

ICP-AESとICP-MSの 一般試験法への新規収載

Newly addition of inductively coupled plasma - atomic emission spectrometry and - mass spectrometry to Supplemental I to the Japanese Pharmacopoeia sixteenth edition

昭和薬科大学 衛生化学研究室

小椋康光

YASUMITSU OGRA

Laboratory of Chemical Toxicology and Environmental Health, Showa Pharmaceutical University

はじめに

誘導結合プラズマ発光分光分析法(ICP-AES)および誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)は、誘導結合プラズマ(ICP: Inductively Coupled Plasma)を励起源またはイオン源として利用する元素分析法である。

ICPは、高周波誘導結合法により得られるアルゴンプラズマの高温の熱エネルギーを有する励起源である。このプラズマ中に試料溶液を噴霧導入すると、試料溶液中に含有される原子が励起され、このとき生じる原子発光スペクトルの波長および強度を測定して、元素の同定や定量分析を行う方法をICP発光分光分析法という。ICPは良い励起源であると同時に良いイオン化源でもあることから、検出器として質量分析計を用い、ICPによりイオン化された元素を m/z 値ごとに分離してイオンのピーク強度を測定することにより、定性分析および定量分析を行う方法を誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)という。

ICP-AESおよびICP-MSは、原薬または製剤中の無機不純物または共存元素に対する特異的な微量分析法として優れており、アルカリ金属、アルカリ土類金属、重金属だけでなく、医薬品の安全性を確保するために適切な管理が必要とされる多くの元素の定性および定量分析が可能である。また、多元素同時分析が可能なことから、無機元素のプロファイル分析を行い、およその濃度を知ることにより、原薬などの品質確保を図ることができる。

このような利点から、日本薬局方第16改正(JP16)で

は無機元素の分析として原子吸光光度法に加え、ICP-AESが参考情報として加えられた。しかしその後、医薬品の金属の規制を重金属としてではなく個別金属の規制として、国際的に調和を進めることとなり、ICH Q3Dとしてトピック化され、2年にわたって国際会議が持たれてきた。ICP-MSはICP-AESに比べ、さらに高感度であること、同位体希釈法といった試料中のマトリクスによる妨害を回避した測定が可能であることなどから、ICP-AESとともに米国薬局方(USP)および欧州薬局方(EP)ではすでに収載されている。そこで、局方の国際整合の観点から、ICP-MSを加えて、ICP-AESとともに一般試験法化することが望まれていた。

本稿では、JP16第一追補に「2.63 誘導結合プラズマ発光分光分析法及び誘導結合プラズマ質量分析法」として一般試験法に収載されたICP-MSの必要な装置要件、測定に際して求められる装置の最適化条件などを、USP、EPおよび日本工業規格ハンドブック(JIS)と比較し、考察した。

三局方間およびJISとの比較

分析結果に大きな影響を及ぼすと想定されるICP-MSに関する以下の項目について、JP16第一追補収載の「2.63 誘導結合プラズマ発光分光分析法及び誘導結合プラズマ質量分析法」(以下、JP)、USP、EPおよびJISの間で比較し、その結果を表1にまとめた。以下の1)~5)は装置構成要件を、6)~11)については装置の最適化や分析条件に関する項目をあげた。

ICP-AESとICP-MSの一般試験法への新規収載

表1 ICP-MSの分析上の特徴における三局方間およびJISとの比較

	USP	EP	JIS K 0133	JP
ICP-AESとの併記	Plasma spectrochemistryとして以下を併記 ICP-AES ICP-MS laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) イントロのみ	ICP-MS (ICP-AESとは別項目)	高周波プラズマ質量分析通則 ICP-MS MIP-MS装置概要のみ	ICP-AESおよびICP-MSとして併記
試料導入部	peristaltic pump self-aspiration pneumatic (concentric, cross flow) ultrasonic DIHEN etc.	peristaltic pump	送液ポンプ 自然吸引 同軸型 V溝型 クロスフロー型など 電気加熱 水素化物発生装置 超音波ネブライザーなど	型を限定しない
Hyphenation	GC, LC, laser ablation (LA)		LC, LA, キャピラリー電気泳動 (CE)	
質量分離部	quadrupole time-of-flight high-resolution sector field	quadrupole magnetic sector	四重極型 磁場二重収束型 飛行時間型 三次元四重極型	四重極型
コリジョン・リアクションセル	○	×	○	○
装置の最適化 2価イオン 生成比		3%以下 (CeかBa)	5%以下 (Ce) 10%以下 (Ba)	0.05以下 (Ce)
酸化物イオン 生成比		2%以下 (CeかBa)	3%以下 (Ce) 0.5%以下 (Ba)	0.03以下 (Ce)
感度		to obtain the highest possible number of count	1 μg/L溶液で、 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ cps (四重極型)、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ cps (磁場二重収束型)	1 μg/L溶液で、数万cps
検量線の直線性 (相関係数)	0.99以上	0.99以上 (ブランク含め5点)		0.99以上 (定量分析)
再現性	適当な間隔をおいて測定した再定量用標準液の測定値 ±10% (単一元素分析かつ 1 ppb)、±20% (複数元素分析 または < 1 ppb)	3%以下 (定量分析) 5%以下 (純度分析)		最低濃度の検量線用標準液を6回測定して、相対標準偏差が、 3%以下 (定量分析) 5%以下 (純度分析)
使用する水	18MΩ以上。この水に含まれる不純物が、測定対象元素に干渉しないことを確認しておく。		JIS K 0557に規定するA3またはA4。この水に含まれる不純物が、測定対象元素に干渉しないことを確認しておく。	ICP分析用水を用いる。なお、その水に含まれる不純物が分析対象元素に干渉しないことを確認しておく。ICP分析用水とは、電解質及びコロイド状の無機物並びに有機物を含まず、その導電率が $1 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ (25°C) 以下の水とする。

〈比較検討項目〉

- 1) ICP-AESとの併記について
- 2) 試料導入部構成
- 3) hyphenation
- 4) 質量分離部構成
- 5) 干渉回避装置の収載
- 6) 2価イオン生成比
- 7) 酸化物イオン生成比
- 8) 分析上必要とする感度
- 9) 分析上必要とする直線性
- 10) 分析上必要とする再現性
- 11) 分析に用いるべき水

(1) ICP-AESとの併記について

ICP-MSはイオン化源として、ICP-AESと同様に誘導結合プラズマを用いる点で、装置の試料導入部からプラズマに至る部分までほぼ同様の装置構成となっている。そ

のため、ICP-MSとICP-AESを併記している試験法もある。

USPにおいては、Plasma spectrochemistryという項目を立てており、ICP-MSはICP-AESと併記されている。特に試料調製、試料導入、標準液調製およびプラズマ生成の原理については、ICP-AESおよびICP-MSに共通する項目として記載されている。またEPについては、別項目としてあるもののICPの基本原理はICP-AESを参照するようにICP-MSの項目に記載がある。一方、JISでは高周波プラズマ質量分析通則という項目立てになっており、分光光度法を測定原理とするICP-AESとは分離されている。しかし、ICP-MSではイオン源となるプラズマにアルゴンプラズマを用いるが、窒素をプラズマ源とするマイクロ波誘導プラズマ質量分析装置 (MIP-MS) についても記載がある。

JPでは、すでに参考情報としてICP-AESが収載されていたことから、ICP-AESの記述にICP-MSに必要な内容を付記することにより、両法の比較や移行が容易に

るようにICP-AESとICP-MSを同一項目内に記載してある。またJISに記載のあるMIPについては、現状では装置そのものがあまり普及していないことに鑑み、記載はされていない。

(2) 試料導入部構成

USPでは代表的な試料導入方法であるペリスタルティクポンプや負圧吸引による導入方法について記載がある。ネブライザーの種類についても、同軸型やクロスフロー型が取り上げられている。さらに特殊な導入方法ともいえる超音波ネブライザーや高効率直接導入型ネブライザー(DIHEN)についての記載も認められる。EPについては、ペリスタルティクポンプを用いた方法が記載されているにとどまっている。JISについては、USPで取り上げられているよりもさらに詳細な方法が記述されている。水素化物発生装置や電気加熱による導入なども取り上げられている。

JPにおいては、試料導入方法には多彩な方法が存在すること、測定対象とする元素によって適切な導入方法が異なることなどから、特定の試料導入方法を取り上げることなく、多様な手法が利用できるような記載となっている。

(3) hyphenation

hyphenationとは、ICP-MSの試料導入部の前に、適切な試料の分離装置を結合させ、試料を化学形態、例えば分子量、電荷あるいは酸化還元状態などにに基づき分離した後、ICP-MSにより元素特異的に検出するいわゆるspeciationを行うための装置構成のことである。分離装置とICP-MSという独立した2つの機器を結合させるという意味でhyphenationという語が用いられている。

USPでは、ICP-MSに結合可能な分離手段として、ガスクロマトグラフィー(GC)、液体クロマトグラフィー(LC)およびレーザーアブレーション(LA)をあげている。EPについては、hyphenationの記載はない。JISにおいては、LC、LAの他にキャピラリー電気泳動(CE)をあげている。

JPにおいては、hyphenationあるいはspeciationに関しては手法として必ずしも確立したものがあるわけではないということを考慮し、記載はしていない。しかし、ヒ素をはじめとする類金属元素の毒性は、化学形態に著しく依存していることが知られているため、今後JPにおいてもspeciationに関して記述が必要になるかもしれない。

(4) 質量分離部構成

USPにおいては、最も汎用されている四重極型に加え、飛行時間型および高分解能の磁場二重収束型の記載がある。EPにおいては、四重極型および磁場二重収束型の記載がある。JISにおいては、四重極型、飛行時間型、磁場二重収束型に加えて、三次元四重極型(イオントラップ型)の記載がみられる。

JPにおいては、四重極型以外のICP-MSは極めて特殊でまれな使用に限定されること、新たに開発されるICP-MSはほぼ四重極型に限られることから、四重極型のみ記載としている。

