

平成 20 年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告*6
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

前田 瑛起*1,2, 北 莊一郎*1, 中世古みなみ*1, 木下 充弘*1,
田邊 豊重*3, 大庭 澄明*4, 早川 堯夫*5, 掛樋 一晃*1

Investigational Testing of SDS-PAGE and Capillary Electrophoresis
for Biological Therapeutics, Aimed for Listing on Japanese Pharmacopoeia
as General Tests

Eiki MAEDA*1,2, Soichiro KITA*1, Minami NAKASEKO*1,
Mitsuhiro KINOSHITA*1, Toyoshige TANABE*3, Sumiaki OHBA*4,
Takao HAYAKAWA*5 and Kazuaki KAKEHI*1

Summary

Biological therapeutics, such as hormones, enzymes, cytokines, antibodies, blood coagulation factors and vaccines, have been attracting much attention from the pharmaceutical industry, and the development of such products has been accelerating. Among them, antibody products, used as biological therapeutics, have been growing most rapidly. In this study, the performance of SDS-PAGE and capillary electrophoresis was investigated using commercially available antibody pharmaceuticals (tocilizumab, bevacizumab, rituximab and trastuzumab), in terms of the precision, linearity and the detection capability of degradation products. Capillary zone electrophoresis (CZE) showed the highest precision for peak areas and migration times, and analysis could be completed within 10 min, which is much faster than in the cases of SDS-PAGE and capillary gel electrophoresis (CGE). All the methods examined in this study gave a good linear relationship between sample concentration (sample dose) and band/peak area. As for detection capability of degradation products, good results were obtained with CGE. However, pressure injection was found to be problematic; because of the difficulties of sample injection into a capillary filled with a high-viscosity running buffer, as is often used in CGE, the variability of sample injection should be evaluated in advance. Furthermore, it is necessary to improve the sample preparation methods and the estimation methods for molecular weight under non-reducing conditions. Therefore, further investigation is necessary to develop and extend the versatility of testing methods for biological therapeutics.

*1 近畿大学薬学部 大阪府東大阪市小若江 3-4-1 (〒577-8502)

School of Pharmacy, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka, Osaka 577-8502, Japan

*2 武田薬品工業株式会社 CMC 研究センター開発分析研究所 大阪府大阪市淀川区十三本町 2-17-85 (〒532-8686)

Analytical Development Laboratories, CMC center, Takeda Pharmaceutical Company Limited, 2-17-85 Jusohonmachi, Yodogawa-ku, Osaka 532-8686, Japan

*3 大阪医薬品協会技術研究委員会 大阪市中央区伏見町 2-4-6 (〒541-0044)

Research and Technical Committee, Osaka Pharmaceutical Manufacturers Association, 2-4-6 Fushimi-cho, Chuo-ku, Osaka 541-0044, Japan

*4 社団法人東京医薬品工業協会局方委員会 東京都中央区日本橋本町 3-4-1 (〒103-0023)

Pharmacopoeia and CMC committee, The Pharmaceutical Manufacturers' Association of Tokyo, 3-4-1, Nihonbashihon-cho, Chuo-ku, Tokyo 103-0023, Japan

*5 近畿大学薬学総合研究所 大阪府東大阪市小若江 3-4-1 (〒577-8502)

Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka, Osaka 577-8502, Japan

*6 本研究は、平成 20 年度日本公定書協会の「日本薬局方の試験法に関する研究」により実施したものである。

Key words

SDS-PAGE, Capillary electrophoresis, Antibody, Biological therapeutics, Tocilizumab, Bevacizumab, Rituximab, Trastuzumab

緒言

近年のバイオテクノロジー技術の進展に伴い、ホルモン、酵素、サイトカイン、抗体、血液凝固因子、ワクチンなどのたん白質製剤の開発はますます活発になり、上市されるバイオ医薬品数は増加を続けている。日本薬局方はバイオ医薬品を各条に積極的に収載するという方針のもとに、第十四改正では2品目、第十五改正で4品目が収載され、第十六改正では13品目が収載予定となっている。これらのバイオ医薬品の中でも、毎年数十%の成長率を維持しているのが抗体医薬品であり、1994年から2008年にかけて世界で22種類の抗体医薬品が認可されている^{1,2)}。これにはモノクローナル抗体作成技術やヒト化及びヒト抗体作成技術の進展が大きく寄与し、今後の更なる進展が期待されている。このようなバイオ医薬品の発展を展望して、理化学試験法としてSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE)、等電点電気泳動法、キャピラリー電気泳動法 (Capillary electrophoresis; CE)、アミノ酸分析法、ペプチドマッピング法、たん白質定量法などが日米欧3極薬局方国際調和検討グループ (PDG) 案件として取り上げられ、その成果は日本薬局方参考情報として収載されている³⁾。これらの試験法が参考情報から一般試験法として収載されれば、局方品製造関係者、新薬開発関係者そして規制当局などが、生物薬品各条や新規生物薬品の公的試験法としてより一層適切に活用できるようになる。一方、SDS-PAGEは、最近、ICH Q4Bで3薬局方一般試験法の3極規制当局における受入の対象として挙げられ、その評価作業が進められている。

したがって、国内的にも国際的にも日本薬局方参考情報に収載された試験法の一般試験法への取り込みは重要な課題であるが、その際に一般試験法に収載すべき部分と、参考情報に留めておく部分などについて慎重に吟味する必要がある。また、有用で効果的な活用の仕方、特長と限界についても把握しておく必要がある。そのため、各試験法についての技術的留意点や要点を実際の試料を用いて検討し、データを蓄積しておくことは極めて重要である。

そこで本研究では、日本薬局方参考情報に収載されているSDS-PAGE及びCEの2つの試験法について、既に

上市されているTocilizumab, Bevacizumab, Rituximab, Trastuzumabの4種類の抗体医薬品を試料とし、試験法の特徴や技術的留意点を明らかにすることを目的として検討を行った。

実験方法

1. 試料

試料は市販製剤であるTocilizumab (分子量約148,000, 軽鎖: $C_{1,033}H_{1,606}N_{278}O_{337}S_6$, 重鎖: $C_{2,181}H_{3,398}N_{582}O_{672}S_{15}$), Bevacizumab (分子量約149,000, 軽鎖: $C_{1,034}H_{1,591}N_{273}O_{338}S_6$, 重鎖: $C_{2,235}H_{3,413}N_{585}O_{678}S_{16}$), Rituximab (分子量約144,500, $C_{6,426}H_{9,900}N_{1,700}O_{2,008}S_{44}$), Trastuzumab (分子量約148,000, 軽鎖: $C_{1,032}H_{1,603}N_{277}O_{335}S_6$, 重鎖: $C_{2,192}H_{3,387}N_{583}O_{671}S_{16}$)を用いた。各試料は調製時にバイアル中で適切に溶解し使用後、残存溶液を近畿大学附属奈良病院薬剤部から供与された。各試料約1 mLを調剤から3日以内 (冷所保存) に5 Lの蒸留水で透析 (12時間, 冷所) 後、凍結乾燥したものを試料とした。その他の試薬及び試液は特級あるいはHPLCグレードのものを使用した。

2. 装置

SDS-PAGEはゲル電気泳動装置 (Mini Protean 3 cell) 及びパワーサプライ (POWER PAC 3000) 共にBio Rad製のものを用いて実施した。ゲル画像はスキャナー (GT-9300UF, EPSON製) を用いて取得し、Image Master 2D Platinum (GEヘルスケア製) を用いてデータ処理した。CEはP/ACE™ MDQ及びProteome Lab™ PA800 (共にBeckman Coulter製) を使用した。

3. 操作手順

3.1 SDS-PAGE

3.1.1 試料調製

3.1.1.1 非還元条件

凍結乾燥した4種の抗体医薬品1 mgをそれぞれ水に溶解し1 mg/mLの水溶液とした。この試料溶液20 μ Lに18 μ Lの反応溶液を加え、ボルテックスミキサーを用いてよく混和した後、沸騰水浴中に10分間浸した。反応溶液として、250 mmol/L トリス-塩酸緩衝液 (pH 6.8)、4.6%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、20%グリセリンの混液を使用した。数分間放冷後、1%プロモフェノー

ルブルー (BPB) 水溶液 (2 μL) を加えた。次いで反応溶液と 1% BPB 水溶液を 9 : 1 の比率で混合した希釈溶液で 0.03, 0.06, 0.13, 0.25 及び 0.50 mg/mL となるように希釈した。これらの試料溶液は分析直前に遠心分離 (14,000 rpm, 10 分間) し、その上清を 10 μL ずつゲルに導入した。

3.1.1.2 還元条件

凍結乾燥した 4 種の抗体医薬品 1 mg をそれぞれ水に溶解し 1 mg/mL 水溶液とした。この試料溶液 20 μL に、反応溶液と 2-メルカプトエタノール (2-ME) を 9 : 1 の比率で混合した溶液を 18 μL 加え、ボルテックスミキサーを用いてよく混和した後、沸騰水浴中に 10 分間浸した。以後は非還元条件と同様に処理したものを試験に用いた。

3.1.1.3 分子量マーカー

分子量マーカーは Bio Rad 製 Precision Plus Protein™ Unstained Standards を用いた。本分子量マーカーは 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 kDa の未染色リコンビナントたん白質から構成されており、試料溶液と同様に 10 μL ずつゲルに導入した。

3.1.2 ポリアクリルアミドゲルの作成

ポリアクリルアミドゲルは分離 (下層) ゲルと濃縮 (上層) ゲルからなる不連続な緩衝液系ゲルを用いた。分離ゲルは分析対象となる試料の分子量に合わせ、非還元条件では 6%、還元条件では 10% とした。操作は一部

を除き、第十五改正日本薬局方中の参考情報 6, SDS-PAGE⁹⁾ に準じて行った。

3.1.2.1 分離ゲルの調製

目的濃度 (非還元条件では 6%、還元条件では 10%) の分離ゲルを調製するため、Table 1 に従い各成分をメートルガラス内で混和した。各成分はあらかじめセルロースアセテート膜 (孔径 : 0.45 μm) でろ過した。過硫酸アンモニウム (APS) 及び *N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) 混和前に 5 分間超音波処理して脱気し、APS 及び TEMED を加えて混合した後、直ちに Bio Rad 製 Mini Protean 3 cell のゲル形成枠ガラス板の間に 4.8 mL を注いだ。この液の上に 0.1 mL の水飽和ブタノールを載せ室温で 30 分間静置しゲルを重合した。

