

ては、乳化しているもので「〇〇軟膏」としているものは「〇〇軟膏」と称してよい旨を当局からの通知で示すこととなった。また、局方各条収載のうちで、乳化している軟膏剤である「親水軟膏」は「親水クリーム」、「吸水軟膏」は「吸水クリーム」と名称が変更されたが、「親水軟膏」及び「吸水軟膏」の名称も別名として残すこととした。

C-7: 製剤総則改正後の課題

(1) 日本薬局方は医療用医薬品、OTC医薬品、生薬含有製剤、薬局製剤、院内製剤すべてを対象としている。したがって、このたびの製剤総則改定は極めて大きな改訂であり、製薬企業、医療関係者、関連研究機関等への周知をはかることが重要である。また各条収載製剤についても、総則改定にあわせて、記載の整備を徹底することが必要である。

(2) また大きな課題としては、一般試験法に記載のない製剤特性の試験法の設定がある。現在「適切な〇〇性を有する」としてある製剤特性について、可能なものから一般試験法の整備が必要である。この中には国際調和で取り上げられている試験法などがあり、近々に整備が可能と考えられる。

(3) このたびの製剤総則改正の方針の一つは「国際的整合性」にあった。製剤の分類および定義、製剤試験内容については、欧米の動向をみながら改正を行った。しかし一方で欧米の薬局方も改正の議論を行っているところである。したがって、日本薬局方としても改正内容に関する情報発信を積極的に行い、欧米薬局方と齟齬ができないように注意を払う必要がある。

(4) さらに、将来にわたっての課題としては、今後も医療現場において導入され標準的に用いられるようになった新規製剤については、速やかに製剤各条へ収載するよう、フォローアップが重要である。

(5) 製剤通則 8 に記したような非無菌製剤に関する微生物混入への配慮については、パブリックコメントにおいて、適用すべき微生物限

度試験を適用すべきケースについて、具体的な記述を求める意見が寄せられた。したがってこの点を何らかまとめる必要がある。

(6) 製剤通則10に関する容器・包装については、新薬については、容器施栓系という用語がICHで仕様されている。また一次容器、二次容器という用語も使われており、局方医薬品を対象とする薬局方の、容器、包装と用語がことなる。したがって今後容器・包装について、薬局方における容器・包装関係の用語、およびその定義を整理する必要がある。その上で、医薬品の一定性確保の観点から、容器・包装に記述を整備する必要がある。あわせて、容器・包装に関する試験法も整備が必要と思われる。

D. 考察

C-7 (5) でふれた非無菌製剤における微生物混入への配慮について、以下考察することとする。

局方製剤通則では、注射剤、点眼剤、眼軟膏剤は無菌製剤とされ、無菌試験<4.06>による品質保証、あるいは滅菌工程の重要管理項目を適正に管理することによって無菌性を保証するパラメトリックリリースによる管理が必要になる。ただし、これら製剤以外の非無菌製剤であっても、微生物による汚染や増殖を避けて、製剤を製造、保管することの重要性を示し、必要に応じて、微生物限度試験<4.05>を適用すべきである。

微生物限度試験を適用するのはどのような場合かについては、(1)製剤が微生物に汚染されるリスク、および(2)微生物汚染の人体に与える影響を考慮して判断すべきである。

例えば、経口固形製剤では微生物の汚染、繁殖が起こりにくく、人体への影響が少ないと考えられるので、原材料、製造環境の微生物管理が適切に行われている限り、微生物限度試験は一般に不要と考えられよう。しかし、微生物汚染のリスクが高いような液剤、適用後に人体への影響が大きい吸入剤の場合などは、微生物限

度試験の適用を検討する必要がある。

ただし、微生物限度試験を適用する場合でも、当該試験をスキップ試験とすることも含めて、微生物管理をどのように実施するのが効率的で効果的であるかを個別の製剤ごとに検討すればよい。

なお、平成13年5月1日発出の“新医薬品の規格及び試験方法の設定について”（医薬審発第568号）のフローチャート#8「非無菌製剤の微生物学的試験」に非無菌製剤の微生物試験試験設定の考え方が示されている。これは新有効成分医薬品を対象として作成されたものであるが、局方医薬品においても当てはまるものである。また非無菌製剤の微生物管理試験に関する一般的な考え方は、日局16参考情報「非無菌医薬品の微生物学品質特性」に示されており、試料の採取方法、試験の実施頻度、微生物管理計画、剤形ごとの許容基準値が示されている。また日局16参考情報「保存効力試験法」には、多回投与容器中に充てんされた製剤自体又は製剤に添加された保存剤の効力を微生物学的に評価する方法が示されている。

E. 結論

このたびの製剤総則改正は、半世紀ぶりともいえる大改正であった。

改正製剤総則では、臨床で標準的に使用されている製剤をほぼ網羅するとともに、投与部位および適用部位を大分類し、さらに製剤の形状や特性等によりさらに細分類した。この改正により、医薬品製剤の全体像の把握が可能になり、医療関係者の医薬品製剤の教育用テキストとして使用することもできよう。その上で、各製剤の品質管理に必要な基本的な要件（製剤試験、容器・包装、貯法等）を整備したことにより、医薬品品質管理のテキストとしても使用できると思われる。

大きな改正のため、残された課題も少なくないが、日局16製剤総則の何よりの成果は、今後臨床現場に導入される製剤についても、速や

かに収載を可能とする柔軟性のあるフレームワークの完成にあると考えている。

日局16製剤総則に書き込まれる「非無菌製剤に関する微生物混入への配慮」について、以下のような解説をまとめた：(1)医薬品製剤では、非無菌製剤であっても、微生物による汚染や増殖を避けて、製剤を製造、保管することが重要であり、必要に応じて微生物限度試験を適用すべきである；(2)微生物限度試験を適用すべきケースについては、製剤が微生物に汚染されるリスク、微生物汚染の人体に与える影響を考慮して判断すべきである；(3)例えば微生物の汚染、繁殖が起こりにくく、人体への影響が少ないと考えられる経口固形製剤では、原材料や製造時の微生物管理が適切に行われている限り、微生物限度試験は一般に不要である一方、微生物汚染のリスクが高い液剤、人体への影響が大きい吸入剤は微生物限度試験の適用を検討する必要がある；(4)ただし、微生物限度試験の適用については、スキップ試験とすることも含めて、個別の製剤ごとに効率的、効果的な微生物管理の方策をたてればよい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kadoya, S., Fujii, K., Izutsu, K., Yonemochi, E., Terada, K., Yomota, C., Kawanishi, T.: Freeze-drying of proteins with glass-forming oligosaccharide-derived sugar alcohols, *Int J Pharm*, 389, 107-113, (2010)
- 2) Suzuki, T., Ishii-Watabe, A., Tada, M., Kobayashi, T., Kanayasu-Toyoda, T., Kawanishi, T., Yamaguchi, T.: Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: a comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and

Fc-fusion proteins to human neonatal FcR,
J Immunol., 184, 1968-76 (2010)

- 3) H. Shibata, C. Saito, C. Yomota, T. Kawanishi, Ammonium ion level in serum affects doxorubicin release from liposomes. *Pharmazie*, 651, 251-253 (2010)
- 4) K. Izutsu, K. Fujii, C. Katori, C. Yomota, T. Kawanishi, Y. Yoshihashi, E. Yonemochi, K. Terada, Effects of solute miscibility on the micro- and macroscopic structural integrity of freeze-dried solids, *J. Pharm. Sci.* 99, 4710-4719 (2010)
- 5) Sakai-Kato, K., Saito, E., Ishikura, K., Kawanishi, T.: Analysis of intracellular doxorubicin and its metabolites by ultra-high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 878, 1466-1470 (2010)
- 6) Izutsu, K. I., Yomota, C., Kawanishi, T., Stabilization of liposomes in frozen solutions through control of osmotic flow and internal solution freezing by trehalose., *J Pharm Sci* (in press)
- 7) Miyazaki, T., Aso, Y., Yoshioka, S., Kawanishi, T., Differences in crystallization rate of nitrendipine enantiomers in amorphous solid dispersions with HPMC and HPMCP., *In J. Pharm*, 407, 111-118 (2011)
- 8) 川西 徹: バイオ後続品の開発状況とその評価、ジェネリック研究, 4, 5-18 (2010)
- 9) 川西 徹: 製剤総則の改正、薬局 62, 2598-2605 (2011)
- 10) 川西 徹: 製剤試験法、薬局 62, 2654-2657 (2011)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

医薬品の製造・品質管理の高度化と国際化に対応した日本薬局方の改正のための研究
分担研究報告書

医薬品の名称、化学名及び構造式の改正に関する研究

分担研究者 宮田直樹
名古屋市立大学 大学院薬学研究科 教授

研究協力者 山崎 壮
国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 室長

研究要旨

本研究は、日本薬局方 (JP) 収載医薬品を中心に我が国で承認されている医薬品の名称 (日本名、英名、別名)、構造式、分子式、分子量、化学名、ケミカル・アブストラクツ・サービス (CAS) 登録番号 (CAS 番号)、および、基原の項に含まれる構造情報など医薬品の本質を規定する項目 (以上を、名称関連事項と略す) について、医薬品の製造・品質管理の高度化と国際化に対応するために必要な検討事項を抽出し、今後の JP の改正作業に資することを目的とする。

今年度は、JP 収載医薬品の化学名および構造式について、平成 23 年 3 月の第 16 改正にむけて、国際調和の観点から局方全体の整合性を検討し、修正の必要な項目を明らかにした。これらの検討結果は、平成 23 年 3 月 24 日に告示された第 16 改正日本薬局方 (JP16) に反映された。

医薬品の名称関連事項は医薬品の本質を規定するものであり、その記載内容は、科学的に正しく、また、国際的にも調和している必要があり、今後も継続的に検討し修正を提案できる体制が必要である。

A. 研究目的

日本薬局方 (JP) には我が国で使用されている主要な医薬品が収載され、法律すなわち規格書としての役割を果たしている。加えて JP は、我が国の医薬品の規範書としての役割も負っている。JP 収載医薬品の医薬品各条は、医薬品の情報記載の規範を

