、わが国でのバイオ後続品の審査に関する経験が殆ど無いことから、品質から非臨床開発、臨床開発、市販後調査を含めた包括的な指針となっている。また適用範囲としては、目的有効性を明確に規定することが比較的容易で、かつ高度に精製され十分な品質特性解析が可能とされる組換えDNA技術応用タンパク質医薬品を取り上げている。組換えDNA技術応用タンパク質医薬品全てが開発可能かということに関しては、パブリックコメントで多くの意見が寄せられたが、開発の可能性については個別に判断すべきこととして組換えDNA応用タンパク質医薬品全てを含むとしている。ワクチンや血液凝固第Ⅷ因子のような複雑なタンパク質医薬品は、品質特性の類似性を示すことが困難であることが想定されるが、タンパク質化学の進歩は急速に進んでおり、適切な試験法が開発されてくることも十分考えられる。

参照する先行バイオ医薬品は国内で承認されているものとされるが、WHOガイドラインやHealth Canada<sup>17)</sup>のガイドライン案では国内市場の大きさや経済的な理由から先行バイオ医薬品の開発が行われていない製品も多く、国内未承認の製品を参照して開発することもありえている。しかし国内指針では、使用経験が無く、さらにわが国で治験が行われておらず、バイオ医薬品に対する審査の経験も無い製品に対するバイオ後続品を十分評価可能であるか不明なことなどから、現時点では認められないとしている。また、先行バイオ医薬品は新薬として承認された組換えDNA技術応用タンパク質医薬品（バイオ医薬品）としているが、将来的な課題として市場での十分な経験を持つバイオ後続品を参照とすることが可能か検討する必要が出てくる可能性はある。

先行バイオ医薬品の特許期間や再審査期間等を考慮すると、一般的にバイオ後続品は先行バイオ医薬品の開発から10-15年の科学の進歩があることから、この間の科学進歩を積極的に取り入れた安全性対策を模索し、また最新の評価手法を適用することが求められると考えられる。さら

に、先行バイオ医薬品の市場での安全性や有効性に関する経験を生かし、合理的な非臨床試験や臨床試験の設定が可能であることも示している。このためには品質特性の類似性が示される必要があり、類似性がどの程度示せるかによって、必要とされる非臨床試験や臨床試験のデータも異なってくると想定される。

バイオ後続品の開発に当たって、先行バイオ医薬品の製法に関して添付文書や関連論文等から、使用している細胞基材や製法の部分的な情報は得られても、その情報は非常に限定的なものと想定される。後述するように、開示されているデータから細胞基材などを同一にすることが望ましいとされることはあっても、先行バイオ医薬品の収集可能な情報から製法を確立することは考えにくい。従ってバイオ後続品の開発では、通常の新規バイオ医薬品と同様に品質の一定性を担保できる製法を独自に確立する必要がある。確立した製法で製造されたバイオ後続品について新薬と同様に品質特性解析を行い、得られたデータを提出することが求められる。その上で、先行バイオ医薬品との品質特性の高い類似性を示し、さらに合理的かつ必要と考えられる非臨床試験、臨床試験をデザインし、これらの試験を総合して先行バイオ医薬品との同等性・同質性を示すことによってバイオ後続品としての開発が可能と考えられる。従って、非臨床試験や臨床試験については、一部のデータの取得は不要であるとしても、化学薬品の後発品と異なり承認申請資料としてはCTDの第3部から5部までのデータの提出が求められる（図1）。現実には、製法の確立に当たっては、先行バイオ医薬品との比較検証を行い、もし品質特性に大きな差異が認められた場合には、製法の改良を行うことも必要になると想定される。

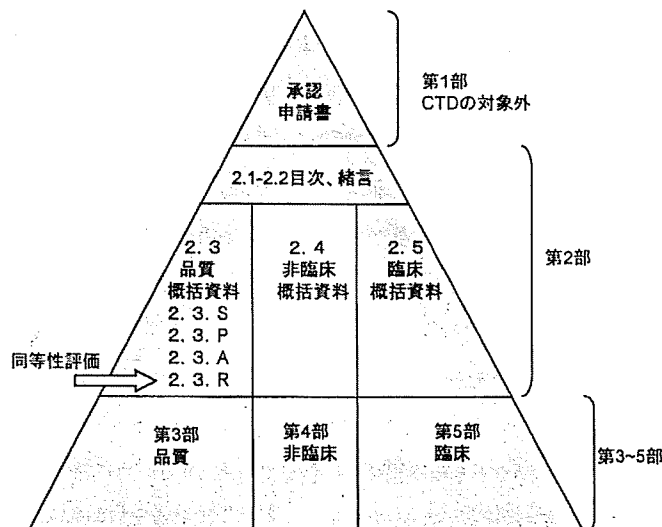


図1 ICH コモン・テクニカル・ドキュメント構成の概念図結構

## 第14章 バイオ後続品の開発における品質・安全性・有効性評価の留意点と承認申請

製法と品質特性に関しては、まず新薬同様に開発を行っていくことが必要となるが、先行バイオ医薬品との品質特性の比較試験の結果、品質特性に差異が認められた場合には2つの選択肢が想定される。

1つには、明らかに不均一性等に差異がある場合に、それが培養工程や精製工程等を工夫することにより品質特性のより類似した製品の開発が可能と予測される場合には、製造工程を再デザインし、目的とする先行バイオ医薬品と類似性の高い品質特性を持つバイオ後続品を得られるように製法を最適化していくことである。

一方、先行バイオ医薬品との品質特性の差異が大きい場合や、品質特性の高い類似性を示すにはデータが不足しているが有効性や安全性に影響を与えないと推定される場合には、非臨床試験や臨床試験での先行バイオ医薬品との比較試験を実施し、同等性・同質性を実証していくことも想定される。品質特性での類似性をどの程度立証できたかにより、必要となる非臨床試験や臨床試験のデータが異なってくると想定される。

先行バイオ医薬品との同等性(類似性)を実証するという意味は、先行バイオ医薬品に対して、バイオ後続品の品質特性がまったく同一であるということの意味するのではなく、品質特性において類似性が高く、かつ、品質特性に何らかの差異があったとしても、最終製品の安全性や有効性に有害な影響を及ぼさないと科学的に判断できることを意味する。

しかし、バイオ後続品の開発では、殆どの先行バイオ医薬品の承認申請に関連するデータがブラックボックスのなかにあることから、手法的には様々な工夫が必要となるであろう。また、試験に用いることのできる先行バイオ医薬品の入手の可能性や試験法の限界などにより、実施が困難な試験も想定される。したがって、すべての特性を比較することを求めているのではなく、合理的にアプローチ可能な範囲での比較試験を実施することが求められている。

### 3 バイオ後続品の開発における要点

#### 3.1 製造方法

製造方法については、細胞バンクの樹立から培養工程に関する事項とバルクハーベストから原液・製剤の製造までに分けて考えることができる。これは製法確立から、製剤の製法までの工程で参考とすべきガイドラインの適用範囲に沿うものである(図2)。

種細胞の作製からマスターセルバンクの作製、さらにワーキングセルバンクから製造工程を超えて製造された細胞(CAL)の評価、培養工程の管理に関しては、新薬と同様にICH Q5Dガイドライン(細胞の特性解析等)、Q5Bガイドライン(遺伝的安定性評価)に基づいて評価を行うことが求められ、さらに動物細胞を用いる場合のウイルス安全性評価についてはQ5Aガイドラ