(5) 干渉回避装置の収載

四重極型のICP-MSの最大の短所は、分子イオンや同重体イオンの干渉を受けることである。特に鉄、ヒ素、セレン、などの金属の測定には、プラズマ源であるアルゴンに起因する大きな干渉が生じる。この干渉を回避するため、現行のICP-MSにはコリジョン・リアクションセル(CRC)やダイナミックリアクションセル(DRC)といわれる干渉回避装置が搭載されている。

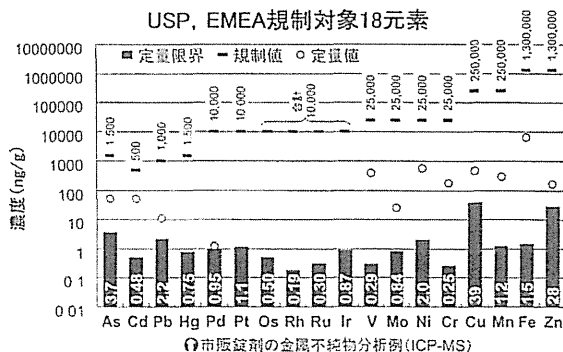
USPおよびJISでは干渉回避装置の記載があるが、EPでは記載がない。JPでは汎用型の四重極型ICP-MSを使

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
ICP-AES, ICP-MSによる重金属試験

【試験法設定、試験法バリデーション、実測】

- 豊富な経験により適切な前処理方法、分析手法をご提案
- クラス100のクリーンブース使用によるコンタミネーション制御で、信頼性の高いデータをご提供



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. 234

ICP-AESとICP-MSの一般試験法への新規記載

用することを想定しているため、干渉回避装置の記載が加えられている。

(6) 2価イオン生成比

2価イオン生成比は、次項の酸化物イオン生成比とともに、測定対象イオンの感度低下を評価する指標である。2価イオン生成比は、Ceなどを含む溶液を測定した際に、測定対象イオンである m/z 140に検出される Ce^+ に対して、 m/z 70に検出される Ce^{2+} のカウント比で表わされる。すなわち、本来 Ce^+ として検出されるべきイオンがプラズマ内で Ce^{2+} となる比率の限界を規定する指標である。

USPでは特に数値を規定していないが、EPでは試験用液としてCeあるいはBa溶液を用いたときに3%以下、JISではCe溶液で5%以下、Ba溶液で10%以下と規定している。JPでは、確認試験や純度試験を行う際に必要な値として、Ce溶液を用いたときに0.05以下と規定している。

(7) 酸化物イオン生成比

前項同様に測定対象イオンの感度低下を防ぐ指標となる。Ce溶液を用いた時に m/z 140の Ce^+ に対して、 m/z 156で検出される $^{140}Ce^{16}O^+$ の生成比で表す。

USPでは規定はないが、EPではCeあるいはBa溶液を用いた場合、2%以下、JISではCe溶液で3%以下、Ba溶液で0.5%以下と規定している。JPでは、確認試験や純度試験を行う際に必要な値として、Ce溶液を用いたときに0.03以下と規定している。

(8) 分析上必要とする感度

感度は、規定濃度の標準溶液を導入した時に得られるカウント数のことであるが、測定条件によりイオンの積算時間が異なることを考慮し、JISやJPでは、1秒あたりのカウント数で規定している。JISでは $1\mu\text{g/L}$ の溶液を測定した際に、四重極型のICP-MSでは $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ cps (counts per second)、二重収束型のICP-MSでは $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cpsと規定している。JPでは、測定対象となる元素ごとにイオン化効率など感度に与える影響が異なることから、 $1\mu\text{g/L}$ の溶液を測定した際に、数万cpsと規定している。USPでは規定はなく、EPではto obtain the highest possible number of countと規定している。

(9) 分析上必要とする直線性

各試験法では、標準溶液を用いて検量線を作成したと

きの直線性を相関係数で規定している。USPでは0.99以上、EPではブランクを含め5点の標準溶液で作成した際に0.99以上と規定している。JISでは規定はない。

JPでは、定量分析を実施する際には、0.99以上であることを規定している。

(10) 分析上必要とする再現性

USPにおいては、適当な間隔において測定した再定量用標準液の測定値が、単一の元素の分析であり、かつ標準液の濃度が 1ng/mL 以上である場合は $\pm 10\%$ 未満、複数の元素の同時分析または標準液の濃度が 1ng/mL 未満の場合は $\pm 20\%$ 未満と規定されている。EPでは定量分析の場合は3%以下、純度分析の場合は5%以下と規定している。JISには相当する規定が通則のなかには示されていない。

JPでは、最低濃度の検量線用標準液を6回測定して、相対標準偏差が、定量分析の場合は3%以下、純度分析の場合は5%以下と規定している。

(11) 分析に用いるべき水

USPでは、 $18M\Omega$ 以上であり、この水に含まれる不純物が、測定対象元素に干渉しないことを確認しておくことと規定されている。EPではICP-MSの項に水に関する記載はない。JISでは、JIS K 0557に規定するA3またはA4であり、この水に含まれる不純物が、測定対象元素に干渉しないことを確認しておくことと規定されている。

JPでは、水はICP分析用水を用いるとし、なお、その水に含まれる不純物が分析対象元素に干渉しないことを確認しておく必要があるとしている。ここで、ICP分析用水とは、電解質およびコロイド状の無機物ならびに有機物を含まず、その導電率が $1\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ (25°C) 以下の水とすると記載している。

まとめ

USP、EPおよびJISに記載されているICP-MSに関する試験法とJPに記載されたICP-MSの試験法との比較を行ったところ、JPは汎用型のICP-MSを使用した分析に焦点を絞り、最新の技術を取り入れて、実際の確認試験や純度試験に使用されることを想定した試験法となっているといえた。また国際調和を図る際にも、JPの試験法が汎用性や実効性において最も確実であると考えられた。

ヒト化モノクローナル抗体製剤の攪拌により誘導された凝集体の 相対光散乱強度の動的散乱による測定

遠藤素子, 新見伸吾[#]

Determination of the relative light scattering intensity of aggregates induced by stirring of humanized monoclonal antibody product using dynamic light scattering

Motoko Endo and Shingo Niimi[#]

To evaluate the usefulness of dynamic light scattering for estimation of the relative level of aggregates in the manufacturing process of monoclonal antibody substance and its final product, the particle sizes and relative light scattering intensities of monomer and aggregates induced by stirring of humanized monoclonal antibody product were determined by dynamic light scattering. The particle sizes of monomer and aggregates were approximately 5 and 500 nm, respectively. When aggregates and monomer were mixed at the ratio of 1 to 6, the relative light scattering intensity of aggregates was approximately 50%. These findings indicate the relative light scattering intensity of aggregates is approximately 7 times higher than that of monomer. Furthermore, these findings suggest that dynamic light scattering may be useful for the estimation of relative content of aggregates in the case that the relationship between the particle sizes of monomer and aggregates, and their relative light scattering intensities has been already examined.

Keywords: aggregates, monoclonal antibody product, dynamic light scattering

1. はじめに

タンパク質性医薬品において、目的物質由来不純物である凝集体は目的物質に比べて活性が低下するだけでなく免疫原性の原因となる可能性が懸念されている^{1, 2)}。例えば、IFN- β 製剤では凝集体が通常のマウス及びトランスジェニックマウスにおいて抗体産生を誘導することが知られている^{3, 5)}。また、臨床における抗体の産生頻度と凝集体の割合が相関することも示唆されている^{6, 7)}。したがって、その上限値は可能な限り低く設定し、厳密に管理する必要がある。

しかしながら、高濃度で抗体医薬品を産生すると、小胞体に存在しフォールディングに関与する分子シャペロンに対する抗体医薬品の割合が過剰になり、フォールディングされない抗体医薬品が生じる。その結果、フォールディングされない抗体医薬品より凝集体が誘導され、その割合は最大30%に達する場合がある^{8, 9)}。抗体医薬

品の精製工程には、プロテインAクロマトグラフィーで酸性溶液 (pH約3) による溶出工程が含まれる。このような極端なpHに抗体医薬品が曝露されると、抗体医薬品の表面及び内部の荷電性極性基 (グルタミン酸, アスパラギン酸, リシン, アルギニン, ヒスチジン) の荷電状態が変化する。これによりクーロン相互作用 (荷電粒子間に働く力) によるストレスがかかり、抗体医薬品が変性する。変性した抗体医薬品は凝集体が誘導されやすい¹⁰⁾。また、1回の投与量が多く一般的に数十mg/mLの高濃度で処方されるため、製剤化、保存状況下で凝集体がさらに増加する可能性がある¹¹⁾。

凝集体の測定には、サイズ排除クロマトグラフィー、超遠心分析法、場流動分画、動的散乱法、SDS-PAGE、マイクロ・フロー・イメージング等が用いられている^{12, 13)}。その中で、動的散乱法は不溶性の凝集体も含め最大約5 μ mの粒子径を有する凝集体を、吸光度の測定と同様な簡単な操作で測定可能であり、用いるサンプルの容量も約30 μ Lと微量で測定時間も約数分と短い。ダイナミックレンジは他の測定法に比べて広く、希釈せずに測定できるので、凝集体の解離を回避することができる。また、相対光散乱強度は粒子径の6乗に比例して増大するため¹⁴⁾、高感度の測定が可能である。しかし、

[#] To whom correspondence should be addressed:

Shingo Niimi; Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-9347 Fax: +81-3-3700-9084; E-mail: niimi@nihs.go.jp

定量的な関係が成り立つのは球状の場合でのみあり、形状が異なれば相対光散乱強度は異なるため定量的な測定はできない。

我々は抗体医薬品製剤をガラスバイアル中で攪拌することにより、大きな粒子径の凝集体を効果的に誘導できることを見出している¹⁵⁾。そこで同じ濃度の抗体医薬品製剤の単量体とこの方法で作製した凝集体の溶液を任意の比率で混合して動的光散乱で測定し、凝集体の含量と相対光散乱強度との関係について解析を行なった。