示しておりその波及効果は大きい。このような観点から、JP の記載内容は、

- 1) 科学的に正しいこと、
- 2) 整合性があること、
- 3) 国際的に調和していること、
- 4) 情報の電子化に対応していること、

などが必要要件となる。

本研究では、JP に収載されている医薬品を中心に我が国で承認されている医薬品の名称（日本名、英名、別名）、構造式、分子式、分子量、化学名、ケミカル・アブストラクツ・サービス(CAS)登録番号（CAS番号）、および、基原の項に含まれる構造情報など、医薬品の本質を規定する項目（以上を、名称関連事項と略す）について、先に示した観点から記載内容を精査し、医薬品の製造・品質管理の高度化と国際化に対応した日本薬局方の改正に資するための調査研究を行う。

今年度は、第 16 改正日本薬局方(JP16) 収載予定の医薬品の化学名および構造式について、国際調和の観点および局方全体の整合性の面から記載事項を検討し、修正の必要な項目を明らかにした。

B. 研究方法

JP16 収載予定の医薬品（JP15 既収載品目および JP16 新規収載品目）の化学名および構造式について、米国薬局方（USP）および欧州薬局方（EP）の記載内容と比較検討するとともに、JP 収載品目間での不整合を調べ、修正が必要な品目を調査した。

C. 研究結果

1) methane 置換体の化学名に関する調査

JP15 既収載の「ビホナゾール」や「クロトリマゾール」など methane 置換体の化学名において、methane に置換するすべての置換基を括弧で囲んでいる場合と置換基を囲っていない場合があり、局方全体で整合性がとれていない。

JP15 収載品目のうち括弧で囲んでいない例：「ビホナゾール」

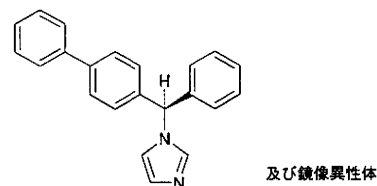
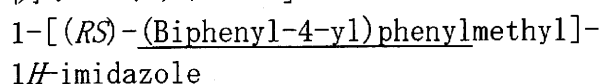


図 1 ビホナゾール

JP15 収載品目のうち括弧で囲んである例：「クロトリマゾール」

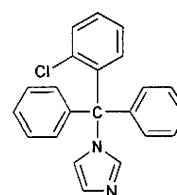
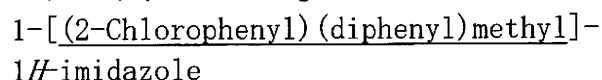
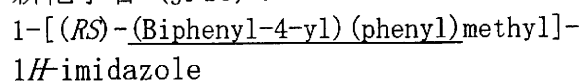


図 2 クロトリマゾール

methane 置換体の化学名は、methane に置換するすべての置換基を括弧で囲んだ化学名のほうが構造式の理解が容易であることから、「ビホナゾール」の化学名を methane に置換するすべての置換基を括弧で囲んだ化学名に修正することが望ましい。

「ビホナゾール」

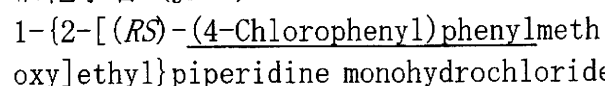
新化学名（JP16）：



同様に、「クロペラスチン塩酸塩」, 「ヒドロキシジン塩酸塩」, 「ヒドロキシジンパモ酸塩」, 「セチリジン塩酸塩」などの化学名も修正が必要である。

「クロペラスチン塩酸塩」

旧化学名（JP15）：



新化学名（JP16）：

1-{2-[(*RS*)-(4-Chlorophenyl)(phenyl)methoxy]ethyl}piperidine
monohydrochloride

「ヒドロキシジン塩酸塩」

旧化学名 (JP15) :

2-(2-{4-[(*RS*)-(4-Chlorophenyl)phenyl]methyl}piperazin-1-yl)ethoxy) ethanol
dihydrochloride

新化学名 (JP16) :

2-(2-{4-[(*RS*)-(4-Chlorophenyl)(phenyl)methyl]piperazin-1-yl}ethoxy) ethanol
dihydrochloride

「セチリジン塩酸塩」

旧化学名 (JP15) :

2-(2-{4-[(*RS*)-(4-Chlorophenyl)phenyl]methyl}piperazin-1-yl)ethoxy) acetic
acid dihydrochloride

新化学名 (JP16) :

2-(2-{4-[(*RS*)-(4-Chlorophenyl)(phenyl)methyl]piperazin-1-yl}ethoxy) acetic
acid dihydrochloride

2) クロメン構造を有する医薬品の化学名の調査

JP15 既記載の「クロモグリク酸ナトリウム」や「ブクモロール塩酸塩」などクロメン構造を有する医薬品の化学名において、「ブクモロール塩酸塩」のように「chromene」を用いて化学名を表記する場合と、「クロモグリク酸ナトリウム」のように「1-benzopyran」を用いて化学名を表記する場合とが混在しており、局方全体で整合性がとれていない。

JP15 記載品目のうち「chromene」を用いた例 :

「ブクモロール塩酸塩」

8-{(2*RS*)-3-[(1,1-Dimethylethyl)amino]-2-hydroxypropyloxy}-5-methylchromen-2-one
monohydrochloride

JP15 記載品目のうち「1-benzopyran」を用いた例 :

「クロモグリク酸ナトリウム」

Disodium

5,5'-(2-hydroxytrimethylenedioxy)bis(4-oxo-4*H*-1-benzopyran-2-carboxylate)

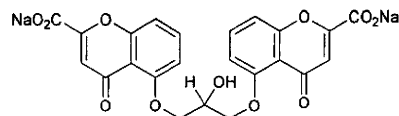


図2 クロモグリク酸ナトリウム

「chromene」は、IUPAC で使用が認められている慣用名であり、「chromene」を用いた化学名で統一することが望ましい。

「クロモグリク酸ナトリウム」

新化学名 (JP16) : Disodium

5,5'-(2-hydroxypropane-1,3-diyl)bis(oxy)bis(4-oxo-4*H*-chromene-2-carboxylate)

3) トシル酸塩の化学名の調査

IUPAC の勧告(2003)で、トシル酸塩の慣用名である「tosylate」は、酸の名前を命名するのに使用しない、となっている。JP15 では、「トスフロキサシントシル酸塩」などトシル酸塩の化学名に「tosylate」を用いている。

JP15 記載品目のうち「tosylate」を用いた例 :

「トスフロキサシントシル酸塩」

7-[(3*RS*)-3-Aminopyrrolidin-1-yl]-1-(2,4-difluorophenyl)-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid monotosylate
monohydrate

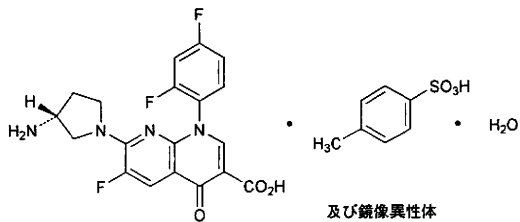


図3 トスフロキサシントシル酸塩

「トスフロキサシントシル酸塩」の化学名は、「4-toluenesulfonate」を用いて命名するのが望ましい。

「トスフロキサシントシル酸塩」

新化学名 (JP16) :

7-[(3*RS*)-3-Aminopyrrolidin-1-yl]-1-(2,4-difluorophenyl)-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid mono(4-toluenesulfonate) monohydrate

同様に、「スルタミシリントシル酸塩水和物」の化学名も変更することが望ましい。

「スルタミシリントシル酸塩水和物」

旧化学名 (JP15) :

(2*S*, 5*R*)-(3,3-Dimethyl-4,4,7-trioxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-ylcarbonyloxy)methyl (2*S*, 5*R*, 6*R*)-6-[(2*R*)-2-amino-2-phenylacetamino]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylate monotosylate dihydrate

新化学名 (JP16) :

(2*S*, 5*R*)-(3,3-Dimethyl-4,4,7-trioxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-ylcarbonyloxy)methyl (2*S*, 5*R*, 6*R*)-6-[(2*R*)-2-amino-2-phenylacetamino]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylate mono(4-toluenesulfonate) dihydrate

4) ステロイド類のリン酸エステルナトリウムの化学名の調査

ステロイド類のリン酸エステルナトリウムの化学名における「sodium」の記載位置について検討した。JP15では、「sodium」を化学名全体の頭に置いて「Sodium ○○ phosphate」としている。(○○はステロイド部分の化学名を示す)

JP15 収載品目のうち「Sodium ○○ phosphate」の例 :

「プレドニゾロンリン酸エステルナトリウム」

Disodium 11*β*, 17, 21-trihydroxypregna-1,4-diene-3,20-dione 21-phosphate

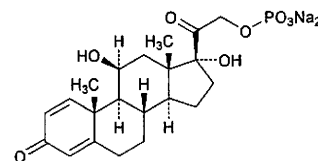


図4 プレドニゾロンリン酸エステルナトリウム

ステロイド類のリン酸エステルナトリウムの化学名は、「sodium」を「phosphate」の直前に置いて「○○ (sodium phosphate)」としたほうが適切であると考えられる。JP16では、このように記載することが望ましい。

「プレドニゾロンリン酸エステルナトリウム」

新化学名 (JP16) :

11*β*, 17, 21-Trihydroxypregna-1,4-diene-3,20-dione 21-(disodium phosphate)

同様に、以下の JP 収載品目の化学名も変更が必要である。

「ベタメタゾンリン酸エステルナトリウム」

旧化学名 (JP15) :

Disodium 9-fluoro-11*β*, 17, 21-trihydroxy-16*β*-methylpregna-1,4-

diene-3, 20-dione 21-phosphate
新化学名 (JP16) :
9-Fluoro-11 β , 17, 21-trihydroxy-16 β -
methylpregna-1, 4-diene-3, 20-dione
21-(disodium phosphate)

