

図2 CHO細胞産生EPOのグリコフォーム解析
 (A)マススペクトル, (B)デコンボリューションマススペクトル
 NeuAc, N-アセチルノイラミン酸; Hex, ヘキサース; HexNAc, N-アセチルヘキササミン; Fuc, フコース。
 MS装置, Qstar elite (Applied Biosystems); m/z 範囲, 1,000~4,000。

酸がみられないこと, などがわかる。これまで, シアル酸結合タンパク質の特性解析では, 負電荷分子を分離する分析手法(等電点電気泳動, キャピラリー電気泳動など)を用いてシアル酸結合数の異なるグリコフォームのパターンを解析することが多かったが, MSでは, シアル酸付加程度に加えて, 糖組成, アセチル化の程度, および非ヒト糖鎖抗原であるN-グリコシルノイラミン酸の付加程度なども確認することが可能であり, 今後, 利用されるケースが増えるものと予想される。

目的物質が不均一性を有する糖鎖以外の例として, 意図的修飾を施した医薬品があげられる。PEG化タンパク質や薬物結合抗体医薬品では, 修飾分子の結合位置や結合数の違いによる不均一性が生じる。このような意図的修飾によって生じた不均一性は, キャピラリー電気泳動法, HPLC, MSなどにより解析されることが多いが, 修飾分子の特徴に合った解析手法を選択することが重要

である^{3,4)}。

バイオ医薬品の製造工程では, 目的物質以外に, 脱アミド体, 異性体, ジスルフィド結合ミスマッチ体, 酸化体, あるいは加水分解酵素などで断片化された切断体など, さまざまな「分子変化体」が生じる可能性がある。分子変化体のうち, 生物活性, 有効性および安全性の点で目的物質のそれに匹敵する性質を持つものは「目的物質関連物質」, また, 生物活性, 有効性および安全性の観点から目的物質に匹敵する特性を持たないものは「目的物質由来不純物」とよばれ区別される。分子不均一性解析では, 目的物質, 目的物質関連物質および目的物質由来不純物を区別すること, それらのプロファイルを求めておくことが重要である。抗体やリソソーム酵素製品のように末端のアミノ酸残基が欠失している分子種が混在する場合には, 末端アミノ酸配列解析を行うとともに, イオン交換クロマトグラフィーやMSなどにより不均一

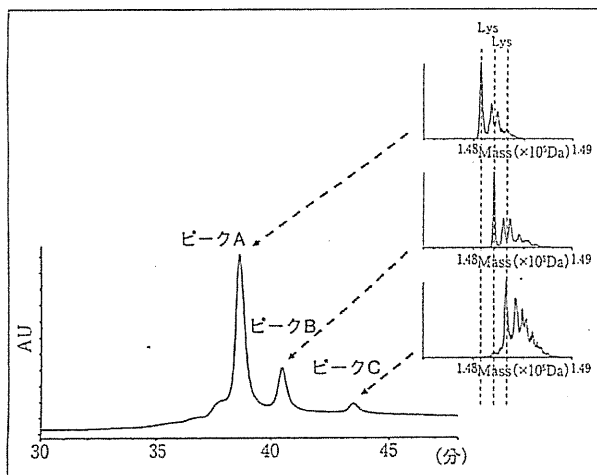


図3 CHO細胞産生ヒト抗体の不均一性解析
カラム, Agilent Bio MAb(0.1×50mm, 1.7mm); 流速, 0.8mL/分; UV, 280nm; A溶媒, 10mMリン酸ナトリウム水溶液(pH6.6); B溶媒, 500mM塩化ナトリウムを含む10mMリン酸ナトリウム水溶液(pH6.6); グラジエント条件, 5分間3%Bで流した後, 50分間かけて20%Bへ上昇させた。

性プロファイルを測定することが望ましい(目的物質由来不純物の解析手法については, 第3回で紹介する)。

分子変体体の解析例として, 弱酸性陽イオン交換クロマトグラフィーにより, CHO細胞産生ヒト抗体のH鎖のC末端リシン(Lys)残基の欠失に由来する不均一性を解析した例を示す(図3)。ここでは検出されたピークA~Cを分取した後, MSにより質量を確認することで, C末端Lys残基の個数を確認している(ピークA, Lys残基をもたない分子; ピークB, Lys残基を1分子もつ分子; ピークC, Lys残基を2分子もつ分子)。また, ピーク面積比から, C末端Lys残基結合数の異なる分子の分布を確認している(ピークA, 72%; ピークB, 20%; ピークC, 8%)。

4. 分光学的性質

分光学的性質は, 目的物質の高次構造情報を得るために解析される。主な分析法として, 核磁気共鳴法(NMR), X線結晶構造解析法, 円偏光二色性測定法(CD)およびフーリエ変換赤外吸収スペクトル測定法(FTIR)などが用いられている。

NMRの測定法のうち, バイオ医薬品の高次構造解析に用いられる測定法は, 核オーバーハウザー効果(NOE)測定法であり, 水素結合の位置や原子間の空間的距離を明らかにすることができる⁵⁾。NMRは, 生体内

の環境に近い状態で試料を測定できる点で優れているが, 現在のNMR装置で測定可能なタンパク質は, 分子量3万程度とされている。一方, X線結晶構造解析法は, タンパク質の分子量に関係なく測定できることから高次構造解析に汎用されているが, 糖タンパク質の結晶化が難しいなどの技術的な課題や, 必ずしも生体内における高次構造を反映していない場合があることに留意する必要がある。タンパク質中の二次構造(α ヘリックスや β シート)の有無についてはCDやFTIRにより解析されることが多い。

5. 構造安定性

タンパク質の構造安定性を解析する手法として, 示差走査熱量計法(DSC)が知られている。DSCによりタンパク質の熱変性に伴う熱変化を測定することで, タンパク質の構造安定性を評価することができる。タンパク質の構造安定性は, 溶媒, pH, イオン強度および添加剤等により変化するので, バイオ医薬品の開発において, DSCは製剤処方最適化等に用いられることが多い。

バイオ医薬品の中には, サブユニットが会合し, 多量体を形成している品目も多いが, 多量体安定性を解析するための技術開発は発展途上である。そのため, 目的の多量体を形成しているか否か, その生物活性から推測されているのが現状である。多量体安定性が有効性・安全性に直接的に関係するバイオ医薬品の1つにインスリン製剤がある。遺伝子組換えヒトインスリン製剤は, 製剤中では主に六量体を形成しており, 投与後に皮下組織で拡散・希釈されることで, 六量体から二量体を経て単量体に解離し, 吸収された後に作用を発現する。多量体の安定性はインスリン単量体が血中に移行するまでの時間に影響を与えるものと考えられており, アミノ酸残基を置換して多量体安定性を変化させて作用発現時間や持続時間を調節した遺伝子組換えインスリンアナログ製剤が次々と開発されている。インスリンスペースリスプロ(リスプロ)は超速効型インスリンアナログであり, ヒトインスリンB鎖の28番目(B28)のProとB29のLys残基が置換されている。同じ超速効型に分類されるインスリングルリジン(グルリジン)は, B3のAsnおよびB29のLys残基がそれぞれLysおよびGlu残基に置換されている。これらの置換により多量体安定性が低下し単量体に解離

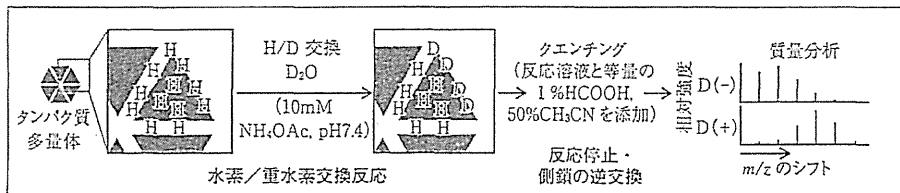


図4 HDX/MSによる多量体安定性解析の概要

重水中でタンパク質中の主鎖アミド水素原子(H)は、徐々に重水素(D)に置換される(HDX反応)。このとき、溶媒との接触の多い水素原子ほど速やかに置換される。交換された水素の数は質量の変化として質量分析計で検出される。交換反応性が特に高い官能基(-OH, -NH₂, -COOH, -SH, -CONH₂など)に取り込まれたDは、反応停止過程で加えられたH⁺により元に戻るため、最終的に検出されるのは主に主鎖のアミド基に取り込まれたDである。