2. 方法

(1) サンプルの調製

ヒト化モノクローナル抗体製剤溶液を4度で保存した。実験開始時に25mMクエン酸ナトリウム (pH 6.0)、125mM塩化ナトリウムで0.1mg/mLに希釈した。

(2) 凝集体の誘導

直径1.4cmのガラスバイアルにサンプル1.2mLを入れ攪拌子を用いて250rpm、室温で2.5時間攪拌した。コントロールとして攪拌しないサンプルを同様に調製した。

(3) 単量体、凝集体、単量体と凝集体の混合物の測定

単量体、凝集体、単量体と凝集体の様々な比の混合物の粒子径 (nm) 及び相対光散乱強度 (%) はMalvern社のZetasizer Nano-ZSにより測定した。

(4) 統計解析

データはStudent's t-testを用いて解析した。P値が0.05以下の場合には統計的に有意と考えた。

3. 結果と考察

Fig. 1に単量体、凝集体及び凝集体と単量体の1対4の混合物の粒子径及び相対光散乱強度を示す。単量体は粒子径約5nmの位置に単一のピークを示した。一方、凝集体は粒子径約500nmの位置に単一のピークを示した。凝集体と単量体の1対4の混合物における凝集体及び単量体の相対光散乱強度はそれぞれ61%及び39%であった。

Fig. 2に様々な比率の凝集体と単量体混合液における単量体の相対光散乱強度を示す。凝集体に対する単量体の比率を増加させると、凝集体の相対光散乱強度は低下し、1対6の比率で約50%に低下した。

凝集体が球状と仮定して算出された粒子径に基づくと、凝集体の相対光散乱強度は単量体に比べて約 100^6 高い値が計算される¹⁴⁾。しかし、結果は約7倍であったことから、凝集体は球状ではないことが示唆された。攪拌により誘導されるモノクローナル抗体の凝集体の形状のマイクロ・フロー・イメージングによる解析では、細長い形状が観察されている¹⁶⁾。本実験で同様な攪拌により誘導された凝集体も細長い形状をしているため、相対光散乱強度が弱いものかもしれない。

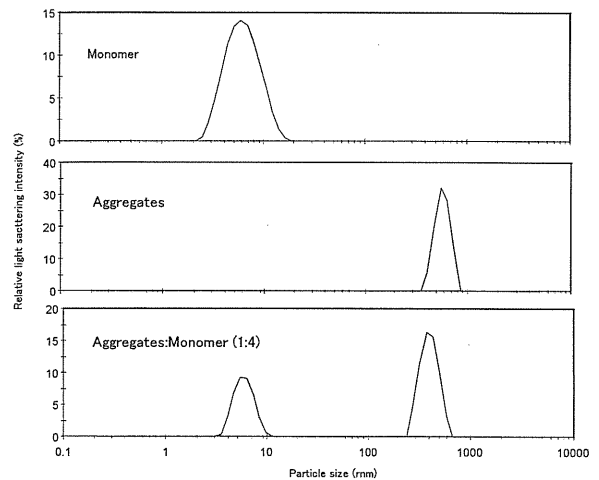


Fig. 1 Particle sizes and relative light scattering intensities of monomer, aggregates and mixture of aggregates and monomer (1:4) of humanized monoclonal antibody product

Humanized monoclonal product solution was transferred to glass vial and stirred at 250 rpm and ordinary temperature for 2.5 h. The solution containing aggregates was mixed with the solution containing monomer at the ratio of 1:4. The particle sizes and relative light scattering intensities of monomer, aggregates and mixture of aggregates and monomer were measured by dynamic light scattering. The data are representatives of 6 experiments.

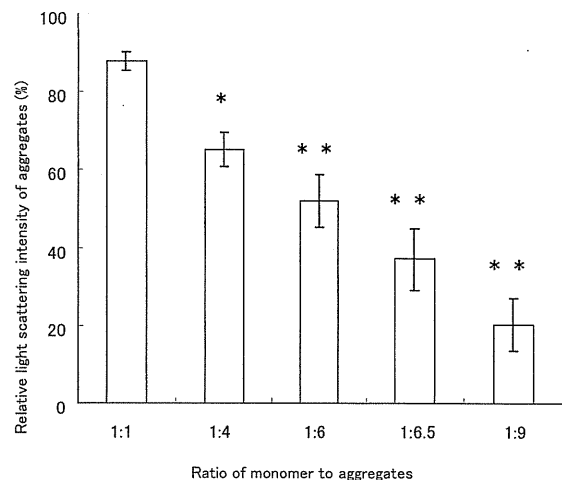


Fig. 2 Relative light scattering intensities of aggregates in the mixture of aggregates and monomer

The solution containing aggregates was mixed with the solution containing monomer at the different ratios. The relative light scattering intensities of aggregates were measured by dynamic light scattering. The data are expressed as the mean \pm S.D. of 6 experiments. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, compared with the immediate left value.

したがって、球状である場合を除き、濃度が未知の単量体と凝集体のタンパク質混合溶液において、動的光散乱により求めた粒子径と相対光散乱強度から凝集体の含量を推定することはできないことが再確認された。

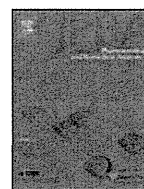
本研究で検討を行なった濃度範囲で単量体と凝集体の比率を変えて調製した混合溶液における凝集体の相対光散乱強度の検量線は、1種類の粒子径の凝集体しか存在しない場合、凝集体含量の推定への活用が考えられる。今後、抗体医薬品の工程内管理試験及び最終製品における凝集体含量の推定において、このような観点からの動的な光散乱の活用が期待される。

謝 辞

本研究は平成23年度厚生労働科学研究費補助金、研究課題名「医薬品の製造・品質管理の高度化と国際化に対応した日本薬局方の改正のための研究」、研究代表者川西徹の研究助成金によって実施された。

引用文献

- 1) Rosenberg, A.S.: *AAPS J*, **8** (3), E501-507 (2006)
- 2) Schellekens, H.: *Nephrol Dial Transplant*, **20**, Suppl 6, vi3-9 (2005)
- 3) van Beers, M.M., Sauerborn, M., Gilli, F., Brinks, V., Schellekens, H., Jiskoot, W.: *Pharm Res*, **27** (9) 1812-1824 (2010)
- 4) Rifkin, R.A. Maggio, E.T. Dike, S. Kerr, D.A. Levy, M.: *J Neuroimmune Pharmacol*, **6** (1), 158-162 (2011)
- 5) Seefeldt, M.B. Rosendahl, M.S. Cleland, J.L. Hesterberg, L.K.: *Curr Pharm Biotechnol*, **10** (4), 447-455 (2009)
- 6) van Beers, M.M., Sauerborn, M., Gilli, F., Hermeling, S., Brinks, V., Schellekens, H., Jiskoot, W.: *J Immunol Methods*, **352** (1-2), 32-37 (2010)
- 7) Bertolotto, A., Deisenhammer, F., Gallo, P., Solberg Sorensen, P.: *J Neurol*, **251** Suppl 2, II15-II24 (2004)
- 8) Kramarczyk, J.F., Kelley, B.D., Coffman, J.L.: *Biotechnol Bioeng*, **100** (4), 707-720 (2008)
- 9) Mahler, H.C., Friess, W., Grauschopf, U., Kiese, S.: *J Pharm Sci*, **98** (10), 2909-2934 (2009)
- 10) Shukla, A.A. Hubbard, B. Tressel, T. Guhan, S. Low, D.: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **848** (1), 28-39 (2007)
- 11) Treuheit, M.J., Kosky, A.A., Brems, D.N.: *Pharm Res*, **19** (4), 511-516 (2002)
- 12) den Engelsman, J., Garidel, P., Smulders, R., Koll, H., Smith, B., Bassarab, S., Seidl, A., Hainzl, O., Jiskoot, W.: *Pharm Res*, **28** (4), 920-933
- 13) Narhi, L.O., Jiang, Y., Cao, S., Benedek, K., Shnek, D.: *Curr Pharm Biotechnol*, **10** (4), 373-381 (2009)
- 14) Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes <http://www.malvern.com/common/downloads/campaign/MRK656-01.pdf>
- 15) Niimi, S.: *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku*, **129**, 55-60 (2011)
- 16) Joubert, M.K., Luo, Q., Nashed-Samuel, Y., Wypych, J., Narhi, L.O.: *J Biol Chem*, **286** (28), 25118-25133 (2011)



Non-destructive analysis of tulobuterol crystal reservoir-type transdermal tapes using near infrared spectroscopy and imaging

Tomoaki Sakamoto^{a,*}, Yasuto Fujimaki^b, Yasunori Takada^c, Kazunosuke Aida^c, Takaaki Terahara^c, Toru Kawanishi^a, Yukio Hiyama^a

^a Division of Drugs, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

^b Tokyo Metropolitan Industrial Technology Research Institute, 7-2-5, Katsuhika-ku, Tokyo 125-0062, Japan

^c TDDS Laboratory, Hisamitsu Pharmaceutical Co. Inc., 1-25-11, Kannondai, Tsukuba 305-0856, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 July 2012

Received in revised form 1 October 2012

Accepted 2 October 2012

Available online xxx

Keywords:

NIR spectroscopy

NIR imaging

Tulobuterol

Transdermal drug delivery system

Chemical imaging

Quality control

ABSTRACT

A non-destructive method for analyzing crystalline tulobuterol (TBR; a bronchodilator [β_2 -blocker]) in transdermal drug delivery system tapes with a crystal reservoir system was developed. A near infrared spectroscopy (NIRS) and a near infrared spectroscopic imaging (NIRI) were used to investigate the distribution of TBR crystals in transdermal tapes. The characteristic peak derived from a first overtone of secondary amine which appears based on crystal growth was used for the detection of crystals. NIR images were composed by the integrated values of that peak at each pixel. The time-course analysis by NIRS showed that the intensity of the peaks gradually increased, and the intensity reached a plateau between day 30 and day 42 after preparation of the model tapes. The authors observed the growth and distribution of TBR crystals in small areas in several types of matrices by NIRI time-course measurement. The authors also found that a macroscopic map can provide a rough distribution map of crystalline TBR in a whole matrix. In the case in which a tape distributed from the innovator was examined, the characteristic peak was also detected through a liner or a supporting board, by transmittance-reflectance NIR measurement.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Tulobuterol (TBR) transdermal tapes are applied for bronchial asthma as a bronchodilator (β_2 -blocker) [1,2]. TBR is a suitable substance for use in systemic transdermal drug delivery because it has high permeability into the skin's keratin layer [1]. The TBR transdermal drug delivery system (TDDS) has advantages such as elimination of the side effects "abdominal pain and appetite loss [3]" and maintenance of effective blood TBR levels for approximately 24 h [4]. The release rate of TBR from a matrix is controlled by the formation of TBR crystals [5]. In this system (called a "crystal reservoir system"), crystalline TBR should be distributed homogeneously in a matrix. The ratio between crystalline TBR and dissolved TBR is dependent on the solubility of TBR in a matrix. Dissolved TBR molecules are released from the matrix into the skin, and crystalline TBR dissolves in the matrix gradually. This mechanism contributes to the control of the release rate of TBR from a matrix into the skin. Thus, the crystallization of an active pharmaceutical ingredient (API) such as TBR is one of the critical quality factors for this

dosage form. A content uniformity of TBR in a transdermal tape is commonly checked by a destructive analytical method such as a chromatography. However, to check a homogeneous distribution of crystalline TBR using non-destructive method is difficult. Therefore, development of non-destructive analytical method to evaluate distribution of crystalline TBR is expected.