先端バイオ医薬品の評価技術

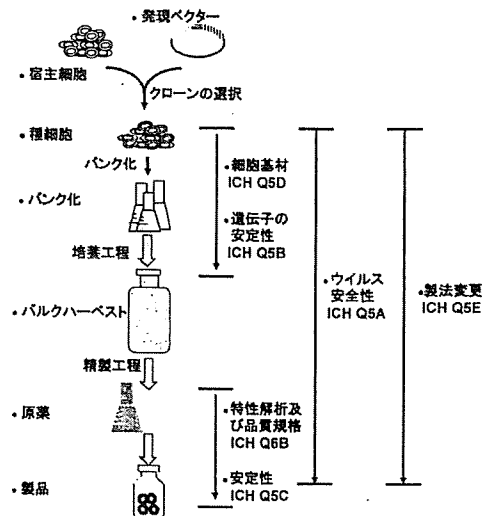


図2 バイオ医薬品の製造と関連 ICH ガイドライン

インや生物由来原料基準に従って評価を行うことが求められる。

また、本書の他章で原核生物を用いた製造や動物細胞を用いた製造方法についても概説しており、これらの稿も参考にすることが有用であろう。これらの稿は、新薬としてのバイオ医薬品の製法について述べており、一般に目標とする品質特性のゴールがあらかじめ設定されているわけではない。一方で、バイオ後続品の製法開発ではゴールとして目指すものは、先行バイオ医薬品と高い類似性のある品質特性を持つように製法を確立することにある。目指すべき品質特性がゴールとして提示されていることから、製法の設計段階から目的にかなう品質特性の製品製造を目指すという“Quality by Design”の考え方が適用できるとも考えられる。

一方で、安全性確保の観点から有効性に影響を与えない範囲でより安全な製法を模索することはむしろ推奨されると考えてよい。特に、先行バイオ医薬品や関連するバイオ医薬品に関する様々な安全情報に基づき、適切な製法をデザインしていくことは有用と考えられ、例えばウシ血清を用いた培地よりも無血清培地の開発を行うことなどが挙げられる。しかし、目的とする有効成分が糖タンパク質であった場合に、血清の有無はその糖鎖の不均一性に大きな影響を与える可能性もあり、ひいては糖鎖の違いによる生物活性や体内動態の大きな差異になる可能性もあるため、品質に対する影響も十分考慮する必要がある。

バイオ後続品の組換え体の樹立から培養工程開発では、参照する先行バイオ医薬品の製法に関しては限定的な情報しか得られないと想定され、宿主・ベクター系、セルバンクシステム、培養・精製工程を同一とすることは不要とされている。しかし、対照とした先行バイオ医薬品で用

いしそ望方は合医で点来とる合来

いられている生産細胞基材が明らかになっている場合には、同一の細胞基材を用いることが望ましいと考えられる。ただし、CHO細胞やBHK細胞を用いているといった情報が得られても、そのサブタイプまでは不明の場合が多いと想定される。従って、細胞のサブタイプまでの一致が望ましいとしているわけではない。また、細胞基材が同じであっても細胞バンクの作製法や培養方法などの差異は、品質特性に大きく影響することが知られている。特に糖タンパク質医薬品では糖鎖の不均一性が、生産基材のみならず、挿入部位や培養条件等によっても大きく変化する場合があり、また精製方法によっても製品の糖鎖の不均一性が異なってくる可能性がある。バイオ医薬品に共通して、培養工程管理は製品の恒常性確保に重要な要素であることを念頭に置くべきである。

一方、異なる生産細胞基材を用いることを否定しているわけではないが、糖鎖の不均一性の観点のみならず、宿主由来タンパク質や目的とする細胞基材に用いられる培養液や添加剤などに由来する工程由来不純物が異なってくると想定され、このような工程由来不純物が異なっていることを前提に不純物の安全性評価を行うことが求められる。

培養からバルクハーベストを得るまでの工程に比べ、精製工程では時によっては参照としている先行バイオ医薬品と品質特性の類似性が高い製品を製造するための様々な工夫が必要となる場合がある。バイオ医薬品の品質特性は、目的物質、目的物関連物質、目的物由来不純物、製法由来不純物から構成される。単純タンパク質医薬品を開発するケースでは、目指すべき目的物質が

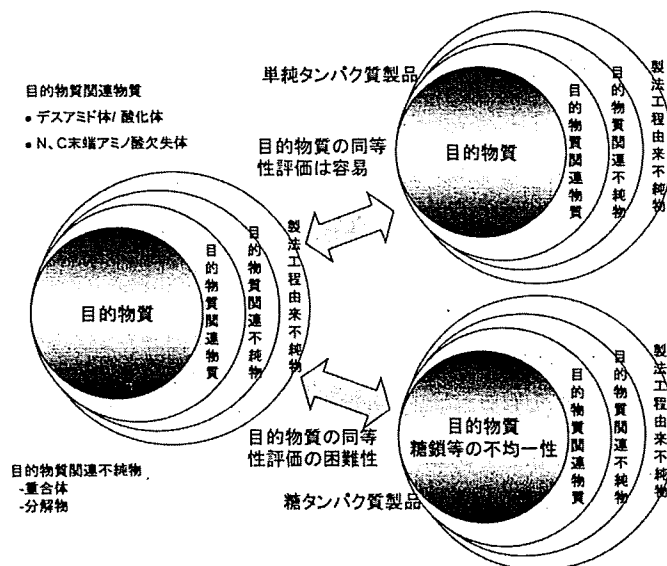


図3 品質特性の構成と同等性評価の課題

先端バイオ医薬品の評価技術

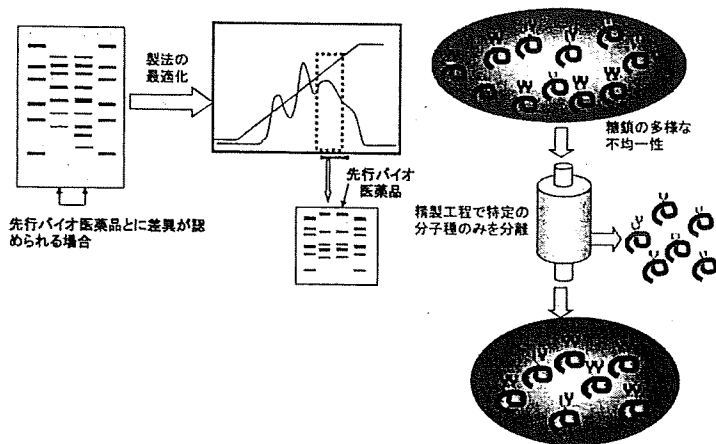


図4 製法の最適化の概念

明確であり、精製方法を確立していく上で比較的容易に製法をデザインすることも可能と想定される(図3)。一方で、目的物質が糖タンパク質医薬品のように不均一性がある場合に、先行バイオ医薬品と不均一性の類似性が高い製品を製造することは困難な場合も多いと考えられる。また、多くのバイオ医薬品で多様な目的物関連物質や目的物由来不純物を含むことが多く、このような目的物質から目的物関連物質や目的物由来不純物を含めた類似性の高い製品を製造するには精製でのウエイトが高いと考えられる。

従ってバイオ後続品の製法開発では先行バイオ医薬品との比較で差異が認められた場合に、製法の最適化を模索することになると想定される。例えば図4のモデル図のように目的成分の不均一性に関して先行バイオ医薬品と差異がある場合に、精製方法を改良することなどにより、不均一性の類似性を可能な限り高くしていくことが想定される。

3.2 品質特性解析

3.2.1 原薬

特性解析では、原薬を用いてICH Q6B ガイドラインに準じて、①構造・組成、②物理的・化学的性質、③生物活性、④免疫化学的性質、⑤不純物等について十分なデータを得る必要がある。この特性解析の結果に基づき、規格及び試験方法の設定を行うことになる。

バイオ後続品の特性解析では、新規組換えタンパク質医薬品と同様に全てのデータを取得する必要がある。実際に特性解析を行う際には、後述する先行バイオ医薬品との品質特性の類似性(同等性)評価と同時の試験を行うことが想定されるが、データは別々に提示する方が理解がしやすいと考えられる。バイオ後続品指針のQ & Aでは、概要としてのモジュール2.3.S.2.3.