3.1.2.2 濃縮ゲルの調製

分離ゲルの重合が完了した後、ろ紙を用いて水飽和ブタノール層を取り除き、ゲルの上部を水 (50 μL) で 2 回洗浄した。次いで、Table 1 に従い濃縮ゲルの調製に必要な各成分を混合した。分離ゲルの調製時と同様に、各成分はセルロースアセテート膜 (孔径 : 0.45 μm) を用いてあらかじめ、ろ過して用いた。APS 及び TEMED 混和前に 5 分間超音波処理により脱気し、APS 及び TEMED を加えて混和した後、直ちにゲル形成枠内の分離ゲル上に注いだ。直ちにサンプルコウムを気泡が混入しないように濃縮ゲル溶液中に差し込み、室温で約 30 分間静置

Table 1 Preparation of Polyacrylamide Gels

Composition of solution	Volume of each solution (mL)				
	5 mL	10 mL	15 mL	20 mL	
6 % Acrylamide gel	Water	2.6	5.3	7.9	10.6
	Acrylamide solution ^(a)	1	2	3	4
	1.5 mol/L Tris solution (pH 8.8) ^(b)	1.3	2.5	3.8	5
	100 g/L SDS ^(c)	0.05	0.1	0.15	0.2
	100 g/L APS ^(d)	0.05	0.1	0.15	0.2
	TEMED ^(e)	0.004	0.008	0.012	0.016
10 % Acrylamide gel	Water	1.9	4	5.9	7.9
	Acrylamide solution ^(a)	1.7	3.3	5	6.7
	1.5 mol/L Tris solution (pH 8.8) ^(b)	1.3	2.5	3.8	5
	100 g/L SDS ^(c)	0.05	0.1	0.15	0.2
	100 g/L APS ^(d)	0.05	0.1	0.15	0.2
	TEMED ^(e)	0.002	0.004	0.006	0.008
Concentrating gel	Water	0.68	2.1	3.4	6.8
	Acrylamide solution ^(a)	0.17	0.5	0.83	1.7
	1.0 mol/L Tris solution (pH 6.8) ^(f)	0.13	0.38	0.63	1.25
	100 g/L SDS ^(c)	0.01	0.03	0.05	0.1
	100 g/L APS ^(d)	0.01	0.03	0.05	0.1
	TEMED ^(e)	0.001	0.003	0.005	0.01

- (a) Acrylamide solution: 30% acrylamide/bisacrylamide (29:1) solution
 (b) 1.5 mol/L Tris solution (pH 8.8): 1.5 mmol/L Tris-hydrochloric acid buffer (pH 8.8)
 (c) 100 g/L SDS: 100 g/L Sodium dodecyl sulfate solution
 (d) 100 g/L APS: 100 g/L Ammonium persulfate solution
 (e) TEMED: *N,N,N',N'*-Tetramethyl-ethylenediamine
 (f) 1.0 mol/L Tris solution (pH 6.8): 1.0 mmol/L Tris-hydrochloric acid buffer (pH 6.8)

しゲルを重畳させた。

重畳終了後、慎重にリンブルコウムを抜き取り、サンプルコウムによって形成された溝やその付近を水でゆすぎ、キムワイプを用いて非重合アクリルアミドを除去した。この際、ゲルの溝に非重合アクリルアミドが入り込み、試料導入や分析に支障をきたす場合があるため、細い注射針などを用いて溶液を除去した。その後、泳動装置に取り付け試験に使用した。

3.1.3 分析条件

泳動緩衝液として3.0%トリス、14.4%グリシン、1.0% SDS 水溶液を用いた。泳動緩衝液を陽極側に135 mL、陰極側に250 mL 注ぎ入れ、約2.5時間泳動した。初めの約1時間は5 mA/gel で泳動し、導入した試料を濃縮ゲル内で濃縮した。試料が濃縮ゲルと分離ゲルの境界を通過したことを確認した後、印加電流を10 mA/gel に変更した。泳動は試料の最先端がゲルの端を越えない適切な時間で終了した。

3.1.4 たん白質の染色及び脱色

泳動後直ちに泳動装置からゲル板を取り外し、水でゲル板やゲルの溝をよくすすぎ、泳動緩衝液を洗い流した。スパーテルを用いて慎重に2枚のゲル板のうちの片方を取り外し、濃縮ゲルを分離ゲルから切り離した。切り離れた分離ゲルをもう片方のゲル板から離してタッパウェアに移し、30 mL の染色液(0.2% Coomassie Brilliant Blue R250, 40%メタノール, 10%酢酸)を注ぎ、静かに振り混ぜながら室温で1時間染色した。その後、染色液を捨て、40 mL の脱色液(40%メタノール, 10%酢酸)を注ぎ、室温で静かに振り混ぜながら1時間脱色した。1時間後、脱色液を入れ替え、更に30分間ゲルを脱色した。その後ゲルを水で洗浄し、ゲル画像を取得した。

3.1.5 試験

非還元条件及び還元条件のそれぞれについて、精度試験としてゲル内のばらつきに1枚、ゲル間の検討に3枚のゲルを使用して電気泳動を行った。直線性については3枚のゲルに5濃度の試料を導入して試験を実施した。

3.2 CE

SDS-PAGEと同様に、非還元及び還元条件について、キャピラリーゲル電気泳動法(CGE)とキャピラリーゾーン電気泳動法(CZE)の2種類の試験法により検討した。CGEについては非還元及び還元条件ともにBeckman Coulter社のIgG Purity/Heterogeneity Assay Kitを用いた。CZEについては本研究室で開発した分析条件⁹⁾を用いた。

3.2.1 試料調製

3.2.1.1 非還元条件, CGE

凍結乾燥した4種の抗体医薬品2 mgをそれぞれ水に

溶解し5 mg/mLの水溶液とし、その一部(20 μ L)にIgG Purity/Heterogeneity Assay Kit 付属のSDS サンプル緩衝液(100 mmol/L トリス-塩酸, pH 9.0, 1% SDS 含有)を75 μ L, 250 mmol/L ヨードアセトアミドを5 μ L, 10 kDa 内部標準溶液を2 μ L 加え、ボルテックスミキサーを用いてよく混和した。その後、14,000 rpm で1分間遠心分離したものを70°Cで10分間たん白変性し、3分以上放冷後、14,000 rpm で再度10分間遠心分離した後、上清100 μ LをCEに用いた。

3.2.1.2 還元条件, CGE

凍結乾燥した4種の抗体医薬品2 mgをそれぞれ水で5 mg/mLの溶液とした。この溶液20 μ LにSDS サンプル緩衝液を75 μ L, 2-MEを5 μ L, 10 kDa 内部標準溶液を2 μ L 加え、ボルテックスミキサーを用いてよく混和した。以後は非還元条件と同様にCEに供した。

3.2.1.3 非還元条件, CZE

凍結乾燥した4種の抗体医薬品1 mgをそれぞれ水に溶かし1 mg/mL溶液とし、その10 μ LにCZE用反応溶液(250 mmol/L トリス-塩酸, pH 6.8, 4.6% SDS 含有)を10 μ L 加え、ボルテックスミキサーを用いてよく混和した。これを沸騰水浴に10分間浸し、放冷後14,000 rpm で10分間遠心分離した。その上清10 μ Lを、水で2倍希釈したCZE用反応溶液で希釈して目的の試料濃度に調整し試料溶液とした。

3.2.1.4 還元条件, CZE

凍結乾燥した4種の抗体医薬品1 mgをそれぞれ水に溶解し1 mg/mL溶液とした。この溶液10 μ Lに、CZE用反応溶液を9 μ L, 2-MEを1 μ L 加えボルテックスミキサーを用いてよく混和し、非還元条件と同様に処理してCEに供した。

3.2.2 分析条件

3.2.2.1 CGE

電気泳動用緩衝液にはIgG Purity/Heterogeneity Assay Kit 付属のSDS ゲル緩衝液(Beckman Coulter製のポリマーを含む緩衝液でpH 8.0, 0.2%のSDSを含有)を用い、印加電圧を-15 kV(試料導入側が陰極、廃液側が陽極)、分析温度を25°Cとして220 nmの紫外吸収検出で分析した。試料は-5 kVで20秒間電氣的に導入した。キャピラリーカラムは有効長(試料導入末端側から検出窓までの長さ)20 cm, 全長30 cm, 内径50 μ mのフューズドシリカキャピラリーを用いた。分析ごとに0.1 mmol/L 水酸化ナトリウム水溶液(70 psi, 3分間)、0.1 mmol/L 塩酸(70 psi, 1分間)、水(70 psi, 1分間)の順で試料導入末端側からキャピラリーを洗浄し、同じく加圧法でSDS ゲル緩衝液をキャピラリーに充てん(70 psi, 10分間)して分析に用いた。

3.2.2.2 CZE

CZE 用緩衝液は 0.1% SDS を含む 25 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 5.8) を用いた。印加電圧は 25 kV (試料導入側が陽極、廃液側を陰極)、分析温度 25°C で 200 nm の紫外部吸収検出で分析した。試料は 1 psi で 5 秒間加圧することにより導入した。キャピラリーカラムは有効長 40 cm、全長 50 cm、内径 50 μ m のフューズドシリカキャピラリー内壁をカルボキシル基で修飾したキャピラリー (FunCap CE TypeC, GL Sciences 製) を用いた。分析ごとに 1 mol/L 塩化ナトリウム水溶液 (20 psi, 1 分 30 秒間)、水 (20 psi, 1 分間) の順で加圧法により試料導入末端側からキャピラリーを洗浄し、同じく加圧法により CZE 用緩衝液で平衡化 (20 psi, 4 分間) した後分析に使用した。

実験結果

1. SDS-PAGE

1.1 精度

0.25 mg/mL に調製した試料溶液を各レーン 10 μ L とするようにゲルに導入して電気泳動したところ、非還元条件で Fig. 1-a、還元条件で Fig. 1-b に示す結果が得られた。非還元条件では、使用したすべての試料が約 150 kDa の位置に IgG 由来のバンドを与えた。また、還元条件では、約 50 kDa の位置に重鎖 (Hc) 由来のバンドが、そして約 25 kDa 付近に軽鎖 (Lc) 由来のバンドが観察された。また、これらのバンド以外に数本の薄いバンドが観察された。IgG、Hc 及び Lc 由来のバンドについて、バンド面積及び相対移動度を求め、それぞれの相対標準偏差 (RSD 値) を算出した (Table 2)。同一ゲル上のこれらのバンドのバンド面積及び相対移動度の RSD 値 (n=6) は $\leq 4.2\%$ 及び $\leq 1.5\%$ であり、ゲル間における RSD 値 (n=3) は $\leq 15.1\%$ 及び $\leq 3.9\%$ であった。

1.2 直線性

非還元及び還元条件共に 0.03, 0.06, 0.13, 0.25 及び 0.50 mg/mL の Tocilizumab 溶液 (10 μ L/lane) をそれぞれ 3 枚のゲルに導入し分析した結果を Fig. 2-a 及び Fig. 2-b に示す。Tocilizumab に由来するバンドの平均バンド面積 (n=3) を算出し、ゲルへの試料導入量に対してプロットしたところ、Table 3 に示すように良好な直線性 ($R \geq 0.9966$) が観察された。

