

- Rejman, J., Bragonzi, A., Conese, M., 2005. Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. *Mol. Ther.* 12, 468–474.
- Richardson, S.C., Wallom, K.L., Ferguson, E.L., Deacon, S.P., Davies, M.W., Powell, A.J., Piper, R.C., Duncan, R., 2008. The use of fluorescence microscopy to define polymer localisation to the late endocytic compartments in cells that are targets for drug delivery. *J. Control. Rel.* 127, 1–11.
- Sahay, G., Batrakova, E.V., Kabanov, A.V., 2008. Different internalization pathways of polymeric micelles and unimers and their effects on vesicular transport. *Bioconjug. Chem.* 19, 2023–2029.
- Sahay, G., Alakhova, D.Y., Kabanov, A.V., 2010a. Endocytosis of nanomedicines. *J. Control. Rel.* 145, 182–195.
- Sahay, G., Gautam, V., Luxenhofer, R., Kabanov, A.V., 2010b. The utilization of pathogen-like cellular trafficking by single chain block copolymer. *Biomaterials* 31, 1757–1764.
- Sakai-Kato, K., Saito, E., Ishikura, K., Kawanishi, T., 2010. Analysis of intracellular doxorubicin and its metabolites by ultra-high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 878, 1466–1470.
- Savič, R., Luo, L., Eisenberg, A., Maysinger, D., 2003. Micellar nanocontainers distribute to defined cytoplasmic organelles. *Science* 300, 615–618.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I., Willingham, M.C., 1987. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 7735–7738.
- Torchilin, V.P., 2002. PEG-based micelles as carriers of contrast agents for different imaging modalities. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 235–252.
- Torchilin, V.P., Lukyanov, A.N., Gao, Z., Papahadjopoulos-Sternberg, B., 2003. Immunomicelles: targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 6039–6044.
- Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., Fukushima, S., Okamoto, K., Kataoka, K., 1999. Selective delivery of adriamycin to a solid tumor using a polymeric micelle carrier system. *J. Drug Target.* 7, 171–186.

A New Approach to Characterization of Insulin Derived from Different Species Using $^1\text{H-NMR}$ Coupled with Multivariate Analysis

Akiko Ohno,*^a Toru Kawanishi,^b Haruhiro Okuda,^a and Kiyoshi Fukuhara^a

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

Received October 7, 2011; accepted December 8, 2011; published online December 27, 2011

Most of the active components of polypeptides have a complex molecular structure, large molecular size. Such components may also be structurally heterogeneous. Therefore, development of a method that can confirm the consistency of polypeptides amino-acid sequences for product characterization is desirable. In general, it is extremely difficult to distinguish differences of a few amino acid residues in the $^1\text{H-NMR}$ spectrum of polypeptides with molecular weights greater than several thousand. However, we have been able to distinguish between three insulin species differing in one to three amino acid residues using a combination of multivariate statistics and $^1\text{H-NMR}$ spectra. These results demonstrate that this methodology could be useful for characterization of polypeptides.

Key words insulin; polypeptide; characterization; principal component analysis; $^1\text{H-NMR}$

Nuclear magnetic resonance (NMR), which is frequently used for structure identification of unknown chemical substances in the fields of organic and natural products chemistry, is the only technique that can provide structural information on all of the components of a chemical substances. Although NMR techniques uniquely provide spectral information on primary and higher-order structure of large polymeric compounds such as polypeptides, such spectra are generally difficult to analyze in detail because of their complexity. NMR measurement has usually been applied to the structural analysis of single chemical substances, and to date, been not suitable for analyzing samples that contain multiple compounds because of the problem of overlapping peaks in the $^1\text{H-NMR}$ spectrum. However, NMR techniques have come to be used recently to analyze biogenic substances, which have made it possible to discriminate between small spectral differences by performing statistical analysis of the $^1\text{H-NMR}$ spectral data. Multivariate statistical methods, such as principal component analysis (PCA) and partial least-squares discriminate analysis (PLS-DA), are often useful for profiling and classifying sample groups and for characterizing the most effective variables of separated compounds.^{1,2} Currently, multivariate statistical methods, which combine various analytical methods, have been widely used to evaluate the quality of drugs and foods, quantitatively or qualitatively, in addition to enabling predictions of drug metabolism, and toxicity.^{3–10}

Compared with small-molecule drugs, polypeptides are heterogeneous and are more complex in their makeup for a number of possible reasons including mutations in the amino acid sequence of the protein, different posttranslational modifications, or by being a mixture of molecules with different terminal structures due to degradation by contaminating proteases.¹¹ The structural heterogeneity caused by these factors may affect the physiological activity and pharmacokinetics of polypeptides, resulting in changes in drug efficacy and safety.¹¹ Therefore, the development of analytical procedures that can confirm the constancy of multiple amino-acid sequences of a polypeptide for product characterization is desirable. However, characterizing the full complexity of polypeptides by presently available analytical methods is still difficult. Therefore, it is necessary to provide a more detailed evalua-

tion of special characteristics of polypeptides by a new physicochemical index or new analytical techniques. In our recent study, it was reported that peak changes in the determination of characteristic spectral changes associated with time-dependent alterations of oxytocin (OXT) were also observed in the PCA loading plot.^{8,12} Thus, the possibility of evaluating slight differences in the quality of a polypeptide was demonstrated.

In this study, we examined multivariate statistics coupled with $^1\text{H-NMR}$ to analyze the difference of amino acid sequences in three species of insulin and to show this method to be effective for the characterization of the polypeptides. As a result, we have succeeded in precisely characterizing human, bovine, and porcine insulins with sequence differences of one or three amino acids, by performing $^1\text{H-NMR}$ measurements of the individual insulins and their mixtures followed by PCA of the spectra. The results suggest that this methodology could be useful for the characterization of species-related sequence differences in polypeptides.