P. 2.  
制当、  
バ  
開情  
医薬  
る可  
複数  
ケー  
最も  
生!  
次の  
等に  
利用  
後続  
3.2.2  
製  
とな  
定さ  
響を  
る。  
えら  
での  
先行  
不要  
わけ  
製  
と同  
も考  
いる  
える。  
安  
てお



P, 2. 3. Aに原薬から製剤, その他のデータを記載し, 同等性試験の結果については2. 3. R (規制当局独自の要求事項)にまとめておくことが理解しやすい。

バイオ後続品の開発では先行バイオ医薬品の情報が開示されていないとはいえ, さまざまな公開情報が利用可能な場合も想定される。これらの情報を有効に活用することにより, 先行バイオ医薬品の開発企業が開発ステージで実施した特性解析に比べ, より合理的に試験を実施できる可能性がある。また開発初期において, すでに複数の先行バイオ医薬品 (ヒト成長ホルモンは複数の同種同効バイオ医薬品が既承認となっている) が市販されている場合もある。このようなケースでは, 開発初期製品と市販されているそれぞれの先行バイオ医薬品の品質特性を比較し, 最も類似性の高い先行バイオ医薬品を候補品とするという戦略も想定される。

生物活性や体内動態に密接に関連する品質特性や, 臨床効果に密接に関連する生物活性や, 副次的な生物活性に関する情報やそれらの生物活性を測定するための試験法についても, 文献情報等により公知となっている可能性もある。さらに生物活性を測定するための, 標準品等について利用可能な場合も多い。従って, 特性解析試験では, 公知の情報を有効に利用することはバイオ後続品開発の迅速化に有用であろう。

### 3.2.2 製剤

製剤設計に当たっては, 原則的に対照バイオ医薬品と剤形や投与経路は同一であることが必要となるが, 臨床での利便性から対照バイオ医薬品と異なる剤形を選択することが可能な場合も想定される。例えば, 先行バイオ医薬品が凍結乾燥製剤であったとしても, 品質特性や安定性に影響を与えないことが実証された液剤での開発は, むしろ臨床現場での利便性が増す可能性もある。ただ, 剤形によっては貯法が大きく異なる場合も想定され, 臨床で混乱が起きる可能性も考えられるので, 総合的に判断することが必要である。一方, 剤形の差異がある場合に, 臨床試験でのブラインド化が困難になることも想定される。

先行バイオ医薬品の添加剤等を同一にしている場合には, 製剤設計の妥当性の説明については不要と考えることもできる。但し, 製剤設計が同一であるからといって安定性試験が不要となるわけではない。

製剤設計が異なっていることもありえることから, 保存条件及び有効期間が対照バイオ医薬品と同一であることは必ずしも必須条件ではないが, 極端に有効期間が短い場合には臨床での誤用も考えられることから, 妥当とされない場合もありえる。対照バイオ医薬品と異なる添加剤を用いることが可能な場合もある。特に安全性の観点から, 異なる添加剤の選択が有用な場合もありえる。

安定性試験では, ICH Q5Cに準じて実保存条件・実時間での長期保存試験の実施が求められており, この試験結果に基づき有効期間を設定することが必要となる。ただし, 新規バイオ医薬

品と同様に承認申請時には、少なくとも6ヶ月以上の試験データを提出することでよいとされている。

保存条件及び有効期間が対照バイオ医薬品と同一であることは必須条件でないことから、安定性について対照バイオ医薬品と比較試験を必ずしも実施する必要はないと考えられる。一般的に、バイオ医薬品では、加速試験及び苛酷試験により、最終的な保存期間の推定や、想定される分解物についての有用な情報を得られることもある。従って、先行バイオ医薬品との加速試験や苛酷試験を比較して行い、分解物の生成プロファイルの比較等を同等性・同質性評価に用いるという戦略もありえるが、これは開発企業の選択肢の一つと考えてよい。

### 3.3 品質特性に関する同等性/同質性の評価試験

バイオ後続品の開発では、独自に実施する品質特性解析に加えて参照とする先行バイオ医薬品との品質特性の比較試験が求められる。基本的なコンセプトとして、品質特性に関して先行バイオ医薬品との高い類似性を示すことにより、先行バイオ医薬品の非臨床データや臨床データに関する経験を利用することが可能となる。すなわち、非臨床試験や臨床試験を通じて先行バイオ医薬品との同等性を「確認する」という試験のデザインが可能となる。

品質特性の同等性・同質性の評価に当たっては、目的物質、目的物質関連物質、目的物質由来不純物、工程由来不純物を含めた品質特性に関して、対照とするバイオ医薬品とバイオ後続品との類似性の評価を行うことが求められる。糖タンパク質医薬品のように目的物質に不均一性がある場合には、その不均一性の同等性を評価する必要がある。また製品によっては目的物質と目的物質関連物質とを明確に区別できない場合も多く、そのようなケースでは、全体のプロファイルと比較することもやむを得ないであろう。

一方、工程由来不純物については製法そのものが異なると想定されることから、差異があることを前提とした対応を行うことが合理的である場合が多い。すなわち、工程由来不純物については類似性を評価するというよりも、どのような差異があるのかを明らかにし、その差異が臨床上の安全性に及ぼす影響を独自に評価する方が妥当なケースも多いと考えられる。

構造解析では一般に原薬を用いた試験が行われるが、参照とする先行バイオ医薬品の原薬の入手は困難な場合が多く、多くの場合、市場から入手した先行バイオ医薬品製剤を用いて試験を行うか、あるいは製剤から抽出した検体を先行バイオ医薬品の原薬として用いることが想定される。しかし、製剤を用いて比較試験を行う場合、例えば製剤に含まれている添加剤が、目的物質関連物質や目的物質由来不純物のピークに重なってしまい、誤った判断をする可能性がある(図5)。このような可能性が想定される場合には、各クロマトグラフ溶出フラクションを、ウエスタンブロッティングやELISA等の免疫学的手法を用いて解析することも有用である。

必要  
される  
質、  
され  
先  
関す  
的な  
てい  
先  
試験  
めら  
物  
のケ  
物活  
活性  
きる  
ま  
やア

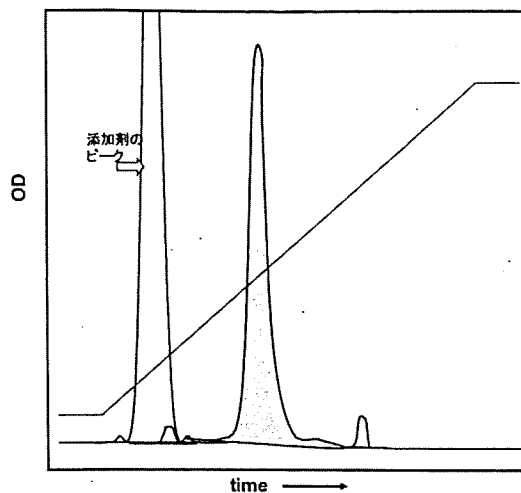


図5 先行バイオ医薬品の製剤を用いての同等性評価の課題

一方、先行バイオ医薬品製剤から抽出精製を行う場合にはその抽出法の有用性を評価しておく必要がある。どのような抽出法を用いるべきかについてはそれぞれの製品ごとに異なると想定されるが、最も注意すべき点は抽出操作によって先行バイオ医薬品の品質特性を構成する目的物質、目的物質関連物質、目的物質由来不純物、工程由来不純物等のプロファイルの同等性が担保されていることが必要である。

先行バイオ医薬品製剤を市場から入手する場合、可能であれば複数ロットを用いて品質特性に関する比較試験を行うことが有用と考えられるが、市場での入手には限界があり、必ずしも代表的なロットが得られるわけではないことに注意を払う必要がある。また、製剤のロットが異なっても原薬のロットが同一の場合も考えられる。

先行バイオ医薬品原薬の入手の困難さや、製剤のみでは必要と考えられる全ての品質特性比較試験を実施することが難しいと考えられる。従って、全ての物理的・化学的な比較試験の実施が求められているわけではない。

物理化学的試験と異なり生物活性の比較試験は、製剤でも十分適用可能と考えられ、かつ多くのケースで生物活性が高次構造の差異を反映することが多く、可能な限り複数の方法を用いて生物活性の比較試験を実施することが望ましい。特にタンパク質ドメインごとに機能の異なる生物活性を持つ製品では、それぞれの生物活性を比較評価することにより、構造上の類似性を評価できる可能性もある。