1.3 不純物の検出

非還元及び還元条件の SDS-PAGE の結果より、分子量マーカーの相対移動度とマーカーたん白質の分子量の

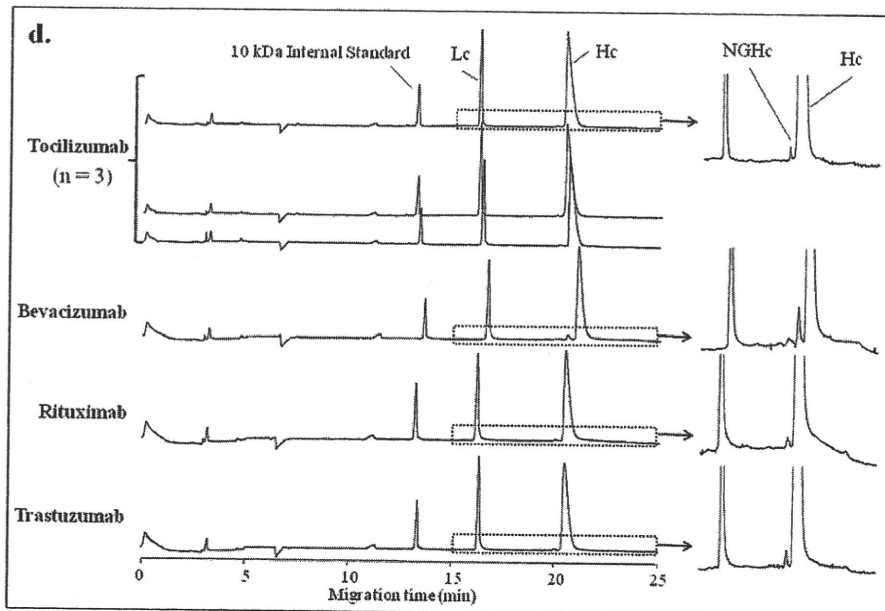
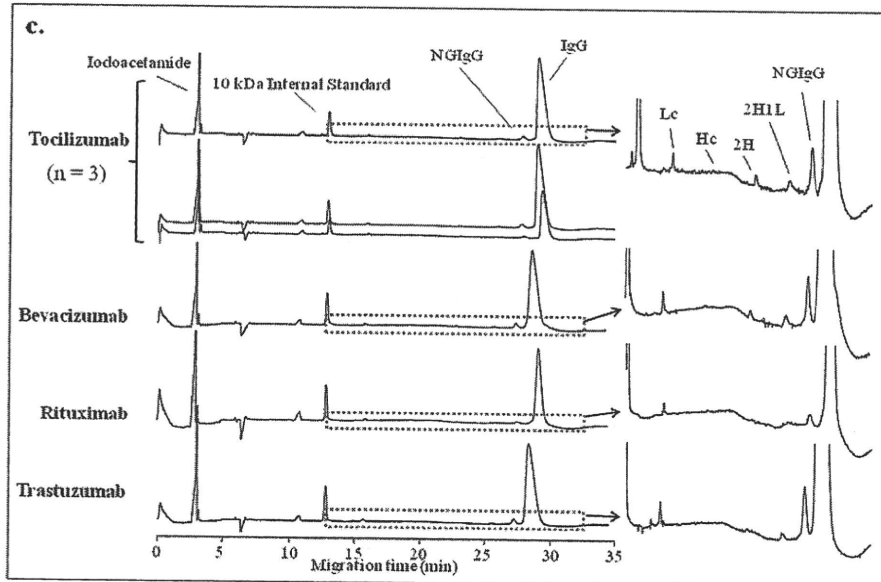
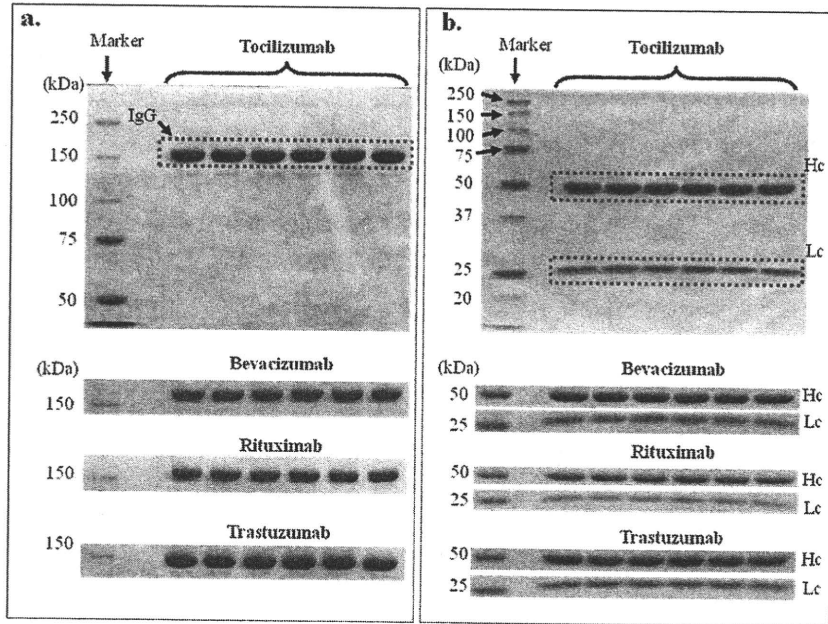
常用対数 ($\log_{10} Mr$) から作成した検量線を用いて試料溶液中に観察されたバンドの分子量を算出した (Table 4)。検量線はゲル毎にそれぞれ作成したものをを用いた。検量線を作成する際、検量線はマーカーたん白質の高分子量側でわずかに S 字曲線を描いた。そのため、直線部分で分子量の算出を行う必要がある。Fig. 3 は還元条件下で SDS-PAGE により作成した検量線であるが、マーカーたん白質の $\log_{10} Mr$ が 2.0 以上の部分で直線性を失っていることがわかる (点線)。そのため、分子量算出には試料溶液レーンで検出された全バンドの分子量算出が可能な $\log_{10} Mr$ が 2.0 以下の範囲の検量線を使用すべきである。そこで、 $\log_{10} Mr$ の値が 2.0 以上の 2 個のプロットを除いた 6 個のプロット (実線) を用いて検量線を作成したところ相関係数が 0.9615 から 0.9916 へと改善され、良好な直線性が確保された。作成した検量線を使用して Tocilizumab, Bevacizumab, Rituximab, Trastuzumab の重鎖及び軽鎖に由来するバンドの分子量を算出したところ、同一ゲル内平均 (n=6)、ゲル間平均 (n=3) どちらも Hc が 53~54 kDa、Lc が 24~25 kDa であった。還元条件では IgG のジスルフィド結合が開裂してジスルフィド結合を持たない Hc と Lc となっており、分子量測定結果は理論値とほぼ等しい値を示した。一方、非還元条件では、ゲル上で検出された分子量 250, 150, 100, 75 及び 50 kDa のマーカーたん白質すべてを検量線作成に用い、算出した分子量を Tocilizumab, Bevacizumab, Rituximab, Trastuzumab それぞれの理論分子量である 148, 149, 145 及び 148 kDa と比較したところ、最大で 27 kDa の誤差が生じていることが示された。

また、主成分以外に観察されたバンドのいくつかは、使用した抗体医薬品間で共通して観察されることが明らかとなった。Fig. 4 の Band 2, Band 4, Band 5 の 3 つのバンド及び Band 3, Band 7 の 2 つのバンドは、それぞれの IgG との相対移動度がほぼ同じであることから、似通った分解過程を経て生成した不純物分子であることが示唆された。また、これらのバンドは還元条件では観察されなかったことから、IgG 中のジスルフィド結合の一部が開裂した分子に由来する可能性が示唆された。

2. CGE

2.1 精度

調製した 0.25 mg/mL の試料溶液をそれぞれ 3 回ずつ繰り返し分析した結果、非還元条件で Fig. 1-c、還元条件で Fig. 1-d に示す結果が得られた。非還元条件では約 30 分に IgG 由来のピークが観察され、還元条件では約 15 分に Lc が、約 20 分に Hc のピークが観察された。CGE では泳動緩衝液が高い粘性を持ち加圧法による試



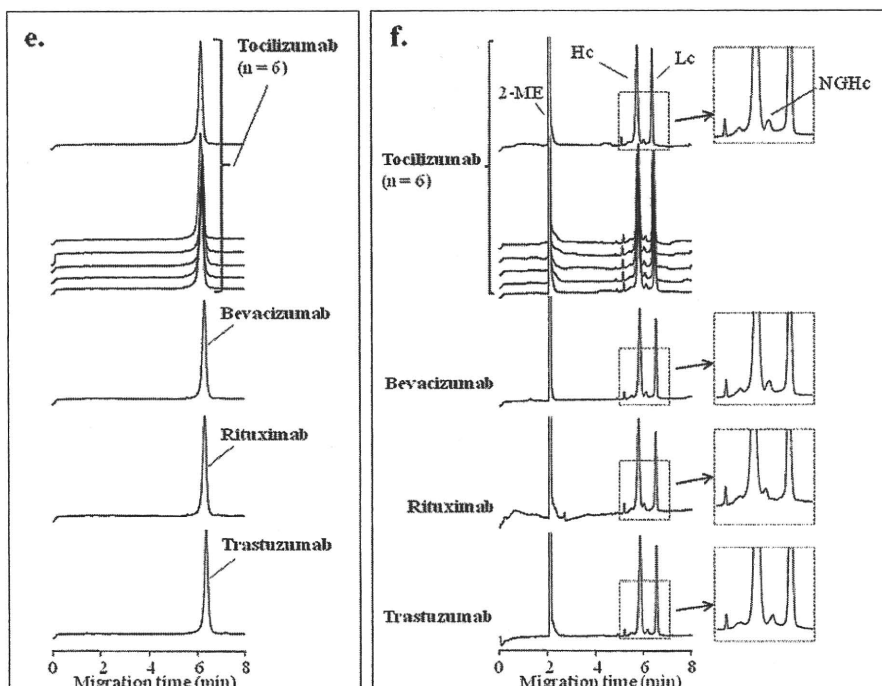


Fig.1 Analysis of Four Antibody Therapeutics for Precision

a) gel images of antibodies by SDS-PAGE at non-reducing conditions, b) analyzed by SDS-PAGE at reducing conditions. c) electropherograms analyzed by CGE at non-reducing conditions and d) CGE at reducing conditions. e) electropherograms analyzed by CZE at non-reducing conditions and f) CZE at reducing condition.