しやすくなるため、超速効型インスリンアナログは速やかに作用を発現するとされている。持続型インスリンアナログであるインスリンスペースグラルギン(グラルギン)は、A21のAsnがGly残基に置換され、さらにB鎖のC末端に2分子のArg残基が付加されており、これらの置換によりグラルギンのpI(6.7)は他のインスリンアナログ(5~5.5)よりも高い。中性付近のpIをもつグラルギンは投与後、中性pHの皮下組織で析出するため多量体から単量体への解離が遅くなり、作用を持続すると考えられている。このように多量体安定性はインスリンアナログ製剤の有効性に影響を及ぼす重要な物理的・化学的性質の1つとなっており、簡便かつ迅速に多量体安定性の評価は重要である。

生体内のタンパク質は、柔軟性(揺らぎ)を保持した分子として存在しており、立体構造の揺らぎは多量体安定性に関係することが知られている。タンパク質の揺らぎ(動的構造)を解析する手法の1つとして、水素/重水素交換(HDX)反応とMSを組み合わせたHDX/MSがある^{6,7)}(図4)。重水中でタンパク質のアミド水素は徐々に重水素に交換される。交換された水素数は、反応溶液のpHを酸性(pH 2.5)に変えてHDX反応を停止した後、MSで分析することで質量変化数として確認することができる。一般に分子表面の溶媒と接触しやすいアミド水素ほど速く重水素に交換され、水素結合に関与する水素原子や分子内部に存在するアミド水素などの交換速度は遅いことから、HDX/MSにより多量体安定性の異なるインスリンアナログの揺らぎを比較できる。

図5は、超速効型、速効型、および持続型インスリンアナログ製剤のHDX/MSを行い、重水素交換数を時間に対してプロットした結果である⁸⁾。超速効型のリスプロおよびグルリジンはより多くの重水素を取り込み、持

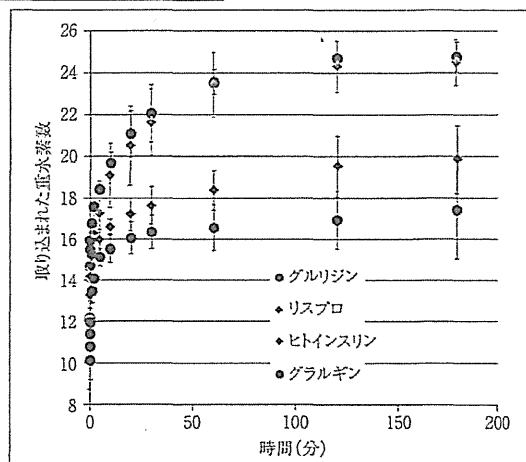


図5 インスリンアナログ製剤のHDX反応性

製剤原液を9倍容量の重水溶媒と混合して氷上でHDX反応後、反応液と同容量の1%ギ酸/50%アセトニトリルで反応を停止させた。
トラップカラム, C18 trap; 溶媒, 0.1%ギ酸, 50%アセトニトリル; MS装置, LTQ-FT(Thermo Fisher Scientific); 流速, 50μL/分

研究開発・生産を支援する総合技術力 医薬品のCMC関連分析はTRCにお任せ下さい。

【申請資料の信頼性の基準(薬事法施行規則第43条)での
抗体医薬品, たんぱく質医薬品の特性解析】

1. たんぱく質部分

- アミノ酸組成分析
- 末端アミノ酸配列解析
-N末端(ブロックN末端)及びC末端
- ペプチドマップの作成
- 全アミノ酸配列解析 Technology & Trust
- ジスルフィド架橋位置の解析
- 分子量測定(質量分析, ゲルろ過, SDS-PAGE)
- CDスペクトルの測定

2. 糖部分

- 糖組成分析-中性糖, アミノ糖, シアル酸
- N-グリコシド型糖鎖の逆相, 陰イオン交換による糖鎖マップの作成
- 糖鎖マップ法によるN-グリコシド型糖鎖の構造解析
- N-及びO-グリコシド結合糖鎖の結合位置の解析
- メチル化分析, NMR測定



株式会社東レリサーチセンター・医薬営業部
http://www.toray-research.co.jp
〒103-0022 東京都中央区日本橋室町3-1-8
TEL:03-3245-5666 FAX:03-3245-5804

DM資料請求カードNo.287

表2 HDXパラメータ

	水素交換数			
	D_{∞}	D_i	D_m	D_l
ヒトインスリン	20.3	3.9	1.5	3.0
リスプロ	24.5	7.3	2.6	2.5
グルリジン	24.7	7.2	2.6	2.8
グラルギン	18.0	2.0	1.8	4.2

フィッティングに使用した式 $D_t = D_{\infty} - D_i \exp(-k_i t) - D_m \exp(-k_m t) - D_l \exp(-k_l t)$ (D_i : 反応開始から t min 後の交換数, t : 反応時間 (min), D_{∞} : 最大交換数, $D_i/D_m/D_l$: 各群由来の交換数, $k_i/k_m/k_l$: 各群の水素の反応速度定数 (min^{-1})). 各アナログの反応速度定数, $k_i \leq 0.1$, $0.1 < k_m \leq 1$, $k_l > 1$
 D_{∞} , 最大交換数; $D_i/D_m/D_l$, 交換速度が遅い/中間/速い水素数

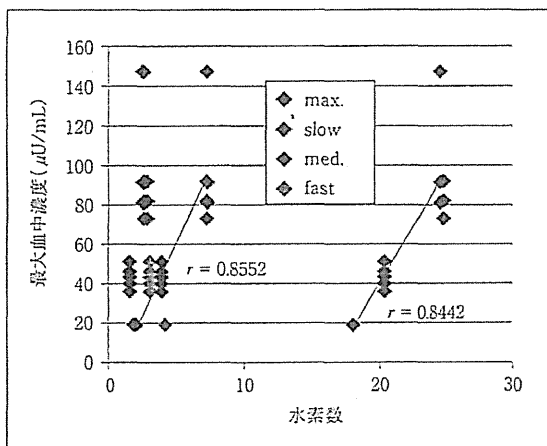


図6 HDXパラメータと最大血中濃度の相関性
 Max., D_{∞} : slow/med./fast., $D_i/D_m/D_l$ (表2参照)。
 最大血中濃度の値は、以下の論文を参照した。
 Mudaliar *et al.* (1999) *Diabetes Care* 22 (9) : 1501-1506; Lindholm *et al.* (1999) *Diabetes Care* 22 (5) : 801-805; Becker *et al.* (2008) *Clin. Pharmacokinet.* 47 (1) : 7-20; EPAR "Product Information" (Apidra); Product Monograph (Humalog), Eli Lilly Canada; Heise *et al.* (1998) *Diabetes Care* 21 (5) : 800-803; Lepore *et al.* (2000) *Diabetes* 49 (12) : 2142-2148.