Experimental

Chemicals and Reagents All reagents used for $^1\text{H-NMR}$ experiments were of analytical grade (purity >99%) from Wako Chemicals and were used without further purification. Human recombinant insulin expressed in yeast (CAS# 11061-68-0) and insulin from bovine pancreas (CAS# 11070-73-8) were purchased from Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.); porcine insulin (CAS# 12584-58-6) was purchased from MP Biomedicals. Acetonitrile- d_3 for NMR was purchased from Acros Organics (CN). Deuterium oxide (D_2O , isotopic purity 99.9%) and 3-(trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3- d_4 acid, sodium salt (TSP) were purchased from Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.). TSP was used as an internal standard with a chemical shift (δ) of 0.0 ppm in $^1\text{H-NMR}$ measurements.

Sample Preparation and $^1\text{H-NMR}$ Spectroscopic Analysis Each insulin (14.7 mg) was dissolved in 140 μL of 0.1 N HCl, 70 μL of 0.1 N NaOH, 200 μL of Milli-Q water, 70 μL of 5 mM TSP/ D_2O , and the pH was adjusted to 3.6 by adding aliquots of 0.1 N NaOH or HCl. Milli-Q water was added to give a total volume of 910 μL , and this mixture solution was diluted with 490 μL of CD_3CN . The solvent used in the present work was $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O} : \text{CD}_3\text{CN}$ (65/35 vol%). For $^1\text{H-NMR}$

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

Table 1. Each Insulin Mixture of the Sample Used in This Experiment: Human Insulin (A), Bovine Insulin (B), and Porcine Insulin (C)

Sample	A	:	B	:	C
A1	1		—		—
A4B1	4		1		—
A1B1	1		1		—
A1B4	1		4		—
B1	—		1		—
B4C1	—		4		1
B1C1	—		1		1
B1C4	—		1		4
C1	—		—		1
A1C4	1		—		4
A1C1	1		—		1
A4C1	4		—		1
A1B1C1	1		1		1
A2B1C1	2		1		1
A1B2C1	1		2		1
A1B1C2	1		1		2

measurements, a total sample volume of 700 μ L with at least a 1.7 mM concentration (pH 3.6) was used.¹³ Samples of each insulin mixture ratio are shown in Table 1.

The sample was introduced into an NMR test tube, and nuclear Overhauser effect spectroscopy (¹H-NOESY) spectra were recorded at 25°C using a Varian 600 MHz NMR spectrometer equipped with a cold probe. Thirty-two free induction decays (FIDs) with 75 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 water resonance was suppressed using presaturation during the first increment of the NOESY pulse sequence, with irradiation occurring during the 2.0 s relaxation delay and also during the 200 ms mixing time. Prior to Fourier transformation, the FIDs were zero-filled to 128 K and an exponential line broadening factor of 0.5 Hz was applied.^{9,14} Spectral ¹H-NMR assignments were achieved according to the literature values of chemical shifts in various media.¹³

NMR Data Reduction and Preprocessing All ¹H-NMR spectra were phased and baseline corrected by Chenomx NMR Suite 6.0 software, professional edition (Chenomx Inc., Canada). ¹H-NMR spectra were subdivided into regions having an equal bin size of 0.04 ppm over a chemical shift range of 0.04–10.0 ppm (excluding the region around the water signal; 4.2–4.6 ppm), and the regions within each bin were integrated. The integrated intensities were then normalized to the total spectral area, and the data were converted from the Chenomx software format into Microsoft Excel format (*.xlt). The resulting data sets were then imported into SIMCA-P version 12.0 (Umetrics AB, Umeå, Sweden) for multivariate statistical analysis.

Multivariate Data Analysis PCA was performed to examine the intrinsic variation in the data sets. The quality of the models was described by the R^2x and Q^2 parameters, which indicate the proportion of variance in the data explained by the models and the goodness of fit. R^2x represents the goodness of fit of the PCA model, and Q^2 expresses the predictability of the PCA model. The quality of the PCA models was described by the total variance of principal component 1 (PC1) and principal component 2 (PC2) at a confidence level

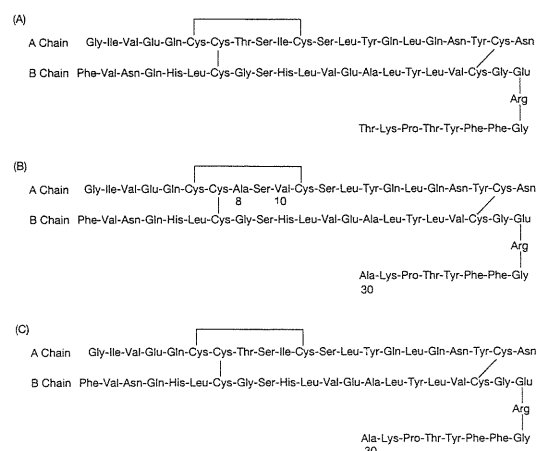


Fig. 1. Amino Acid Sequences of Human Insulin (A), Bovine Insulin (B), and Porcine Insulin (C)

of 95%.