また、免疫反応性の比較を行うことにより構造的差異（重合体や分解の差異）についての情報やアジュバント効果のある不純物の評価に有用な情報が得られることもある。

品質特性解析の比較試験を通じて認められた先行バイオ医薬品との差異が、有効性や安全性にどのような影響があるかを評価し、その結果に基づいて非臨床・臨床で実施すべき試験をデザインすることが求められる。しかし、品質特性の差異が非常に大きい場合には、再度製法を見直す必要も考えられる。あるいは、バイオ後続品としての開発の可能性も検討すべきであろう。

### 3.4 規格試験法

規格及び試験方法は、ICH Q6B ガイドラインを参考に、特性解析結果及び対照とした先行バイオ医薬品との同等性/同質性評価データに基づき設定することになるが、必ずしも先行バイオ医薬品と同じ規格を設定する必要は無い。むしろバイオ後続品としての品質の恒常性を担保することが重要な場合が多い。例えば、特定の目的物質由来不純物の含量がバイオ後続品の方が少ない場合、品質の恒常性の観点から実測値に基づいた規格を設定すべきであろう。規格試験法の設定では、製造工程管理試験との相互補完性にも考慮し、合理的に試験を設定することが有用である。

### 3.5 非臨床試験

非臨床試験では、対照バイオ医薬品と比較評価することが適切と考えられる薬理学試験と、不純物の安全性評価のようにバイオ後続品のみを対象として試験を行うのが合理的な場合がある。すなわち、目的物質関連不純物や工程由来不純物に関しては、製造工程が異なっていることから不純物プロファイルも異なっていると考えられ、対照バイオ医薬品との比較を行うことにより、確立した製法の特徴を考慮し、不純物そのものの特性を評価した上で独自に安全性評価を行うことが合理的と考えられる。

ただし、不純物プロファイルに差異があることを前提として、対照バイオ医薬品との安全性を比較するというアプローチを選択することも開発戦略の一つになりえる。

指針では、毒性試験として反復投与毒性試験を求めているが、単回投与毒性試験のデータは反復投与毒性試験の中で得られるとの考え方に基づいている。

反復投与毒性試験の結果や先行バイオ医薬品で得られている有効成分等に関する情報から、特に必要と判断されない限り、バイオ後続品について、安全性薬理試験、生殖発生毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験等、その他の通常の非臨床安全性試験の必要性は低いと考えられる。

先行バイオ医薬品を参照として薬理作用が同等/同質であることの比較試験の実施が求められる。品質特性解析試験として実施したインビトロ生物活性試験のデータを、薬理試験として利用することも可能な場合があると考えられる。例えば、細胞増殖活性や細胞分化誘導活性が臨床効果と密接に関連している場合などがある。また臨床効果とは直接関連しない場合でも受容体結合

活性  
態  
ら  
医  
3.6  
ハ  
同等  
価す  
質性  
並ひ  
る種  
臨  
PD  
する  
にデ  
いは  
であ  
試験

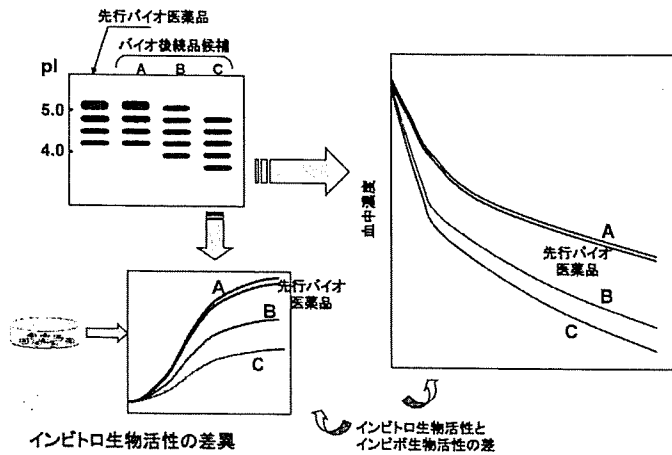


図6 糖鎖の差異が生物活性や体内動態に及ぼす可能性

活性や抗ウイルス作用試験なども、有用なインビトロ薬理試験となりえる。

一方、エリスロポエチンやフォリトロピンなどの糖タンパク質医薬品のように、糖鎖が体内動態に大きく影響するような場合など、インビトロ生物活性がインビボ活性と相関しないことが知られている。このような製品では、インビボ薬理試験によって薬効や薬力学における先行バイオ医薬品との同等性/同質性を比較することが必要となる(図6)。

### 3.6 臨床試験

バイオ後続品の開発では、品質特性及び非臨床試験結果のみによって、対照バイオ医薬品との同等性/同質性を評価することは困難と考えられ、原則的に臨床試験により同等性/同質性を評価することが必要となる。臨床での有効性評価に当たっては、先行バイオ医薬品との同等性・同質性の確認が主な目的となる。また臨床試験の実施に当たっては、品質特性、非臨床試験結果、並びに対照バイオ医薬品との比較データ等に基づいた上で、参照とする先行バイオ医薬品に関する種々の知見も考慮して、必要かつ合理的な試験をデザインすることが有用である。

臨床試験では、まず、薬力学的試験(PK試験)、薬物動態試験(PD試験)、あるいはPKとPDのデータを同時に得るためのPK/PD試験を、参照とする先行バイオ医薬品と比較して実施することになる。原則的に、対照とする先行バイオ医薬品との薬物動態の同等性/同質性を適切にデザインされたクロスオーバー試験により確認することが求められる。しかし、長半減期あるいは抗体産生が起り得るバイオ後続品では、健常人を対象としたクロスオーバー試験が不適切である可能性もある。このようなケースでは、健常人ではなく患者を対象としてクロスオーバー試験を実施することになるであろう。

このような試験により、目的とする臨床エンドポイントにおける同等性/同質性を保証できる十分なデータが得られた場合には、それ以上の臨床試験を省略できる場合もありえる。

有効性に関する比較臨床試験の実施に当たっては、参照とする先行バイオ医薬品との同等性を確認するために必要な症例数を設定するとともに、臨床的に確立されたエンドポイントを用いることが求められる。さらに、試験の実施に先立ち同等/同質とする許容域をあらかじめ設定し、その妥当性を説明することが求められる。適切な代替エンドポイントがある場合には、必ずしも真のエンドポイントを用いる必要はないが、その妥当性を裏付けるデータや文献等により十分な説明が必要とされる。

比較臨床試験で求められる被験者数については、それぞれの製品ごとに異なると考えられるが、試験のデザインによっても必要な被験者数は異なると考えられる。参考までに、EMA で承認されたバイオシミラー製品（バイオ後続品）の臨床試験での被験者数を表2に示した。必ずしも、これらの被験者数を参考にする必要はないが、同種の製品でも被験者数は大きく異なっている。また、PK 試験のみか PK/PD 試験についても、単一投与量のみならず複数の投与量での評価を行っているケースもある。さらに、目的とする効能のみならず参考とする他の効能につい

表2 EUで承認されたバイオシミラー（バイオ後続品）の臨床試験

バイオシミラー (バイオ後続品)	参照品	臨床試験
Omnitrope	Genotropin	3つの単回投与 PK/PD 試験 (N=61) GH 分泌不全小児、有効性に関する比較試験 (N=89) GH 分泌不全小児免疫原性 (N=51)
Valtropin	Genotropin	単回投与 PK 試験 (N=24) GH 分泌不全小児、有効性に関する比較試験 (N=102)
Binocrit	Epoetin alfa	2つの反復投与 PK/PD 試験 (N=158) 腎性貧血患者での有効性に関する比較試験 (N=478) 化学療法による貧血患者を用いた臨床試験 (N=114; 参考データ)
Silapo	Epoetin alfa	2つの単回投与 PK 試験 (N=72) 2つの腎性貧血患者での有効性に関する比較試験 (N=922); 1つは貧血の改善, 1つは改善の維持療法
Biograstim	Filgrastim	2つの単回投与 PK/PD 試験 (N=138): 胸部がん患者での有効性の比較試験 (N=350) 肺がん患者での有効性の比較試験 (N=240; 参考データ) 非ホジキンリンパ腫での有効性の比較試験 (N=92; 参考データ)
Filgrastim Hexal	Filgrastim	単回投与 PK/PD 試験 (N=50) 2つの反復投与 PK/PD 試験 (N=96) 胸部がん患者での有効性の試験 (N=170; 4サイクルで3ヶ月間のホローアップ)