It is therefore necessary to characterize not only the in vitro release rate of TBR from a matrix, but also its crystallinity in dosage form in the matrix. A release test, which is generally carried out to evaluate transdermal pharmaceuticals, shows only one of several alternative physicochemical parameters, such as a release rate in a medium. This test would not provide information about the crystallinity of TBR. The direct observation of crystals by microscopy is also difficult because an opaque liner and a supporting board made from cotton or plastic generally cover the matrix of transdermal tapes.

The term of storage for a crystallization process is generally decided by information about crystallinity based on the development stage. Therefore, a non-destructive detection procedure for the identification of a crystalline API would help to secure the quality of TDDS tapes that have a crystal reservoir system. Several studies have dealt with the qualitative and/or quantitative evaluation of the crystallinity of chemicals using a near infrared

* Corresponding author. Tel.: +81 3 3700 1141x230; fax: +81 3 3707 6950.
E-mail address: tsakamot@nihs.go.jp (T. Sakamoto).

spectroscopy (NIRS) chemometric calculation [6–13]. However, a unique analytical procedure using characteristic peaks based on crystal growth has not been reported, to the our knowledge.

Caira et al. [17] analyzed the chemical structure of two types of forms of TBR using X-ray diffraction. They described a crystal packing arrangement of two types of forms: Form 1 had a monoclinic prism containing four trimers of TBR in a unit cell, and Form 2 had a triclinic block containing two trimers in a unit cell. They concluded that the van der Waals attraction interactions ($C-H \cdots \pi$) link trimers, and an intermolecular hydrogen bond ($-OH \cdots N$) links three TBR molecules, composing a trimer.

These conclusions concerning the crystallographic structure of polymorphs based on the stereochemical observations suggest that a trimer is composed of two molecules that have the same absolute configuration (S-, R-, R-) at the chiral center and a molecule that has the opposite absolute configuration (R-, S-, S-).

The authors previously conducted quality analyses of TBR TDDS tape using microscopic laser Raman spectroscopic mapping (MLRSM) and terahertz pulsed imaging (TPI) [14,15]. In those studies, Raman chemical maps of crystalline TBR in matrices were obtained based on a characteristic peak, and the authors observed lumps of crystals in the terahertz images based on the change in a refractive index of terahertz pulse in the tape. In the present study, the authors observed the characteristic peak from 6500 cm^{-1} to 6350 cm^{-1} based on the crystal growth of TBR using NIRS. A simple data treatment which is not multivariate data processing but an integrated value (a peak area) of the absorption from 6500 cm^{-1} to 6350 cm^{-1} was applied. This absorption consists of overlapped three absorptions, but the origin of these absorptions is only an overtone of secondary amine. Moreover, required accuracy for estimation of crystallization ratio of TBR allows applying a simple data processing. The authors also examined the applicability of a non-destructive analysis for the quality control of TDDS tapes using NIRS and the feasibility of a time-course analysis of the distribution of TBR crystals in matrices by near infrared spectroscopic imaging (NIRI).

2. Experimental

2.1. Instruments and measurement conditions

NIRS measurements were performed using MPA Fourier-transform NIR spectrometer (Bruker Optik, Ettlingen, Germany). Microscopic NIRI measurements were performed using Vertex70 Fourier-transform infrared (IR) spectrometer (Bruker Optik) equipped with Hyperion 2000 IR Microscope (Bruker Optik). The resolution, scan numbers and measurement range were set at 2 cm^{-1} , 64, and $8000\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ for NIR, and 16 cm^{-1} , 32, and $8000\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ for NIRI, respectively. For NIR macroscopic mapping, MPA Fourier-transform NIR spectrometer was used, and NIR light was focused on the stage. The tapes were moved by 3 mm for each measurement. A total of 81 spectra were used to compose the macroscopic map. To reduce the total measurement time, the resolution and scan numbers were set at 16 cm^{-1} and 8, respectively. The measurement areas were $3\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ for the NIRI and $27\text{ mm} \times 27\text{ mm}$ for the NIR macroscopic mapping. For the NIRI measurements, the liner was removed from the matrix. For the transmittance-reflectance measurements, a metallic board was put on the sample tapes.

2.2. Materials

Tulobuterol (TBR, purity > 99.0%, Fig. 1) was provided by Hisamitsu Pharmaceutical Co. (Tokyo, Japan). 2-Ethylhexyl acrylate vinylpyrrolidone copolymer, isopropyl myristate, polyisobutylene,

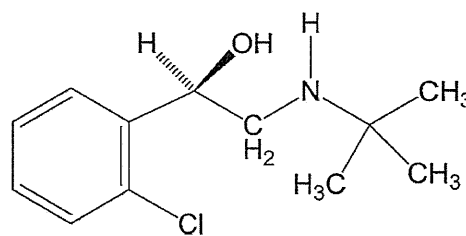


Fig. 1. Chemical structure of tulobuterol (TBR).

polybutene, and lipocyclic petroleum resin for matrices of the model tapes were used as Japanese Pharmaceutical Excipients (JPE)-quality products. Hokunalin[®] Tape (1 mg and 2 mg) (Maruho Co., Osaka, Japan) and other TBR tape products were purchased from a commercial source. Carbon tetrachloride as a reagent grade was purchased from commercial source.

2.3. Preparation of model tapes

The model tapes were prepared by the TDDS Laboratory (Hisamitsu Pharmaceutical Co.). To identify lumps of TBR crystals in the matrix, the authors prepared two types of matrix for model tape: a rubber matrix and an acrylic matrix. These two kinds of matrix are commonly used for a transdermal tape. In order to analyze a commercial tape which is made from an acrylic or a rubber matrix, model tapes made from these matrices should be prepared. TBR and other ingredients were added in a mortar and thoroughly stirred. The mixture was spread on a liner, and residual solvents were removed by drying. The matrix was adjusted to a constant thickness (approximately $50\text{ }\mu\text{m}$) and pasted onto a supporting board. A polyethylene terephthalate (PET) film was selected for both the liner and the supporting board of the model tapes. Each sample was cut to a size of 36-mm dia. TBR crystals in the model tapes were generated by leaving the samples to stand for one week (for the rubber matrix) or one month (for the acrylic matrix).

Model tapes containing 0% (w/w) (R-0, placebo) or 10% (w/w) (R-10) of TBR in the rubber matrix (consisting of polyisobutylene, polybutene, and lipocyclic petroleum resin) were prepared. The authors observed small white crystals in all areas of the matrix of the R-10 sample. Model tapes containing 0% (w/w) (A-0, placebo), 20% (w/w) (A-20) or 30% (w/w) (A-30) of TBR in the acrylic matrix (composed of an acrylic adhesive polymer and isopropyl myristate) were prepared. Due to the solubility of TBR, higher TBR concentrations were necessary to generate crystals in the acrylic matrix than in the rubber matrix.

2.4. Data treatment

The spectral data was treated using the software OPUS 6.5 (Bruker Optik). Standard normal variate (SNV) normalization and second derivative of spectra were carried out as a data pre-processing. NIR chemical images and maps are constructed using integrated values of absorption from 6500 cm^{-1} to 6350 cm^{-1} . Integrated values were calculated using the attached software OPUS 6.5.

2.5. Preparation of TBR carbon tetrachloride solution and NIR measurement

The authors prepared 0.5% (w/v) and 10% (w/v) TBR carbon tetrachloride solutions. A suitable volume of each solution was put in a cuvette and measured by a transmittance NIR spectrometer using carbon tetrachloride as a reference. The measurement range,

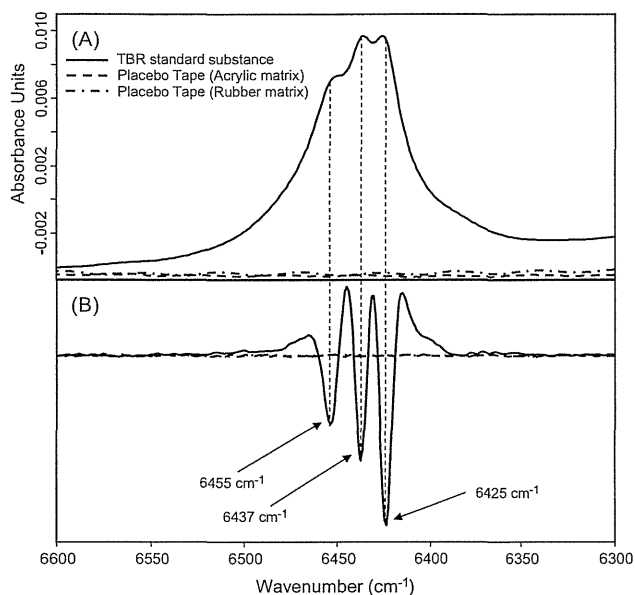


Fig. 2. NIR spectra of TBR reference standard and placebo tapes (TBR 0%). (A) Base-line correlated NIR spectrum and (B) second derivative NIR spectrum.

resolution, and scan number were set at $8000\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$, 2 cm^{-1} , and 64, respectively.