Hc: heavy chain
 Lc: light chain
 2H: molecule of two heavy chains
 2H1L: molecule of two heavy chains and one light chain
 NGIgG: non-glycosylated IgG
 NGHc: non-glycosylated Hc

料導入が困難であるため電気的注入法により試料をキャピラリー内に導入している。そのため分析ごとの試料導入手量が安定しない恐れがある。そこで10 kDa 内部標準を用いてピーク面積を補正してRSD値を算出したところ、SDS-PAGEで得られたバンド面積及び相対移動度のゲル間誤差と同程度の $\leq 18.5\%$ 及び $\leq 6.0\%$ という値が得られた (Table 2)。

2.2 直線性

Tocilizumabを0.03, 0.06, 0.13, 0.25及び0.50 mg/mLの濃度に調製し、各濃度で3回繰り返し分析を行い、非還元条件下でFig. 2-cそして還元条件下でFig. 2-dに示す結果が得られた。Tocilizumab由来ピーク面積を10 kDa 内部標準により補正し、その補正値を各試料濃度に対してプロットしたところ得られた検量線は高い相関係数を示し良好な直線性を示した (Table 3)。

2.3 不純物の検出

CGEでは主要なピーク (IgG, Hc 及び Lc のピーク)

の他に抗体医薬品中の抗体分子が断片化したと考えられる分子や糖鎖を持たない抗体分子に由来すると考えられるピークが観察された (Fig. 1-c 及び d)。非還元条件では、糖鎖を持たない抗体分子 (NGIgG), Hc 及び Lc, また、IgG から軽鎖2つが外れた分子 (2H), IgG から軽鎖1つが外れた分子 (2H1L) に由来すると考えられるピークが観察された。これらのピークは高い再現性で同じ泳動時間に観察されたが、ピーク面積については $< 89.3\%$ と非常にバラツキが大きかった。なお、4種の抗体医薬品について、NGIgGに由来するピークの電気泳動時間のRSD (n=3) は $< 5.8\%$ 、補正後のピーク面積のRSD (n=3) は $< 15.7\%$ であった。更に、NGIgGのIgGに対する割合を算出した結果をTable 5に示す。いずれの試料においても、NGIgGは糖鎖結合IgGに対して約2~3%程度存在していることが明らかとなった。同様に、還元条件においても主要なピーク (Hc 及び Lc のピーク) の他にいくつかのピークが観察された (Fig. 1-d)。糖鎖を持たないHc (NGHc) は約20分 (RSD値： $< 1.0\%$)に観察され、補正ピーク面積のRSD値は $< 34.7\%$ であっ

Table 2 Repeatability of Each Analysis

Conditions	Testing methods	Sample	RSD (%) of band or peak Area		RSD (%) of relative front or migration time		
			IgG	Hc	IgG	Hc	
Non-reducing	SDS-PAGE	Intra gel (n=6)	Tocilizumab	4.2	-	0.4	-
			Bevacizumab	3.3	-	1.5	-
			Rituximab	1.9	-	0.7	-
			Trastuzumab	3.5	-	0.5	-
			Tocilizumab	7.0	-	1.4	-
			Bevacizumab	15.1	-	2.2	-
	CGE (n=3)	Inter gel (n=3)	Rituximab	14.8	-	2.9	-
			Trastuzumab	6.7	-	3.9	-
			Tocilizumab	18.5	-	1.4	-
	CZE (n=6)	Inter gel (n=6)	Bevacizumab	1.2	-	0.7	-
			Rituximab	10.0	-	1.1	-
			Trastuzumab	2.1	-	5.9	-
			Tocilizumab	2.7	-	0.5	-
			Bevacizumab	2.5	-	0.9	-
			Rituximab	2.7	-	0.6	-
Reducing	SDS-PAGE	Intra gel (n=6)	Tocilizumab	2.8	3.3	2.9	0.5
			Bevacizumab	2.4	4.0	3.9	0.3
			Rituximab	4.9	4.7	7.0	0.8
			Trastuzumab	1.4	1.9	5.5	0.5
			Tocilizumab	4.3	2.5	8.1	0.3
			Bevacizumab	8.2	9.3	11.4	0.2
	CGE (n=3)	Inter gel (n=3)	Rituximab	8.3	7.4	10.1	0.5
			Trastuzumab	6.2	6.1	7.5	0.6
			Tocilizumab	6.0	17.2	3.0	0.6
	CZE (n=6)	Inter gel (n=6)	Bevacizumab	1.3	1.6	0.8	0.5
			Rituximab	2.1	2.1	2.3	1.1
			Trastuzumab	1.3	1.5	1.0	0.4
			Tocilizumab	2.5	2.2	3.1	0.6
			Bevacizumab	1.2	0.7	2.0	0.8
			Rituximab	1.2	1.6	1.5	0.4
Trastuzumab	2.3	2.1	2.7	1.5			

CGE: capillary gel electrophoresis, CZE: capillary zone electrophoresis, Hc: heavy chain, Lc: light chain, RSD: relative standard deviation

Table 3 Linearity of Each Analysis

Conditions	Testing methods	IgG (Hc + Lc)		Hc		Lc	
		R	Calibration curve	R	Calibration curve	R	Calibration curve
Non-reducing	SDS-PAGE	0.9992	y = 7312 x + 6701	-	-	-	-
	CGE	0.9997	y = 11.0 x + 0.09	-	-	-	-
	CZE	0.9995	y = 900690 x - 8231	-	-	-	-
Reducing	SDS-PAGE	0.9966	y = 12319 x + 11015	0.9966	y = 7803 x + 630	0.9994	y = 4516 x - 989
	CGE	0.9990	y = 9.2 x - 0.32	0.9990	y = 6.6 x + 0.22	0.9991	y = 2.5 x - 0.09
	CZE	0.9996	y = 833095 x - 8362	0.9996	y = 473870 x - 2829	0.9992	y = 833095 x - 8362

CGE: capillary gel electrophoresis, CZE: capillary zone electrophoresis, Hc: heavy chain, Lc: light chain, R: correlation coefficient

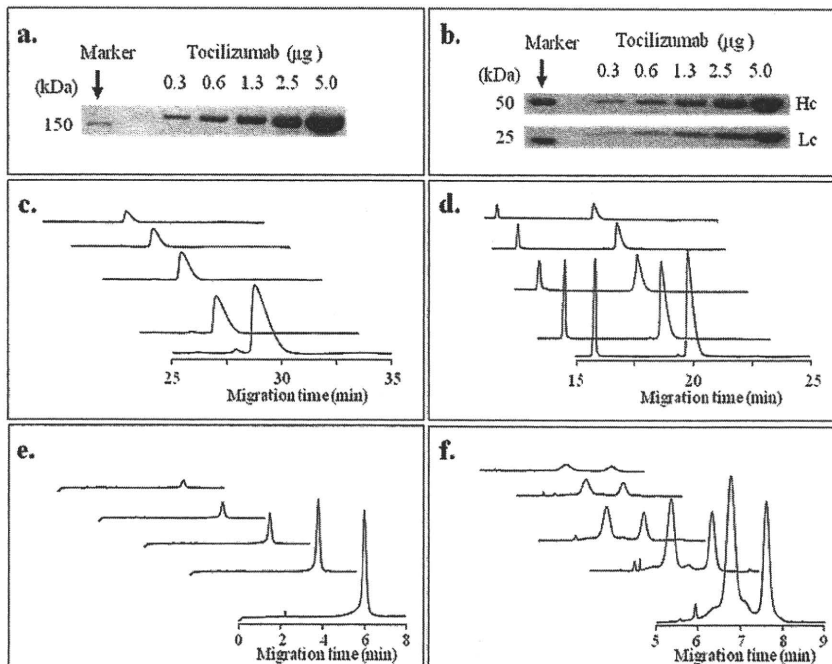


Fig.2 Analysis of Tocilizumab for Linearity

a) gel image of Tocilizumab by SDS-PAGE at non-reducing condition, b) analyzed by SDS-PAGE at reducing condition. c) electropherogram analyzed by CGE at non-reducing condition and d) CGE at reducing condition. e) electropherogram analyzed by CZE at non-reducing condition and f) CZE at reducing condition.

Hc: heavy chain
Lc: light chain

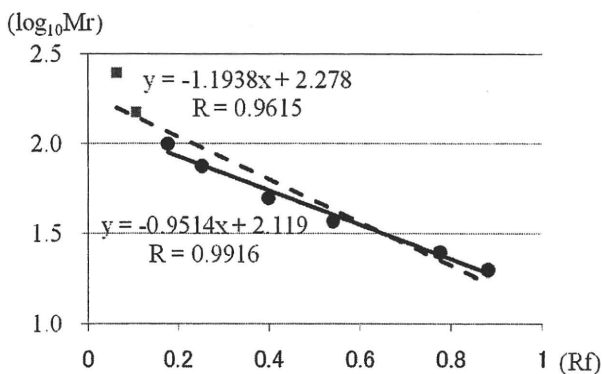


Fig.3 Comparison of Two Calibration Curves for SDS-PAGE at Reducing Condition

The dotted line indicates the calibration curves using all data, but the solid line was prepared with the data obtained from two standard protein bands having low molecular masses.

Rf: relative front

$\log_{10}Mr$: common logarithm of molecular weight

た. NGHc と Hc との存在比率を算出したところ, NGHc の存在比率の RSD 値は <38.8% となり, 非還元条件 CGE と同様に NGHc の定量は困難であるが, 試料中の NGHc の有無を確認することは可能であることが示された.

3. CZE

3.1 精度

調製した 0.25 mg/mL の各試料について繰り返し分析 (n=6) を行った結果を Fig. 1-e (非還元条件) 及び Fig. 1-f (還元条件) に示す. 非還元条件では約 6 分に IgG 由来のピークが, 還元条件では約 6 分に Hc と Lc のピークがそれぞれ観察された. CGE 同様にそれぞれのピーク面積及び電気泳動時間の RSD 値を算出したところそれぞれ $\leq 3.1\%$, $\leq 1.7\%$ となり, 3 種類の試験法中で最も良好な値を示した.

3.2 直線性

Tocilizumab を 0.03, 0.06, 0.13, 0.25 及び 0.50 mg/mL の濃度に調製し, 各濃度について 3 回繰り返し分析し, 非還元条件下で Fig. 2-e に, 還元条件下で Fig. 2-f に示す結果が得られた. Tocilizumab 由来ピーク面積を各試料濃度に対してプロットしたところ, SDS-PAGE 及び CGE 同様に良好な直線性を示した (Table 3).