Results

The amino-acid sequences of human, bovine, and porcine insulins are shown in Fig. 1. Bovine insulin differs from human insulin at the following positions: alanine (Ala) for threonine (Thr) at position A8 (8th position on the A Chain), valine (Val) for isoleucine (Ile) at A10, and Ala for Thr at the carboxyl terminus of the B-chain. Porcine insulin differs from human insulin with an Ala substituted for Thr at the carboxyl terminus of the B-chain. ¹H-NMR spectra of the three types of insulin are shown in Fig. 2. While a simple visual inspection suggests that the three spectra might be indistinguishable, actual spectral differences may be detected if changes can be represented as points in a multidimensional space and examined using PCA. PCA of each insulin spectrum was performed, and distinct differences among the ¹H-NMR spectra at each sample mixture ratio were readily detected by the scores of both PC1 and PC2, which could be clearly depicted as points on the lines of the triangular phase diagram as shown in Fig. 3. In the PC1-PC2 plane, all samples were displayed in a triangular phase diagram bearing the three types of single composition insulin at each vertex. The cumulative contribution rate by PCA of the first two principal components, PC1 and PC2, was 63.8 and 83.3%, respectively. Thus, a spectrum change was characterized by PC1 and PC2 with species-related differences of insulin at a high contribution ratio. This result suggests a large contribution of human and bovine insulin to PC1, indicating that the positive direction from the center of the PC1 coordinate on the horizontal axis corresponded to bovine insulin and the negative direction corresponded to human insulin. Meanwhile, a high contribution to PC2 indicated that the positive direction from the center of the PC2 coordinate on the vertical axis corresponded to porcine insulin and the negative direction corresponded to human and bovine insulin. In addition, the mixed sample of all three types of insulin in a 1:1:1 ratio is in the center of the triangular phase diagram, and samples of each insulin mixture ratio radiate from the center toward each vertex.

The loading plot of all the evaluated ¹H-NMR signals is shown in Fig. 4. Each variable represents a peak at a particular chemical shift in the ¹H-NMR spectra shown in Fig.

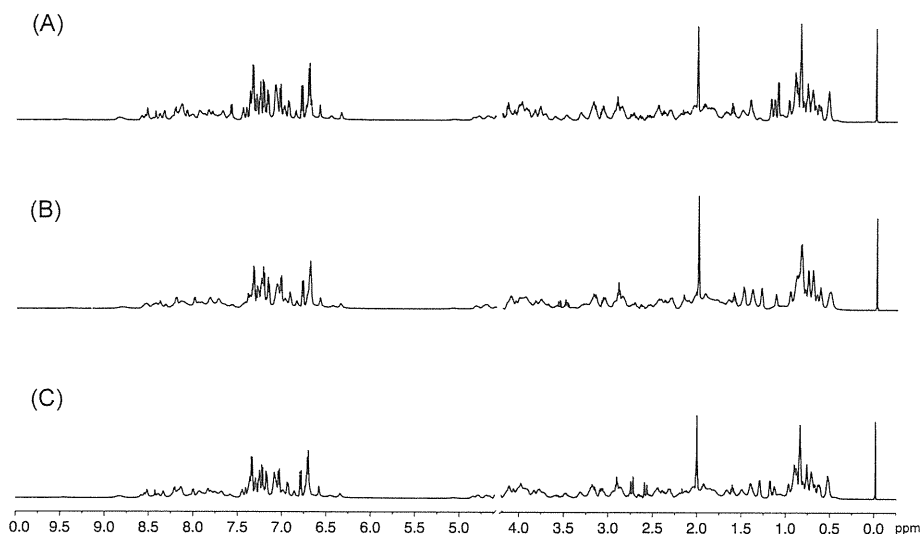


Fig. 2. $^1\text{H-NMR}$ Spectra of Human Insulin (A), Bovine Insulin (B), and Porcine Insulin (C)

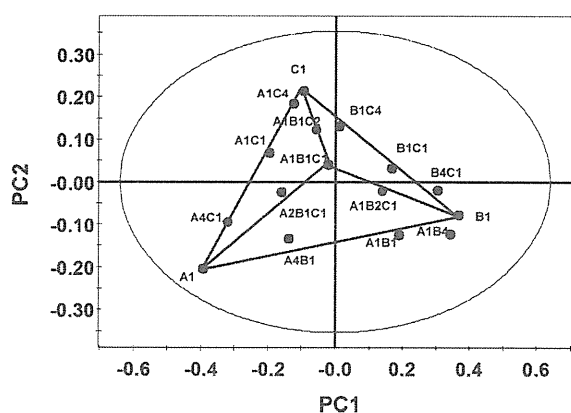


Fig. 3. PCA Scores Plot (PC1/2) Derived from the $^1\text{H-NMR}$ Spectral Data for Each Mixed Insulin Ratio

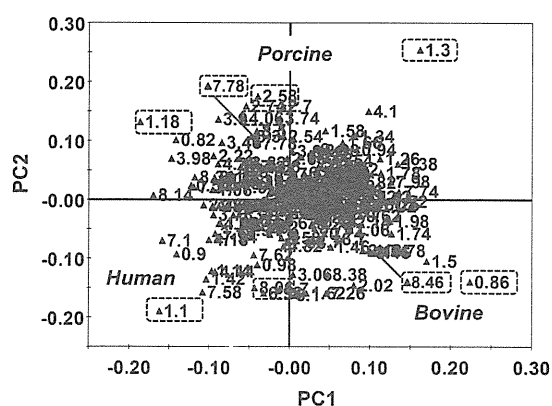


Fig. 4. The PCA Loading Plot (PC1/2) Derived from the $^1\text{H-NMR}$ Spectral Data for Each Mixed Insulin Ratio

1. This loading plot reveals the contributions of particular variables towards either an increase or decrease in the integrated intensities of the $^1\text{H-NMR}$ spectra. Six variables showing typical fluctuations of the different insulin species were identified (Fig. 4), and the integrated intensities of these variables corresponding to the insulin ratios are shown in Fig. 5. The tendency of the intensity of each of these variables to either increase or decrease is evident in the differences of the mixed insulin ratios and suggests specificity of the variables for the different insulin species. The corresponding characteristic variables of human, bovine, and porcine insulin were δ 1.1, 0.86 and 4.06 ppm, respectively. In addition, a common characteristic variable of bovine and porcine insulin occurred at δ 1.3 ppm and that of human and porcine insulin occurred at δ 1.18 ppm. The typical chemical shifts responsible for these variables were shown in Fig. 6. Therefore, these variables were indicative of the species specificity of insulin since the insulin species characterized by each variable tended to have a high intensity either for a single insulin species or for a species making up a high proportion of the mixture as shown in Fig. 5. Next, we examined whether the larger variables characterizing each species were derived from the type of amino acid residue by analysis of the loading and trend plots.