効型のグラルギンと中間型製剤の重水素取り込み数は少ない。インスリンアナログ製剤のHDX反応性から、多量体安定性を確認することができる。また、HDX反応による重水素交換数の経時変化は、擬一次反応速度式で表すこと(フィッティング)が可能であり、その式から重水素最大交換数や反応速度の異なる重水素数などのHDXパラメータを求めることができる(表2)。製剤間のHDXパラメータの比較から、HDX反応性の差には最大交換数(D_{∞})および交換速度の遅い水素数(D_i)を反映していることがわかる。さらに、HDXパラメータは最大血中濃度と相関があることが示唆された(図6)。

おわりに

本稿では、バイオ医薬品の物理的・化学的性質解析の現状と最新技術について、事例を紹介しながら概説した。近年、生物活性、血中安定性、免疫原性および分子標的性の改善を目的とした改変・融合タンパク質、糖鎖改変タンパク質、PEG化ペプチド・タンパク質、細胞毒性が高い低分子化合物をカップリングさせた抗体医薬品など、新しい分子構造をもつ医薬品が次々と開発されている。これらの医薬品には、新規な構造および高度な不均一性をもち、ヒトでの薬理作用や安全性の予測が難しいものも少なくない。物理的・化学的性質解析は、ファーストインマン試験の安全性確保のためにも重要性が増していくものと予想される。

参考文献

- 1) 厚生労働省: 第十六改正日本薬局方 (http://www.pmda.go.jp/kyokuhou/3-24kokujii_index.htm).
- 2) Yanagihara S, Taniguchi Y, Hosono M, Yoshioka E, Ishikawa R, Shimada Y, Kadoya T, Kutsukake K.: Measurement of sialic acid content is insufficient to assess bioactivity of recombinant human erythropoietin., *Biol Pharm Bull*, 33, 1596-1599 (2010)
- 3) Maeda, E., Urakami, K., Shimura, K., Kinoshita, M. and Kakehi, K.: Charge heterogeneity of a therapeutic monoclonal antibody conjugated with a cytotoxic antitumor antibiotic, calicheamicin, *J Chromatogr A*, 1217, 7164-7171 (2010)
- 4) Moosmann, A., Christel, J., Boettinger, H. and Mueller, E.: Analytical and preparative separation of PEGylated lysozyme for the characterization of chromatography media, and *J Chromatogr A*, 1217, 209-215 (2010)
- 5) Ohno, A., Kawasaki, N., Fukuhara, K., Okuda, H. and Yamaguchi, T.: Time-dependent changes of oxytocin using (1)H-NMR coupled with multivariate analysis: A new approach for quality evaluation of protein/peptide biologic drugs, *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 57, 1396-1399 (2009)
- 6) Hamuro, Y. *et al.*: Rapid analysis of protein structure and dynamics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry, *J Biomol Tech*, 14, 171-182 (2003)
- 7) Chitta, R. K., Rempel, D. L., Grayson, M. A., Remsen, E. E. and Gross, M. L.: Application of SIMSTEX to oligomerization of insulin analogs and mutants, *J Am Soc Mass Spectrom*, 17, 1526-1534 (2006)
- 8) Nakazawa, S., Hashii, N., Harazono, A. and Kawasaki, N.: Analysis of oligomeric stability of insulin analogs using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry, *Anal Biochem*, 420(1), 61-67 (2011)

薬局別冊

May 2011
Vol.62 No.6

特集

■一般試験法（参考情報を含む）の改正 ― ①
理化学試験法

四方田千佳子

株式会社 **南山堂**

理化学試験法

Key Points

四方田 千佳子

国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 第一室長

- ⊕ 新たに収載されたものは参考情報の近赤外吸収スペクトル測定法, システム適合性, 誘導結合プラズマ発光分光分析法である。
- ⊕ 一般試験法で大きく改正されたものは, 液体クロマトグラフィーである。
- ⊕ 一般試験法で試験法自体が改正されたものは, プラスチック性医薬品容器試験法の塩化ビニルモノマーの限度試験である。
- ⊕ 窒素定量法では, 装置の自動化が可能となるような修正が行われた。
- ⊕ 残留溶媒試験法では, 基本方針の転換が図られている。

はじめに

理化学試験法委員会関連の試験法では, 第十五改正日本薬局方(日局15)以後, 一般試験法として新たに追加されたものはないが, 一部改正が行われた試験法は, 定性反応, 液体クロマトグラフィー, ガスクロマトグラフィー, 水分測定法, 旋光度測定法, 重金属試験法, 窒素定量法, プラスチック性医薬品容器試験法, 残留溶媒試験法, 導電率測定法である。また, 理化学試験法委員会関連で参考情報に新たに追加されたものとして, 近赤外吸収スペクトル測定法, システム適合性, 誘導結合プラズマ発光分光分析法がある。

そのほか, 澄明性試験法に関しては, いったん新規試験法としてパブリックコメントを求めた経緯があるが, 試験法として再考の余地がある部分があるとの見解となり, さらに

修正が行われる予定となっている。

定性反応

定性反応は確認試験法に用いられる簡便な試験法で, イオンや元素に特異的で医薬品成分を確認することができる。

第一追補で, メシル酸塩の定性反応が新たに追加され, 第二追補で, リン酸塩の定性反応が一部改正された。

メシル酸塩の定性反応

メシル酸塩の定性反応は, 医薬品各条の確認試験法に収載される例が増えたため, 一般試験法としての採用が提案された。メシル酸(メタンスルホン酸)を確認する方法として, 2つの方法が収載された。(1)はメシル酸塩に水酸化ナトリウムを加えると発生する亜硫

酸によりヨウ素酸カリウムデンプン紙が酸化され、ヨウ素が生成し青変するものである。(2)は、希塩酸で発生した亜硫酸イオンが塩化バリウムと反応して、亜硝酸バリウムとして白色の沈殿を形成するものである。

現在日局16には、8種類のメシル酸塩が収載されているが、ジヒドロエルゴタミンメシル酸塩とプロモクリプチンメシル酸塩では、この定性反応は適用されておらず、(2)法が採用されているのは、ドキサゾシンメシル酸塩と、ベタヒスチンメシル酸塩錠の2品目で、ほかは(1)法が採用されている。

2 リン酸塩の定性反応

リン酸塩の定性反応では、医薬品各条に記載通りの操作をしても、明確な沈殿の形成が確認できないとの指摘を受け、調査を行ったところ、日局の七モリブデン酸六アンモニウム試液は、七モリブデン酸六アンモニウム四水和物を水に溶解しているため酸性溶液となっていないが、もともとの試験法の出典である米国薬局方(USP)では、三酸化モリブデンから硝酸酸性の試液を調製することとなっている。しかし、リン酸塩の定性反応では酸性での沈殿形成が想定されているため、確認試験法で検液が中性付近であるものは、沈殿が生じにくいことが明らかとなった。そこで、操作法のなかに、「リン酸塩の中性又は希硝酸酸性溶液に…」となっていた部分から「中性又は」を削除し、試験は酸性の条件下で実施されるべきことと改正した。

したがって、もし検液が中性である場合には、硝酸酸性とすることを求めることとなった。

液体クロマトグラフィー

液体クロマトグラフィーでは、システム適

合性に関する詳細な解説が必要と判断されたが、一部分は参考情報としての収載が望ましいということとなった。したがって、液体クロマトグラフィーの改正と並行して、参考情報の準備が進められた。

第一追補で、一般試験法の液体クロマトグラフィーに関してかなりの加筆修正がなされた。システム適合性は試験を行うのに適切な性能を有していることを確認するためのものであり、規格試験法のなかに規定されていることが必要で、システム適合性に合致する性能が確認されなければ試験を行うことはできないとされた。システム適合性の項目には、「システムの性能」「システムの再現性」および「検出の確認」があり、それぞれについて解説が加えられた。

「検出の確認」は、純度試験において、限度値付近の標準溶液との比較のみで規格が設定されている場合には、この項目を設ける必要はないが、主ピークとの面積百分率などのように定量的な評価を必要とする場合には、設定する必要がある。限度値付近でピークが確実に検出でき、一定の幅で直線性が得られることを示す。ただし、限度値レベルでの検出が、システムの再現性で確認できる場合には設定しなくてもかまわない。

「システムの性能」では、分析対象成分と分離度を規定する物質との間で、分離度の下限値を示す。純度試験ではさらに、分析対象成分と分離度を規定する物質の溶出順を規定する。さらに必要な場合には、シンメトリー係数を規定する。適切な分離度を規定する物質がない場合には、分析対象となっている物質のピークの理論段数やシンメトリー係数で規定することもできる。

「システムの再現性」は、適切な濃度の標準溶液などのくり返し注入した場合の相対標準偏差(RSD, %)の上限値で規定され、原則と

して6回の注入を要求するが、グラディエント分析時などのように、時間がかかりすぎる場合には、回数を減らすことができる。ただし、回数を減らす場合には、後述するシステム適合性の参考情報に記載されている表を基に、統計的に同等な精度が得られるように、RSDの上限値をより小さな値とし、より厳しく設定する必要がある。