「ヒドロコルチゾンリン酸エステルナトリウム」

旧化学名 (JP15) :
Disodium 11 β , 17, 21-trihydroxypregn-
4-ene-3, 20-dione 21-phosphate

新化学名 (JP16) :
11 β , 17, 21-Trihydroxypregn-4-ene-
3, 20-dione 21-(disodium phosphate)

「デキサメタゾンリン酸エステルナトリウム」

旧化学名 (JAN 名)
Disodium 9-fluoro-11 β , 17, 21-
trihydroxy-16 α -methylpregna-1, 4-
diene-3, 20-dione 21-phosphate

新化学名 (JP16 新収載)
9-Fluoro-11 β , 17, 21-trihydroxy-16 α -
methylpregna-1, 4-diene-3, 20-dione
21-(disodium phosphate)

5) ステロイド類の化学名の調査

JP 既収載の「スピロノラクトン」の化学名において、17 位の置換基の位置番号が「17 β 」となっているが、17 α -pregnane 骨格をもつ「スピロノラクトン」では、17 位の置換基に「 β 」は不要である。

JP15 収載品目のうち「17 β 」を用いた例 :
「スピロノラクトン」

7 α -Acetylsulfanyl-3-oxo-17 α -pregn-
4-ene-21, 17 β -carbolactone

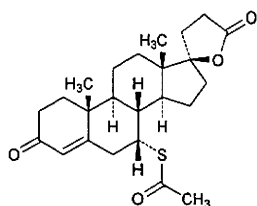


図5 スピロノラクトン

17 α -pregnane 骨格をもつ「スピロノラクトン」では、17 位の置換基に「 β 」を付けるのは正しくない。「17 β 」を「17」に修正する必要がある。

「スピロノラクトン」
新化学名 (JP16) :
7 α -Acetylsulfanyl-3-oxo-17 α -pregn-
4-ene-21, 17-carbolactone

JP 既収載の「エチニルエストラジオール」の化学名は、estrane 骨格を採用した化学名が使われている。

JP15 収載品目のうち estrane 骨格を採用した化学名の例 :

「エチニルエストラジオール」
17 α -Ethynylestra-1, 3, 5(10)-triene-
3, 17 β -diol

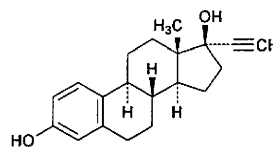


図6 エチニルエストラジオール

一方、類似構造を持つ JP 既収載医薬品である「メストラノール」、「ノルエチステロン」、「ノルゲストレル」の化学名は、19-nor-17 α -pregnane 骨格を用いて命名されている。

JP15 収載品目のうち 19-nor-17 α -pregnane 骨格を用いた例 :

「メストラノール」
3-Methoxy-19-nor-17 α -pregn-
1, 3, 5(10)-triene-20-yn-17-ol

JP 収載品目の化学名の命名法の整合性

を図るため、「エチニルエストラジオール」の化学名は、19-nor-17 α -pregnane 骨格を採用した化学名に変更することが望ましい。

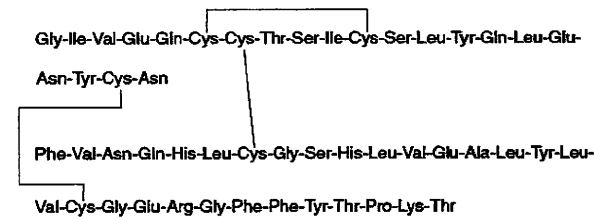
「エチニルエストラジオール」
新化学名 (JP16) :
19-Nor-17 α -pregna-1, 3, 5(10)-
triene-20-yne-3, 17-diol

6) ペプチド系の医薬品の構造式の調査

JP では、アミノ酸残基の数が概ね 20 までのペプチド系の医薬品の構造式はアミノ酸の 3 文字表記を用いてペプチド構造を記載し、アミノ酸残基の数が概ね 21 以上のペプチド系医薬品の構造式はアミノ酸の 1 文字表記を用いてペプチド構造を表記している。しかし、JP15 ではアミノ酸残基の数が 20 以上の一部の収載医薬品で 3 文字表記を用いてペプチド構造を記載している例があった。

JP15 収載のペプチド系の医薬品のうちアミノ酸残基の数が 20 以上でアミノ酸 3 文字表記をしている例 :

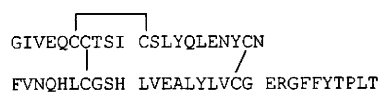
「ヒトインスリン(遺伝子組換え)」



「ヒトインスリン(遺伝子組換え)」の構造式は、アミノ酸の 1 文字表記を用いて記載することが望ましい。

「ヒトインスリン(遺伝子組換え)」

新構造式 (JP16) :

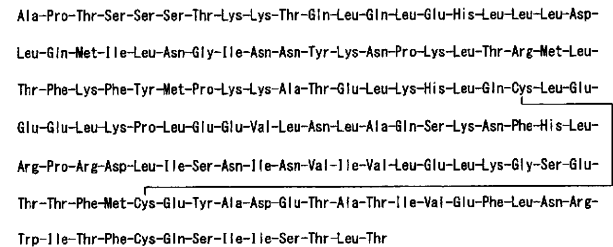


同様に、JP15 収載の「セルモロイキン (遺

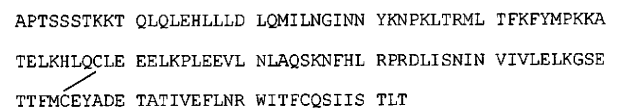
伝子組換え)」、 「テセロイキン(遺伝子組換え)」、 「リゾチーム塩酸塩」、 「ジノスタチン スチマラマー」のアミノ酸残基部分についても、アミノ酸の 1 文字表記を用いた構造式に修正し、JP 全体で整合性をとることが望ましい。

「セルモロイキン (遺伝子組換え)」

旧構造式 (JP15) :

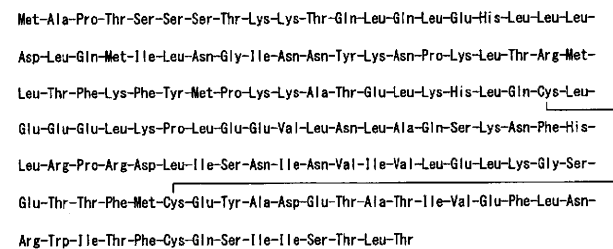


新構造式 (JP16) :

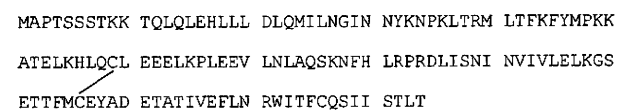


「テセロイキン(遺伝子組換え)」

旧構造式 (JP15) :

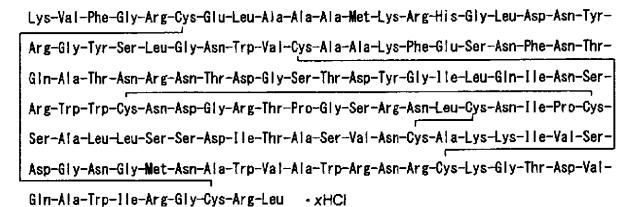


新構造式 (JP16) :

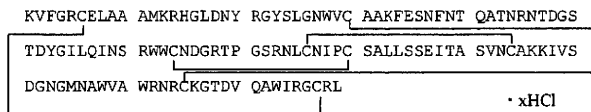


「リゾチーム塩酸塩」

旧構造式 (JP15) :

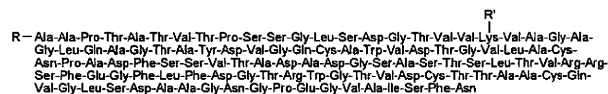


新構造式 (JP16) :

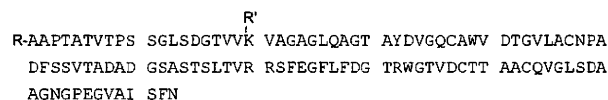


「ジノスタチン スチマラマー」のアミノ酸残基部分

旧構造式 (JP15) :



新構造式 (JP16) :

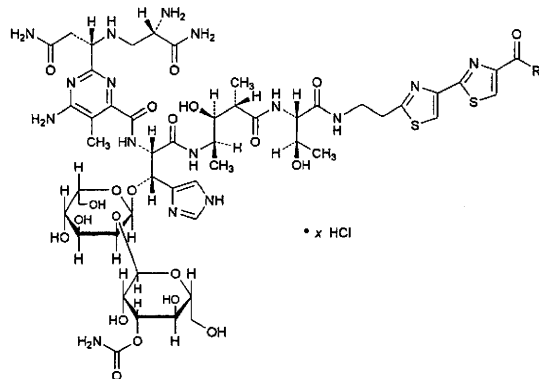


7) 医薬品の構造式の側鎖 R の表記法の調査

JP 既記載の構造式の側鎖 R の書き方について調査した結果、側鎖の根本 (本体と結合する部分) の結合肢を水平に書いている構造式と斜めに書いている構造式があり、局方全体で整合性がとれてないことがわかった。

JP15 記載品目のうち構造式の側鎖 R の結合肢が水平に書かれている例 :

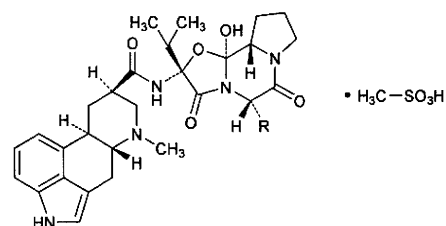
「ブレオマイシン塩酸塩」



- ブレオマイシン酸 : R = —OH
- ブレオマイシン A₁ : R = —NH—(CH₂)₄—S(=O)₂—CH₃
- ブレオマイシンデメチル-A₂ : R = —NH—(CH₂)₄—S—CH₃
- ブレオマイシン A₂ : R = —NH—(CH₂)₄—S⁺(CH₃)₂ · X⁻
- ブレオマイシン A_{2-a} : R = —NH—(CH₂)₄—NH₂
- ブレオマイシン A_{2-b} : R = —NH—(CH₂)₄—NH₂
- ブレオマイシン A₅ : R = —NH—(CH₂)₄—NH—(CH₂)₄—NH₂
- ブレオマイシン B₁ : R = —NH₂
- ブレオマイシン B₂ : R = —NH—(CH₂)₄—NH—C(=NH)—NH₂
- ブレオマイシン B₄ : R = —NH—(CH₂)₄—NH—C(=NH)—NH—(CH₂)₄—NH—C(=NH)—NH₂