First, determination of the variables contributing signifi-

cantly to the variation of the PC1 coordinate axis for the human and bovine insulin groups was performed by analysis of the amino acid residue peaks corresponding to these particular variables. Peaks for each variable could be identified: the variable at 1.1 ppm was attributed to both the γH of Ile at A10 and to the γH of Thr at B30; the variable of the amide group region at 8.06 ppm was attributed to the NH of Thr at A8 of the characteristic amino-acid sequences of human insulin. On the other hand, the variable at 0.86 ppm was attributed to the γH of Val at A10; and the variable at 1.5 ppm was attributed to the βH of Ala at A8 and/or B30; the variable of the amide group region at 8.46 ppm was attributed to the NH of Val at A10 of the characteristic amino-acid sequences of bovine insulin.

Next, determination of the variables contributing significantly to the variation of the PC2 coordinate axis for the two groups, porcine, and both human and bovine was performed by the analysis of the amino acid residue peaks corresponding to these particular variables. Peaks for each variable could be identified: the variable at 4.06 ppm was attributed to the αH of Ala at B30; the variable of the amide group region at 7.78 ppm was attributed to the NH of Ala at B30 of the characteristic amino-acid sequences of porcine insulin. Therefore, identified amino acids for each characteristic variable were by inference associated with the primary structure of the three types of

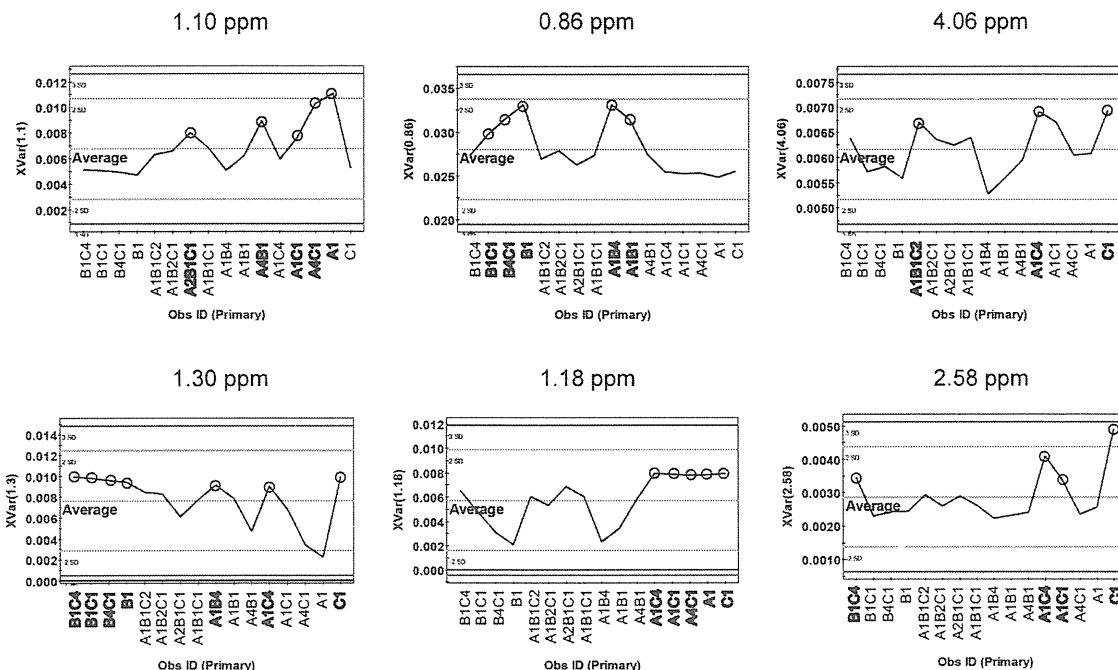


Fig. 5. The PCA Trend Plot: Integrated Intensities of Six Variables Showing Typical Fluctuations of Human Insulin, Bovine Insulin, and Porcine Insulin on the Loading Plot

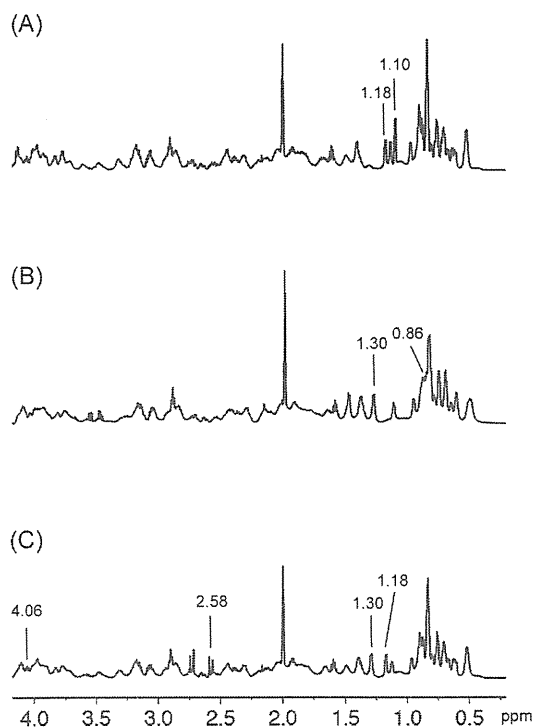


Fig. 6. The Typical Chemical Shifts for the Different Insulin Species on the PCA Loading Plot: Human (A), Bovine (B), and Porcine (C)

insulin, as shown in Fig. 4.