での臨床試験データが参考データとして提出されている。

さらに、有効性の比較臨床試験において得られたデータでは安全性に関するデータが不足する場合には、独自に安全性に関するデータを得る必要も想定される。この場合には、安全性に関する臨床試験を追加で実施することが必要となるが、その場合、先行バイオ医薬品との比較試験が必ずしも求められるわけではない。また、バイオ後続品にのみ含有される工程由来不純物について安全性の懸念がある場合には、独自に安全性に関する臨床試験の実施を考慮すべきであろう。

さらに、対照バイオ医薬品が複数の効能・効果を持つ場合、他の効能・効果においても薬理学的に同様の作用が期待できることが説明できるのであれば、先行バイオ医薬品の他の効能・効果をバイオ後続品に外挿することが可能となる場合もあると考えられる。

### 3.7 製造販売後調査

バイオ後続品の開発では、臨床試験を含めて全ての情報が得られるわけではないと想定される。特に、バイオ後続品は不純物プロファイルの差異や免疫原性の差異がある可能性があり、製造販売後に安全性プロファイル等について引き続き調査することが必要と考えられる。特に、先行バイオ医薬品が複数の効能を持っており、臨床試験を実施せずに外挿により承認された効能については、市販後調査の中で有効性に関するデータの収集が必須となるであろう。

また、このために有害事象のトレーサビリティを確保することが重要である。対照とする先行バイオ医薬品やそれと同一の有効成分を持つ、いわゆる同種・同効医薬品をバイオ後続品に変更可能とされるが、一連の治療期間内に混用することは基本的に避けることが望ましいと考えられる。

## 文 献

- 1) Moran, N.; *Nature Biotechnology (NEWS) Fractured European market undermines biosimilar launches*, 26, 5-6 (2008)
- 2) Schneider, C. K., Lalinke, U.; *Toward biosimilar monoclonal antibodies*, *Nature*, 26, 985-990 (2008)
- 3) *Regulatory Aspects of biosimilars in Europe. Trend in biotechnology*, 27, 385-387 (2009)  
Draft guidance for sponsor: Information and Submission Requirements for Subsequent
- 4) *Guideline on similar biological medicinal products CHMP/437/04* (30 Oct. 2005)
- 5) *Guideline on Similar Biological Medicinal Products containing Biotechnology-Derived Proteins as Active Substance: Quality Issues: EMEA/CHMP/BWP/49348/2005* (22

- Feb. 2007)
- 6) Guideline on similar biological medicinal products biotechnology-derived proteins as active substance : non-clinical and clinical issues ; EMEA/CHMP/BMWP/42832/2005 (22 Feb. 2006)
  - 7) Annex Guideline on Similar Biological Medicinal Products Containing Biotechnology-Derived Proteins as Active Substance : Non-Clinical and Clinical Issues-Guidance on similar medicinal products containing recombinant erythropoietins EMEA/CHMP/BMWP/94526/2005 (2006)
  - 8) Annex Guideline on Similar Biological Medicinal Products Containing Biotechnology-Derived Proteins as Active Substance : Non-Clinical and Clinical Issues-Guidance on similar medicinal products containing recombinant granulocyte-colony stimulating factor. EMEA/CHMP/BMWP/31329/2005 (2006)
  - 9) Annex Guideline on Similar Biological Medicinal Products Containing Biotechnology-Derived Proteins as Active Substance : Non-Clinical and Clinical Issues-Guidance on similar medicinal products containing recombinant somatropin. EMEA/CHMP/BMWP/94528/2005 (2006)
  - 10) Annex Guideline on Similar Biological Medicinal Products Containing Biotechnology-Derived Proteins as Active Substance : Non-Clinical and Clinical Issues-Guidance on similar medicinal products containing recombinant insulin. EMEA/CHMP/BMWP/32775/05 (2006)
  - 11) John Hodgson ; WHO guidelines presage US biosimilars legislation., *Nature Biotech.*, 27, 963-965 (2009)
  - 12) Guidelines on Evaluation of Similar Biotherapeutic Products (SBPs) ; WHO/ BS/09. 2110 (2009)
  - 13) 「バイオ後続品の承認申請について」(平成 21 年 3 月 4 日付薬食発第 0304004 号) 申請区分に関する局長通知(薬食発第 0331015 号) の改正
  - 14) 「バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための指針」(平成 21 年 3 月 4 日付薬食審査発第 0304007 号)
  - 15) 「バイオ後続品に係る一般的名称及び販売名の取扱いについて」(平成 21 年 3 月 4 日付薬食審査発第 0304011 号)
  - 16) 「バイオ医薬品の承認申請に際し留意すべき事項について」(平成 21 年 3 月 4 日付薬食審査発第 0304015 号)
  - 17) The Draft Guidance for Sponsors : Information and Submission Requirements for Subsequent Entry Biologics (SEBs) ; Health Canada ; March 27, 2009 ; 09-108207-996



## Freeze-Drying of Proteins in Glass Solids Formed by Basic Amino Acids and Dicarboxylic Acids

Ken-ichi IZUTSU,<sup>\*,a</sup> Saori KADOYA,<sup>b</sup> Chikako YOMOTA,<sup>a</sup> Toru KAWANISHI,<sup>a</sup> Etsuo YONEMOCHI,<sup>b</sup> and Katsuhide TERADA<sup>b</sup>

<sup>a</sup>National Institute of Health Sciences; 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan; and <sup>b</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toho University; 2-2-1 Miyama, Funabashi, Chiba 274-8510, Japan.

Received August 1, 2008; accepted October 11, 2008; published online October 15, 2008

The purpose of this study was to produce and characterize glass-state amorphous solids containing amino acids and organic acids that protect co-lyophilized proteins. Thermal analysis of frozen solutions containing a basic amino acid (e.g., L-arginine, L-lysine, L-histidine) and a hydroxy di- or tricarboxylic acid (e.g., citric acid, L-tartaric acid, DL-malic acid) showed glass transition of maximally freeze-concentrated solute at temperatures ( $T_g$ ) significantly higher than those of the individual solute solutions. Mixing of the amino acid with some dicarboxylic acids (e.g., oxalic acid) also suggested an upward shift of the transition temperature. Contrarily, combinations of the amino acid with monocarboxylic acids (e.g., acetic acid) had  $T_g$ 's between those of the individual solute solutions. Co-lyophilization of the basic amino acids and citric acid or L-tartaric acid resulted in amorphous solids that have glass transition temperatures ( $T_g$ ) higher than the individual components. Mid- and near-infrared analysis indicated altered environment around the functional groups of the consisting molecules. Some of the glass-state excipient combinations protected an enzyme (lactate dehydrogenase, LDH) from inactivation during freeze-drying. The glass-state excipient combinations formed by hydrogen-bonding and electrostatic interaction network would be potent alternative to stabilize therapeutic proteins in freeze-dried formulations.