JP15 記載品目のうち構造式の側鎖 R の結合肢が斜めに書かれている例 :

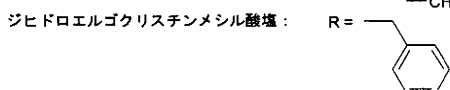
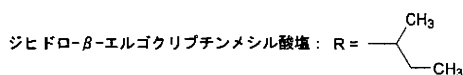
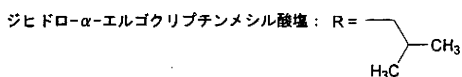
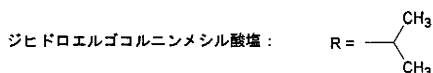
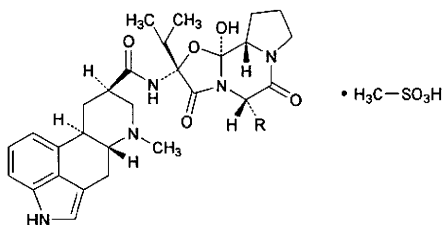
「ジヒドロエルゴトキシニンメシル酸塩」



- ジヒドロエルゴコリンメシル酸塩 : R =
- ジヒドロ-α-エルゴクリプテンメシル酸塩 : R =
- ジヒドロ-β-エルゴクリプテンメシル酸塩 : R =
- ジヒドロエルゴクリプテンメシル酸塩 : R =

このように JP15 では側鎖 R の結合肢の表記に不整合がある。JP16 では、側鎖 R の結合肢を水平な表記で統一することを提案する。

「ジヒドロエルゴトキシンメシル酸塩」
新構造式 (JP16) :

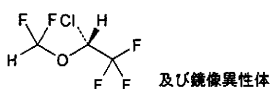


「キタマイシン」, 「キタマイシン酢酸エステル」, 「キタマイシン酒石酸塩」, 「ジヒドロエルゴトキシンメシル酸塩」, 「スピラマイシン酢酸エステル」, 「テイコプラニン」, 「ブレオマイシン硫酸塩」, 「ヘパリンカルシウム」などの構造式の側鎖 R の表記についても同様に変更が必要である。

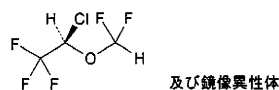
8) フルラン類の構造式の調査

JP 掲載のフルラン類の構造式の表記を調査した結果、不整合があることがわかった。フルラン類の構造式は、WHO の医薬品構造式表記のガイドラインに従い、アルキル主鎖 (長い方のアルキル鎖) の位置番号が右から左に大きくなるような構造式で表記することが望ましい。このルールに従い、「イソフルラン」と「エンフルラン」の構造式の修正を提案する。

「イソフルラン」
旧構造式 (JP15) :

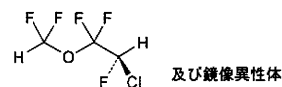


新構造式 (JP16) :

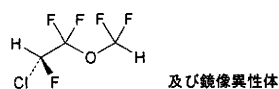


「エンフルラン」

旧構造式 (JP15) :



新構造式 (JP16) :



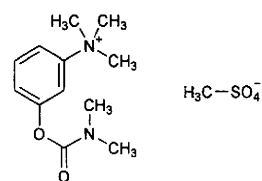
フルラン類のうち、「セボフルラン」および「ハロタン」については、構造式の変更は不要である。

9) 硫酸エステルの構造式の調査

JP15 では、硫酸基を「 $-\text{SO}_4^-$ 」と表記している。しかし、WHO の医薬品構造式表記のガイドラインでは、炭素原子から非炭素原子に結合が伸びる場合には結合する原子を結合枝の先に明示することを提案している。この記載ルールに従うと、硫酸基は「 $-\text{OSO}_3^-$ 」と表記することになる。

JP15 掲載で硫酸基を「 $-\text{SO}_4^-$ 」と表記している例 :

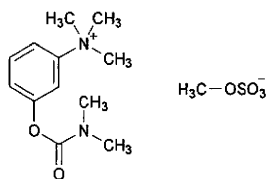
「ネオスチグミンメチル硫酸塩」



「ネオスチグミンメチル硫酸塩」のメチル硫酸の構造は、WHO のガイドラインに従い「 $-\text{OSO}_3^-$ 」で表示するのが適切である。

「ネオスチグミンメチル硫酸塩」

新構造式 (JP16) :



D. 結論と考察

今回は、JP16 収載予定の医薬品の構造式と化学名の記載方法について調査した。その結果、化学名については、methane 置換体の化学名、クロメン構造を持つ医薬品の化学名、トシル酸塩の化学名、ステロイド類のリン酸エステルの化学名、ステロイド類のうち「スピロラクトン」および「エチニルエストラジオール」の化学名に、IUPAC の命名法に合致しない事項および JP 収載品目間での不整合を見いだした。また、構造式については、ペプチド系の医薬品の構造式、医薬品の構造式の側鎖 R の表記法、フルラン類の構造式、硫酸エステルの構造式などについて、JP 収載品目間での不整合および WHO の医薬品構造式記載のガイドラインに合致しない事項を見いだした。これらについては、修正案が速やかに JP に採用されることを期待する。

E. 参考文献

本調査研究を行うにあたって、諸外国の医薬品公定書 (JP15 および米国薬局方 (USP)、欧州薬局方 (EP))、IUPAC による化学名命名法、WHO による医薬品構造式記載のガイドラインなどを参考資料として用いた。

F. 知的所有権の取得状況

なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Takao HAYAKA WA and Akiko Ishii	Japanese Regulatory Perspective on Immunogenicity . Detection and Quantification of Antibodies to Biopharmaceuticals	Michael G. Tovey	バイオ後続品/バイオシミラー医薬品	John Wiley & Sons	New Jersey, USA	2010	
川崎ナナ	医薬品各条へパリンカルシウム		日本薬局方技術情報(2011)	じほう	東京	印刷中	
川崎ナナ	医薬品各条へパリンナトリウム		日本薬局方技術情報(2011)	じほう	東京	印刷中	

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kadoya, S., Fujii, K., Izutsu, K., Yonemochi, E., Terada, K., Yomota, C., Kawanishi, T	Freeze-drying of proteins with glass-forming oligosaccharide-derived sugar alcohols	<i>Int J Pharm,</i>	389,	107-113	2010
Suzuki, T., Ishii-Watabe, A.; Tada, M., Kobayashi, T., Kanayasu-Toyoda, T., Kawanishi, T., Yamaguchi, T	Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: a comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human neonatal FcR	<i>J Immunol.</i>	184,	1968-76	2010
H.Shibata, C.Saito, C.Yomota, T.Kawanishi	Ammonium ion level in serum affects doxorubicin release from liposomes	<i>Pharmazie,</i>	651,	251-253	2010
Sakai-Kato, K., Saito, E., Ishikura, K., Kawanishi, T	Analysis of intracellular doxorubicin and its metabolites by ultra-high-performance liquid chromatography	<i>J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci</i>	878,	1466-1470	2010
Miyazaki, T., Aso, Y., Yoshioka, S., Kawanishi, T	Differences in crystallization rate of nitrendipine enantiomers in amorphous solid dispersions with HPMC and HPMCP.	<i>In J.Pharm.,</i>	407	111-118	2011

川西 徹	バイオ後続品の開発状況とその評価	ジェネリック研究	4	5-18	2010
川西 徹	製剤総則の改正	薬局	62	2598-2605	2011
川西 徹	製剤試験法	薬局	62	2654-2657	2011
Yamada K, Hyodo S, Kinoshita M, Hayakawa T, Kakehi K	Hyphenated technique for releasing and MALDI MS analysis of O-glycans in mucin-type glycoprotein samples.	Anal Chem	82,	7436-7443	2010
Kinoshita M, Kakoi N, Matsuno YK, Hayakawa T, Kakehi K	Determination of sulfate ester content in sulfated oligo- and poly-saccharides by capillary electrophoresis with indirect UV detection	Biomed Chromatogr		印刷中	2010
早川堯夫	日本薬局方におけるバイオ医薬品の現状と今後	ヒューマンサイエンス	21,	28-32	2010
早川堯夫	最近の局方における生物薬品各条及び生物薬品関連試験法の改正について.	医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス,	41,	378-387	2010
前田瑛起, 北荘一郎, 中世古みなみ, 木下充弘, 田邊豊重, 大庭澄明, 早川堯夫, 掛樋一晃	日本薬局方一般試験法収載へ向けた SDS-PAGE 法及びキャピラリー電気泳動法に関する研究	医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	41,	477-489	2010
A. Ohno, N. Kawasaki, K. Fukuhara, H. Okuda, T. Yamaguchi	Complete NMR analysis of oxytocin in phosphate buffer.	<i>Magn. Reson. Chem</i>	48	168-172	2010
中澤志織, 橋井則貴, 川崎ナナ	遊離糖鎖の LC/MS.	試料分析講座		印刷中	
石井明子, 橋井則貴, 鈴木琢雄, 川崎ナナ	ヘパリン製剤の品質確保に関する国際的動向 - 第 4 回ヘパリン製剤の品質評価に関するワークショップ報告 -	医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス		印刷中	
K. Izutsu, K. Fujii, C. Katori, C. Yomota, T. Kawanishi, Y. Yoshihashi, E. Yonemochi, K. Terada	Effects of solute miscibility on the micro- and macroscopic structural integrity of freeze-dried solids.	J. Pharm. Sci.	99	4710-4719	2010
伊豆津健一, 四方田千佳子, 川西徹	凍結によりリポソームからの脱水と内部の氷晶形成に対するトレハロースの影響	低温生物工学会誌,	56	159-162	2010
宮田直樹 他	薬の名前: ステムを知られば薬がわかる	Pharm Tech Japan	26 (4,6, 7,8,9 ,10)	611,947, 1171,149 5,1695,1 927	2010