Discussion

The three insulin species used in this study each consist of 51 amino acid residues; bovine insulin has three different positions and porcine insulin has one different position from human insulin. In general, it is extremely difficult to distinguish differences of one to three amino acid residues in the ¹H-NMR spectrum of polypeptides of approximately MW

6000. However, we succeeded in distinguishing between the insulin species using a combination of multivariate statistics and ¹H-NMR spectra. PCA of the insulin spectrum for each mixture ratio was performed, and variables due to several different amino acid residues were detected from both the scores of PC1 and PC2, clearly depicting three separate groups, as shown in Figs. 3 and 4. In addition, from the scores plot, the components of the single insulin species and of mixtures consisting of two-three species were statistically distributed in the triangular phase diagram according to differences in the species composition ratio (Fig. 3, Table 1). This result shows that it is possible to analyze the composition of a mixture of species with a small number of amino acid sequence differences by taking advantage of the scores plot.

We also examined by PCA the partial aliphatic and amide regions of each insulin spectrum (data not shown). The determination of the variables contributing significantly to the variation of the PC1 coordinate axis for the human and bovine insulin groups and to the variation of the PC2 coordinate axis for the two groups, porcine, and both human and bovine insulin groups of the loading plots was performed by analysis of the amino acid residue peaks corresponding to these particular variables. Differences of the characteristic amino acid residues for each insulin species as well as the results from analyzing entire spectra were reflected in the scores plot. It is noteworthy that a similar tendency from analysis of the complete spectral region was observed with the scores plot of the amide region. These results suggest that it may be possible to distinguish slight sequence differences of polypeptides by PCA analysis of the amide region of the NMR spectrum.

On the other hand, the biological effect of polypeptides is also influenced by differences in their higher-order structure. It is difficult to evaluate differences in the higher-order structure of polypeptides by conventional analytical methods. In this PCA analysis study, it was found that the first and second principal components accounted for a majority of the vari-

ability differences of the primary insulin species structures. Interestingly, there were some variables that were not derived from the differences of amino acids among the three insulin types. Through a comparison of the NOESY spectra of the insulin species, it was proposed that these variables were associated with differences in the higher-order structures (data not shown). Therefore, the NMR technique coupled with PCA might also be useful as a tool for analyzing the higher-order structure, which is associated with the quality of a polypeptide, because in addition to primary structure information of the amino acid residues, the ^1H -NMR spectrum also contains information related to the three-dimensional structure of a molecule that is dependent on the solution conformation.

In conclusion, we have succeeded in precisely characterizing samples of human, bovine, and porcine insulin, molecules that differ in amino acid sequence from one to three amino acid residues, by ^1H -NMR spectroscopy coupled with PCA. Currently, assessment of the differences of higher-order structure using PCA analysis of NOESY spectral data are underway.

Acknowledgements We thank Dr. J. Kurita and Mr. K. Kushida (Agilent Technologies Japan Ltd.) for their technical assistance in measuring the NMR spectra. This work was supported by a Health Labour Sciences Research Grant from the Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan and by a 'Grant-in-Aid for Young Scientists (B)' (No. 22790126) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) of Japan.

References

- 1) Eriksson L., Johansson E., Kettaneh-Wold N., Wold S., "Multi- and Megavariate Data Analysis," Umetrics Academy, Umeå, 2001.
- 2) Wold S., Albano C., Dunn W. J., Edlund U., Esbensen K., Geladi P., Hellburg S., Johansson E., Lindberg W., Sjöström M., "Chemometrics: Mathematics and Statistics in Chemistry," D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, 1984.
- 3) Clayton T. A., Baker D., Lindon J. C., Everett J. R., Nicholson J. K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 14728—14733 (2009).
- 4) Clayton T. A., Lindon J. C., Cloarec O., Antti H., Charuel C., Hanton G., Provost J. P., Le Net J. L., Baker D., Walley R. J., Everett J. R., Nicholson J. K., *Nature (London)*, **440**, 1073—1077 (2006).
- 5) Coen M., Holmes E., Lindon J. C., Nicholson J. K., *Chem. Res. Toxicol.*, **21**, 9—27 (2008).
- 6) Crockford D. J., Holmes E., Lindon J. C., Plumb R. S., Zirah S., Bruce S. J., Rainville P., Stumpf C. L., Nicholson J. K., *Anal. Chem.*, **78**, 363—371 (2006).
- 7) Fukuhara K., Ohno A., Ando Y., Yamoto T., Okuda H., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **26**, 399—406 (2011).
- 8) Ohno A., Kawasaki N., Fukuhara K., Okuda H., Yamaguchi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 1396—1399 (2009).
- 9) Ohno A., Oka K., Sakuma C., Okuda H., Fukuhara K., *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 5181—5187 (2011).
- 10) Pongsuwan W., Bamba T., Yonetani T., Kobayashi A., Fukusaki E., *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 744—750 (2008).
- 11) Uchiyama M., Toyoshima S., Ono S., Uyama Y., "Iyakuhin Hyouka Gaisetu," Tokyo Kagaku Doujin, Tokyo, 2009.
- 12) Ohno A., Kawasaki N., Fukuhara K., Okuda H., Yamaguchi T., *Magn. Reson. Chem.*, **48**, 168—172 (2010).
- 13) Bocian W., Sitkowski J., Bednarek E., Tarnowska A., Kawecki R., Kozerski L., *J. Biomol. NMR*, **40**, 55—64 (2008).
- 14) Nicholson J. K., Foxall P. J., Spraul M., Farrant R. D., Lindon J. C., *Anal. Chem.*, **67**, 793—811 (1995).