**Key words** freeze-drying; protein formulation; amorphous; stabilization; glass

Freeze-drying is a popular method of ensuring the stability of proteins that are not stable enough in aqueous solutions during the period required for storage and distribution.<sup>1,2</sup> Various freeze-dried protein formulations contain excipients (e.g., sugars, polymers, and amino acids) that protect proteins from physical and chemical changes. Disaccharides (e.g., sucrose, trehalose) are the most popular among them because they stabilize proteins both thermodynamically and kinetically in aqueous solutions and freeze-dried solids.<sup>3–5</sup>

The development of freeze-dried protein formulations containing amino acids is often more challenging than the development of formulations with saccharides because of the varied physical and chemical properties (e.g., crystallinity, glass transition temperature) of the freeze-dried amino acids, as well as their tendency to form complexes with other ingredients.<sup>6</sup> Many amino acids are considered to protect proteins basically in similar mechanisms with disaccharides. They thermodynamically stabilize protein conformation in aqueous solutions and probably in frozen solutions by being preferentially excluded from the immediate surface of proteins.<sup>7</sup> Glass-state amorphous solids formed by freeze-drying of the disaccharides or some amino acids protect proteins from structural changes thermodynamically by substituting surrounding water molecules.<sup>8</sup> They also reduce chemical degradation of freeze-dried proteins kinetically by reducing the molecular mobility.<sup>2,8</sup> In addition, some amino acids (e.g., L-arginine) also prevent protein aggregation in aqueous solutions prior to the drying process and after reconstitution.<sup>9</sup> Choosing appropriate counterions that form glass-state solid should be one of the key factors in designing amino acid-based amorphous freeze-dried formulations.<sup>10,11</sup> For example, glass transition temperatures ( $T_g$ ) of freeze-dried L-histidine salts depend largely on the counterions.<sup>12</sup> Co-lyophilization of L-arginine and multivalent inorganic acids (e.g.,  $H_3PO_4$ ,  $H_2SO_4$ ) results in glass-state amorphous solids

that protect proteins during the process and storage (e.g., tissue plasminogen activator formulation, PDR 2003).<sup>13</sup> Some organic acid and inorganic cation combinations (e.g., sodium citrates) also form high glass transition temperature amorphous solids.<sup>14</sup> Various functional groups (e.g., amino, carboxyl, hydroxyl) in the constituting molecules contribute significantly to form the glass-state amorphous salt solids.<sup>15</sup> Producing glass-state amorphous solids by freeze-drying of amino acid and organic acid combinations, and their application in pharmaceutical formulations are interesting topics to explore.<sup>15</sup>

The purpose of this study was to produce stable amorphous solids that protect proteins by freeze-drying combinations of amino acids and organic acids. The physical properties of frozen solutions and freeze-dried solids containing the popular excipients and model chemicals were studied. The effect of the excipient combinations on the freeze-drying of lactate dehydrogenase (LDH) was also examined.

### Experimental

**Materials** LDH (rabbit muscle) was obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO, U.S.A.). Succinic acid was produced by Kanto Chemical Co. (Tokyo, Japan). L-(+)-Tartaric acid, DL-malic acid, and other chemicals were of analytical grade and were purchased from Wako Pure Chemical (Osaka, Japan). The protein solutions were dialyzed against 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), and then centrifuged (1500 g × 5 min) and filtered (0.45  $\mu$ m, polyvinylidene difluoride (PVDF), Millipore) to remove insoluble aggregates before the freeze-drying study.

**Freeze-Drying** A pH meter (HM-60G, TOA-DKK Co., Tokyo, Japan) was used to determine the pH of the aqueous solutions at 25 °C. A freeze-drier (Freezvac 1C, Tozai-Tsusho, Tokyo, Japan) was used to lyophilize the aqueous solutions. Aliquots of aqueous solutions (250  $\mu$ l) in flat-bottom glass vials (10 mm diameter) were frozen by immersion in liquid nitrogen. The solutions were freeze-dried without shelf temperature control (20 h), and then at 35 °C (8 h). Solid samples for diffuse-reflection near-infrared analysis were prepared by freeze-drying the aqueous solutions (2 ml) in glass vials (21 mm diameter).

**Thermal Analysis** Thermal analysis of frozen solutions and dried solids

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

was performed using a differential scanning calorimeter (DSC) (Q-10, TA Instruments, New Castle, DE, U.S.A.) and software (Universal Analysis 2000, TA Instruments). Aliquots of aqueous solutions (10  $\mu$ l) in aluminum cells were cooled from room temperature at 10  $^{\circ}$ C/min, and then scanned from  $-70^{\circ}$ C at 5  $^{\circ}$ C/min. The effect of heat-treatment (annealing) on the thermal properties of the frozen solutions was studied after the initial heating scan paused at  $-10^{\circ}$ C, then the samples were maintained at this temperature for 10 min. Thermal data were acquired in the subsequent heating from  $-70^{\circ}$ C at 5  $^{\circ}$ C/min. Freeze-dried solids (1–2 mg) in hermetic aluminum cells were subjected to the thermal analysis from  $-20^{\circ}$ C at 5  $^{\circ}$ C/min under nitrogen gas flow. Melted organic acids (approx. 5 mg, 200  $^{\circ}$ C) in aluminum cells were rapidly cooled to  $-50^{\circ}$ C, and then scanned at 5  $^{\circ}$ C/min to obtain the glass transition temperatures. Glass transition temperatures were determined as the midpoint (maximum inflection) of the discontinuities in the heat flow curves.

**Powder-X-Ray Diffraction (XRD)** The powder X-ray diffraction patterns were measured at various temperatures by using a Rint-Altima diffractometer (Rigaku, Tokyo, Japan) with  $\text{CuK}\alpha$  radiation at 40 kV/40 mA. The samples were scanned in the area of  $5^{\circ} < 2\theta < 35^{\circ}$  at an angle speed of 15  $^{\circ}$ /min by heating at 2  $^{\circ}$ C/min from room temperature.

**Mid- and Near-Infrared Analysis** A Fourier-transform infrared spectrophotometer (MB-104, Bomen, Quebec, Canada) with a gas generator (Balston, Haverhill, MA, U.S.A.) and Grams/32 software were used to obtain mid-infrared spectra of freeze-dried solids. Approximately 0.5 mg of the solid was mixed with dried KBr powder (250 mg) and made into tablets by compression. The KBr tablets were scanned 128 times to obtain the spectra in the 400–4000  $\text{cm}^{-1}$  region. Near-infrared spectroscopy was performed by using a Bruker MPA system with a diffuse-reflectance integrating-sphere probe (PbS detector) and OPUS software (Ettlingen, Germany). Near-infrared light was directed upward from the bottom of the glass vials containing freeze-dried solids to obtain the reflected signal over a range of 4000–12000  $\text{cm}^{-1}$  with a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$  in 128 scans. The freeze-dried solids were measured twice by rotating the sample vials between measurements.

**Activity of Lactate Dehydrogenase in Freeze-Dried Solids** Aqueous solutions (250  $\mu$ l) containing LDH (0.05 mg/ml) and excipients were freeze-dried in flat-bottom glass vials (10 mm diameter). One of the enzyme solutions was freeze-dried at a higher sodium phosphate buffer concentration (50 mM, pH 7.0). Other enzyme solutions contained the added excipients and lower concentration buffer components (<1 mM) diluted from the dialyzed protein solutions. Activity of LDH was obtained spectrophotometrically at 25  $^{\circ}$ C. Each 1.0 ml of assay mixture contained 0.35 mM pyruvic acid and 0.07 mM reduced nicotinamide-adenine dinucleotide (NADH) in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5). The enzyme reaction was started by the addition of LDH solution (50  $\mu$ l), and the decrease in the absorbance at 340 nm was monitored. The enzyme activity (%) relative to that before freezing was shown.

## Results

**Physical Property of Frozen Solutions** The thermal profiles of frozen solutions containing L-histidine and citric acid at various concentration ratios (total 200 mM) are shown in Fig. 1. The single-solute frozen L-histidine solution (200 mM) showed a  $T'_g$  (glass transition temperature of maximally freeze-concentrated solute) at  $-33.5^{\circ}$ C, and an exotherm peak that suggests eutectic crystallization at around  $-8^{\circ}$ C.<sup>12</sup> Freeze-drying of solutions at above their  $T'_g$  often induces physical collapse because of the significantly reduced local viscosity in the freeze-concentrated phase.<sup>1)</sup> The second scan of the 200 mM L-histidine solutions after the heat-treatment ( $-10^{\circ}$ C, 10 min) gave flat thermograms that indicate crystallized solute up to the ice melting temperature (data not shown). The citric acid solution (200 mM) had a  $T'_g$  at  $-55.1^{\circ}$ C, indicating that the solute remained amorphous in the freeze-concentrated phase surrounding ice crystals. The L-histidine crystallization peak disappeared in the presence of citric acid. The two-solute frozen solutions showed transitions ( $T'_g$ 's) at temperatures as high as  $-22.8^{\circ}$ C at the equal (100 mM) L-histidine and citric acid concentrations.