Freeze-drying of proteins with glass-forming oligosaccharide-derived sugar alcohols

Saori Kadoya^a, Kahori Fujii^a, Ken-ichi Izutsu^{b,*}, Etsuo Yonemochi^a, Katsuhide Terada^a, Chikako Yomota^b, Toru Kawanishi^b

^a Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toho University, Miyama 2-2-1, Funabashi, Chiba, 274-8510, Japan

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 August 2009

Received in revised form 6 January 2010

Accepted 15 January 2010

Available online 25 January 2010

Keywords:

Freeze-drying

Amorphous

Excipients

Stabilization

Sugar alcohol

Glass transition

ABSTRACT

Physical properties and protein-stabilizing effects of sugar alcohols in frozen aqueous solutions and freeze-dried solids were studied. Various frozen sugar alcohol solutions showed a glass transition of the maximally freeze-concentrated phase at temperatures (T_g 's) that depended largely on the solute molecular weights. Some oligosaccharide-derived sugar alcohols (e.g., maltitol, lactitol, maltotriitol) formed glass-state amorphous cake-structure freeze-dried solids. Microscopic observation of frozen maltitol and lactitol solutions under vacuum (FDM) indicated onset of physical collapse at temperatures (T_c) several degrees higher than their T_g 's. Freeze-drying of pentitols (e.g., xylitol) and hexitols (e.g., sorbitol, mannitol) resulted in collapsed or crystallized solids. The glass-forming sugar alcohols prevented activity loss of a model protein (LDH: lactate dehydrogenase) during freeze-drying and subsequent storage at 50 °C. They also protected bovine serum albumin (BSA) from lyophilization-induced secondary structure perturbation. The glass-forming sugar alcohols showed lower susceptibility to Maillard reaction with co-lyophilized L-lysine compared to reducing and non-reducing disaccharides during storage at elevated temperature. Application of the oligosaccharide-derived sugar alcohols as alternative stabilizers in lyophilized protein formulations was discussed.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Freeze-drying is a popular method to ensure long-term stability of therapeutic proteins that are not stable enough in the aqueous solutions during distribution and long-term storage (Manning et al., 1989; Nail et al., 2002). Removal of surrounding water molecules by lyophilization significantly reduces gradual chemical and physical degradation of proteins, whereas the dehydration often induces structural perturbation that leads to misfolding and/or aggregation in the re-hydrated solutions (Arakawa et al., 2001). Protecting the protein conformation in freeze-dried formulations through appropriate process control and ingredient optimization is essential to ensure the pharmacological effects, as well as to reduce the risk of product immunogenicity (Hermeling et al., 2004).

Some non-reducing saccharides (e.g., sucrose, trehalose) are popular stabilizers that protect proteins from the chemical and physical degradations in aqueous solutions, during freeze-drying, and in subsequent storage (Arakawa and Timasheff, 1982; Carpenter and Crowe, 1989; Franks, 1992; Wang, 2000). They

protect protein conformation in the solids thermodynamically through direct interactions (e.g., hydrogen bonds) that substitute surrounding water molecules and reduce protein chemical degradation kinetically by embedding the protein in a glass-state lower molecular mobility environment. High molecular mobility of the glass-state disaccharide solids, however, induces slow but not negligible chemical degradation of embedded proteins over pharmaceutically relevant timescales. Unexpected exposure of the solids to humid or high-temperature environments often induces physical changes of the dried cakes (e.g., shrinkage) (Breen et al., 2001; Tian et al., 2007).

Application of other excipients that stabilize proteins by themselves and/or in combination with disaccharides would provide further choices to improve the formulation quality (Wang, 2000; Costantino, 2004). Some excipients (e.g., polymers, sodium phosphates) raise the glass transition temperature (T_g) of co-lyophilized disaccharide-based solids, which limited molecular mobility should confer robustness against undesirable storage conditions (Ohtake et al., 2004). Some amino acids and their salts (e.g., L-arginine citrate) form glass-state amorphous solids that protect proteins from inactivation during freeze-drying (Tian et al., 2007; Izutsu et al., 2009). In addition to the structural stabilization, varied physicochemical properties of amino acids would provide some unique effects (e.g., reducing the protein aggregation in aque-

* Corresponding author. Tel.: +81 337001141; fax: +81 337076950.

E-mail address: Izutsu@nihs.go.jp (K.-i. Izutsu).

ous solutions) that are preferable for pharmaceutical formulations (Arakawa et al., 2007).

The purpose of this study was to systematically examine the physical properties and protein-stabilizing effects of oligosaccharide-derived sugar alcohols for their application in freeze-dried formulations. It has been established that various sugar alcohols (e.g., sorbitol, xylitol, lactitol) protect proteins from heat-induced denaturation in aqueous solutions through a thermodynamic mechanism (preferential exclusion) identical to that of saccharides and other polyols (e.g., glycerol) (Arakawa and Timasheff, 1982; Gekko, 1982). Some pentitols and hexitols (e.g., xylitol, sorbitol) protect biological macromolecules (e.g., proteins) and microorganisms from inactivation and/or viability loss during freeze-thawing and during freeze-drying (Tamoto et al., 1961; Carpenter and Crowe, 1988). Varied physical properties (i.e., crystallinity, molecular mobility) have been considered as key factors that determine effects of sugar alcohols to stabilize proteins in frozen solutions and freeze-dried solids (Griebenow and Klibanov, 1995; Carrasquillo et al., 2000; Liao et al., 2002). For example, high propensity to crystallize in the frozen solution (e.g., mannitol) or to collapse during primary drying (e.g., sorbitol, xylitol) makes them inappropriate for main stabilizer in freeze-drying. Some oligosaccharide-derived sugar alcohols (e.g., maltitol, lactitol, maltotriitol) should have greater opportunities to structurally and kinetically stabilize proteins during freeze-drying and subsequent storage. Maltitol and lactitol are popular excipients for oral (tablet) formulations, and are also widely used in food industries as glass-forming additives upon cooling of edible hot-melt compositions (Slade et al., 2006). Information on the physical properties (e.g., thermal transition temperatures) and protein-stabilizing effects (e.g., enzyme activity, protein secondary structure) should be relevant in the application of sugar alcohols to the freeze-dried formulations.

2. Materials and methods

2.1. Materials

All chemicals employed in this study were of analytical grades and were obtained from the following commercial sources: L-lactic dehydrogenase (LDH, rabbit muscle), bovine serum albumin (BSA, essentially fatty acid free), glucose, trehalose dihydrate, sorbitol, and sucrose (Sigma Chemical, St. Louis, MO); maltitol, maltotriitol and maltotetraitol (Hayashibara Biochemical Laboratories, Okayama, Japan); maltose, lactose, mannitol, xylitol, lactitol monohydrate, and other chemicals (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan); methanol dehydrate (Kanto Kagaku, Tokyo, 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 μm PVDF filters, Millipore, Bedford, MA) to remove insoluble aggregates before the freeze-drying study.

2.2. Freeze-drying

A freeze-drier (FreeZone-6; Labconco, Kansas City, MO) was used for lyophilization. Aliquots (0.3 ml) of aqueous solutions in flat-bottom glass vials (13 mm diameter, SVF-3; Nichiden-Rika Glass, Kobe, Japan) were placed on the shelf of the lyophilizer. The shelf was cooled to -40°C at $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, and then maintained at this temperature for 2 h before the primary drying process. The frozen solutions were dried under a vacuum (4.0 Pa) while maintaining the shelf temperature at -40°C for 15 h, -30°C for 6 h, and 35°C for 6 h. The shelf was heated at $0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ between the thermal steps. The vials were closed with rubber stoppers under a vacuum.

2.3. Thermal analysis

Thermal analysis of frozen solutions and dried solids was performed by using a differential scanning calorimeter (Q-10; TA Instruments, New Castle, DE) and software (Universal Analysis 2000; TA Instruments). Aliquots of aqueous solutions (10 μl) in hermetic aluminum cells were cooled from room temperature to -70°C at $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, and then scanned by heating at $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Freeze-dried solids (1–2 mg) in hermetic aluminum cells were subjected to the thermal analysis from -20°C at $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ under a nitrogen gas flow. Cooled-melt saccharide and sugar alcohol solids obtained by a brief period of heating (1 min at 160°C for maltose monohydrate, xylitol, sorbitol, maltitol, and lactitol monohydrate; at 180°C for glucose; at 200°C for sucrose, mannitol, and maltotriitol; and at 220°C for lactose and trehalose monohydrate) and subsequent rapid cooling (-50°C) in hermetic aluminum cells were scanned at $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to obtain the glass transition temperatures. The glass transition temperatures were determined as the maximum inflection point of the discontinuities in the heat flow curves.

2.4. Freeze-drying microscopy (FDM)

We observed the behavior of frozen aqueous excipient solutions under a vacuum using a freeze-drying microscope system (Lyostat2; Biopharma Technology, Winchester, UK) with an optical microscope (BX51; Olympus, Tokyo). Aqueous solutions (2 μl) sandwiched between cover slips (70 μm apart) were frozen at -40°C and then maintained at that temperature for 5 min. Each sample was heated under a vacuum (12.9 Pa) at $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to a temperature approximately 5°C below its T_g' as obtained by thermal analysis, and then scanned at an angle speed of $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ after reaching T_g' . The collapse onset temperature (T_c) of the frozen solution was determined from the first appearance of translucent dots behind the ice sublimation interface ($n = 3$).

2.5. Powder X-ray diffraction (XRD) and residual water measurements

The powder X-ray diffraction patterns were measured at room temperature by using a Rint-Altima diffractometer (Rigaku, Tokyo, Japan) with $\text{Cu K}\alpha$ 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 $5^{\circ}/\text{min}$. The lyophilized solids were suspended in dehydrated methanol to obtain residual water by a volumetric Karl-Fischer titrator (AQV-6; Hiranuma Sangyo, Ibaraki, Japan). Residual water contents were shown as ratios (%) to the estimated solid weights in the vials.