さらに、欧州薬局方(EP)の2.2.46 Chromatographic separation techniquesに記載されている用語集から次の2つが追加された。S/N比(クロマトグラムのノイズに対するシグナルの比)、ピークバレー比(不完全な分離を示す2つのピーク間の分離の指標となる値で、小さい方のピークのピーク高さを、ピークの谷の高さで除した値)である。S/N比は、図1に示すように、 H :対象物質のピークの基線(バックグラウンドノイズの中央値)からのピーク高さ、 h :対象物質のピークの前後における試料溶液または溶媒ブランクのクロマトグラムのバックグラウンドノイズの幅としたときに、

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

で求められる。ここで注意を要するのは、実

際には分母に2が掛かっているため、ノイズ幅の半分で計算しているのと同じこととなり、JIS K 0124高速液体クロマトグラフィーと同じ取り扱いである。一方、JIS K 0114ガスクロマトグラフィーでは、ノイズ幅そのまま計算に用いられるためS/N比は局方の式の倍の数値となっている。なお、基線およびバックグラウンドノイズは対象物質のピーク高さの midpoint におけるピーク幅(w)の20倍に相当する範囲で測定することとなっており、JIS K 0124と同じである。現在EPでは w の5倍の範囲と記載されているが、これは安易に範囲を狭めた結果で、近々修正される予定と聞いている。

また、溶媒ブランクを用いる場合、対象物質が溶出する位置付近で、上記とほぼ同様の範囲で測定する。

さらに、日局16では、液体クロマトグラフィーによる確認試験で多波長検出器を使用できるよう記載することとなり、実際の記載では、MSなども包含するように、化学構造に関する知見が得られる検出器が用いられる場合、保持時間の一致に加えて、化学構造に関する情報が一致することを確認することで、より特性の高い確認を行うことができるとした。

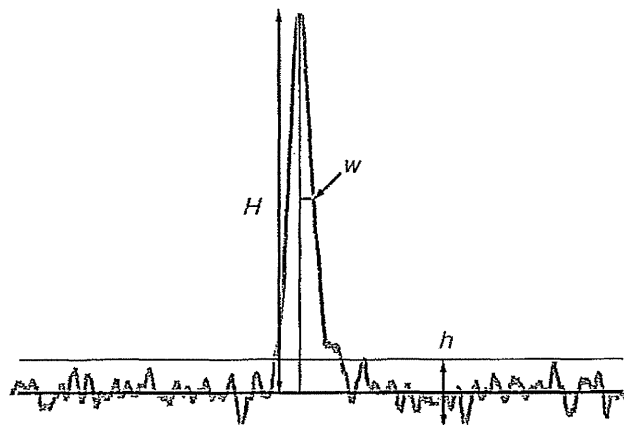


図1 クロマトグラムのS/N比の説明

ガスクロマトグラフィー

液体クロマトグラフィーの改正に伴って、システム適合性は液体クロマトグラフィーのシステム適合性の規定を準用するという記載が追加された。

参考情報、システム適合性

当初、液体クロマトグラフィーのシステムの再現性において、くり返し注入の回数を減らしたときの相対標準偏差の許容限度値を示した表は、一般試験法のなかに収載する予定であったが、規格値に関わる問題ではなく、むしろ運用上の数字であるとして、必ずしも一般試験法のなかに取り込まない方がよいと判断されたため、参考情報に関する技術情報としてシステム適合性を収載することとした。それに伴い、このくり返し回数の変更の表も含めて、必ずしもクロマトグラフィーに限定されない、分析法一般に対する参考情報として記載された。

ここで、許容限度値の設定に関しては、液体クロマトグラフィーの場合に、定量法では「原薬の場合に、含量規格の幅が5%以下の場合には、1.0%以下を目安として適切に設定する」と記されているが、これはEPの2.2.46 Chromatographic separation techniques

の Repeatability requirements の表を念頭に置かれたもので、EPでは経験に基づいた値を設定したものである。

システムの再現性の試験の質を落とさずにくり返し注入の回数を減らす方法として、表1が与えられている。表から、くり返し注入回数が6回の場合に許容限度値が2%と規格が設定されている場合には、くり返し注入回数を3回ですまそうとすると、0.95%の限度値以内のRSDを示せば、同じ精度を保証できていることを確認することができる。すなわち、この表を使えば、分析精度を確認しながら、くり返しの回数を減らせることになる。

最後にシステム変更時の考え方が記載され、カラムなどを交換したときに、システム適合性試験に合致しない場合には、試験結果が適切に得られるか再検証する必要があるとしている。

水分測定法

容量適定法において、調製法2に準じて調製販売されていた試薬に、安定性の向上を目的として、2-メチルイミダゾールが添加されたため、水分測定用試薬として添加剤を加えた試薬を用いることができるような記載として欲しいとの要望が出された。そこで、第一追補において、性能を向上させることを目的

表1 注入のくり返し数を減らしたときの相対標準偏差の許容値

注入回数	許容限度値(RSD-%)					
	1	2	3	4	5	10
6						
5	0.88	1.76	2.64	3.52	4.40	8.81
4	0.72	1.43	2.15	2.86	3.58	7.16
3	0.47	0.95	1.42	1.89	2.37	4.73
2	0.13	0.26	0.39	0.52	0.66	1.31

として、安定化剤などを添加した試薬は、規定の試薬を用いたときと同等の結果を与えることを確認したうえで、使用可能であることを明記した。

旋光度測定法

測定温度が日局の標準温度である20℃に限定されていたため、USPやEPの標準温度25℃でも測定できるように、第一追補で、「……その測定は、通例、温度は20℃又は25℃、層長は……」と下線部を追記した。

窒素測定法

窒素測定法では、製薬業界からの要望で、自動化装置および市販の分解促進剤を使用可能な記載に改正した。自動化装置は、灰化部分と上流適定部分に分かれている装置が多いため、それぞれ単体でも導入できるようにした。また、自動適定装置では、指示薬などの差や、電位差適定法も包含されるような記載としている。自動化装置に関しては、装置の記載の後に、「ただし、有機物の分解、生成したアンモニアの蒸留及びその定量における適定終点検出法(電位差適定法、比色定量法など)など、自動化された装置を用いることができる」が追記された。また、自動化された装置を用いるにあたって、装置の適合性を確認することとした。標準試薬であるアミド硫酸を用いて、装置の指示通りの操作をするときに、窒素として99.0～101.0%が回収できる場合に装置として適合していると判断される。分解促進剤では、規定されたものと同等以上の結果を与えることを実試料を用いて検証してから、その種類と量を変更することができるとした。

重金属測定法

第3法の記載は、「医薬品各条に規定する量の試料を石英または磁性のろつぽに量り、初めは注意して弱く加熱し、強熱して灰化する」となっており、灰化温度の記載がなかったため、第二追補において、後半を、「加熱した後、500～600℃で強熱し、灰化する」と改正し、試験操作を明確化した。

残留溶媒試験法

日局における残留溶媒の取り扱い方針の変遷に伴い、日局16において若干の記載の修正を行った。日局15の第二追補では、残留溶媒は製造方法に依存するために、医薬品各条に一律に規定することは困難であるとして、医薬品各条に「別に規定する」と記載することとされた。その後、「別に規定する」こととなったことで、承認審査の場では、日局品であってもすべての残留溶媒試験法を個別に審査する必要が生じ、対応が困難であることという意見が出された。その後、個別の審査および医薬品各条での記載をしない方向で、「医薬品の残留溶媒ガイドライン」に基づいた総括的な考え方を通則に記載することで、すべての医薬品へ適応可能となり、GMP上の規制へと移行することとされた。しかし、製薬業界側から猶予期間が必要であるとの意見が出されたため、再度、日局16においては医薬品各条に「別に規定する」と記載し、通則への記載は日局17での対応を目指すことになった。

日局16における改正点は、上記の方針に従って、医薬品各条に有機溶媒の限度値を示すこと及び許容値を超えてはならないという記載を削除した。また、「医薬品の残留溶媒ガイドライン」に従って、ヒトに対して低毒性と考えられる溶媒のみが残留する場合には、乾