3.3 不純物の検出

非還元条件 CZE では不純物を検出することはできなかったが, 還元条件では CGE と同じく NGHc のピークが観察された. Tocilizumab, Bevacizumab, Rituximab, Trastuzumab それぞれについて 6 回繰り返し分析した

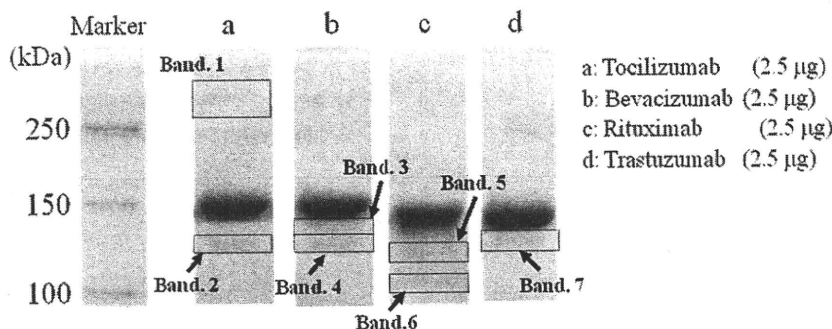


Fig. 4 Gel Images of Non-reducing SDS-PAGE

Table 4 Calculated Molecular Weight and Component Ratio in SDS-PAGE

Conditions	Sample	Band	Molecular weight		Component ratio			
			Mw (kDa)	RSD (%)	Percentage	RSD (%)		
Non-reducing	Intra gel (n=6)	Tocilizumab	IgG	167	0.2	100.0	0.0	
			Band. 1	262	1.1	6.7	8.3	
			Band. 2	142	0.6	12.6	29.7	
		Bevacizumab	IgG	175	0.8	100.0	0.0	
			Band. 3	160	1.2	8.5	9.6	
			Band. 4	146	0.6	8.7	17.2	
		Rituximab	IgG	166	0.4	100.0	0.0	
			Band. 5	155	0.5	5.3	17.9	
			Band. 6	139	0.4	5.0	27.4	
		Trastuzumab	IgG	154	0.3	100.0	0.0	
			Band. 7	140	0.5	3.7	12.3	
	Inter gel (n=3)	Tocilizumab	IgG	158	1.6	100.0	0.0	
				Band. 1	241	0.7	5.0	43.9
				Band. 2	136	1.5	6.2	4.7
		Bevacizumab	IgG	159	2.1	100.0	0.0	
				Band. 3	146	1.8	5.5	17.3
			Band. 4	137	1.8	5.3	6.3	
Rituximab		IgG	153	2.6	100.0	0.0		
			Band. 5	131	3.6	5.0	2.6	
			Band. 6	113	3.1	4.2	5.4	
Trastuzumab		IgG	149	3.4	100.0	0.0		
			Band. 7	135	3.0	4.0	9.7	
		Reducing	Intra gel (n=6)	Tocilizumab	Hc	53	0.5	-
Lc	25				0.6	-	-	
Bevacizumab	Hc			54	0.2	-	-	
	Lc			25	0.8	-	-	
Rituximab	Hc			53	0.6	-	-	
	Lc			25	1.3	-	-	
Trastuzumab	Hc		54	0.5	-	-		
	Lc		25	0.8	-	-		
Inter gel (n=3)	Tocilizumab		Hc	53	0.3	-	-	
			Lc	25	0.9	-	-	
	Bevacizumab		Hc	54	0.5	-	-	
			Lc	25	0.8	-	-	
	Rituximab	Hc	54	0.5	-	-		
		Lc	24	1.3	-	-		
Trastuzumab	Hc	54	0.7	-	-			
	Lc	25	0.9	-	-			

Mw: molecular weight, RSD: relative standard deviation

結果, NGHc のピークは約 6 分 (RSD : <1.6%) に観察された (Fig. 1-f)。また, NGHc のピーク面積の RSD 値は Tocilizumab, Bevacizumab, Rituximab, Trastuzumab それぞれで 4.0%, 4.1%, 11.6% 及び 6.5% であった。ま

た試料中の NGHc の糖鎖結合 Hc に対する存在比率を Table 5 のように算出したところ, 存在比率はそれぞれ 3.1%, 4.0%, 2.9%, 3.2% となり, RSD 値はそれぞれ 2.5%, 4.0%, 12.0% 及び 5.2% となった (Table 5)。

Table 5 Component Ratio of Non-glycosylated IgG and Non-glycosylated Heavy Chain

Testing methods	Conditions	Percentage of NGIgG/IgG or NGHc/Hc			
		Tocilizumab	Bevacizumab	Rituximab	Trastuzumab
CGE (n=3)	Non-reducing	2.2 (RSD: 8.2%)	3.3 (RSD: 2.0%)	2.5 (RSD: 6.7%)	3.1 (RSD: 1.6%)
	Reducing	0.6 (RSD: 38.8%)	3.1 (RSD: 13.6%)	0.87 (RSD: 4.1%)	1.0 (RSD: 11.7%)
CZE (n=6)	Non-reducing	-	-	-	-
	Reducing	3.1 (RSD: 2.5%)	4.0 (RSD: 4.0%)	2.9 (RSD: 12.0%)	3.2 (RSD: 5.2%)

CGE: capillary gel electrophoresis, CZE: capillary zone electrophoresis, Hc: heavy chain, NGIgG: non-glycosylated IgG, NGHc: non-glycosylated Hc

考 察

本研究で検討した日本薬局方参考情報に記載されている SDS-PAGE, キャピラリー電気泳動法 (CGE, CZE) について Table 6 に整理した。

精度については CZE が電気泳動時間及びピーク面積のどちらについても最良の結果を示し、再現性の高い分析法であることが示された。マイクロピペットを用いて試料を導入する SDS-PAGE や電氣的に試料を導入する CGE と異なり、CZE では加圧法により試料を導入できるため、特にピーク面積の再現性が優れている。また、SDS-PAGE においては、同一ゲル内に比べてゲル間バンド面積のバラツキが大きくなったが、これはゲルを手作業により作成して試験に用いていることが大きく影響を与えていると考えられることから、市販のゲルを使用することによりゲル間のバラツキを抑えることが期待される。

試料導入量と得られたレスポンスとの直線性については SDS-PAGE, CGE 及び CZE のいずれも高い相関係数 (>0.996) を与えた。このことから、今回設定した操作法により試験を実施すれば、0.03~0.50 mg/mL のたん白質濃度を求めることができる。しかし、電氣的導入法を用いる CGE では、高い電荷を帯びた分子がより多くキャピラリー内に導入されてしまう可能性が考えられるため、試料がもつ本来の存在比率を正確に反映できない恐れがある⁶⁾ ことから、定量的評価を行うためには注入法の影響や精度について更に詳細な検討が必要である。一方、SDS-PAGE については試料をゲルに導入する作業が手作業であることや、染色及び脱色時の気温の変化、選択する染色試薬の種類などによる誤差が大きくなる可能性が考えられる。したがって、これらの要因を排除できるような頑健性の高い試験法を構築する必要がある。

抗体医薬品由来の不純物分子の検出については、糖鎖を持たない NGIgG や NGHc, 抗体分子の断片化分子である 2H や 2H1L を検出できる CGE が最も有力であると考えられるが、現状では使用する泳動緩衝液が高粘性であるため電氣的な試料導入法を用いるを得ない。そのため前述したように不純物の定量的評価を CGE で実

施する際には注意する必要がある。この点については、存在量の少ない不純物だけでなく存在量の多い IgG であってもピーク面積のバラツキが最大で 18.5% と大きかったことから明らかである。これまでに、サブクラスの違う IgG を内部標準に用いることで、ピーク面積の再現性が改善されることが報告されている⁷⁾。この系では、得られた IgG_{2a} のピーク面積値を内部標準である IgG₁ のピーク面積値で補正することで、安息香酸を内部標準としたときに得られたピーク面積の再現性 (7.5~9.3%) を 1.5% 以下にまで改善することに成功しており、選択する内部標準が試験の性能に著しい影響を与えることが明らかにされている。CZE では還元条件でのみ糖鎖を持たない分子種の検出が可能であり、非還元条件では糖鎖を持たない分子を検出できなかった。これは使用したキャピラリーの電気浸透流が極めて大きいこと、また SDS-PAGE や CGE のような分子ふるい効果を分離原理に利用していないために十分な分離能が確保できていないことに起因すると考えられるが、今後、CZE が更に改良され、不純物ピークの分離検出が可能になれば非還元及び還元条件どちらにおいても有用な試験法となる可能性を有している。一方、SDS-PAGE は不純物分子をゲル上に検出できる利点を有しているが、ゲル間での誤差や試験者間での誤差が大きいと考えられる。これを解決するため、試料溶液を希釈した標準溶液を同一のゲル上で泳動して得られたバンド面積を比較するなどの工夫が必要となるが、やはり半定量的であり、限度試験などへの利用が望ましいと考えられる。

また、今回用いた 3 種類の試験法に共通する懸念事項もいくつか明らかとなった。まず、非還元条件では試料中に含まれるたん白質の分子量を正確に求められない点である。本研究でも、SDS-PAGE において IgG の分子量が実測値と理論値との間で最大 27 kDa もの誤差を示し、実測値が理論値に比べ大きくなる傾向が見られた。これは、非還元条件ではたん白質が高次構造を保ったままであり SDS によって完全に飽和されないため、SDS と一定の質量比 (1.4 g SDS/1 g たん白質⁸⁾) で結合しないことに起因している⁹⁾。つまり、試料とマーカーたん白質との間で SDS への結合親和性に差が生じ、これが非還元条件での分子量分析を困難にしている。もう一点

Table 6 Summary of SDS-PAGE, CGE and CZE

Conditions	Testing methods	Precision			Linearity				Characterization of testing methods			
		RSD (%) of band or peak area	RSD (%) of relative front or migration time	R (IgG)	Required analytical time	Stability of sample injection	Detection of NGIg/NGHc	Detection of fragment	Determination of Mw			
Non-reducing	SDS-PAGE	Intra gel (n=6) 1.9 - 4.2 mean; 3.2	0.4 - 1.5 mean; 0.8	-	300 min	unstable	×	○	○			
		Inter gel (n=3) 6.7 - 15.1 mean; 10.9	1.4 - 3.9 mean; 2.6	0.9992	300 min	unstable	×	○	○			
	CGE (n=3)	1.2 - 18.5 mean; 8.0	0.7 - 5.9 mean; 2.3	0.9997	60 min	unstable	○	○	×			
CZE (n=6)	2.2 - 2.7 mean; 2.5	0.5 - 1.1 mean; 0.8	0.9995	10 min	stable	×	×	×				
Reducing	SDS-PAGE	Intra gel (n=6) 1.4 - 7.0 mean; 3.7	0.3 - 0.8 mean; 0.5	-	300 min	unstable	×	×	○			
		Inter gel (n=3) 2.5 - 11.4 mean; 7.5	0.2 - 0.8 mean; 0.4	0.9966	300 min	unstable	×	×	○			
	CGE (n=3)	0.8 - 17.2 mean; 3.4	0.4 - 1.1 mean; 0.6	0.9990	60 min	unstable	○	○	×			
CZE (n=6)	0.7 - 3.1 mean; 2.0	0.4 - 1.7 mean; 0.8	0.9996	10 min	stable	○	×	×				