Figure 2 shows transition temperatures ( $T'_g$ ) of frozen solu-

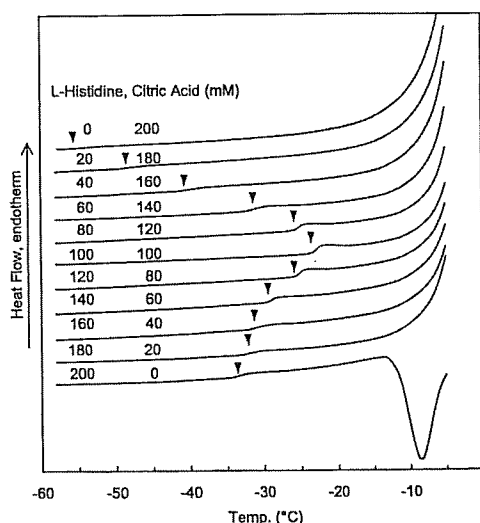


Fig. 1. Thermal Profiles of Frozen Solutions Containing L-Histidine and Citric Acid

Aliquots (10  $\mu$ l) of solutions in hermetic aluminum cells were scanned from  $-70^{\circ}$ C at 5  $^{\circ}$ C/min. Glass transition temperatures of maximally freeze-concentrated solutes ( $T'_g$ ) are indicated by inverted triangles (▼).

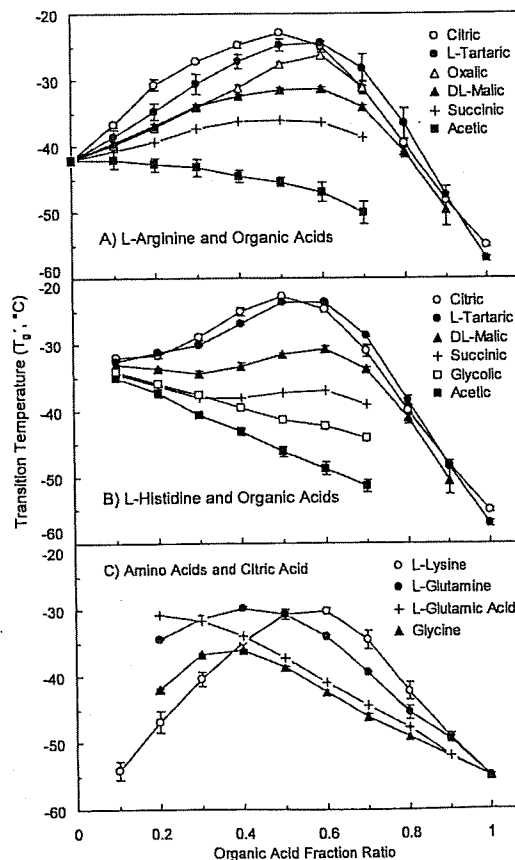


Fig. 2. Glass Transition Temperatures of Maximally Freeze-Concentrated Solute ( $T'_g$ ) in Frozen Solutions Containing an Amino Acid and an Organic Acid at Varied Concentration Ratios (Total 200 mM, Average  $\pm$  S.D.,  $n=3$ )

tions containing amino acids and organic acids at various concentration ratios. Some single-solute frozen amino acid or organic acid solutions (200 mM) had apparent  $T'_g$  transitions at  $-44.2^{\circ}$ C (L-arginine),  $-55.1^{\circ}$ C (citric acid), and

–57.1 °C (L-tartaric acid). The frozen L-glutamine solution showed both  $T'_g$  (–42.8 °C) and the subsequent eutectic crystallization peak (approx. –25 °C) in the heating scan (data not shown). Thermograms of the frozen L-lysine and DL-malic acid solutions inclined gradually without apparent transition up to the ice melting endotherm, which suggested  $T'_g$ s lower than –60 °C. Exotherm peaks either in the cooling process (glycine, acetic acid) or in the heating scan (oxalic acid) indicated eutectic crystallization in the frozen solution.<sup>16)</sup> Potential  $T'_g$  transitions of some frozen solutions that also showed eutectic crystallization peaks (e.g., 200 mM L-histidine or L-glutamine) were not included in the figure. The limited solubility of some amino acids and organic acids (e.g., L-glutamic acid, fumaric acid, maleic acid) prevented them from undergoing thermal analysis at 200 mM. A lower concentration glutamic acid solution (100 mM) showed a  $T'_g$  at –32.2 °C and an exotherm peak that suggests eutectic crystallization at around –11.0 °C (data not shown).

Mixing of the solutes induced some unique physical properties in the frozen solutions that depend on the number of functional groups in the consisting molecules. The transition temperatures ( $T'_g$ s) of frozen solutions containing a basic or neutral amino acid (L-histidine, L-arginine, L-lysine, L-glutamine, glycine) and a hydroxy di- or tricarboxylic acid (citric acid, L-tartaric acid, DL-malic acid) showed bell-shaped profiles. The frozen solutions containing a hydroxy di- or tricarboxylic acid (citric acid, L-tartaric acid) and an acidic amino acid (L-glutamic acid) did not show the mixing-induced upward  $T'_g$  shift. Citric acid also effectively prevented the crystallization of glycine in the frozen solutions. Dicarboxylic acids (succinic acid, maleic acid, fumaric acid, oxalic acid) showed a high tendency to crystallize in the single-solute frozen solutions and in some mixture frozen solutions.<sup>15,17)</sup> The frozen solutions containing L-arginine and oxalic acid or succinic acid also presented the high transition temperature ( $T'_g$ ) by mixing. A mono-carboxylic acid (acetic acid), a hydroxy mono-carboxylic acid (glycolic acid), and HCl did not show the upward  $T'_g$  shift in the mixture with the basic amino acids.<sup>13)</sup>

**Physical Property of Freeze-Dried Solids** Freeze-drying of the single-solute amino acid solutions resulted in cylindrical cakes that showed varied crystallinity in the powder X-ray diffraction (XRD) and thermal analyses (Figs. 3, 4). Freeze-dried L-arginine showed the typical narrow XRD pattern of amorphous solids. Thermal scan of the solid showed the glass transition (52.6 °C) and subsequent crystallization exotherm (105–110 °C). Freeze-dried L-histidine showed largely amorphous XRD pattern (30 °C) with the broad glass transition (65–100 °C) and crystallization at varied temperatures (120–150 °C). The L-arginine and L-histidine solids showed apparent crystallization peaks in the XRD patterns at the elevated temperature (150 °C). The dried L-glutamine (200 mM) solids showed features of both crystalline (e.g., peaks in the XRD pattern) and amorphous (e.g., glass transitions and heat-induced crystallization exotherm) solids. The solute concentration in the initial solution and thermal history in the freeze-drying process should determine the crystallinity of the freeze-dried L-histidine and L-glutamine.<sup>12)</sup> Glycine was freeze-dried as  $\beta$  polymorph crystal.<sup>18)</sup> Freeze-drying of citric acid or L-tartaric acid solutions (200 mM) resulted in unstructured or particulate solids that

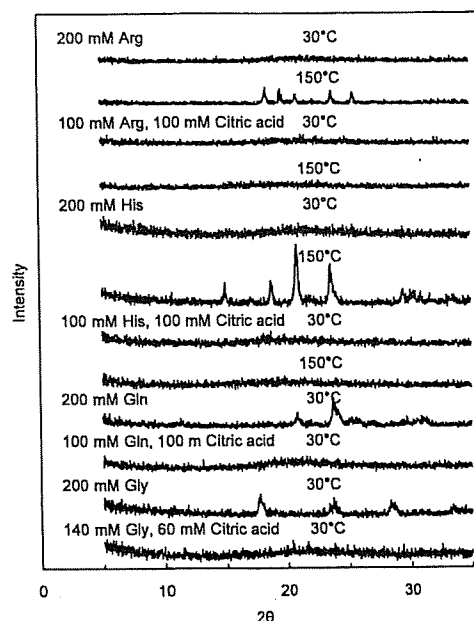


Fig. 3. Powder X-Ray Diffraction Patterns of Freeze-Dried Solids Containing Amino Acids and Citric Acid