2.6. Preparation of amorphous form of TBR

To make an amorphous TBR, a portion of crystalline TBR (m.p.: $90.4\text{ }^{\circ}\text{C}$) on a glass dish was put into a dryer (the temperature was set at $100\text{ }^{\circ}\text{C}$). After crystalline TBR was melted, heating was stopped. And the glass dish was left for a while under an ambient temperature. A melting point of melted TBR was checked by a differential scanning calorimetry (DSC) ($82.6\text{ }^{\circ}\text{C}$).

3. Results and discussion

3.1. Characteristic absorption based on the crystallization of TBR

Fig. 2 shows the base-line correlated NIR spectrum and the second derivative NIR spectrum of pure TBR and the placebo model tapes (rubber matrix R-0 and acrylic matrix A-0). The characteristic peak of TBR was observed from 6500 cm^{-1} to 6350 cm^{-1} , and there was no interfering peak around it. The second derivative absorption of the peak was divided into three sharp peaks at 6454 cm^{-1} , 6437 cm^{-1} and 6423 cm^{-1} . The second derivative peak which had the strongest intensity, was observed at 6423 cm^{-1} .

The offset spectra and the second derivative spectra obtained from the A-30, A-20, and R-10 model tapes are shown in Fig. 3. The TBR characteristic peak from 6500 cm^{-1} to 6370 cm^{-1} was detected in the A-30 model tape, which had white crystals in the matrix. The three sharp peaks at 6455 cm^{-1} , 6437 cm^{-1} and 6425 cm^{-1} were also observed on the second derivative spectrum. These peaks correspond to pure TBR. Although the absorption from 6500 cm^{-1} to 6350 cm^{-1} was also observed on the spectrum obtained from the R-10 model tape (which contained white crystals), the peak shape of R-10 was a bit different from that of A-30. There are three peaks on the second derivative spectrum of first overtones of N–H, and their peak positions were observed at 6448 cm^{-1} , 6439 cm^{-1} and 6415 cm^{-1} . The peak positions (apart from the center peak) were shifted to 7 cm^{-1} or 10 cm^{-1} lower peak positions.

The unique absorption was not detected on the spectrum obtained from the A-20 model tape (which did not contain white

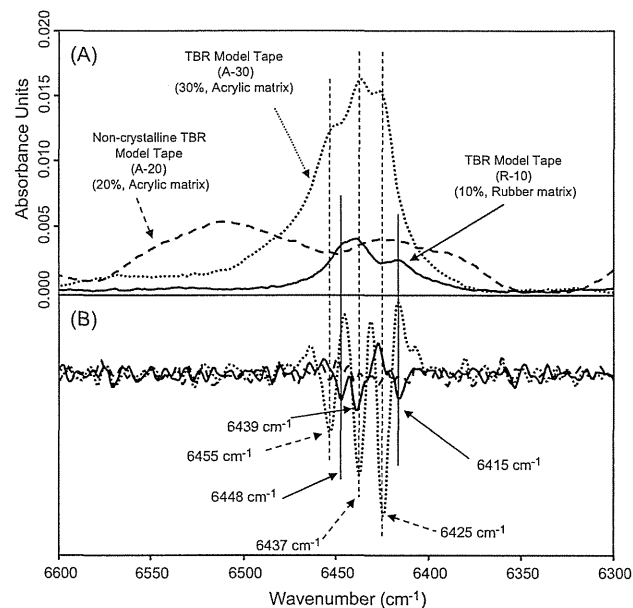


Fig. 3. NIR spectra obtained from the A-30, A-20, and R-10 model tapes. (A) Baseline correlated spectra and (B) second derivative spectra.

crystals in the matrix). TBR molecules in the A-20 matrix may remain in an amorphous form and/or at a very early stage of their crystallization process. The authors suspect that the broad waveform observed on the spectrum obtained from A-20 (Fig. 3) is a fringe. These results suggest that the peak from 6500 cm^{-1} to 6350 cm^{-1} is uniquely produced by the crystallization of TBR. The NIR absorptions of TBR that are assigned from a group vibration and a chemical structure are shown in Table 1.

3.2. Vibrational spectroscopic understanding of the characteristic absorption of TBR crystals

Fig. 4 shows the vector normalized and second derivative spectra obtained from the TBR carbon tetrachloride (CCl_4) solutions at 0.5% (w/v) and 10.0% (w/v). In the spectrum obtained from the 0.5%

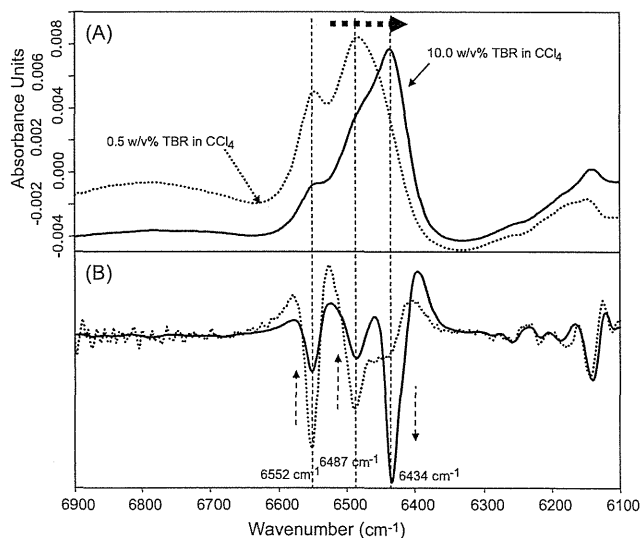


Fig. 4. NIR spectra obtained from the two TBR carbon tetrachloride (CCl_4) solutions. (A) Base line correlated spectra and (B) second derivative spectra.

Table 1
Wavenumbers of TBR (tulobuterol).

9000	8000	7000	6000	5000	4000 (cm ⁻¹)
← 2 nd Overtone region →		← 1 st Overtone region →		← Combination →	
→ 3 rd Overtone region					
CH ₃		C-H Comb.		C-H, Ar-C-H	
O-H Comb.					
8800 cm ⁻¹ : CH (aromatic) 2 nd overtone		7176 cm ⁻¹ : CH ₂ comb., 2xCH str. + CH bend		5990 cm ⁻¹ : CH ₃ 1 st overtone (anti-sym. Stret.)	
8418 cm ⁻¹ : CH ₂ sym. Stret., 2 nd overtone		7092 cm ⁻¹ : OH (free), 1 st overtone		5922 cm ⁻¹ : CH (aromatic), 1 st overtone	
		6487 cm ⁻¹ : NH (sec) first overtone		5757 cm ⁻¹ : CH ₂ , 1 st overtone (anti-sym. Stret.)	
		6425 cm ⁻¹ : NH (sec) first overtone		5668 cm ⁻¹ : CH, 1 st overtone	
				5650 cm ⁻¹ : CH, 1 st overtone	
				4395 cm ⁻¹ : CH ₂ comb., CH stret. + CH bend	
				4330 cm ⁻¹ : CH ₂ comb., CH stret. + CH bend	

(w/v) solution, the two characteristic absorptions at 6552 cm⁻¹ and 6487 cm⁻¹ and the shoulder-like weak absorption at 6434 cm⁻¹ were observed. In the spectra of 10.0% (w/v), the intensities of the absorptions at 6551 cm⁻¹ and 6487 cm⁻¹ were reduced, depending on the TBR concentration. Conversely, the intensity of the absorption at 6432 cm⁻¹ increased depending on the TBR concentration. It was reported that a first overtone of secondary amine obtained from a dilute CCl₄ solution of butyl amine was observed at 6530 cm⁻¹ [16]. A stretching of a secondary amine of each molecule of butyl amine would not be affected by an inter-molecular force from near molecules in a dilute solution. In addition, several examples of first overtone of N-H for a secondary amine (R-NH-R) in CCl₄ were reported from 6471 cm⁻¹ to 6844 cm⁻¹ [16]. The absorption at 6552 cm⁻¹ observed in the present study is included in the reported wavenumber range based on the functional group. The positions of the three second derivative peaks obtained from crystalline TBR were observed at 10 cm⁻¹ or 100 cm⁻¹ lower peak positions compared to the corresponding peak positions obtained from the TBR CCl₄ solution.

Fig. 5 shows the time-course of peak intensities during the re-crystallization process after the melting of the TBR crystals. The spectra which were obtained from the samples in the early stage (less than 1 h), middle stage (from 1 h to 3 h), later stage (from 3 h to 24 h) and final stage (after 24 h) of the re-crystallization process are shown in the figure. The spectra obtained from the sample which contained no lumps of crystals that could be confirmed visually (0–40 min after melting and cooling) represent the wide and round-top peaks.

In addition, the peak widths and the peak intensities were getting narrow and strong with the passage of time, and the shape of the top of the absorptions became similar to that of the TBR standard substance. Although the three sharp peaks in the second derivative spectrum were not observed on the spectrum obtained from the sample within 1 h after melting, these peaks appeared at 3 h and the intensities became strong with the passage of time.

During the measurement, white crystals from the colorless lumps of amorphous TBR were observed in the vial. The authors suspect that the intensity of a first overtone of N–H stretching was getting stronger with the passage of time because an orientation of TBR molecules was arranged by means of re-construction of the

crystalline structure. The N–H functional group in TBR will form an inter-molecular hydrogen bonding network between neighbor TBR molecules. A first overtone of N–H stretching derived from hydrogen bonding-formed secondary amine in TBR crystals was shifted to lower wavenumbers compared to free N–H stretching.