PATによる医薬品品質管理の課題と展望

Perspective on PAT in Pharmaceutical Quality Control

国立医薬品食品衛生研究所 薬品部

小出達夫, 香取典子, 檜山行雄, 奥田晴宏

TATSUO KOIDE, NORIKO KATORI, YUKIO HIYAMA, HARUHIRO OKUDA

Division of Drugs, National Institute of Health Sciences

はじめに

PAT (Process Analytical Technology) は、「最終製品の品質保証を目標として原材料や中間製品／中間体の重要な品質や性能特性及び工程を適時に(すなわち製造中に)計測することによって、製造の設計、解析、管理を行うシステム」(ICH Q8 (R2) ガイドラインより)である。PATは2002年のFDAの「Pharmaceutical Current Good Manufacturing Practices (cGMPs) for the 21st Century: A Risk-Based Approach」に取り上げられたころから、日本でも注目されるようになった。現在ではQbD (Quality by Design) アプローチを行うための重要なツールの1つとして製剤開発、製造工程管理に活用されるようになったが、これまでに実際にPATを医薬品品質管理に採り入れていく過程においてさまざまな問題点が浮かび上がってきた。そこで本稿ではPATによる医薬品品質管理における課題および展望について記述する。

1. 医薬品品質保証の パラダイムシフトとPATの必要性

医薬品の品質保証は、遠い昔は出荷時の品質試験のみによるものであった。そのため製品の品質のばらつきが大きい場合には数少ないサンプル数、例えばN=3の品質試験では不良品が試験をすり抜け出荷されてしまう確率が非常に高くなってしまったため、品質保証のレベルが非常に低いと言わざるを得なかった。1970年代からは徐々にGMPやバリデーションの考え方が医薬品製造管

理に導入され、製造工程を管理することにより品質のばらつきが抑えられることとなり、出荷試験のみの場合と比べて品質保証のレベルは向上していくこととなった。そして21世紀に入ると、製剤開発にQbDアプローチを採用することで製剤設計の段階でばらつきの少ない一定の品質を持つ製品を作ることができるよう設計することがICH Q8ガイドライン等において推奨されたため、今後、品質保証のレベルがさらに向上していくと考えられる。実際に最近では多くの企業が品質保証の向上を目指して製剤開発にQbDアプローチを採り入れるようになってきている。

このようにこれからの医薬品の品質保証は、品質試験、製造管理、そして製剤設計の3つの要素から構成されるようになると考えられ、そのため製剤開発におけるQbDアプローチの必要性およびその関連する研究はますます重要度が高まると考えられる。QbDはQ8ガイドラインにおいて「事前の目標設定に始まり、製品及び工程の理解並びに工程管理に重点をおいた、立証された科学及び品質リスクマネジメントに基づく体系的な開発手法」と定義されており、このような体系的な開発をするためには効率的なプロセス理解および工程管理が行えるPATのような技術が必要となる。さらにはPATにより工程内で品質管理が可能になれば最終の品質試験は不要になるのでは、という考えからRTRT (Real Time Release Testing: リアルタイムリリース試験) という新たな品質管理の手法が出てきたことなど、医薬品の品質管理手法は大きな変革期を迎えており、現在、PATの重要性が非常に高まっている。

2. PATの医薬品品質管理への 応用と問題点

PATの医薬品品質管理への応用としては、PATを単なる工程のモニタリングや工程内試験のみに用いる場合（最終の品質試験を出荷試験とする）と、PATを出荷試験のデータとして用いるRTRTに用いる場合の2通りに分けられ、それぞれ品質管理における現状が異なっている。RTRTはICH Q8 (R2) において「工程内データに基づいて、工程内製品及び／又は最終試験の品質を評価し、その品質が許容されることを保証できること。通常、あらかじめ評価されている物質（中間製品）特性と工程管理との適切な組み合わせが含まれる」と定義されており、最終の品質試験を行わないのはスキップテストと同じであるが、スキップテストのようにまったく試験を行わずに出荷するのではなく、工程内でCQA (Critical Quality Attribute: 重要品質特性) 等を測定、評価した結果をもって出荷試験としている。そのためPATを用いたRTRTを行う場合は、PATを単なる工程内試験のみに用いる場合とは異なり、工程内試験法およびその管理値を最終品質試験方法およびその規格値と同等に取り扱う必要性が生じた。また、RTRTを採用しても安定性試験や代替試験法として最終品質試験を設定しておく必要があると考えられるので、最終品質試験による管理とRTRTによる管理を共存させる必要性が出てきた。これらのことからPATをRTRTに用いる場合の、最終品質試験による管理とRTRTによる管理との整合性について新たな規制上のルールを作り上げることが現在、課題となっている。

その一例として、これまでにほとんど最終品質試験に用いられていなかったNIR (近赤外分光法) を用いたPATによるRTRTにおける試験法のルールづくりがあげられる。特にNIRを定量試験として採用する場合、多変量解析という特殊な手法を使うことが多くなるため、検量線を作成する(キャリブレーション)手法および検証する(バリデーション)手法、構築したシステムが試験前に正しく動いていることを確認する方法(システムの性能)について、これまでのHPLCなどの定量に用いられてきた設定方法とは異なる方法が要求される。さらにNIRは測定データが温度、湿度等の環境や粒子径や密度などの物性等多くの要因に左右され、その上開発時にこれらの要因がすべて検量線に反映されているとは限らな

いため、開発時に組み込まれなかった何らかの要因により検量線にずれが生じていないか継続的に確認するための定期的な点検(定期再バリデーション)を行う際のルールを必要とする(ただし試験方法により一部不要の場合もある)。しかしNIRという手法自体が複雑で多くの場合個々の状況に応じた柔軟な対応が必要となるため、その妥当性を一律に判断してルールを決めておくことは非常に難しい。

また、NIRのようなPATを用いたRTRTは含量均一試験などに適用が想定されるが、一般的に用いられるHPLCなどによる定量による局方試験とNIRによるRTRTでは分析法自体が異なるため、これまでの局方試験と同じ判定基準をRTRTにそのまま用いることができない。そのため、PATを用いたRTRTの規格値の妥当性および局方試験法との整合性を考慮する必要が生じている。例えば、局方の含量均一試験ではサンプルサイズが10~30錠で1回の試験が行われるが、NIRなどのPATを用いる場合では何百~何千錠で試験を行うことになり、サンプル数が異なるため局方と同じ基準を使うことは難しい。PATを用いたRTRTの場合にはサンプルサイズが限られている薬局方の試験規格をそのまま準用することを考えるよりも、母集団の特性に応じた試験規格を、薬局方の許容品質を保持しながら規定することが望ましいと考えられる。この含量均一試験の問題については欧米ではLarge N法およびその改法など¹⁻⁴⁾が対応策として提案されている。