燥減量試験法を用いることができることを追記した。また、あらかじめ対象となる残留溶媒に分析に適した方法を設定することが必要であることを明記し、状況に応じた対応が重要であることを示した。さらに、医薬品各条には残留溶媒の規格は設定しない方向にあるが、これは残留溶媒は医薬品の製造方法に依存するために一律に設定できないためであり、残留溶媒の管理は、医薬品の製造工程でどのような溶媒を使ったかにより各製造業者が残留量を適切に把握し、自主的に管理する必要があることを追記した。これらは、日局17に向けた下準備のための記載整備といえる。なお、連動して参考情報の残留溶媒も一部加筆修正した。

プラスチック製医薬品容器試験法 —ポリ塩化ビニル製水性注射剤容器—

ポリ塩化ビニル製水性注射剤容器の(11)塩化ビニルの試験法のなかで、日局15では、2つの分析条件のガスクロマトグラフィーが記載されており、塩化ビニルモノマーの標準液のピークより大きなピークがいずれか一方の測定条件で認められなければ試験に合格するという変則的な試験法で、判定法が不明瞭であったため、記載を整備した。

その後、この日局15の試験方法が、塩化ビニル容器の試料を完全に溶解して、パックドカラムのガスクロマトグラフィーに注入するというもので、妨害成分の影響が大きく、カラムの汚染が激しいために、カラムの空焼きに長時間を要するなどの問題点があった。そこで日局16では、食品、添加物などの規格基準の塩化ビニル試験法を基に、キャピラリーカラムを使用して、試料を*N,N*-ジメチルアセトアミド(DMA)を溶媒として溶解させ、マニュアルサンプリングによるヘッドスペース法に

より注入後、水素炎イオン化検出器で検出する方法へ変更した。

導電率測定法

水の各条改正に伴い、試験に用いる水の記載を変更した。「蒸留水又は精製水(導電率 $2\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ 以下)」となっていたものを、「蒸留水又は導電率 $2\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ 以下の水」へ変更し、精製水という用語を使用しない方向へ統一した。同様に、pH測定法でも、「精製水を蒸留し、留液を15分間以上煮沸した後、」となっていたのを、「蒸留した水を15分間以上煮沸した後、」へと変更した。

さらに、塩化カリウム標準溶液の測定が 20°C で行えない場合の温度補正式の有効範囲を、 $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ から、 $15\sim 30^{\circ}\text{C}$ へ広げた。これは水の導電率測定が 25°C でなされることとなっており、測定温度での校正を可能とするためである。

なお、導電率測定法は国際調和の対象となっている試験法であるが、日局16に記載されている塩化カリウム標準溶液の導電率はJISなどに収載されている値と若干異なっており、早期の改正が待たれている。

参考情報、近赤外吸収スペクトル測定法

医薬品の最終製品の品質を保証することを目的として、製造プロセスにおける重要な品質特性を連続的に計測管理する手法であるPAT (Process Analytical technology) が欧米で推進されており、わが国でも品質の管理手法として取り込まれるようになってきている。PATの代表的な分析ツールとして、近赤外吸収スペクトルがあり、非破壊測定、連続測定、多成分同時測定が可能で、すでにUSP

やEPで一般試験法として設定されている。日局では、第二追補に参考情報として収載された。

近赤外吸収スペクトルでは、750～2,500nmの波長の近赤外光の吸収を測定し、主に水素結合が関与するO-H, N-H, C-Hなどに由来する吸収が捉えられる。近赤外分光光度計として、分散型近赤外分光光度計およびフーリエ型近赤外分光光度計が主に医薬品分野で使用されている。測定法としては、赤外スペクトルと同様に、試料の形状に応じて、透過法、拡散反射法、透過反射法の測定法を選択する。装置性能の管理では、波長の精度の確認など詳細に記載されており、定性または定量分析への応用に関しても概説されている。

参考情報、誘導結合プラズマ発光分光分析法

医薬品の金属元素などの無機性不純物などの測定法としては、すでに一般試験法として原子吸光光度法が収載されているが、多くの元素について同時に微量分析が可能なこと、化学的干渉による妨害がほとんどないことなどから、誘導結合プラズマ(ICP)発光分光分析法の局方への取り込みが要望されていた。ICP発光分析法は、高周波誘導結合法により得られるアルゴンプラズマ中に試料を噴霧導

入し、高温の熱エネルギーにより励起された原子による発光スペクトルの波長及び強度を測定して、定性、定量分析を行うものである。

別に、ICPをイオン源とするICP質量分析法もあり、多くの部分が共通する部分も多いため、今後両者を併せた形で、一般試験法への収載を検討中である。

現在、ICH(日米欧医薬品規制調和国際会議)の場で、金属不純物の規制に関する国際調和が進行中であり、関連する個別金属の測定法も局方として取り入れる予定となっており、ICP発光分析法、ICP質量分析法が国際的に共通のツールとして取り上げられるため、今後、重要な役割を果たすことになる。

おわりに

理化学試験法では、局方の国際調和の案件としては、従来から継続しているものとして、色の試験法、導電率測定法があり現在進行中である。色の測定法では、色の標準液が局方で異なるため、色差計による測定法の導入が検討されている。また、医薬品分析ではもっとも多用されているクロマトグラフィーの国際調和が開始されることになり、現在、わが国の医薬品の承認申請や、局方への取り込み時に生じている、試験法設定方法の差異に起因するトラブルの解消が期待されている。

A New Approach to Characterization of Insulin Derived from Different Species Using ¹H-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 ¹H-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 ¹H-NMR spectra. These results demonstrate that this methodology could be useful for characterization of polypeptides.

Key words insulin; polypeptide; characterization; principal component analysis; ¹H-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 ¹H-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 ¹H-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 evaluation

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 ¹H-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 ¹H-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 ¹H-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 (D₂O, 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 ¹H-NMR measurements.

Sample Preparation and ¹H-NMR Spectroscopic Analysis Each insulin (14.7 mg) was dissolved in 140 μ L of 0.1 N HCl, 70 μ L of 0.1 N NaOH, 200 μ L of Milli-Q water, 70 μ L of 5 mM TSP/D₂O, 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 μ L, and this mixture solution was diluted with 490 μ L of CD₃CN. The solvent used in the present work was H₂O/D₂O : CD₃CN (65/35 vol%). For ¹H-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 (*.xls). 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

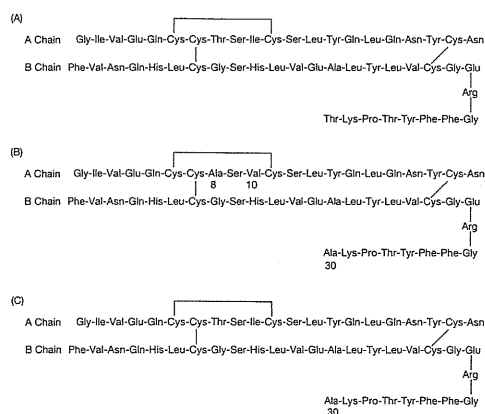


Fig. 1. Amino Acid Sequences of Human Insulin (A), Bovine Insulin (B), and Porcine Insulin (C)

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 carboxy 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.