2.6. Freeze-drying and activity measurement of LDH

Aqueous solutions (0.5 ml) containing LDH (0.05 mg/ml), excipients (100 mg/ml) and sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) were lyophilized in the flat-bottom glass vials. Some freeze-dried solids plugged with rubber stoppers were stored at 50°C for 7 days in a temperature chamber (Model SH-221, Espec, Osaka, Japan). Pyruvate and NADH were used as substrates to obtain LDH activity from the absorbance reduction at 340 nm (25°C). Residual enzyme activity was shown as the ratio (%) to that of the solution before freezing ($n = 6$) (Izutsu et al., 1994).

2.7. Fourier-transform infrared (FT-IR) analysis of freeze-dried BSA

A Fourier-transform infrared spectrophotometer (MB-104; Bomen, Quebec, Canada) with a dry gas generator (Balston, Haverhill, MA) and software (PROTA; BioTools, Jupiter, FL and GRAMS/32; Galactic Ind., Salem, NH) was used to obtain mid-infrared spectra of

Table 1
Physical properties of saccharides and sugar alcohols in frozen solutions and freeze-dried solids.

	Excipient			Excipient + BSA + Buffer			
	Frozen solution	Freeze-dried solid		Cooled-melt Solid	Frozen solution	Freeze-dried solid	
	T_g' (°C)	T_g (°C)	Residual water (% w/w)	T_g (°C)	T_g' (°C)	T_g (°C)	Residual water (% w/w)
w/o excipients					n.d.		6.3 ± 0.4
Glucose	-42.7 ± 0.5	Collapsed	-	37.3 ± 0.8	-41.4 ± 1.6	41.5 ± 2.0	2.6 ± 0.4
Lactose	-29.1 ± 0.1	90.9 ± 6.6	1.2 ± 0.1	112.0 ± 1.9	-27.8 ± 1.8	105.3 ± 2.2	1.0 ± 0.4
Sucrose	-33.5 ± 0.1	62.0 ± 2.6	1.8 ± 0.9	46.4 ± 0.3	-32.0 ± 0.7	68.2 ± 0.8	1.9 ± 0.0
Maltose monohydrate	-31.1 ± 0.0	86.2 ± 1.1	0.9 ± 0.0	68.8 ± 1.5	-28.8 ± 1.6	95.6 ± 1.2	1.2 ± 0.4
Trehalose dihydrate	-30.6 ± 0.1	80<	1.0 ± 0.2	117.3 ± 0.3	-27.4 ± 0.5	90<	1.2 ± 0.4
Xylitol	-48.5 ± 0.5	Collapsed	-	-21.9 ± 0.2	-45.9 ± 1.2	Collapsed	-
Sorbitol	-45.0 ± 0.4	Collapsed	-	-1.9 ± 0.2	-39.9 ± 0.7	Collapsed	-
Mannitol	Crystallized	Crystallized	-	Crystallized	Crystallized	Partially Crystallized	-
Maltitol	-36.7 ± 0.2	40.6 ± 0.4	1.1 ± 1.1	47.3 ± 0.8	-35.7 ± 0.6	56.3 ± 1.0	1.3 ± 0.4
Lactitol monohydrate	-31.8 ± 0.1	54.9 ± 2.5	0.3 ± 0.5	48.4 ± 3.3	-29.2 ± 1.5	63.3 ± 1.9	1.2 ± 0.2
Maltotriitol	-29.5 ± 0.0	72.8 ± 2.8	0.3 ± 0.2	88.6 ± 0.8	-26.6 ± 0.7	85.3 ± 3.1	1.5 ± 0.2
Maltotetraitol	-24.9 ± 0.2	n.d.	1.2 ± 0.3	-	-24.8 ± 0.3	n.d.	0.9 ± 0.1

Average ± s.d. (n = 3).

BSA in the aqueous solution and freeze-dried solids (Prestrelski et al., 1993; Dong et al., 1995; Izutsu et al., 2004). Spectra of aqueous BSA solutions (10 mg/ml in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0) were recorded at 4 cm⁻¹ resolution using infrared cells with CaF₂ windows and 6 μm film spacers (256 scans). Spectra of freeze-dried BSA solids were obtained from pressed disks containing the sample (approximately 1 mg BSA) and dried potassium bromide (approx. 250 mg). Area-normalized second-derivative amide I spectra (1600–1715 cm⁻¹, 7-point smoothing) were employed to elucidate the integrity of the protein secondary structure.

2.8. Non-enzymatic color development of freeze-dried solids

Lyophilized solids containing L-lysine (5 mg/ml) and a saccharide or a sugar alcohol (100 mg/ml, 0.3 ml) were stored at 80 °C for 4 days. Changes in the absorbance (280 nm) of the re-hydrated solutions (5-times diluted) were obtained by using a UV-visible spectrophotometer (UV-2450; Shimadzu, Kyoto, Japan).

3. Results

3.1. Physical property of frozen solutions

Most of the frozen aqueous solutions containing a saccharide or a sugar alcohol (100 mg/ml) showed typical thermograms that indicated an amorphous freeze-concentrated phase surrounding ice crystals (Table 1). An increase in the solute molecular weight shifted the glass transition of the maximally freeze-concentrated phase (T_g') to higher temperatures, which trend was consistent with literature (Levine and Slade, 1988). Addition of BSA (10 mg/ml) and sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) raised the T_g' of the frozen excipient solutions except for that of maltotetraitol. The frozen mannitol solution showed an exotherm peak that indicated eutectic crystallization at around -23 °C (Cavatur et al., 2002).

Freeze-drying of some disaccharides or oligosaccharide-derived sugar alcohol solutions (trehalose, sucrose, maltitol, lactitol, maltotriitol) resulted in cake-structure solids. Conversely, frozen solutions containing smaller solute molecules (e.g., glucose, sorbitol, xylitol, $T_g' < -40$ °C) collapsed during the process. Addition of BSA prevented glucose from physical collapse during the freeze-drying process. Freeze-drying microscopy indicated dynamic changes of frozen solutions under vacuum (Fig. 1). Heating of a frozen lactitol solution showed ice sublimation from the upper right corner of the image, leaving a structurally ordered dark dried region behind (-30 °C). Further heating induced transparent dots

that indicated loss of the local structure (collapse onset temperature, T_c : -27.8 ± 0.3 °C), followed by larger structural damage. Other frozen solutions also showed T_c 's (trehalose: -24.3 ± 0.7 °C; maltitol: -31.2 ± 2.1 °C) several degrees higher than their T_g' 's.

3.2. Characterization of freeze-dried solids

The physical properties of the freeze-dried solids were studied by thermal analysis, powder X-ray diffraction, and residual water measurement. Thermal analysis showed glass transition of some lyophilized oligosaccharide-derived sugar alcohol solids (maltitol, lactitol, maltotriitol) at above room temperature (Table 1) (Shirke et al., 2005). No apparent transition was observed in freeze-dried maltotetraitol solid. Some freeze-dried disaccharides (e.g., lactose, maltose) showed T_g 's higher than those of the structurally relating sugar alcohols. Freeze-dried solids containing BSA, buffer components, and disaccharides or oligosaccharide-derived sugar alcohols (maltitol, lactitol, maltotriitol) showed halo powder X-ray diffraction (XRD) patterns typical for non-crystalline solids (Fig. 2). Some peaks in the XRD pattern, as well as the combination of an exotherm peak (51.7 °C) and an exotherm peak (164.1 °C) in the thermogram, indicated partially crystallized mannitol lyophilized with BSA and the buffer salts. The small peaks in the XRD patterns also suggested partial crystallization of glucose and sorbitol during the freeze-drying process and/or during sample preparation for the analysis. The residual water contents of the cake-structure dried solids were less than 2%. The protein lyophilized without the stabilizing excipients showed higher residual water contents.

3.3. Effects on protein stability

The effects of the oligosaccharide-derived sugar alcohols on the protein stability during the freeze-drying process and subsequent storage were studied through the enzyme activity (LDH) and secondary structure (BSA) measurements. The enzyme (0.05 mg/ml) freeze-dried from the sodium phosphate buffer solution (50 mM, pH 7.0) retained approximately 60% of its initial activity (Fig. 3). The disaccharides and oligosaccharide-derived sugar alcohols (100 mg/ml sucrose, trehalose, maltitol, lactitol, maltotriitol) protected LDH from the activity loss during freeze-drying. In contrast, sorbitol and mannitol did not show any apparent effect on the co-lyophilized enzyme activity. The enzyme lyophilized with sorbitol or in the absence of polyols lost most of its activity during storage at 50 °C for 7 days. The disaccharides and oligosaccharide-