Moreover, the intensity of the second derivative peak at 6508 cm⁻¹ was stronger and reached its maximum in the later stage, and then the intensity became smaller in the final stage of measurement. (The spectrum is represented in the enlarged window in Fig. 5B.) The spectra which were obtained from amorphous TBR are not shown here, in order to represent the other spectra clearly (the characteristic absorbance was not observed in the spectrum obtained from amorphous TBR). The intensity of the second

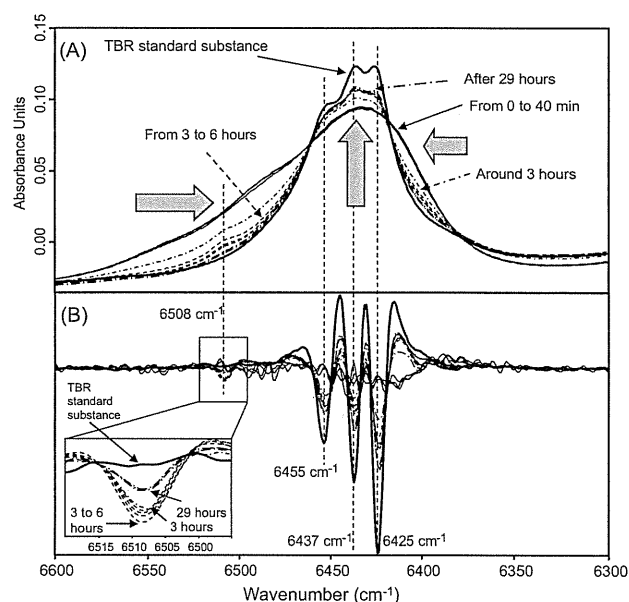


Fig. 5. Time-dependent change of peak intensity and shape during the re-crystallization process of TBR. (A) Base line correlated spectra and (B) second derivative spectra.

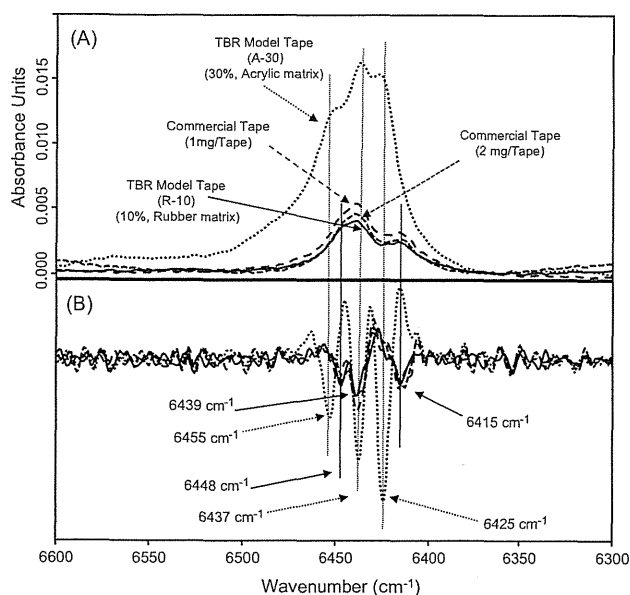


Fig. 6. NIR spectra obtained from the commercial tapes (1 mg/tape and 2 mg/tape) and the model tapes (A-30 and R-10). (A) Base line correlated spectra and (B) second derivative spectra.

derivative peak observed after 3 h at 6508 cm^{-1} increased at 6 h, but its intensity after 29 h was decreased. The intensity of that peak obtained from pure TBR disappeared.

The melting point of the small lumps of crystals in the early stage of re-crystallization was 82.6°C (measured by differential scanning calorimetry). The measured melting point was the same as the melting point of a polymorph of TBR (a less stable Form 2) [17]. The melting point of the crystals in the final stage of re-crystallization was 90.4°C , and that temperature is the same as the melting point of the pure TBR used as the standard substance for this study (a stable Form 1). This conclusion would support our experimental results and also suggest that the crystalline form of TBR would be transformed from amorphous to Form 1 via Form 2. The authors believe that the absorption at 6508 cm^{-1} would be characteristically detected in Form 2, and then it would disappear when the crystals transform to Form 1.

3.3. Detection of TBR crystals in the commercial tapes

The NIR spectra obtained from the commercial tapes are shown in Fig. 6. The N–H overlapped absorption from 6500 cm^{-1} to 6350 cm^{-1} was observed. The narrow broken line and the wide broken line represent the spectra obtained from the 2 mg-tape and 1 mg-tape, respectively. The peak intensities from both tapes are almost the same, because several different TBR contents of the tapes were made by cutting several different sizes from one large sheet (i.e., from one batch). The dotted line and the solid line represent the spectra obtained from the model tapes A-30 and R-10, respectively. The three peak positions of the second derivative spectra of the two types of commercial tape correspond to R-10 but not with A-30.

A comparison of the growth process of TBR crystals in two types of matrix measured by MLRSM was reported [12]. Although further study would be necessary to determine the details of the differences in the peak position between two types of matrix, an interaction such as hydrogen-bonding networks between the TBR crystal and each matrix would differ, and this difference may affect the peak position derived from the N–H first overtone.

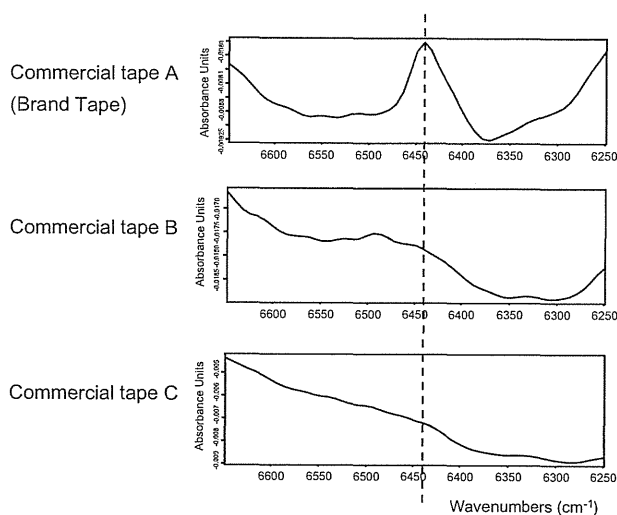


Fig. 7. NIR spectra obtained from the three kinds of commercial tapes (brand and other two commercial products).

In the present study, the detection of TBR crystals without removal of a liner that protects the adhesive side of the tape was possible by conducting transmittance-reflectance NIR measurements. Other commercial tapes which are used for the same clinical purpose but distributed by different manufacturers were also measured. Fig. 7 shows the NIR spectra obtained from these commercial tapes. The top of the three spectra represents the spectrum obtained from the brand product. The NIR spectra obtained from the other commercial tapes (which were from two different manufacturers) are also shown in the figure and no characteristic absorbance from 6500 cm^{-1} to 6350 cm^{-1} was observed. These results suggest that only the brand tape contains crystalline TBR in a matrix.

3.4. Time-dependent changes in the distribution of crystalline TBR in the model tapes

The absorbance intensities at 6340 cm^{-1} on days 3, 10, 17, 30, 42, 49 and 63 after the preparation were examined. Fig. 8(A) shows each NIR spectrum. The intensities on day 3 were almost the same as a fringe level, but they were significantly increased after day 10. After day 42, the intensities of absorbance reached a plateau. These results suggest that the crystallization term of TBR of this model tape is from 30 days to 40 days after the preparation. The correlation between absorption intensities and the elapsed days is shown in Fig. 8(B). The model tapes No. 1 to No. 3 were cut from one large sheet of the model tape. The relative intensities represent the ratio of the average intensity of three measurements of each model tape to that of a reference model tape which had been stored for about 6 months. Model tape No. 1 demonstrated strong intensities throughout the measurement term compared to the other tapes. The spot of NIR light is approximately 15 mm in dia., and the model tapes are each 36 mm in dia. Therefore, the authors used the average intensity obtained from three different measurement areas to cover the entire areas of the model tapes for calculation. This means that the crystallinity of TBR in each tape (each piece) would differ, and suggests that heterogeneity of distribution of TBR crystals would occur in the large sheet of model tape. The results suggest that NIRS is applicable for non-destructive quantitative predictions for an end-point of a crystallization process, and/or at a development stage.

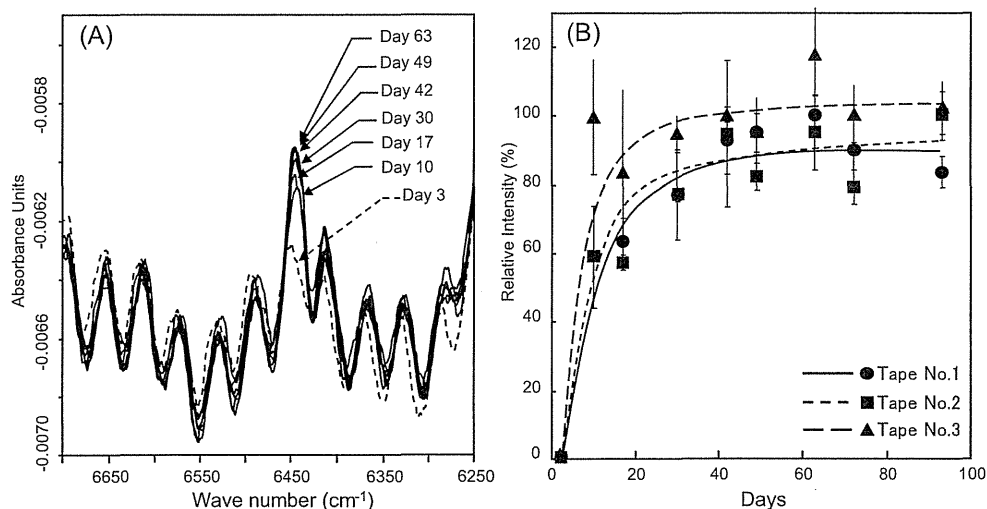


Fig. 8. (A) and (B) The time-course of peak intensities during the re-crystallization process after the melting of the TBR crystals, from day 3 to day 63 after the melting.