RSD: relative standard deviation, R: correlation coefficient, NGIg: non-glycosylated IgG, NGHc: non-glycosylated Hc, CGE: capillary gel electrophoresis, CZE: capillary zone electrophoresis

は、非還元条件の試料溶液を調製する際に、本来は試料中に含まれていない不純物が生成してしまう恐れがある点である。これまでに、IgG中のジスルフィド結合は、特に塩基性溶液中で開裂しランダムに他のチオール基と新たなジスルフィド結合を形成することが数多く報告されている⁹⁻¹²⁾。これを回避するために、試料溶液のpHを酸性側に保つこと¹³⁾、またヨードアセトアミドなどのアルキル化剤を添加してチオール基を保護すること¹⁴⁾などが提案されている。しかしながら、チオール基がジスルフィド結合を形成する反応の速度は、アルキル化反応よりも速く、高濃度のアルキル化剤を用いたとしても反応を完全に抑制することは困難である。したがって、本研究でSDS-PAGE、CGE、及びCZE用の試料調製時に断片化分子が生成している可能性が考えられ、本来の試料が持つ不純物と生成した不純物とを区別できていない。今後、試料を完全に変性し、かつ断片化分子の発生を最小限に抑えられる試料調製法の開発が必要である。

分析に要する時間の観点から見れば、今回検討した3種類の試験法のうち、CZEは10分以内で分析を終了することが可能である。一方、SDS-PAGEの場合は300分程度、そしてCGEでは60分程度が必要とされる。したがって、CZEが分析時間の観点から最も優れていることが示された。ただし、SDS-PAGEはゲル上に多検体を導入することができ、更にゲルを複数枚用いて同時に試験できる長所を有する。

このように各試験法がそれぞれ異なった特徴を有しており、現段階では、試験者がそれぞれの目的に沿った最適な試験法を選択することが必要である。また、現行の参考情報に記載されたSDS-PAGE及びキャピラリー電気泳動法の内容をそのまま一般試験法へ移行していく件や、SDS-PAGEに関して3薬局方国際調和版を日米欧各規制当局が受け入れるという件に関して支障となるような基本的な問題はないと考えられる。しかし、個々の試験の実施にあたってのそれぞれの特長や限界、技術的留意点などについては、「日本薬局方技術情報」などに詳しく記載する必要があることが明らかになった。

更に、正確かつ迅速な医薬品分析のためにも、今後、これらの3種類の試験法の長所を併せ持つ汎用性の高い分析条件の確立が求められる。

結 論

本研究では、4種類の市販抗体医薬品を材料としてSDS-PAGE及びCE分析を行い、それぞれの試験法の特

徴や操作における留意点を明らかにした。精度及び所要時間についてはCZEが最良の結果を与え、直線性に関しては3種類の試験法が良好な結果を与えた。CGEは不純物分析において第一選択となりうる有力な試験法であるが、試料導入量を管理できる分析系の構築が必要であることが明らかとなった。一方、非還元条件における試料調製及び分子量分析に関する留意点も明らかになった。非還元条件の試験では、試料調製に由来する不純物が生成しないこと、また、分子量分析に使用するマーカーが適切なものであることをあらかじめ検討しておく必要がある。今回の検討の結果、現行の参考情報に記載されたSDS-PAGE及びキャピラリー電気泳動法の内容をそのまま一般試験法へ移行していく件や、SDS-PAGEに関して3薬局方国際調和版を日米欧各規制当局が受け入れるという件に関して支障となるような基本的な問題はないと考えられた。その傍ら、各試験法が持つそれぞれの利点とともに、改良すべき点もいくつか明らかとなった。更に、試験実施にあたっての詳細な技術的留意点も明らかにした。これらの知見を踏まえ、バイオ医薬品のためのより汎用性の高い試験法を構築するために更なる検討を続けていく必要がある。

文 献

- 1) 伊藤勝彦：ファルマシア，45(7)，655-660 (2009)。
- 2) 山口照英，川崎ナナ：ファルマシア，45(7)，677-682(2009)。
- 3) 厚生労働省：第十五改正日本薬局方，参考情報，2006，1602-1617。
- 4) 厚生労働省：第十五改正日本薬局方，参考情報，2006，1583-1587。
- 5) Taga, A., Kita, S., Nishiura, K., Hayashi, T., Kinoshita, M., Sato, A., Suzuki, K., Kodama, S., Kakehi, K.: *J. Sep. Sci.*, **31**, 853-858 (2008)。
- 6) 本田 進，寺部 茂：キャピラリー電気泳動 基礎と実際，講談社，101-104 (1995)。
- 7) Lee, H. G., Chang, S., Fritsche, E.: *J. Chromatogr. A.*, **947**, 143-149 (2002)。
- 8) Reynolds, J.A., Tanford, C.: *J Biol. Chem.*, **245**, 5161-5165 (1970)。
- 9) Gray, W.: *Protein Sci.*, **2**, 1732-1748 (1993)。
- 10) Salas-Solano, O., Tomlinson, B., Du, S., Parker, M., Strahan, A., Ma, S.: *Anal. Chem.*, **78**, 6583-6594 (2006)。
- 11) Liu, H., Gaza-Bulsecu, G., Chumsae, C., Newby-Key, A.: *Biotechnol. Lett.*, **29**, 1611-1622 (2007)。
- 12) Hunt, G., Nashabeh, W.: *Anal. Chem.*, **71**, 2390-2397 (1999)。
- 13) Gilbert, H. F.: *Methods Enzymol.*, **251**, 8-28 (1995)。
- 14) Lundell, N., Schreitmuller, T.: *Anal. Biochem.*, **266**, 31-47 (1999)。

Time-Dependent Changes of Oxytocin Using $^1\text{H-NMR}$ Coupled with Multivariate Analysis: a New Approach for Quality Evaluation of Protein/Peptide Biologic Drugs

Akiko OHNO,^{*,a,b} Nana KAWASAKI,^a Kiyoshi FUKUHARA,^b Haruhiro OKUDA,^b and Teruhide YAMAGUCHI^a

^aDivision of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences; and ^bDivision of Organic Chemistry, National Institute of Health Sciences; Setagaya-ku, Tokyo 158–8501, Japan.

Received September 2, 2009; accepted September 29, 2009; published online October 5, 2009

A new method that combines $^1\text{H-NMR}$ and principal component analysis (PCA) was employed to obtain the quality evaluation of biopharmaceuticals, with regard to their quality, consistency, and differences in protein modification patterns. To assess the feasibility of the method, three $^1\text{H-NMR}$ spectra of oxytocin (OXT) were collected every 7 d (at Day 0, 7 and 14), and time-dependent changes in the spectra were found by PCA of the $^1\text{H-NMR}$ signals from 0.5–9.0 ppm, excluding the region around the water signal (4.6–5.0 ppm). Although the three OXT spectra seemed similar by simple visual inspection, time-dependent differences among the three spectra were clearly distinguished by a PCA scores plot. Peak changes indicating both OXT decomposition and the emergence of new OXT decomposition products within the timeframe of the experiment were also observed by a PCA loading plot. The results demonstrate that this method can evaluate the consistency of biopharmaceutical quality.

Key words quality evaluation; biologic drug; principal component analysis; $^1\text{H-NMR}$; oxytocin

The biotechnology industry has grown significantly in the past decade and continues to grow at a rapid rate. Biopharmaceuticals such as oxytocin (OXT), insulin, and somatropin are large, complex molecules that are receiving increased attention as therapeutics in humans, particularly since this class of molecules can potentially exert pharmacological effects that are unattainable by synthetic chemical products. However, while biologics show great potential value in medicine, many technical hurdles must be overcome before such treatments are made practical. In particular, since biologic drugs are typically derived from living sources such as microorganisms, plants, or human or animal cells, the production and use of such material introduces certain hazards that are not presented by small molecule drugs manufactured through chemical synthesis.¹⁾ In addition, to fully understand the mechanism of action of a protein/peptide drug, not only the primary amino acid sequence but also the folding, post-translational processing, and multimerization properties of the biologic within the cell must be considered. Moreover, different cell types or cell growth conditions may yield different protein modification patterns, as well as different impurities, into the desired product.^{2,3)} Therefore, all of these complications may potentially influence the intended pharmacological effect of biologic drugs. With respect to safety and efficacy concerns surrounding biologics, the consistency of biologics between production lots, including maintenance of tight quality control specifications, is an important consideration for manufacturing biologic drugs.

To date, many analysis methods, such as sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE),^{4,5)} capillary electrophoresis (CE),⁶⁾ mass spectrometry (MS), tandem MS (MS/MS),⁷⁾ liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), high-performance liquid chromatography (HPLC)⁸⁾ and nuclear magnetic resonance (NMR), are employed to evaluate physicochemical characteristics and purity, and thus determine the quality of biopharmaceuticals.^{2,3,9,10)} However, characterizing the full complexity of bi-

ologics by present examination methods is still currently difficult. Therefore, new analytical techniques that provide more detailed evaluation of biologic quality are necessary. Among the various analytical techniques, we focused on NMR profiling as the most suitable tool for rigorous quality evaluation because this approach can provide structural information on all compounds contained in product lots, and can distinguish structural differences. Principal component analysis (PCA) is often useful for profiling and classifying sample groups, and to characterize the most effective variables in separation compounds.^{11,12)} Therefore, small differences in product quality, e.g. a structural change or the appearance of a decomposition product, are thought to be appropriately evaluated by the combination of PCA using multivariate statistics and $^1\text{H-NMR}$.

Herein, we demonstrate that $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy coupled with PCA can provide a molecular fingerprint to precisely characterize a specific protein/peptide, using the determination of time-dependent changes of OXT as an example of this method. The results suggest that this new methodology can be useful for the quality evaluation of a manufactured protein/peptide biologic drug.

Experimental

Chemicals and Reagents All reagents used for $^1\text{H-NMR}$ experiments were purchased from Wako Chemicals, were of analytical grade (purity >99%), and were used without further purification. Deuterium oxide (D_2O , isotopic purity 99.9%) containing 0.75% 3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3- d_4 acid, sodium salt (TSP) was purchased from Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.). TSP was used as an internal standard at a chemical shift (δ) of 0.0 ppm for $^1\text{H-NMR}$ measurements.