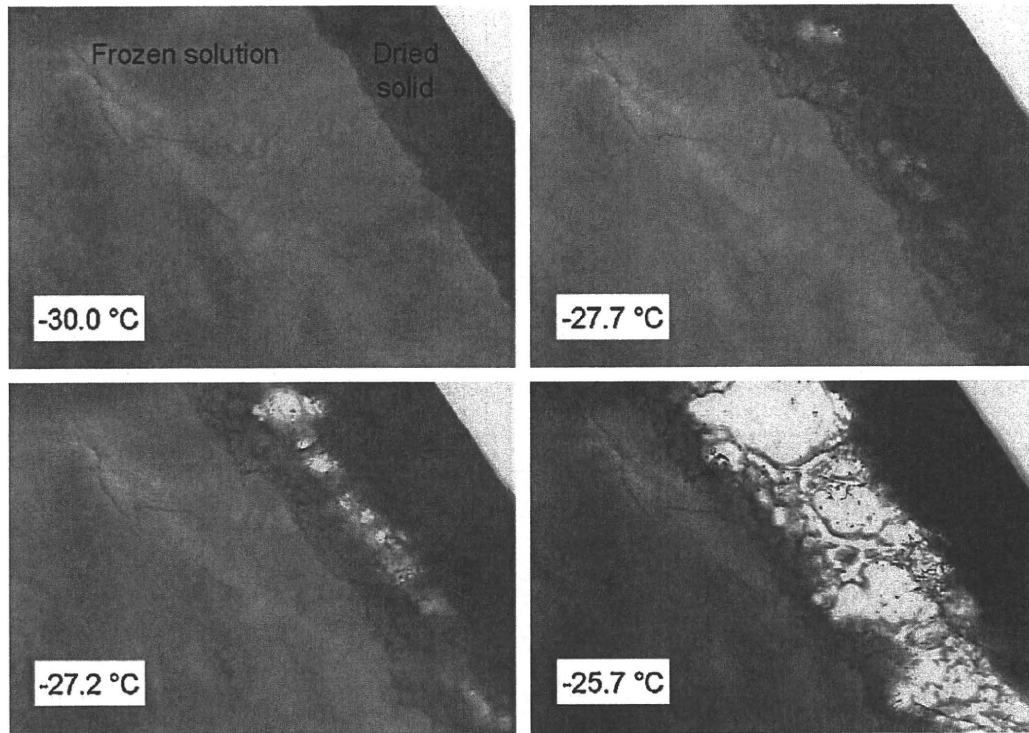


Fig. 1. Freeze-drying microscopy images of a frozen lactitol solution (100 mg/ml) obtained during a heating scan (1 °C/min). The frozen solution (2 µl) in a thin cell was dried under a vacuum (12.9 Pa) from the upper right corner of the figures.

derived sugar alcohols retained the enzyme activity during the high-temperature storage. The freeze-dried maltitol formulation shrunk during the storage near its glass transition temperature. The enzyme lyophilized with mannitol retained its activity to some

extent in the largely crystallized solid during the high-temperature storage.

The effects of the saccharides and sugar alcohols on the secondary structure of freeze-dried BSA were studied (Fig. 4). The area-normalized second-derivative amide I spectra of BSA in the sodium phosphate buffer solution (50 mM, pH 7.0) showed a large band at 1656 cm⁻¹ that denoted a predominant α-helix structure in the native conformation (Dong et al., 1995). Lyophilization of the protein from the buffer resulted in a reduction of the α-helix band intensity and broadened the overall spectra, indicating a perturbed secondary structure (Prestrelski et al., 1993). Maltitol and

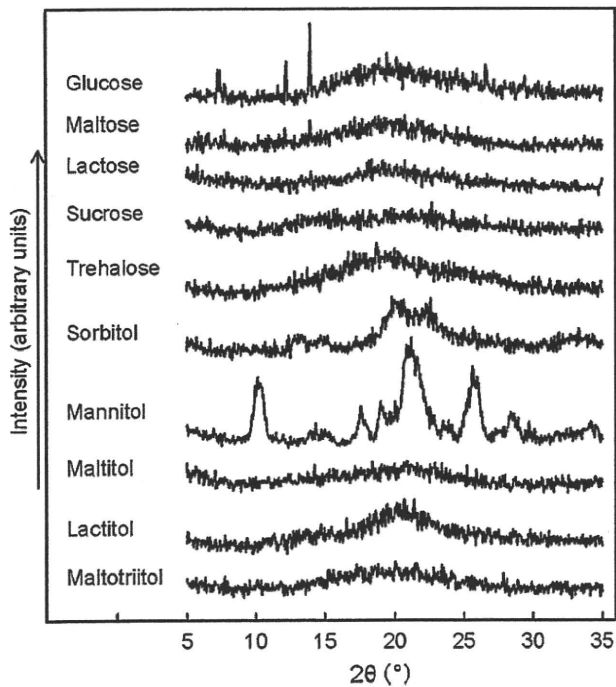


Fig. 2. Powder X-ray diffraction patterns of solids freeze-dried from solutions containing BSA (10 mg/ml), excipient (100 mg/ml) and sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0).

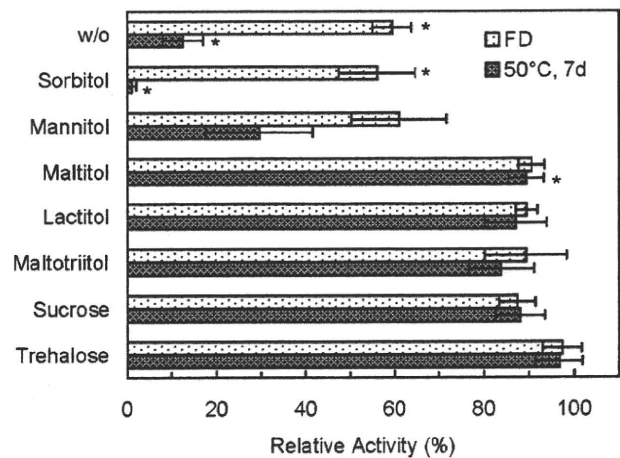


Fig. 3. Effects of excipients on the relative activity of rabbit muscle lactate dehydrogenase after freeze-drying and subsequent storage at 50 °C for 7 days (n = 3). Aqueous solutions containing LDH (0.05 mg/ml), excipient (100 mg/ml) and sodium buffer salt (50 mM, pH 7.0) were freeze-dried in glass vials. Asterisks indicate collapsed or shrunk solids.

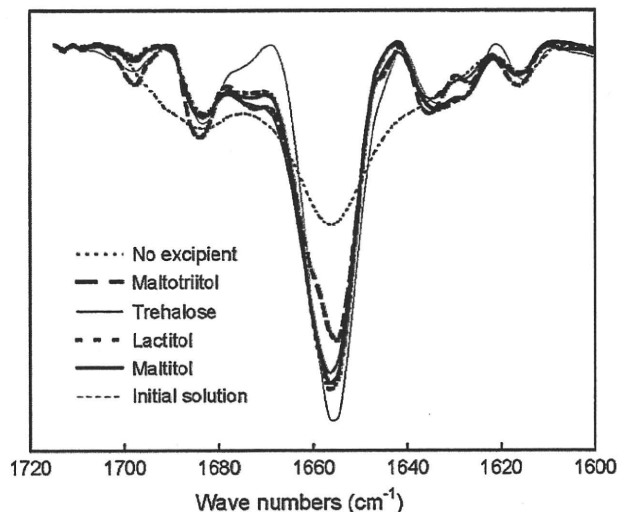


Fig. 4. Area-normalized second-derivative amide I spectra of BSA (10 mg/ml) in a sodium phosphate buffer solution (50 mM, pH 7.0) and in solids freeze-dried with or without co-solutes (100 mg/ml).

lactitol were as effective as trehalose at retaining the conformation of the co-lyophilized protein. The smaller α -helix band of the protein lyophilized with maltotriitol suggested insufficient structure stabilization.

3.4. Chemical stability in freeze-dried solids

The possible reactivity of the sugar alcohols with proteins (e.g., Maillard reaction) in the dried solids was studied by using model freeze-dried systems containing the excipients and L-lysine (Fig. 5) (Kawai et al., 2004). The co-lyophilized solids maintained the cake-structure (e.g., trehalose, lactose) or shrunk (other excipients) during the storage at an elevated temperature (80 °C for 4 days). The solids turned brown to varying degrees irrespective of the solid structure. The high-temperature storage of solids containing the reducing saccharides (glucose, maltose, lactose) and L-lysine induced apparent absorbance changes of the re-hydrated solutions ($3 < \text{Abs.280}$, data not shown). The oligosaccharide-derived sugar alcohols (maltitol, lactitol, maltotriitol) showed lower chemical reactivity with co-lyophilized L-lysine

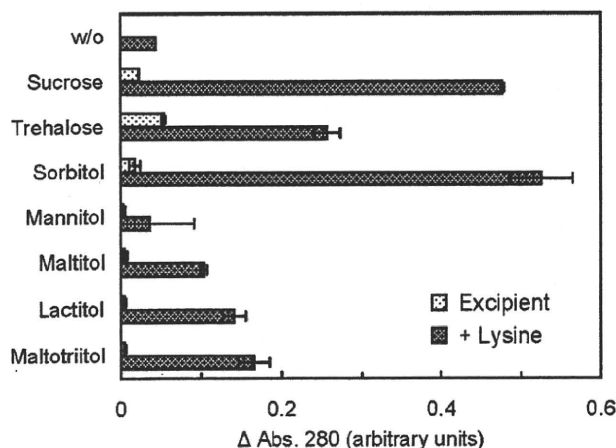


Fig. 5. Effect of storage (80 °C, 3 days) on non-enzymatic color development of solids freeze-dried from solutions containing L-lysine (5 mg/ml) and saccharides or sugar alcohols (100 mg/ml). Changes in the absorbance of re-hydrated solutions were obtained at 280 nm ($n=3$).

compared to the non-reducing saccharides (sucrose, trehalose). Lower absorbance suggested limited reactivity of the partially crystallized mannitol in the dried solids.

4. Discussion

The results indicated the relevance of some oligosaccharide-derived sugar alcohols as principal stabilizers in the freeze-drying of proteins. An improved understanding the varied physical properties and protein-stabilizing mechanisms in the frozen solutions and freeze-dried solids, in comparison with those of disaccharides, will be indispensable for the rational application of the sugar alcohols.

The thermal transition and collapse onset temperatures (T_g' , T_c) of frozen disaccharide-derived sugar alcohol solutions, comparable with those of structurally related saccharides, should allow freeze-drying by ordinary lyophilizers that are designed to cool their shelves down to -40 °C. Decreasing local viscosity of non-crystalline concentrated solute phases above the thermal transition (T_g') induces physical collapse from the drying interface (Pikal and Shah, 1990; Meister and Gieseler, 2009). The collapsed solids are not usually pharmaceutically acceptable because of their inelegant appearance and other changes in their physical properties (e.g., higher residual water, component crystallization) (Costantino et al., 1998). Controlling the shelf temperature to achieve a product slightly below T_g' or T_c (maximum allowable product temperatures) is usually recommended for efficient ice sublimation without collapse, since the ice sublimation speed increases significantly depending on the temperature (approx. 13% at 1 °C interval) (Pikal and Shah, 1990; Nail et al., 2002). Frozen saccharide solutions often show a T_c several degrees higher than the corresponding T_g' , which difference depends on various factors, including the component composition and measurement methods (e.g., vacuum pressure, cell structure, type of microscope). Technical difficulties in distinguishing the changes at the collapse onset may partly explain the relatively large difference between the T_g' and T_c in the higher concentration (100 mg/ml) frozen excipient solutions.