以上の課題を例にあげてきたが、これらの運用上の問題の解決については、ICHのIWG (Implementation Working Group: Q8, 9, 10) についての実施に関する作業部会)のQ&AやPoints to Consider、また日本においてはサクラ錠Mockおよびその報告書⁵⁾に方針が示されている。また厚生労働科学研究においてもさらなる議論が続いており、近くその内容が公開される予定である。これらの情報については国立医薬品食品衛生研究所薬品部のウェブサイト (<http://www.nihs.go.jp/drug/DrugDiv-J.html>) や本誌等で順次、提供される予定である。

3. PATの発展についての展望

前項で示したようにPATは課題も多いが、品質管理に使う上では非常に有用な手法であるため、原薬合成、造粒、乾燥、打錠等、さまざまな工程において、NIRやラマンなど多くの分析法により行われており、その応用

はさらに発展すると考えられる。そこで、今取り組まれているPATの応用についての展望をこの項で記述したい。

(1) SustainabilityにおけるPATの活用

有機溶媒使用量の削減を念頭に置いたIn-line GC-MSによる原薬製造工程中の有機溶媒量のコントロールや、有機溶媒を用いるHPLCのような最終試験から溶媒を用いないNIRなどの分光光学系試験もしくはRTRTへの転換など、PATの活用およびRTRTの採用が検討されている⁷⁾。このような環境、エネルギー問題など、いわゆるグリーンイノベーションの観点からもPATは有望視されている。

(2) Continuous Manufacturing Processへの適用

欧米では近年Continuous Manufacturing Process(連続工程)の導入により、製造工程を一体化することが検討されている。そのメリットとして場所、時間、原料等の資源の節約ができ、また開発時のスケールアップ問題の解消にも繋がるため、製剤開発が明確かつ迅速に行われるようになるということがあげられる。しかし連続工程においては試験におけるサンプリングを製造ロット、バッチ単位から時間単位などに変えるなどの対応が必要となる。そのため連続測定が可能なPATやそれを用いたRTRTとContinuous Manufacturing Processとの組合せによる品質管理は非常に相性の良い手法である。米国FDAもこのような革新技術の導入への取り組みに対してシンポジウム等⁸⁾で支持を表明しており、そのため今後、PATが活躍する場はますます増えると考えられる。

(3) 新しいPAT技術としてのラマン分光法

NIRはPATとして最も実用化が進んでいる分析技術であるが、温度、湿度などの外部環境や粒子径など原料の物性に測定結果が影響される、NIRによる測定が不可能な化合物もあり、また多変量解析を用いることから解析を理解することが難しい、さらには検量線のメンテナンス等に手間がかかるため問題点が多い。そのため研究レベルではあるが前方散乱型(透過型)ラマン⁹⁾のような新しいPAT技術の開発、導入の検討が積極的に行われている。ラマン分光法はこれまで後方散乱型(反射型)が主であったが、前方散乱型ラマン分光法を導入することができれば錠剤等が精度良く解析、定量できるようになり、また検量線のメンテナンスが不要になる等、NIRよ

り解析が簡素化できるため次世代のPATの実用化技術として有望視されている。

(4) 製剤のイメージング技術の利用

NIRやラマン等を用いた製剤のイメージング技術は製剤中の物理的もしくは化学的情報を視覚化するため、製造中に何がどのように起きたのかを把握することができ、PATのみを用いた場合と比べて製剤および製造工程の理解が高まりやすい。その活用の一例を図1に示す。A、Bの2種類の製剤があり、NIRイメージングのデータから製剤Aは錠剤中の主薬が均一のため、NIRを用いたPAT、RTRTで定量を行う場合、透過でも反射でも測定できる。一方、製剤Bでは表面と内部の主薬量が異なり、不均一なために透過測定しかできない。また主薬分布が不均一なため測定のばらつきが大きくなる原因となることも考えられる。このようにイメージング技術を併用することにより製剤に対する理解が高まり、適切なPATの導入に繋がる。またイメージング技術は単独でも混合均一性評価などのPATとして活用できる¹⁰⁾ので、今後応用がさらに発展すると考えられる技術である。

筆者の研究グループは、高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法をテーマに、PATに用いられる先進分析技術および顕微分光イメージング技術の評価研究や、これらの技術の製剤開発およ

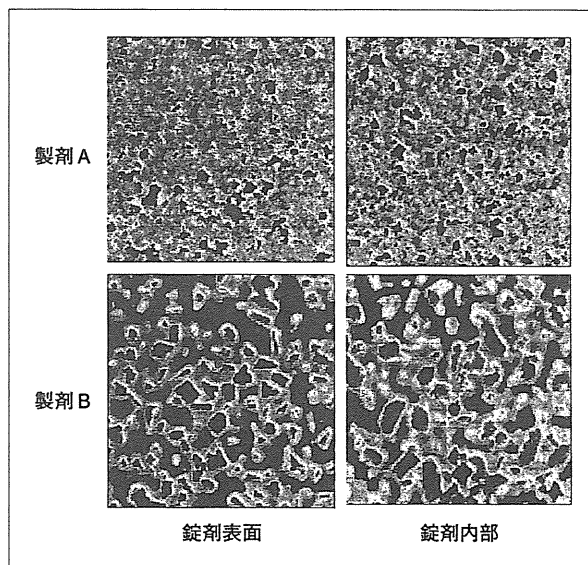


図1 NIRイメージング技術の応用例

製剤Aでは表面および内部の主薬量(イメージ中の赤い部分)はほぼ同一(50%)であるが、製剤Bでは主薬量は表面では約40%で内部では60%と大きな差があり、錠剤内部に主薬が偏析して不均一になっていると考えられる。