Sample Preparation and $^1\text{H-NMR}$ Spectroscopic Analysis OXT (5 mg) was dissolved in 60 μl of D_2O containing 0.75% TSP, 30 μl of 0.2 M phosphate buffer (pH 6.2), and 510 μl of ultrapure water to produce a 600 μl solution for NMR measurements. The sample was introduced into an NMR test tube, and nuclear Overhauser effect spectroscopy ($^1\text{H-NOESY}$) spectra were recorded every 7 d at 25 $^\circ\text{C}$ using a Varian 600 MHz NMR spectrometer equipped with a coldprobe. Thirty-two free induction decays (FIDs) with 77 K data points per FID were collected using a spectral width of 9615.4 Hz, an acquisition time of 4.00 s, and a total pulse recycle delay of 2.02 s. The

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

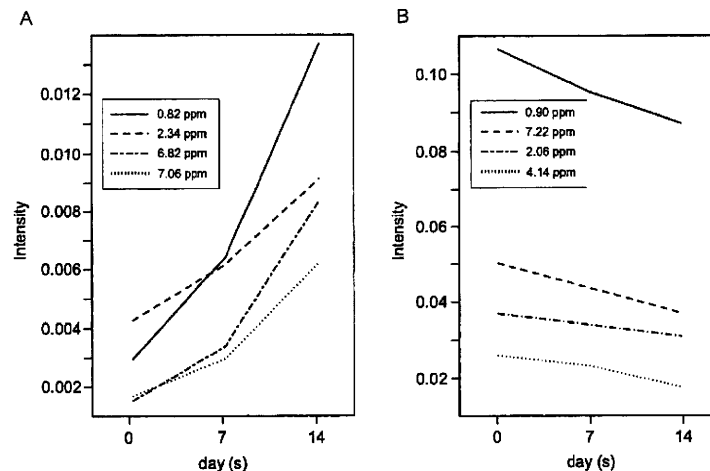


Fig. 4. Time-Dependent Changes in the OXT ^1H -NMR Spectrum Showing the Formation of New Decomposition Products (A) and the Decomposition of OXT (B)

and 4.14 ppm) is associated with larger decreases in integrated intensity over time (Fig. 4B). In addition, while the time-dependent increases in intensity for each variable in Fig. 4A are surmised to be due to new peaks from OXT decomposition products of OXT, identifying individual peaks in Fig. 1 associated with these decomposition products is difficult, as these peaks are minor signals. The peaks corresponding to these particular variables were too small to analyze further. On the other hand, peaks for each variable in Fig. 4B could be identified: the variable at 0.90 ppm was attributed to both the δH (δ 0.88) and $\gamma'\text{H}$ (δ 0.89) of Ile and to the $\delta'\text{H}$ (δ 0.90) of Leu; the variable at 7.22 ppm to the $2', 6'\text{H}$ (δ 7.22) of Tyr; the variable at 2.06 ppm to the γH (δ 2.05) of Pro and to the βH (δ 2.08) of Gln; and the variable at 4.14 ppm to the αH (δ 4.14) of Gln and to the αH (δ 4.16) of Ile. Therefore, some amino acids for each variable in Fig. 4B are inferred to be associated with OXT decomposition, although proposing a specific decomposition mechanism for OXT is difficult owing to the complexity of protein/peptide systems.

Recently biotechnology-derived drugs for medical treatment are increasingly receiving attention, but many problems associated with the quality, efficacy, and safety of biologics persist. Almost all biologics are designed to mimic human proteins to better predict pharmacological effects, and are thus produced from recombinant or non-recombinant cell-culture expression systems. Preserving the consistency of these complex products during the production is important, as well as reducing or eliminating molecular heterogeneity and higher-order structural aggregates. In addition, since raw materials derived from animals or humans may be used during production,¹⁾ consideration of possible viral contamination is also crucial. To date, the quality of manufactured biologics is evaluated by measuring biological activity of the biologics, rather than through analysis of physicochemical information. In fact, the product complexity and purity for quality control of biologics are quite difficult to evaluate by current physicochemical methodologies, such as SDS-PAGE, CE, MS, and HPLC.^{2–10)}

As a new approach for assessing the quality of biopharmaceuticals, we examined a method to distinguish time-depend-

ent changes of OXT ^1H -NMR spectra by introducing PCA of NMR signals. We initially found that simple visual inspection was insufficient to distinguish whether the three ^1H -NMR spectra of OXT, gathered every 7 d for 14 d, showed time-dependent changes. However, the PCA scores plot of these same spectra clearly revealed time-dependent changes. In addition, peak changes associated with both new decomposition products and the decomposition of OXT were also observed by the PCA loading plot. Therefore, a combination of ^1H -NMR and PCA techniques can provide a molecular fingerprint capable of precisely identifying a protein/peptide biologic, and can represent a powerful new approach for assessing the quality of protein/peptide biologic drugs. The study concerning the feasibility and the limitation of this method in terms of the molecular size is currently under way.

Acknowledgements We thank Mr. H. Watanabe and Mr. K. Kushida (Varian Technologies Japan Ltd.) for their technical assistances in measuring NMR spectra. This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (No. 20390038) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan.

References

- 1) Schiff L. J., *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, **41**, 65–70 (2005).
- 2) Murano G., *Dev. Biol. Stand.*, **91**, 3–13 (1997).
- 3) Kemsley J. N., "Chemical & Engineering News," Vol. 87, 2009, pp. 20–23.
- 4) Silva M. M., Lamarre B., Cerasoli E., Rakowska P., Hills A., Bailey M. J., Wheeler J. X., Burns C. J., Gaines-Das R. E., Jones C., Robinson C. J., *Biologicals*, **36**, 383–392 (2008).
- 5) Faber B. W., Remarque E. J., Kocken C. H., Cheront P., Cingolani D., Xhonneux F., Jurado M., Haumont M., Jepsen S., Leroy O., Thomas A. W., *Vaccine*, **26**, 6143–6150 (2008).
- 6) Bayol A., Bristow A., Charton E., Girard M., Jongen P., *Pharmeuropa Bio*, **2004**, 35–45 (2004).
- 7) Anumula K. R., *Anal. Biochem.*, **350**, 1–23 (2006).
- 8) Royle L., Campbell M. P., Radcliffe C. M., White D. M., Harvey D. J., Abrahams J. L., Kim Y. G., Henry G. W., Shadick N. A., Weinblatt M. E., Lee D. M., Rudd P. M., Dwek R. A., *Anal. Biochem.*, **376**, 1–12 (2008).
- 9) Domann P. J., Pardos-Pardos A. C., Fernandes D. L., Spencer D. I., Radcliffe C. M., Royle L., Dwek R. A., Rudd P. M., *Proteomics*, **7 Suppl 1**, 70–76 (2007).
- 10) Wada Y., Azadi P., Costello C. E., Dell A., Dwek R. A., Geyer H., Geyer R., Kakehi K., Karlsson N. G., Kato K., Kawasaki N., Khoo K. H., Kim S., Kondo A., Lattova E., Mechref Y., Miyoshi E., Nakamura

- K., Narimatsu H., Novotny M. V., Packer N. H., Perreault H., Peter-Katalinic J., Pohlentz G., Reinhold V. N., Rudd P. M., Suzuki A., Taniguchi N., *Glycobiology*, **17**, 411—422 (2007).
- 11) Plumb R. S., Jones M. D., Rainville P. D., Nicholson J. K., *J. Chromatogr. Sci.*, **46**, 193—198 (2008).
- 12) Barton R. H., Nicholson J. K., Elliott P., Holmes E., *Int. J. Epidemiol.*, **37 Suppl 1**, i31—i40 (2008).
- 13) Nicholson J. K., Foxall P. J., Spraul M., Farrant R. D., Lindon J. C., *Anal. Chem.*, **67**, 793—811 (1995).
- 14) Wold S., Albano C., Dunn W. J., Edlund U., Esbensen K., Geladi P., Hellburg S., Johansson E., Lindberg W., Sjoström M., "Chemometrics: Mathematics and Statistics in Chemistry," D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, 1984.
- 15) Eriksson L., Johansson E., Kettaneh-Wold N., Wold S., "Multi- and Megavariate Data Analysis," Umetrics Academy, Umeå, 2001.
- 16) Holmes E., Loo R. L., Stampler J., Bictash M., Yap I. K., Chan Q., Ebbels T., De Iorio M., Brown I. J., Veselkov K. A., Davignus M. L., Kesteloot H., Ueshima H., Zhao L., Nicholson J. K., Elliott P., *Nature (London)*, **453**, 396—400 (2008).

Effects of Solute Miscibility on the Micro- and Macroscopic Structural Integrity of Freeze-Dried Solids

K. IZUTSU,¹ K. FUJII,² C. KATORI,² C. YOMOTA,¹ T. KAWANISHI,¹ Y. YOSHIHASHI,² E. YONEMOCHI,² K. TERADA²

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

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

Received 15 September 2009; revised 8 February 2010; accepted 1 March 2010

Published online 10 May 2010 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/jps.22170

ABSTRACT: The purpose of this study was to elucidate the effect of solute miscibility in frozen solutions on their micro- and macroscopic structural integrity during freeze-drying. Thermal analysis of frozen solutions containing poly(vinylpyrrolidone) (PVP) and dextran showed single or multiple thermal transitions (T'_g : glass transition temperature of maximally freeze-concentrated solutes) depending on their composition, which indicated varied miscibility of the concentrated noncrystalline polymers. Freeze-drying of the miscible solute systems (e.g., PVP 10,000 and dextran 1060, single T'_g) induced physical collapse during primary drying above the transition temperatures ($>T'_g$). Phase-separating PVP 29,000 and dextran 35,000 mixtures (two T'_g s) maintained their cylindrical structure following freeze-drying below both of the T'_g s ($<-24^\circ\text{C}$). Primary drying of the dextran-rich systems at temperatures between the two T'_g s (-20 to -14°C) resulted in microscopically disordered "microcollapsed" cake-structure solids. Freeze-drying microscopy (FDM) analysis of the microcollapsing polymer system showed locally disordered solid region at temperatures between the collapse onset (T_{c1}) and severe structural change (T_{c2}). The rigid dextran-rich matrix phase should allow microscopic structural change of the higher fluidity PVP-rich phase without loss of the macroscopic cake structure at the temperature range. The results indicated the relevance of physical characterization and process control for appropriate freeze-drying of multicomponent formulations. © 2010 Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmacists Association *J Pharm Sci* 99:4710–4719, 2010

Keywords: freeze-drying/lyophilization; formulation; thermal analysis; calorimetry (DSC); amorphous; glass transition

INTRODUCTION

Increased clinical relevance of various parenteral biopharmaceuticals and drug delivery system formulations emphasize the advantage of freeze-drying for ensuring long-term stability due to reduced molecular mobility.^{1–4} The freeze-drying, however, exposes the compounds to freezing and dehydration stresses that often damage their higher order structure, which is essential for the biological activity and other pharmaceutical functions. Optimizing the excipient compositions (e.g., stabilizer, pH-adjusting salt, tonicity modifier) and process parameters for the particular active ingredients or delivery system are inevitable to achieve desirable formulation quality and an efficient drying cycle.^{5–7} Controlling the shelf temperature and chamber pressure during the

primary drying segment for ice sublimation is of particular importance because of its energy-intensive nature and the large effects on the physical (e.g., solid structure, residual water content, component crystallinity) and functional (e.g., protein activity, drug delivery) properties of the formulations.^{8–11}