The disaccharides and oligosaccharide-derived sugar alcohols formed cake-structure glass-state solids upon freeze-drying. Varied solid densities, degradation products, and residual water contents originating from the hydrated crystals may explain the different T_g s of some excipients prepared by freeze-drying and quench-cooling of the heat-melt. Addition of BSA and the buffer salts raised the transition temperature of the frozen solutions (T_g') and the dried solids (T_g) containing the oligosaccharide-derived sugar alcohols, suggesting their molecular-level mixing in the freeze-dried solid. Possible large molecular mobility during primary (low T_g' of frozen solutions) and/or secondary (low T_g of partially dried solids) drying processes should explain the partial crystallinity of glucose and sorbitol in the solids (Piedmonte et al., 2007).

The retention of the enzyme activity (LDH) and secondary structure (BSA) indicated that the oligosaccharide-derived sugar alcohols protected the proteins against stresses in each step of the freeze-drying process. LDH is a typical enzyme that irreversibly loses its activity by freeze-thawing and freeze-drying-induced subunit dissociation and conformation changes (Jaenicke, 1990; Anchordoquy et al., 2001; Bhatnagar et al., 2008). Various sugar alcohols (e.g., sorbitol, xylitol, maltitol) favor the native conformation of proteins over the unfolded states in the aqueous solutions in the same thermodynamic mechanism with those of saccharides (e.g., preferential exclusion) (Arakawa and Timasheff, 1982; Gekko, 1982; Gekko and Idota, 1989). In addition to the stabilization of aqueous proteins prior to freeze-drying and after re-hydration, some sugar alcohols (e.g., xylitol, sorbitol) is considered to protect proteins from low-temperature-induced conformational changes in frozen solutions through the thermodynamic mechanism (Carpenter and Crowe, 1988; Arakawa et al., 2001). Sta-

bilization of proteins and cell membranes makes sorbitol a popular additive for food cryopreservation (e.g., minced fish meat) (Suzuki, 1981).

Extent of conformation changes by dehydration during secondary drying usually determines the lyophilization-induced protein inactivation (Jiang and Nail, 1998). The oligosaccharide-derived sugar alcohols (e.g., lactitol, maltitol) should substitute water molecules surrounding proteins that are essential to maintain the conformation during the freeze-drying process, as has been reported in oligosaccharides (Carpenter and Crowe, 1989). Insufficient number of water-substituting hydrogen bonds due to steric hindrance may explain the smaller structure-stabilizing effect of maltotriitol compared to maltitol and lactitol. Similar reductions of the structure-stabilizing effects have been reported in some larger oligosaccharides (e.g., maltotriose, maltotetraose, maltopentaose) and polysaccharides (e.g., dextran) (Tanaka et al., 1991; Izutsu et al., 2004). Crystallization during the freeze-drying process and storage deprives some sugar alcohols (e.g., mannitol, sorbitol) of the water-substituting molecular interaction (Izutsu et al., 1993; Cavatur et al., 2002; Piedmonte et al., 2007). Some non-crystallizing pentitols and hexitols (e.g., sorbitol) can provide additional protein-stabilizing water-substituting interactions in the co-lyophilization with some glass-forming or crystallizing excipients (Chang et al., 2005). Crystallization of mannitol in the frozen mixture solutions allows fast lyophilization that results in cake-structure microporous solids and dispersing amorphous regions containing proteins and protein-stabilizing excipients (e.g., sucrose) (Johnson et al., 2002).

The glass-state freeze-dried oligosaccharide-derived sugar alcohol solids should also protect embedded proteins from the chemical and physical degradation during storage. The high T_g and sufficient water-substituting interactions should make lactitol a preferable protein stabilizer over maltitol and maltotriitol for long-term storage of lyophilized solids (Hancock et al., 1995). The lower T_g amorphous solids are prone to faster chemical degradation and physical changes by the larger molecular mobility during storage and occasional exposure to temperatures above their T_g . Our present results also indicate the superior robustness of freeze-dried trehalose against the high-temperature stresses over the other saccharides and sugar alcohols studied. Co-lyophilization with some high T_g excipients (e.g., polymers) or excipients that intensify molecular interactions between stabilizing excipients (e.g., sodium phosphate) should be a potent method to raise the T_g of the amorphous sugar alcohol solids (Miller et al., 1998; Ohtake et al., 2004). The low enzyme activity remaining in the stored mannitol formulation suggested protection of the protein by rubber-state amorphous mannitol moiety dispersed in the physically stable crystalline cake.

In addition to the water-substitution and glass-embedding mechanisms, the oligosaccharide-derived sugar alcohols should protect protein structure in several other ways. They should dilute the non-ice phase in frozen solutions, and thus prevent protein denaturation by various stresses, including excess concentration of unfavorable co-solutes (e.g., inorganic salt), pH change by buffer opponent crystallization, and contact with ice surfaces. The sugar alcohols should also prevent crystallization of co-lyophilized saccharides (e.g., sucrose) during storage (Bhugra et al., 2007). The higher exclusion volume of larger sugar alcohol molecules (e.g., maltotriitol) should help to retain the integrity of the quaternary structure of LDH against the low-temperature-induced subunit dissociation that leads to irreversible structural change (Jaenicke, 1990; Anchordoquy et al., 2001).

The suggested lower susceptibility for the Maillard reaction should be an advantage to applying the oligosaccharide-derived sugar alcohols for freeze-drying of chemically labile proteins. The Maillard reaction, which often appears as non-enzymatic browning, is one of the major pathways of protein chemical degradation that also leads to biological activity loss (Manning et al., 1989;

Kawai et al., 2004). The lower hydrolysis rate compared to some oligosaccharides should explain the limited reactivity of the sugar alcohols (Desai et al., 2007). Sucrose tends to be degraded into reactive reducing monosaccharides (glucose, fructose), as well as highly reactive fructofuranosyl cations during storage (Perez Locas and Yaylayan, 2008).

The oligosaccharide-derived sugar alcohols should be potent options in the formulation design as principal stabilizers that alternate disaccharides and/or an additional excipient to optimize the physical properties of the disaccharide-based formulations. Excipients appropriate for a particular therapeutic protein should vary depending on their chemical and physical stability, as well as their intended use. Further information on the safety and long-term protein stability would facilitate application of the oligosaccharide-derived sugar alcohols for freeze-dried protein formulations.

5. Conclusion

Some oligosaccharide-derived sugar alcohols (e.g., maltitol, lactitol, maltotriitol) formed glass-state amorphous cake-structure solids that protect model proteins from secondary structure perturbation (BSA) and activity loss (LDH) during freeze-drying and subsequent storage. Thermal and FDM analysis indicated applicability of ordinary lyophilizer for their freeze-drying without physical collapse during the process. The dried sugar alcohol solids have lower glass transition temperatures than the structurally related oligosaccharides, whereas lower susceptibility to Maillard reaction during storage should be an apparent advantage for particular applications.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Japan Health Sciences Foundation (KHB1006).

References

- Anchordoquy, T.J., Izutsu, K.I., Randolph, T.W., Carpenter, J.F., 2001. Maintenance of quaternary structure in the frozen state stabilizes lactate dehydrogenase during freeze-drying. *Arch. Biochem. Biophys.* 390, 35–41.
- Arakawa, T., Prestrelski, S.J., Kenney, W.C., Carpenter, J.F., 2001. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46, 307–326.
- Arakawa, T., Timasheff, S.N., 1982. Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemistry* 21, 6536–6544.
- Arakawa, T., Tsumoto, K., Kita, Y., Chang, B., Ejima, D., 2007. Biotechnology applications of amino acids in protein purification and formulations. *Amino Acids* 33, 587–605.
- Bhatnagar, B.S., Pikal, M.J., Bogner, R.H., 2008. Study of the individual contributions of ice formation and freeze-concentration on isothermal stability of lactate dehydrogenase during freezing. *J. Pharm. Sci.* 97, 798–814.
- Bhugra, C., Rambhatla, S., Bakri, A., Duddu, S.P., Miller, D.P., Pikal, M.J., Lechuga-Ballesteros, D., 2007. Prediction of the onset of crystallization of amorphous sucrose below the calorimetric glass transition temperature from correlations with mobility. *J. Pharm. Sci.* 96, 1258–1269.
- Breen, E.D., Curley, J.G., Overcashier, D.E., Hsu, C.C., Shire, S.J., 2001. Effect of moisture on the stability of a lyophilized humanized monoclonal antibody formulation. *Pharm. Res.* 18, 1345–1353.
- Carpenter, J.F., Crowe, J.H., 1988. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology* 25, 244–255.
- Carpenter, J.F., Crowe, J.H., 1989. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry* 28, 3916–3922.
- Carrasquillo, K.G., Sanchez, C., Griebenow, K., 2000. Relationship between conformational stability and lyophilization-induced structural changes in chymotrypsin. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31, 41–53.
- Cavatur, R.K., Vemuri, N.M., Pyne, A., Chrzan, Z., Toledo-Velasquez, D., Suryanarayanan, R., 2002. Crystallization behavior of mannitol in frozen aqueous solutions. *Pharm. Res.* 19, 894–900.
- Chang, L.L., Shepherd, S., Sun, J., Tang, X.C., Pikal, M.J., 2005. Effect of sorbitol and residual moisture on the stability of lyophilized antibodies: implications for the mechanism of protein stabilization in the solid state. *J. Pharm. Sci.* 94, 1445–1455.
- Costantino, H.R., 2004. Excipients for use in lyophilized pharmaceutical peptide, protein, and other bioproducts. In: Costantino, H.R., Pikal, M.J. (Eds.), *Lyophiliza-*