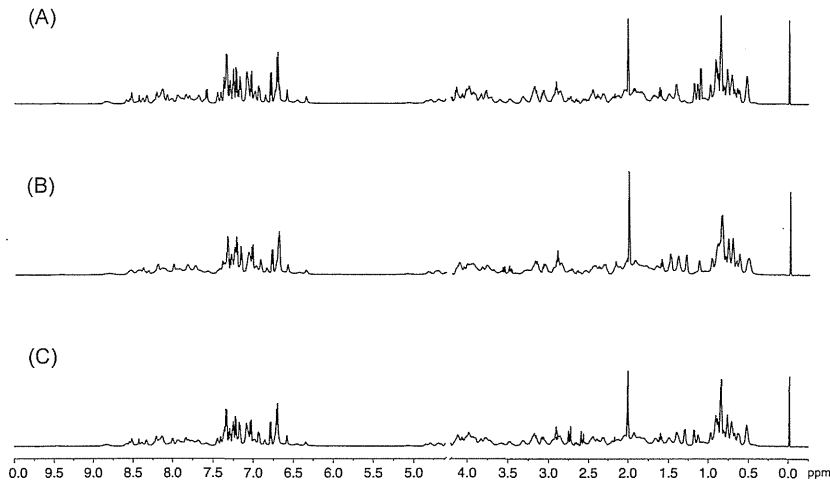


Fig. 2. $^1\text{H-NMR}$ Spectra of Human Insulin (A), Bovine Insulin (B), and Porcine Insulin (C)

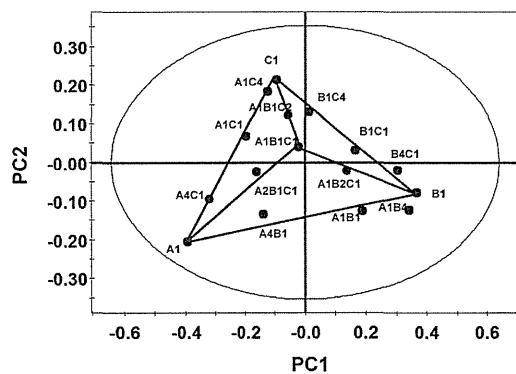


Fig. 3. PCA Scores Plot (PC1/2) Derived from the $^1\text{H-NMR}$ Spectral Data for Each Mixed Insulin Ratio

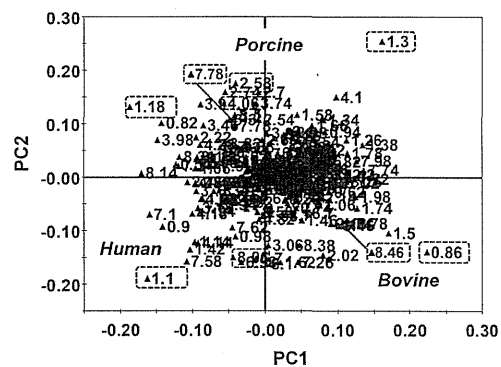


Fig. 4. The PCA Loading Plot (PC1/2) Derived from the $^1\text{H-NMR}$ Spectral Data for Each Mixed Insulin Ratio

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

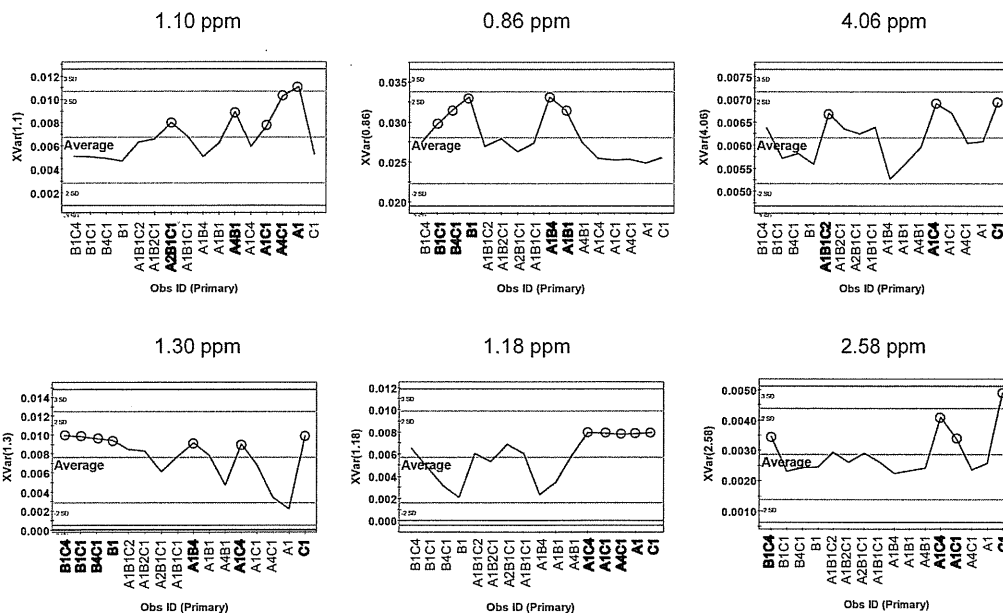


Fig. 5. The PCA Trend Plot: Integrated Intensities of Six Variables Showing Typical Fluctuations of Human Insulin, Bovine Insulin, and Porcine Insulin on the Loading Plot

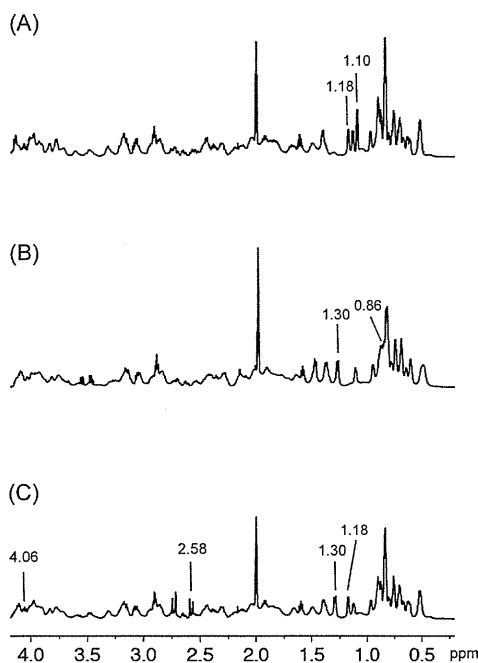


Fig. 6. The Typical Chemical Shifts for the Different Insulin Species on the PCA Loading Plot: Human (A), Bovine (B), and Porcine (C)

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 $^1\text{H-NMR}$ 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 $^1\text{H-NMR}$ 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., Hellberg S., Johansson E., Lindberg W., Sjostrom 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., "Iyakuhiin 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).

Comparison of Particle Size and Dispersion State among Commercial Cyclosporine Formulations and Their Effects on Pharmacokinetics in Rats

Hiroko Shibata,* Haruna Saito, Toru Kawanishi, Haruhiro Okuda, and Chikako Yomota

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

Received February 13, 2012; accepted May 18, 2012

Generic versions of Neoral, a microemulsion capsule formulation of cyclosporine, have been approved worldwide. However, there are concerns about the quality and efficacy of the generics due to the formulation specificity and differences in inactive ingredients among products. In this study, we measured the physicochemical properties of both the innovator and the generic formulations, and compared their bioavailability in rats. When the capsule contents were dispersed in water, the absorbance (600 nm wavelength) of generic products was higher than that of the innovator. Whereas the dispersion solution of the innovator in Fed State Simulated Intestinal Fluid was nearly clear, that of all the generics became white and turbid. The mean diameter of the microemulsion (or emulsion) formed in water by the generics was 39.7, 57.7, 64.5, and 74.8 nm, all of which were larger than that of the innovator (26.4 nm). Although the T_{\max} of the generics tended to be long relative to that of the innovator, there were no significant differences between the innovator and generics with regard to maximum blood concentration (C_{\max}) or area under the curve (AUC). These results suggest that the physicochemical differences between the innovator and the generics will not have a significant effect on C_{\max} or AUC, which is necessary to ensure bioequivalence.