The rationale for the freeze-drying process optimization has been established primarily for low-molecular-weight pharmaceutically active ingredients and mixtures of the APIs with excipients (e.g., antibiotics and tonicity modifier).^{8–10,12} Freezing of aqueous solutions concentrates solutes into the nonice-phase until high viscosity of the supercooled solution (70–80%, w/w) kinetically prevents further ice growth. Each solute has a different propensity to crystallize or remain amorphous in the freeze concentrate. A higher product temperature during the primary drying usually allows faster ice sublimation,¹² however, a significant increase in the mobility of hydrated molecules above certain highest allowable product temperatures often alters the structure of solute systems in the process (meltback

Correspondence to: K. Izutsu (Telephone: 81-33700-1141; Fax: 81-33707-6950; E-mail: izutsu@nihs.go.jp)

Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 99, 4710–4719 (2010)
© 2010 Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmacists Association

and collapse).^{5,12} Primary drying of the crystallizing (e.g., NaCl, mannitol, poly(ethylene glycol) (PEG)) and noncrystallizing (e.g., saccharides) single-solute frozen solutions is performed at product temperatures slightly lower than their eutectic crystal melting temperature (T_{eu}) and collapse temperature (T_c), respectively, to satisfy reasonable ice sublimation speed and to avoid pharmaceutically unacceptable changes (e.g., inelegant appearance, higher residual water, reduced dissolution rate). Recent improvements in freeze-drying microscopy (FDM) have enabled collapse temperature measurements to be carried out in a reasonable operation time.^{12–16} The glass transition temperature of maximally freeze-concentrated solutes (T'_g) obtained by thermal analysis is often used as a surrogate of the T_c . Various solute combinations (e.g., oligosaccharides) miscible in a freeze-concentrated nonice-phase show single T'_g , which is necessary for determining the primary drying temperatures.¹⁷

Setting appropriate freeze-drying process parameters for frozen solutions and/or suspensions containing heterogeneous freeze-concentrated phases is often more challenging because the varied physical properties (e.g., crystallinity, viscosity) of the individual phases have profound impacts on the occurrence of collapse phenomena. Some polymers (e.g., large poly(vinyl pyrrolidone) (PVP) and dextran) that are miscible in their lower concentration aqueous solutions separate into multiple freeze-concentrated phases predominant in one of the polymers, showing different transitions ($T'_{g,s}$) for the individual phases in the thermal analysis.^{18–22} Thermodynamically unfavorable interactions between the polymer molecules that cause aqueous two-layer formation in their higher concentration solutions, as well as the excess concentrations caused by ice growth, induce the multiple freeze-concentrated phases.^{19,23,24} The polymer miscibilities also depend on various factors including monomer structure, molecular size, concentration ratio, and cosolute compositions. A variety of polymer combinations, including some proteins and polysaccharides, are considered to be immiscible in their frozen solutions.^{25–27} Crystallization of some component solutes also induces the heterogeneous concentrated phases in a frozen solution.²⁸ Colyophilization of a crystallizing (e.g., glycine, mannitol) and a noncrystallizing (e.g., sucrose) solutes above T'_g of the amorphous phase results in microcollapsed cake-structure solids consisting of a crystalline matrix and a locally disordered amorphous phase that protects embedded proteins from dehydration stress.²⁸ Various suspension formulations containing particles and/or molecular assemblies (e.g., drug delivery system carrier, microorganisms) should form concentrated medium and particle phases surrounding ice crystals. Inclusion of some solutes into small ice

crystal also induces microscopic component and physical state heterogeneity in a frozen aqueous solution.²⁹

The purpose of this study was to elucidate the relationship between the miscibility of amorphous solutes in frozen solutions and their structural integrity during primary drying. The individual concentrated solute mixture and their unmixed phases in a frozen solution should possess different viscosities dependent on both composition and temperature. The effects of the varied physical properties on the micro- and macroscopic structural integrity during primary drying remain to be elucidated. Some observations regarding unusual collapse phenomena during lyophilization of microorganism suspensions indicate the requirement for a strategic approach in setting the process parameters based on the physical properties.³⁰ Varied molecular weights of PVP and dextran were used as model systems that show different miscibilities in frozen solutions. Methods for characterizing the multiphase frozen solutions and their application to formulation and process optimization are discussed herein.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Chemicals used in this study were purchased from Wako Pure Chemical Co. (NaSCN and dehydrated methanol, Osaka, Japan), Sigma–Aldrich Chemical Co. (PVP 29,000, PVP 10,000, dextran 35,000, average molecular weights, St. Louis, MO), and Serva Electrophoresis GmbH (dextran 1060, Heidelberg, Germany).

Thermal Analysis

Thermal analysis of frozen solutions was conducted using a differential scanning calorimeter (DSC Q-10, TA Instruments, New Castle, DE) with Universal Analysis 2000 software (TA Instruments). An aliquot (10 μ L) of aqueous solution in an aluminum cell was cooled to -70°C at $10^\circ\text{C}/\text{min}$ and then scanned at $5^\circ\text{C}/\text{min}$. The T'_g was determined from the maximum inflection point of the discontinuities in the heat flow curves.

Freeze-Drying Microscopy

We observed the behavior of frozen aqueous polymer solutions under vacuum using a freeze-drying microscope system (Lyostat 2, Biopharma Technology Ltd, Winchester, UK) with an optical microscope (Model BX51, Olympus Co., Tokyo, Japan). The sample temperature sensor was calibrated using the melting temperatures of ice, naphthalene crystal, and eutectic NaCl crystal as standards. Aqueous solutions (2 μ L) sandwiched between cover slips (70 μm apart) were

frozen at -30°C and then maintained at that temperature for 5 min. Each sample was heated under a vacuum (0.097 Torr) at $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to a temperature approximately 5°C below its T_g' , and then scanned at $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. The observation field was moved during the scan to follow the ice sublimation front. Collapse onset temperature (T_c , T_{c1}) of the frozen solution was determined from the appearance of translucent dots behind the ice sublimation interface ($n = 3$). The initial temperature of severe collapse growth observed in some phase-separating polymer systems was temporarily termed the second collapse temperature (T_{c2}).

Freeze-Drying

A freeze-drier (Freezone-6, Labconco, Kansas City, MO) equipped with temperature-controlling trays was used for lyophilization. Aqueous solutions (800 μL) containing the solutes in flat-bottomed borosilicate glass vials (13-mm diameter, SVF-3, Nichiden-rika Glass Co., Kobe, Japan) were placed on the freeze-drier shelves at room temperature. The shelves were cooled to -32°C at $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and then maintained at that temperature for 2 h to freeze the aqueous solutions. The shelves were maintained at -32°C for an additional 2 h or heated to different temperatures (-28 , -24 , -20 , -16 , or -12°C) at $0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and then maintained at the temperatures for 2 h before the vacuum drying. Primary drying of the frozen solutions was performed at varied shelf temperatures by maintaining the chamber pressures slightly (0.1–0.2 Torr) lower than the vapor pressures of ice at the designated shelf temperatures to avoid large temperature drop by rapid ice sublimation. After the primary drying at -32°C (0.120 Torr), -28°C (0.231 Torr), -26°C (0.315 Torr), -24°C (0.390 Torr), -22°C (0.471 Torr), -20°C (0.636 Torr), -18°C (0.771 Torr), -16°C (0.936 Torr), -14°C (1.236 Torr), and -12°C (1.236 Torr) for 20 h, the samples were further dried at these temperatures for an additional 4 h under reduced pressure (0.03 Torr). The shelves were heated to 35°C at $0.2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and then dried at that temperature for 4 h (0.03 Torr) for the secondary drying. The vials were closed with rubber stoppers under vacuum. Thermocouples were immersed in three polymer solutions to record the product temperature profiles during the drying process. The structural integrity of the freeze-dried solids was judged from their volume and surface texture (e.g., roughness, bubbles).

Scanning Electron Microscopy Measurements

Morphological study of a roughly crushed freeze-dried solid surface was performed using scanning electron microscopy (SEM) (VE-7800, Keyence Co., Osaka, Japan). Prior to imaging, mounted samples were

sputter-coated with gold. The samples were exposed to a 20-kV acceleration voltage at 10 Pa.

Measurement of Residual Water Content

An AQV-7 volumetric titrator (Hiranuma Sangyo, Ibaraki, Japan) was used to determine the amount of water in the freeze-dried solids suspended in dehydrated methanol. The amount of residual water obtained in three experiments (Karl-Fischer method) was shown as the ratio (% w/w) to the solid content.

RESULTS

Thermal Analysis of Frozen Solutions

Figure 1 shows the T_g' s of frozen solutions containing various molecular weights of PVP and dextran at different concentration ratios (total 100 mg/mL). The transitions of single-solute frozen solutions were observed at -26.8°C (PVP 10,000), -23.3°C (PVP 29,000), -23.3°C (dextran 1060), and -12.1°C (dextran 35,000). The frozen polymer mixture solutions showed single or double T_g' transitions that indicated

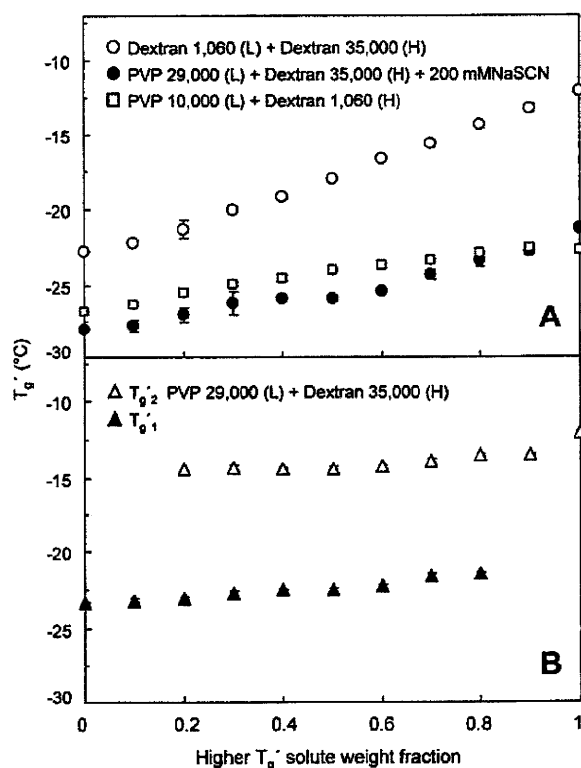


Figure 1. T_g' values of frozen solutions containing PVP and dextran at various concentration ratios (total: 100 mg/mL). The transition temperatures are plotted against the weight concentration ratio of the higher T_g' solute (H) in each combination (average $T_g' \pm \text{SD}$, $n = 3$). The two transitions in a thermal scan are shown as lower (T_{g1}') and higher (T_{g2}') temperature transitions.