び製造工程管理への応用研究を産官学の共同研究として
行っている。本研究については不定期ではあるが1~2
年に1度、研究発表会を開催して情報提供を行っている。

4. A QbD (Analytical QbD) について

QbDは製剤開発に使われるアプローチであるが、近年、このQbDの考え方を分析手法の開発アプローチに
応用する取組みがある。通常、QbDアプローチの手順は、
目標製品品質プロファイルの設定に始まり、経験、知識
やこれらを生かしたリスクマネジメント、開発研究にお
ける実験結果を組み合わせた検討よりCQAを特定して、
CQAと物質特性および工程パラメータとの関連づけか
ら製造工程の理解を行い、製造工程および品質保証のた
めの最終的な管理戦略を構築する。分析手法の開発は通
常管理戦略中に行われるが、A QbDによるアプローチ
の場合、同じように最初に何をどのように測定するか分
析標的プロファイルを決める、そして測定方法の選択、
測定法に影響する要因、例えば温度、湿度等のリスク評
価、要因を把握することにより分析手法の理解を行い、そ
の分析手法における頑健性のデザインスペースを設定する
等管理戦略を構築するという、製剤開発の場合とほぼ同
じような手順を踏むことになる。その枠組みを図2に示
す。このようなA QbDアプローチを導入することによ
り頑健な分析手法が開発され、その割合が増加したという
報告¹¹⁾もある。またPATは今後新しい分析技術が開発
されると考えられるため、新しい分析手法の開発の際に
A QbDが開発アプローチの1つとなり得ると思われる。
もちろん、A QbDは通常のHPLCなどの分析法開発にも

応用が可能である。これからの分析法開発はリスクマネ
ジメントを導入していくことにより、N=3から科学とリ
スクをベースとした品質管理へ移行した製剤開発の
QbDのように、6σによる管理基準から科学とリスクを
ベースとした管理基準による分析法開発へと移行してい
くと考えられる。

おわりに

これからの医薬品品質保証において最も重要視される
点は、科学的根拠に基づく製品の理解および適切な品質
管理戦略の構築である。PATは、まだ課題が多く残っ
ているが、科学的根拠に基づいて製造工程を理解し、そ
れをコントロールする技術としてこれからも重要な役割
を果たしていくと考えられる。そしてPATの活用によ
り、科学的根拠に基づく品質管理技術が発展し、品質
の良い医薬品の安定な供給に役立つと考えられる。

参考文献

- 1) D. Sandell, K. Vukovinsky, M. Diener, J. Hofer, J. Pazdan, J. Timmermans : Development of a Content Uniformity Test Suitable for Large Sample Sizes, Drug Information Journal, 40, 337-344 (2006)
- 2) J. Bergum, K. E. Vukovinsky : A Proposed Content Uniformity Test for Large Sample Sizes, Pharmaceutical Technology, Nov 2, 72-79 (2010)
- 3) Demonstration of Uniformity of Dosage Units Using Large Sample Sizes, Proposal for a new general chapter in the European Pharmacopoeia, Pharmeuropa, 23 (2), 285-293 (2011)
- 4) Y. Tsong, M. Shen : Parametric two-stage sequential quality assurance test of dose content uniformity, Journal of biopharmaceutical statistics, 17(1), 143-57 (2007)
- 5) 檜山行雄：原薬・製剤開発研究に基づいた製造・品質管理手法の研究－重要工程におけるデザインスペース及びControl StrategyとしてのReal Time Release等の研究 分担研究報告書 (2008)
- 6) 檜山行雄：医薬品の製造開発から市販後に及ぶ品質確保と改善に関する研究－製剤の開発・製造情報に関する研究 分担研究報告書 (2010)
- 7) Sustainability and PAT applications, 37th FACSS Symposium (2010)
- 8) C. Moore : Regulatory Perspective on Continuous Manufacturing, AAPS Annual Meeting Symposium (2010)
- 9) C. Eliasson, N. A. Macleod, P. Matousek, L. C. Jayes, F. C. Clarke, S. V. Hammond, M. R. Smith : Rapid non-invasive quantitative assessment of pharmaceutical capsules using transmission Raman spectroscopy, CENTRAL LASER FACILITY ANNUAL REPORT, 256-259 (2007/2008)
- 10) A. S. El-hagrasy, H. R. Morris, F. D'Amico, R. A. Lodder, J. K. Drennen III, Near-infrared spectroscopy and imaging for the monitoring of powder blend homogeneity, J. Pharm. Sci. 90(9), 1298-1307 (2001)
- 11) J. F. McCafferty, P. Nethercote : Applying QbD Approaches to Analytical Methods, AAPS Annual Meeting Symposium (2011)

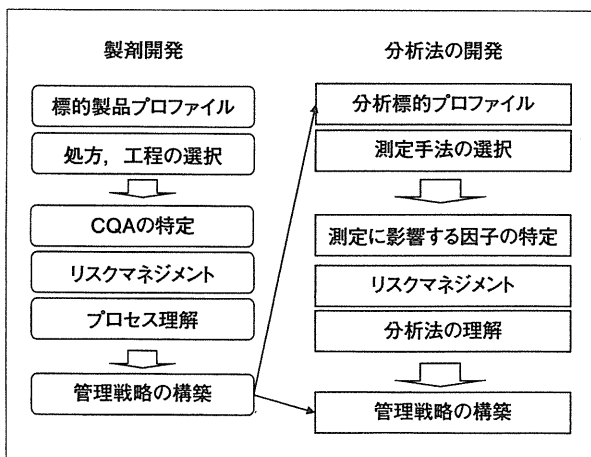


図2 QbDとA QbDの比較