Key words microemulsion; emulsion; biorelevant medium; innovator; generic

Cyclosporine (CsA) is an immunosuppressive agent,^{1,2)} and is categorized as a Biopharmaceutics Classification System (BCS) Class II drug with high lipophilicity³⁾ and low aqueous solubility.⁴⁾ One way to improve the aqueous solubility of such drugs is to prepare them as self-emulsifying formulations.^{5,6)} The first generation of orally administered formulations containing CsA consisted of a corn-oil-based solution encapsulated in soft gelatin (Sandimmune), which is now referred to as a “self-emulsifying drug delivery system” (SEDDS). The oily solutions are emulsified by bile salts, which form mixed micelles in the gastrointestinal fluid, and the CsA in these mixed micelles is then absorbed from the upper intestinal tract.⁷⁾ Thus, the absorption of CsA in Sandimmune is susceptible to the effects of bile acid secretion and the ingestion of food, resulting in variability of absorption within individual patients.^{8,9)}

To address the variability in absorption of Sandimmune, an improved formulation of CsA, Neoral, has been developed. Neoral is a microemulsion pre-concentrate formulation, which has recently been referred to as a “self-microemulsifying drug delivery system” (SMEDDS).⁶⁾ After oral administration of Neoral, a microemulsion with stable dispersibility is easily formed in the intake water or gastric fluid, and the drug is quickly absorbed from the upper intestinal tract. Therefore, when compared to Sandimmune, Neoral demonstrates a significantly higher and more consistent absorption profile that is unaffected by bile acid secretion or food consumption.^{10–12)}

The need to reduce healthcare costs in many countries has led to the production of generic substitutions for original drugs. Four generic versions of Neoral have already been approved in Japan; in other countries, several generics have been marketed, such as Gengraf, Eon, and Cicloral. In the U.S.A., SangCya, which is the liquid generic form of Neoral,

was recalled because it is not bioequivalent to Neoral when administered with apple juice.¹³⁾ There are reports that in transplant recipients the area under the curve (AUC) and maximum blood concentration (C_{\max}) values of the generic tended to be lower than those of the innovator, and that the bioavailability of the innovator decreased when administered after a fat-rich meal, whereas that of the generic increased.^{14,15)} A recent report at a scientific meeting in Japan also indicated that the physical appearance and particle diameter of generics were different from those of the innovator.¹⁶⁾ In addition, another group reported that after oral administration in rats, the pharmacokinetics of CsA metabolites differed between the innovator and generics.¹⁷⁾

Thus, as we describe above, there are concerns about the quality and efficacy of generics due to the formulation specificity of the innovator and the narrow therapeutic window of CsA. To our knowledge, there have been no direct comparisons of innovator and generics using both *in vitro* and *in vivo* assessment. Therefore, in this study, we assessed the physicochemical properties of various commercial formulations of CsA when dispersed in solution, such as their physical appearance and particle diameter. We examined the oil-based formulation Sandimmune, the microemulsion formulation Neoral, and 4 generic products of Neoral that are approved by the regulatory agency in Japan. In addition, we compared the pharmacokinetics of CsA and its metabolites for these formulations, and investigated whether or not the differences in physicochemical properties are likely to affect their pharmacokinetics.

Experimental

Materials Six cyclosporine A (CsA) capsule products were purchased from a general sales agency for drugs in Japan and used in this study: Sandimmune[®] capsule, 50 mg (Product A, Lot No. S0016; Novartis Pharma K.K., Basel,

The authors declare no conflict of interest.

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

Switzerland); Neoral[®] capsule, 50 mg (Product B, Lot No. S1046; Novartis Pharma K.K., Basel, Switzerland); Amadora[®] capsule, 50 mg (Product C, Lot No. 34006; TOYO CAPSULE Co., Ltd., Shizuoka, Japan); Cicporal[®] capsule, 50 mg (Product D, Lot No. EC2501; Nichi-Iko Pharmaceutical Co., Ltd., Toyama, Japan); cyclosporine capsule, 50 mg "Mylan" (Product E, Lot No. 0450RH; Mylan Seiyaku, Tokyo, Japan); and cyclosporine capsule, 50 mg "FC" (Product F, Lot No. 9C1; Fuji Capsule Co., Ltd., Shizuoka, Japan). The official CsA reference standard was purchased from the Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science Society of Japan. Sodium taurocholate and lecithin were purchased from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan). Cyclosporin D (CsD) (ALEXIS[®] Biochemicals) was purchased from Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, U.S.A.). Rat liver microsomes were obtained from Celsis In Vitro Technologies (Baltimore, MD, U.S.A.). β -Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADP), glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (G-6-PDH), and glucose-6-phosphate (G-6-P) were purchased from Oriental Yeast Co., Ltd. (Tokyo, Japan).

Physicochemical Characteristics Eighty percent of the contents of a single capsule was placed in a test tube, and 10 mL of test medium was added. The solution was mixed by gentle inversion until the capsule contents were dispersed homogeneously in the test medium. Using this solution, 5-fold and 25-fold dilutions were prepared in different test tubes.

Preparation of Test Medium The 1st Fluid and 2nd Fluid for the dissolution test were prepared according to the Japanese Pharmacopoeia (JP)16. Fasted State Simulated Intestinal Fluid (FaSSIF) and Fed State Simulated Intestinal Fluid (FeSSIF) were prepared by the modified method reported by Galia *et al.* and Jantratid *et al.*^{18,19} FaSSIF was formulated using approximately 900 mL of blank buffer, which was prepared by dissolving sodium chloride (4.01 g), sodium hydrate (1.39 g), and maleic acid (2.22 g) in 900 mL distilled water. The pH was then adjusted to 6.5. Sodium taurocholate (1.613 g) was dissolved in 50 mL of blank buffer, to which lecithin (0.15 g) was added and dissolved with heat and agitation until the solution became clear. The volume was adjusted to 1 L using the remaining blank buffer and distilled water. In the case of FeSSIF, sodium taurocholate (8.07 g) was dissolved in 50 mL of blank buffer (potassium chloride [15.20 g] and acetate [8.65 g] in 900 mL distilled water, pH 5.0), to which lecithin (2.81 g) was added and dissolved with heat and agitation until the solution became clear and yellow. The volume was adjusted to 1 L as with FaSSIF. Mixed micelles were not detected in either FaSSIF or FeSSIF when examined by a dynamic light scattering (DLS) photometer.

Absorbance To assess the degree of turbidity, the absorbance at 600 nm of each capsule sample was measured by a spectrophotometer (UV-2550/2450; Shimadzu, Kyoto, Japan) after mixing the samples with different test media.

Solubility The solubility of CsA in the dispersed solution was measured. The dispersed solution of each capsule sample was filtrated by 0.45 μ m filter, and its concentration of CsA was measured by HPLC. The apparatus used for the HPLC system consisted of a constant pump (L-7200, Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan), a degasser (L-7610, Hitachi), an autoinjector (L-7200, Hitachi), a column oven (L-7300, Hitachi), an UV detector (214 nm) (L-7405, Hitachi), and a system controller (D-7000, Hitachi). The separation

was carried out at 70°C on a Inertsil ODS-3 (100 \times 4.0 mm i.d., 5 μ m) from GL Science (Tokyo, Japan). The mobile phase consisted of water–tetrahydrofuran (5:3.6), and flow rate was 1.0 mL/min. A standard stock solution of CsA was prepared by dissolving 10 mg of CsA in 10 mL of ethanol, and stored at 4°C. A 10 μ L aliquot of a sample was injected.

Particle Size Distribution The size distribution and mean diameter of particles in the capsule content samples were measured using a DLS photometer DLS-7000 (Otsuka Electronics Co., Ltd., Osaka, Japan) equipped with an He–Ne laser source (wavelength, 632.8 nm) after mixing the samples with different test media. All DLS measurements were made with a scattering angle of 90°. The neutral density filter was adjusted depending on intensity. Data were gathered with a counting period of 100 s. Histogram analysis was performed to assess the particle size distribution, and cumulant analysis was performed to calculate the mean diameter. The data between different products were statistically analyzed using a one-way analysis of variance followed by Dunnett's test.

The number of large-diameter particles (>0.5 μ m) in the solution of the capsule content in 10 mL water was measured by an Accusizer 780A instrument (Particle Sizing Systems, Santa Barbara, CA, U.S.A.). This instrument is based on light extinction (LE) or light scattering (LS) that employs a single-particle optical sizing (SPOS) technique, and was equipped with an automatic dilution system. In this study, the summation mode, which is a combination of LE and LS, was applied. Duplicate measurements were made for each sample at the appropriate time point using the following conditions: data collecting time, 60 s; flow rate, 60 mL/min; injection loop volume, 1.04 mL; syringe volume, 2.5 mL; second dilution factor, 40.