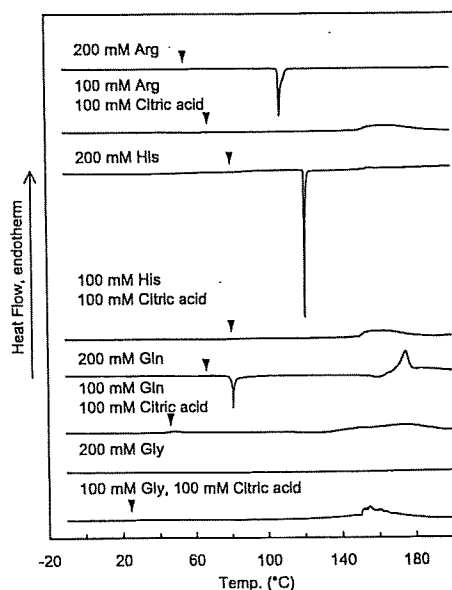


Fig. 4. DSC Thermograms of Freeze-Dried Solids Containing Amino Acids and Citric Acid

Freeze-dried solids (1–2 mg) in hermetic aluminum cells were scanned from –20 °C at 5 °C/min.

indicate physical collapse in the primary during process. Amorphous solids of the organic acids prepared by rapid-cooling of the melt liquid showed glass transition at 9.2 °C (citric acid) and 68.1 °C (L-tartaric acid) in the thermal scan ( $n=3$ ).<sup>19)</sup>

Co-lyophilizing the basic or neutral amino acids (L-arginine, L-histidine, L-glutamine, glycine) and the organic acid (citric acid, L-tartaric acid) produced cylindrical non-crystalline cake solids at wide initial concentration ratios (Figs. 3–5). The solids obtained by freeze-drying the basic amino acids (L-arginine, L-histidine) with citric or L-tartaric acid showed glass transition at temperatures ( $T'_g$ s) much higher

than those of the individual components. The transitions were observed at temperatures as high as 89.5 °C (140 mM L-arginine, 60 mM citric acid) or 98.5 °C (160 mM L-histidine, 40 mM citric acid). Shrinking of some solids containing higher ratio of organic acid during the freeze-drying process suggested their low glass transition temperatures. The XRD and thermal analysis also indicated that the co-lyophilized solids remained amorphous up to 150 °C. Some binary freeze-dried solids showed a broad endotherm that suggests component decomposition at the elevated temperatures. The mixing of L-arginine with citric acid and with L-tartaric acid showed similar  $T_g$  profiles, in spite of the large difference in their transition temperatures of the cooled-melt solids. The bell-shaped profiles of the transition temperatures were significantly different from the reported transitions of binary nonionic molecule systems that follow Gordon-Taylor equation.<sup>20</sup> Glass transition temperatures of amorphous solids containing ideally mixed nonionic molecules without particular attractive or repulsive interactions shift between those of the individual components. Contrarily, the glass transition temperatures of co-lyophilized L-glutamine and citric acid

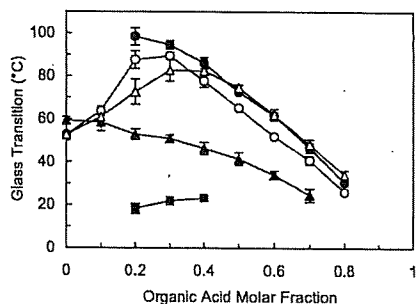


Fig. 5. Glass Transition Temperatures of Freeze-Dried Binary Solids

Each symbol denotes transition of solids containing L-arginine and citric acid (O), L-arginine and tartaric acid ( $\Delta$ ), L-histidine and citric acid ( $\bullet$ ), L-glutamine and citric acid ( $\blacktriangle$ ), or glycine and citric acid ( $\blacksquare$ ) (total: 200 mM, average  $\pm$  S.D.,  $n=3$ ).

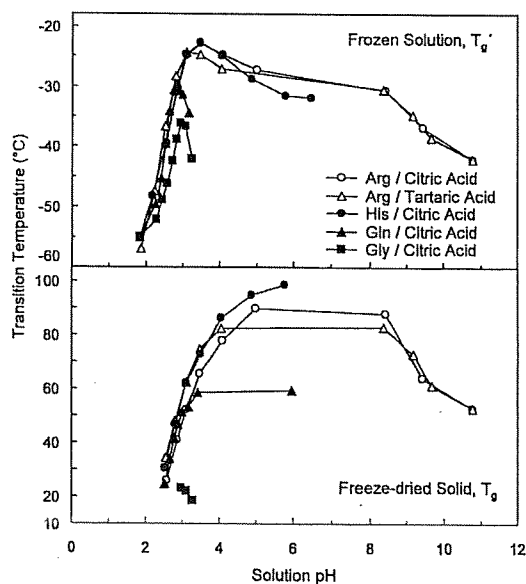


Fig. 6. Effect of Initial Solution pH (25 °C) on the Transition Temperatures of Frozen Solutions ( $T'_g$ ) and Freeze-Dried Solids ( $T_g$ ) Containing an Amino Acid and an Organic Acid at a Fixed (0.1) Molar Concentration Ratio Intervals (200 mM Total,  $n=3$ )

combination solids shifted linearly between those of the individual components, which suggested absence of the particular attractive interactions between the heterogeneous molecules in the solids. Co-lyophilization of glycine and citric acid resulted in amorphous cake solids only at limited molar ratios.

Transition temperatures ( $T'_g$ ,  $T_g$ ) of the excipient combinations obtained at a fixed (0.1) molar ratio interval were plotted against the pH of the initial solutions (25 °C, Fig. 6). Some mixtures (e.g., L-arginine and citric acid, L-histidine and citric acid) yielded high  $T'_g$  frozen solutions and high  $T_g$  freeze-dried solids from weakly acidic initial solutions ( $-35^\circ\text{C} < T'_g$ ,  $80^\circ\text{C} < T_g$ , pH 4–6), which are preferable in parenteral protein formulations. Small changes in the L-arginine and organic acid compositions (0.1 molar fraction) significantly shifted pH at the neutral region.

The mid- and near-infrared spectra of the freeze-dried L-arginine and citric acid combinations showed broad absorption bands that are typical of amorphous solids (Figs. 7, 8).<sup>21</sup> Co-lyophilization with citric acid reduced an amino group absorption band of L-arginine at  $1550\text{ cm}^{-1}$  in the mid-IR spectra (KBr method), indicating altered environment of the functional group. Similar reduction of the amino group band has been reported in L-arginine-HCl salt crystal and L-argi-

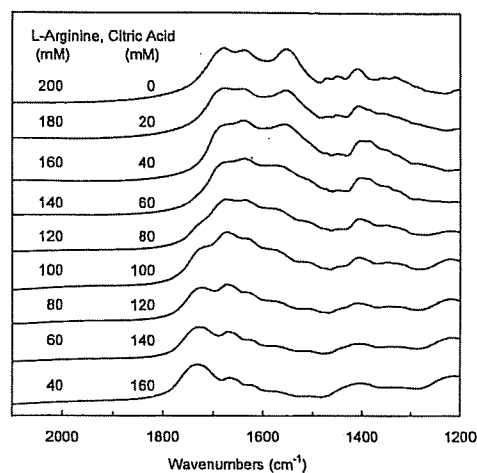


Fig. 7. Mid-Infrared Spectra of Freeze-Dried L-Arginine and Citric Acid Combinations Obtained by a KBr Tablet Method (128 Scans)

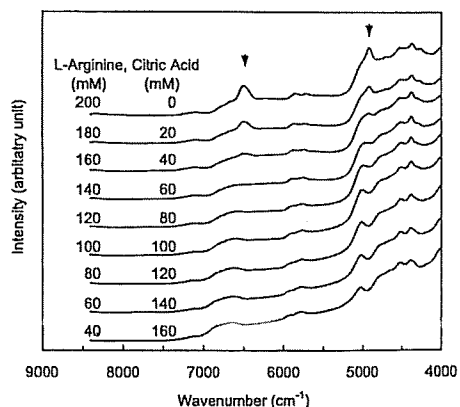


Fig. 8. Diffuse-Reflection Near-Infrared Spectra of Freeze-Dried L-Arginine and Citric Acid Combinations Obtained at the Bottom of the Glass Vials (128 Scans)