3.5. Chemical imaging of TBR crystals in matrix and time-course observations

Fig. 9 provides the NIR chemical images of the matrix of a model tape (R-10) and the corresponding area of the micro-photograph. The distribution of strong intensities based on a first overtone of secondary amine corresponded to the distribution of crystalline TBR which is observed in the micro-photograph.

Fig. 10 represents the NIR chemical images of the model tape (R-10) on days 2, 17, 23 and 37 in a 3-mm × 3-mm area after the preparation. Although lumps of TBR crystals that were detected using NIRI were not observed in the model tape 2 days after the preparation, two spots which are the origin of the lumps of TBR crystals were identified on day 17. These spots became larger with the passage of time. A total of nine lumps of TBR crystals were observed in this measurement area on day 37. Thus, a time-dependent aspect of crystallization was observed.

The authors also observed a crystal lump formation process in a rubber matrix, using MLRSM [12]. The results showed that TBR crystals formed many small lumps, and these lumps grew independently in the matrices of the model tapes. The results of the present study support those observations.

The combination of the visible identification of crystals in a matrix and chemical information based on NIR spectrometry using the absorption from 6500 cm⁻¹ to 6350 cm⁻¹ of crystalline TBR offers a highly specific measurement approach.

3.6. Rapid measurement of TBR crystals distribution in the entire area of a transdermal tape by microscopic mapping

The authors used macroscopic mapping to measurements of four pieces of the model tapes obtained from one batch was performed. A heterogeneous distribution of TBR crystals was observed in the certain tapes (Fig. 11). Notably, only one lump of crystals was found in the tape No. 1. However, lumps of crystals were distributed over approximately a half of the area of the matrix of the tape No. 4. According to the chemical maps of lumps of TBR crystals in the tapes, single lumps of crystals and small groups of several lumps of crystals were observed. One tape contained numerous lumps of TBR crystals that looked like a mountain chain, based on a rough image with 3-mm spatial resolution. These macroscopic maps were all obtained using the same intensity range. Thus, not only a distribution of TBR crystals but also a rough quantity of it TBR crystals can be estimated.

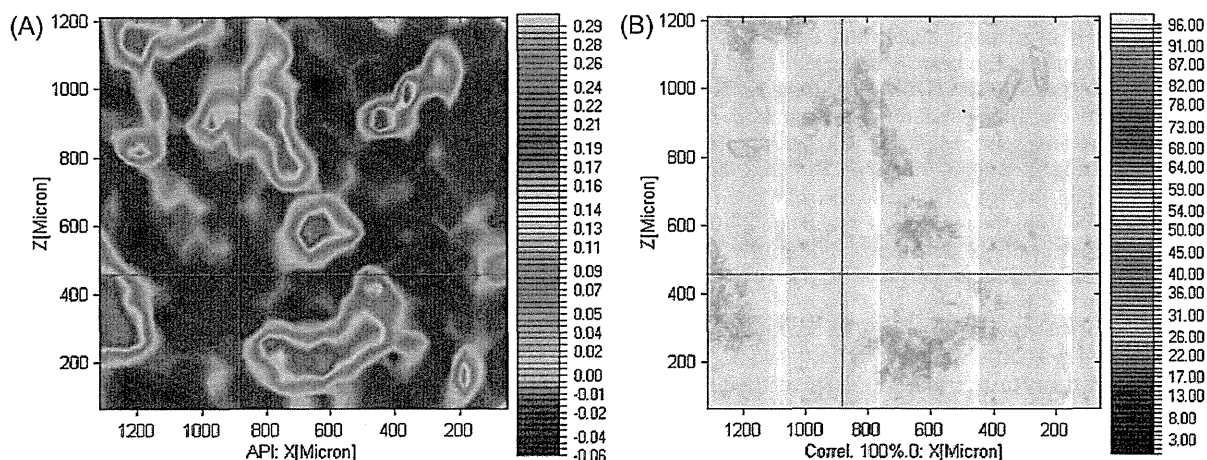


Fig. 9. NIR chemical image (A) and micro-photograph (B) of an R-10 model tape.

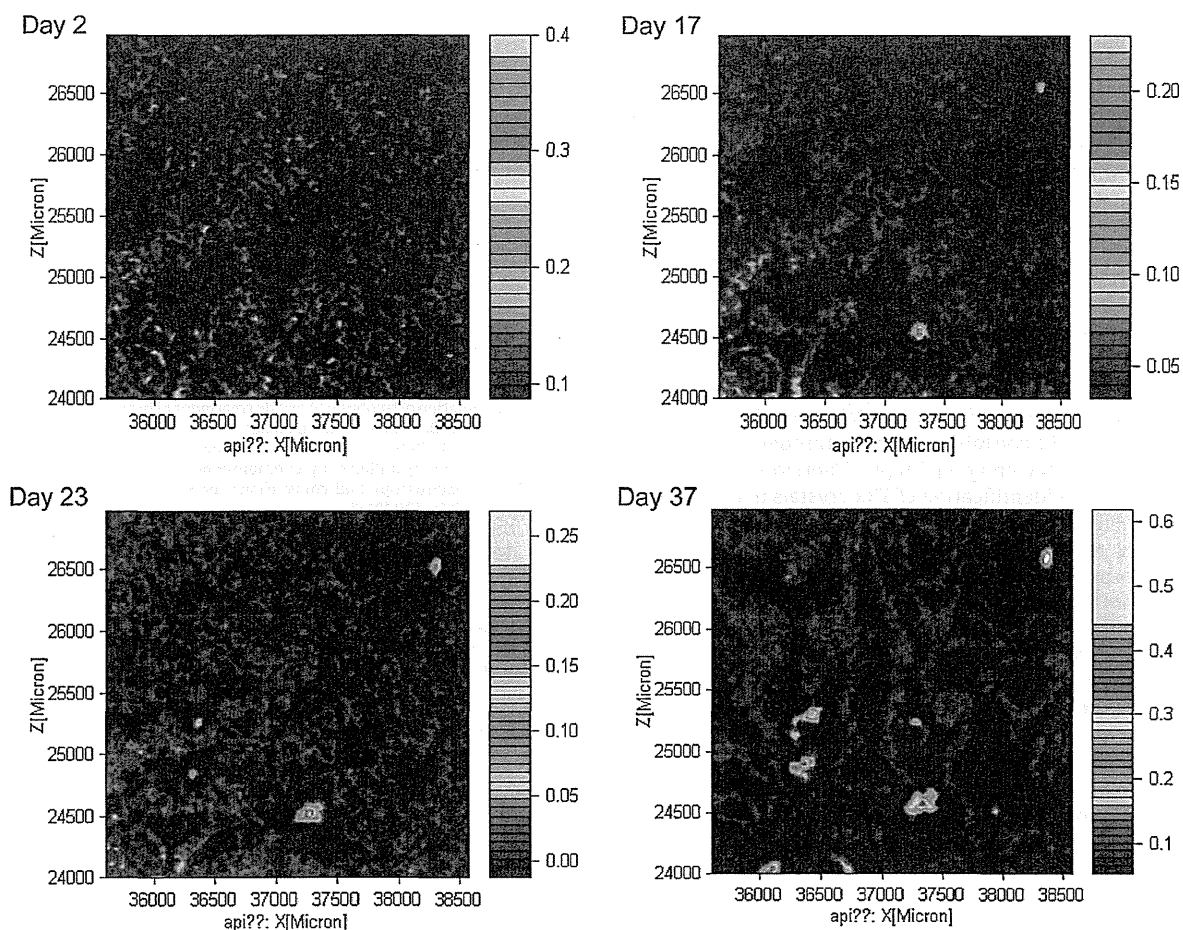


Fig. 10. Generation of TBR crystals in the model tape.

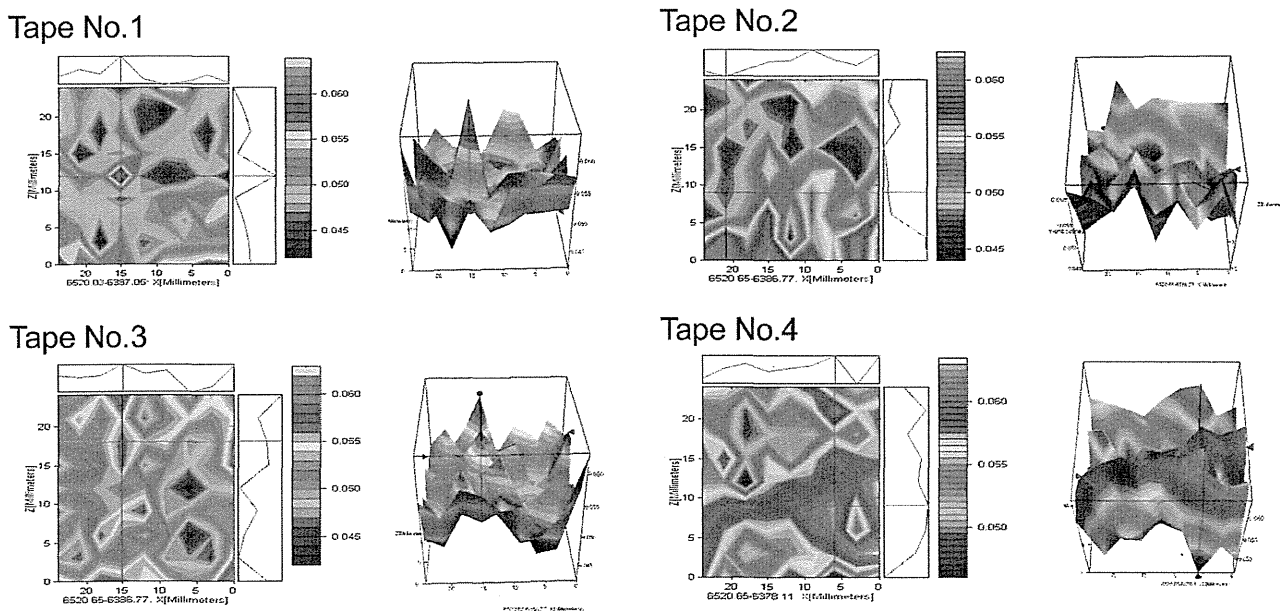


Fig. 11. NIR macroscopic maps of four commercial tapes obtained from the same batch.