Sample Preparation for Assay A 100 μ L aliquot of each blood sample was transferred to a microtube. A 200 μ L aliquot of internal standard (IS) solution (8.3 ng/mL of CsD in methanol–0.3 mol/L ZnSO₄, 7:3 v/v) was added to each tube. Tubes were tapped and vortexed for a few minutes until the pellet was completely dispersed. After centrifugation at 12000 rpm for 5 min, the supernatant was filtered by a centrifugal filter device (Ultrafree-MC, 0.22 μ m polyvinylidene difluoride (PVDF); Millipore, Billerica, MA, U.S.A.). After further centrifugation at 10000 rpm for 2 min, the filtered sample was directly applied to the liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) system.

Due to difficulty in obtaining reference standards of CsA metabolites, the *in vitro* metabolic reaction was performed by following the method for rat liver microsomes, and reactants containing metabolized CsA were used to confirm the LC separation of CsA and its metabolites. First, a reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) regenerating system (NRS; 1.7 mg/mL NADP, 7.8 mg/mL G-6-P, 6.0 units/mL G-6-PDH in 2% (w/v) NaHCO₃) was prepared. A 50 μ L aliquot of rat liver microsomes, 5 μ L of 500 ng/mL CsA in acetonitrile, and 320 μ L of 50 mM Tris buffer were mixed in a microtube, and then pre-incubated at 37°C for 5 min. Next, 125 μ L NRS was added and the solution was thoroughly mixed. After incubation at 37°C for 60 min, 500 μ L internal standard solution was added to terminate the reaction. After centrifugation at 10000 rpm for 5 min, the supernatant was filtered, as described above, and applied to the LC/MS system.

Assay for Cyclosporine A and Its Metabolites CsA and its metabolites in whole blood were measured by LC/MS

system in accordance with Koseki *et al.*,²⁰⁾ with some modifications. LC/MS was performed on a Shimadzu LCMS-2010 system that includes a constant pump, column thermostat, degasser, autosampler, and quadrupole mass spectrometer (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). The HPLC column was a Symmetry C8 (4.6×75 mm, 3.5 μm; Waters, Milford, MA, U.S.A.) with a guard column (Opti-Guard-min C8, 1×15 mm; Optimize Technologies, Oregon City, OR, U.S.A.). LC/MS grade water and methanol were prepared as mobile phase A and B, respectively. The flow rate was set to 0.3 mL/min and the column temperature was 80°C. A linear gradient separation was used, with 72% of mobile phase B from 0 to 1 min, then 72% to 85% of mobile phase B over 5 min, holding for 3 min, and finally 72% of mobile phase B over 6 min. The total run time was 15 min for each injection. A 20 μL aliquot of each prepared sample was injected.

The mass spectrometer was interfaced with an electrospray ionization (ESI) source used in the positive ion mode. The following parameters were retained for optimal detection of all analytes: nitrogen gas flow rate, 1.5 L/min; interface voltage, 4.5 kV; desolvation line voltage and temperature, 20.0 V and 250°C, respectively; block heater, 200°C. For the determination of CsA and its metabolites as well as CsD, the sodium adducts were measured at m/z 1210.9 (AM4N), m/z 1224.9 (CsA), m/z 1238.9 (CsD, IS), and m/z 1240.9 (AM1, AM9, AM1c) by using selected ion monitoring (SIM). Retention times for AM1, AM9, AM1c, AM4N, CsA, and CsD were 8.6, 8.9, 9.5, 10.4, 11.4, and 12.2 min, respectively. Quantification of CsA and its metabolites was achieved with a calibration curve of CsA (concentration range, 7.8–500 ng/mL). The limit of detection (signal-to-noise ratio, 3) and quantification (signal-to-noise ratio, 10) of CsA was approximately 1.5 ng/mL and 5 ng/mL, respectively.

Animal Study The animal experiments were outsourced to Charles River Japan and performed in accordance with the Guideline for Animal Experiments of Charles River Japan. Male Sprague-Dawley rats weighing 220–250 g were fasted overnight with free access to water. The content of each CsA capsule product was diluted in distilled water to obtain a CsA concentration of 1.0 mg/mL. The CsA solution equivalent of 3.5 mg/kg CsA was orally administered to rats using a stomach sonde. Next, blood samples (300 μL) were collected from the jugular vein at 0.5, 1, 2, 3, 6, 12, and 24 h using a syringe flushed with 100 mg/mL ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and stored at –80°C until analysis by LC/MS. The pharmacokinetic parameters of CsA and its metabolites, such as AUC , C_{max} , and time to reach C_{max} (T_{max}), were estimated by non-compartmental analysis using WinNonlin (version 5.2; Pharsight Corporation, Sunnyvale, CA, U.S.A.). The data between different products were compared for statistical significance by a Kruskal–Wallis test.

Results

Physicochemical Characteristics Neoral, a microemulsion pre-concentrate formulation, is composed of lipophilic solvent, hydrophilic solvent, surfactant, and drug. Table 1 shows the difference in additive composition of CsA capsule contents among products. First, we removed the contents of each capsule and compared the physical appearances before dispersion. Product A was the oil-based formulation Sandimmune, Product B was the innovator Neoral, and Products C

to F were generic formulations. As seen in Fig. 1a, Product A and Product F were yellow, Product B and Product E were slightly yellow, and Product C and Product D were almost clear. Next, we dispersed the contents of 1 capsule in 10 mL of each test medium and compared the physical appearances (Fig. 1b). For the test media, water, 1st and 2nd Fluids for the dissolution test, artificial intestinal juice, Fasted State Simulated Intestinal Fluid (FaSSIF), and Fed State Simulated Intestinal Fluid (FeSSIF) were used. For all capsules the contents were homogeneously dispersed in each test medium except for Product A. The dispersion liquid of SEDDS is typically turbid and inhomogeneous, whereas that of SMEDDS is usually nearly clear. Thus, the dispersion state of the generics was obviously different from that of Product A (SEDDS). When the capsule contents were dispersed in water, Product B and Product E produced a clear and almost clear solution, respectively; Product F produced a white solution; and Product C and D produced bluish milky solutions. Assessment using the other test media indicated the same tendency. On the other hand, when the capsule contents were dispersed in FeSSIF, all generic products produced a white cloudy solution, whereas Product A produced a clear solution.

To quantify the degree of turbidity, we measured the absorbance at 600 nm of the dispersion solutions. The absorbance of the solutions formed by dispersion in water was high and showed the following order: $B \approx E < C = D < F \ll \ll A$. This same tendency was observed for the other test media (Fig. 2). These results correlated with the physical appearance of the solutions, including the significantly higher absorbance of generics dispersed in FeSSIF. In the case of Product F, a slight precipitate was formed in the dispersion solution several hours after initial dispersion (data not shown). The absorbance of Products B through E in each test medium decreased with increasing dilution, and no creaming or precipitation was observed. The solubility of dispersion solution was measured and found that there were no differences between the innovator and the generics with regard to solubility.

The distribution and number of particles of the microemulsion (or emulsion) in the dispersion solution were determined. The contents of 1 capsule were dispersed in 10 mL of water, and the distribution and number of particles ($>0.5 \mu\text{m}$) were measured by the single-particle optical sizing (SPOS) method. As seen in Fig. 3a, the particle size of the oil-based formulation Product A was significantly larger than that of the other products. Whereas the particle number ($>0.5 \mu\text{m}$) of products B and E was almost the same, that of Products C and D was 5-fold larger, and that of Product F was 25-fold larger, than that of Product B, which correlates with their physicochemical appearances (Fig. 3b). These results indicated that the particle distribution of generic products in solution is wider than that of the innovator.

The mean diameter and distribution of the particles of the microemulsion (or emulsion) in the dispersion solution formed from the capsule contents were measured by dynamic light scattering (DLS) (Fig. 4, Table 2). The mean diameter of each product in water at a 5-fold dilution was as follows: Product B, 26.4 nm; E, 29.7 nm; C, 74.8 nm; D, 64.5 nm; and F, 79.2 nm. Thus, the mean diameter of the generics tended to be larger than that of the innovator. The same tendency was observed in 1st and 2nd Fluids for the dissolution test, and FaSSIF. When the capsule contents of the generics were dispersed