Heterogeneity of the distribution and contents of TBR crystals in these model tapes was revealed by this approach, even though the model tapes were obtained from the same batch. If a heterogeneous distribution of TBR crystals will occur in each commercial tape, the pharmacological effects of the tapes may differ. The NIR spectroscopic and imaging techniques described herein will be useful to evaluate the homogeneity of TBR crystals in a matrix at the pharmaceutical development stage and/or in quality-control procedures.

4. Conclusion

The authors developed a method for determining the characteristics of TBR crystals in TDDS tapes using transmittance-reflectance NIR measurements. This method could be useful for quality evaluation for TBR TDDS tapes that have a crystal reservoir system. It is difficult to observe TBR crystals in a matrix through a supporting board and/or a liner in commercial tapes. Therefore, our method will contribute to the identification of TBR crystals in tapes which are in storage and/or on the market.

In addition, time-course measurements based on the characteristic absorption of crystalline TBR will also provide useful information for the estimation of an end-point of a crystallization process at a development stage, and for studies of crystallization mechanisms of an API in a matrix. The macroscopic mapping technique is advantageous for rapid analyses of the distribution of crystalline TBR, although only rough maps will be obtained. The authors obtained NIR measurements using a wavenumber range from 8000 cm^{-1} to 4000 cm^{-1} . But if the authors use a narrower wavenumber range which include the characteristic absorbance of a crystalline API to acquire a chemical maps, the authors would know a distribution of crystalline API in a matrix within a few minutes. A near infrared spectroscopy and imaging technique is useful as a non-destructive evaluation tool to secure the quality of TDDS pharmaceuticals.

Acknowledgements

This study was supported in part by a research grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (H20-iyaku-ippan-004).

The authors thank Dr. Yukio Aso and Dr. Tamaki Miyazaki, Division of Drugs, National Institute of Health Sciences, for their kind cooperation regarding the polymorphs of TBR and the differential scanning calorimetry measurements. The authors thank Mr. Daisuke Sasakura, Mr. Tomoyuki Matsuura and Mr. Tsuyoshi Miura, Bruker Optics K.K., for their kind assistance in the measurement of TDDS tapes using the NIR microscopic imaging system.

References

- [1] T. Uematsu, M. Nakano, K. Kosuge, M. Kanamaru, M. Nakashima, The pharmacokinetics of the beta 2-adrenoceptor agonist, tulobuterol given transdermally and by inhalation, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 44 (1993) 361–364.
- [2] T. Horiguchi, R. Kondo, J. Miyazaki, K. Fukumoto, H. Torigoe, Clinical evaluation of a transdermal therapeutic system of β_2 -agonist tulobuterol in patients with mild or moderate persistent bronchial asthma, *Arzneimittelforschung* 54 (2004) 280–285.
- [3] Y. Iikura, H. Uchiyama, K. Akimoto, M. Ebisawa, N. Sakaguchi, T. Tsubaki, H. Ishizu, H. Kabayama, K. Yagi, K. Miura, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tulobuterol patch, HN-078, in childhood asthma, *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 74 (1995) 147–151.
- [4] T. Horiguchi, R. Kondo, J. Miyazaki, H. Torigoe, S. Tachikawa, Clinical evaluation of tulobuterol patch in patients with mild or moderate persistent bronchial asthma—effects of long-term treatment on airway inflammation and hyper-sensitivity, *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 42 (2004) 132–137 (in Japanese).
- [5] H. Kato, O. Nagata, M. Yamazaki, T. Suzuki, Y. Nakano, Development of transdermal formulation of tulobuterol for the treatment of bronchial asthma, *Yakugaku Zasshi* 122 (2002) 57–69 (in Japanese).
- [6] M. Otsuka, F. Kato, Y. Matsuda, Comparative evaluation of the degree of indomethacin crystallinity by chemoinformatical Fourier-transformed near-infrared spectroscopy and conventional powder X-ray diffractometry, *AAPS PharmSci.* 2 (1) (2000) E9.
- [7] M. Otsuka, F. Kato, Y. Matsuda, Determination of indomethacin polymorphic contents by chemometric near-infrared spectroscopy and conventional powder X-ray, *Analyst* 126 (2001) 1578–1582.
- [8] A. Gambás, I. Antai, P. Szabó-Révész, S. Marton, I. Erős, Quantitative determination of crystallinity of alpha-lactose monohydrate by near infrared spectroscopy (NIRS), *Int. J. Pharm.* 256 (2003) 25–32.
- [9] S.J. Bai, M. Rani, R. Suryanarayanan, J.F. Carpenter, R. Nayar, M.C. Manning, Quantification of glycine crystallinity by near-infrared (NIR) spectroscopy, *J. Pharm. Sci.* 93 (2004) 2439–2447.
- [10] M. Savolainen, A. Heinz, C. Strachan, K.C. Gordon, J. Yliruusi, T. Rades, N. Sandler, Screening for differences in the amorphous state of indomethacin using multivariate visualization, *Eur. J. Pharm. Sci.* 30 (2007) 113–123.
- [11] M. Allesø, S. Velaga, A. Alhalaweh, C. Cornett, M.A. Rasmussen, F. van den Berg, H.L. de Diege, J. Rantanen, Near-infrared spectroscopy for cocystal screening. A comparative study with Raman spectroscopy, *Anal. Chem.* 80 (2008) 7755–7764.
- [12] T.R. De Beer, P. Vercurysse, A. Burggraef, T. Quinten, J. Ouyang, X. Zhang, C. Vervaeet, J.P. Remon, W.R. Baeyens, In-line and real-time process monitoring of a freeze drying process using Raman and NIR spectroscopy as complementary process analytical technology (PAT) tools, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 3430–3446.
- [13] B. Connolly, T.W. Patapoff, Y.J. Wang, J.M. Moore, T.J. Kamerzell, Vibrational spectroscopy and chemometrics to characterize and quantify trehalose crystallization, *Anal. Biochem.* 399 (2010) 48–57.
- [14] T. Sakamoto, T. Matsubara, D. Sasakura, Y. Takada, Y. Fujimaki, K. Aida, T. Miura, T. Terahara, N. Higo, T. Kawanishi, Y. Hiyama, Chemical mapping of tulobuterol in transdermal tapes using microscopic laser Raman spectroscopy, *Pharmazie* 64 (2009) 166–171.
- [15] T. Sakamoto, A. Portieri, P.F. Taday, Y. Takada, D. Sasakura, K. Aida, T. Matsubara, T. Miura, T. Terahara, D.D. Arnone, T. Kawanishi, Y. Hiyama, Detection of tulobuterol crystal in transdermal patches using terahertz pulsed spectroscopy and imaging, *Pharmazie* 64 (2009) 361–365.
- [16] J. Workman Jr., L. Weyer, *Practical Guide to Interpretive Near-Infrared Spectroscopy*, CRC Press, Florida, 2007.
- [17] M.R. Caira, S.A. Bourne, C.L. Oliver, Thermal and structural characterization of two polymorphs of the bronchodilator tulobuterol, *J. Therm. Anal. Calorim.* 77 (2004) 597–605.



バイオ後続品／バイオシミラーに関する 国内外の規制動向と品質評価

Current international regulatory trends and quality evaluation of follow-on biologics/biosimilars

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

石井明子, 原園 景, 川崎ナナ

AKIKO ISHII, AKIRA HARAZONO, NANA KAWASAKI

Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences

心が高まっている。

はじめに

1985年ヒトインスリンが承認されて四半世紀が経過し、わが国で承認された遺伝子組換え／培養細胞由来タンパク質・ペプチド医薬品の数は、80品目を超えるまでに増えている。一方で、バイオ医薬品の薬価は高く設定されていることから、バイオ医薬品の普及は患者への経済的負担の増大にもつながっており、バイオ医薬品の薬価の問題は社会的課題として考えられるようになってきた。そのなかで、1990年前後に開発された初期のバイオ医薬品の特許期間・再審査期間が終了し、非臨床および臨床試験を簡略化することにより、低コストでの開発と低価格での提供が期待できるバイオ後続品／バイオシミラーに世界的な注目が集まるようになった。2013年以降は大型抗体医薬品の特許存続期間が相次いで終了することから、抗体医薬品のバイオ後続品／バイオシミラーへの関

1. バイオ後続品／バイオシミラーとは

バイオ後続品とは、「国内で既に新有効成分含有医薬品として承認されたバイオテクノロジー応用医薬品（先行バイオ医薬品）と同等／同質^{注)}の品質、安全性、有効性を有する医薬品として、異なる製造販売業者により開発される医薬品」のことである。平成21年3月に厚生労働省よりバイオ後続品に関する一連の通知が発出され（表1）、わが国におけるバイオ後続品に対する考え方が示されるとともに、新有効成分含有医薬品やジェネリック医薬品とは区分して取り扱われることとなった¹⁻³⁾。

注)

「同等性／同質性」は、バイオ医薬品の製法変更に関して確立された考え方である。同等性／同質性は、comparabilityの日本

表1 バイオ後続品に関する指針・通知

発出年月日および通知番号	内容
平成21年3月4日 薬食審査発第0304007号	バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための指針
平成21年3月4日 薬食発第0304004号	バイオ後続品の承認申請について
平成21年3月4日 薬食審査発第0304015号	バイオ後続品の承認申請に際し留意すべき事項について
平成21年3月4日 薬食審査発第0304011号	バイオ後続品に係る一般的名称および販売名の取扱いについて
平成21年3月4日 厚生労働省医薬食品局審査管理課	「バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための指針」(案)に関する意見公募に対して寄せられた御意見について
平成21年7月21日 事務連絡 厚生労働省医薬食品局審査管理課	バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための指針に関する質疑応答集(Q&A)について
平成22年3月31日 事務連絡 厚生労働省医薬食品局審査管理課	バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための指針に関する質疑応答集(Q&A)について

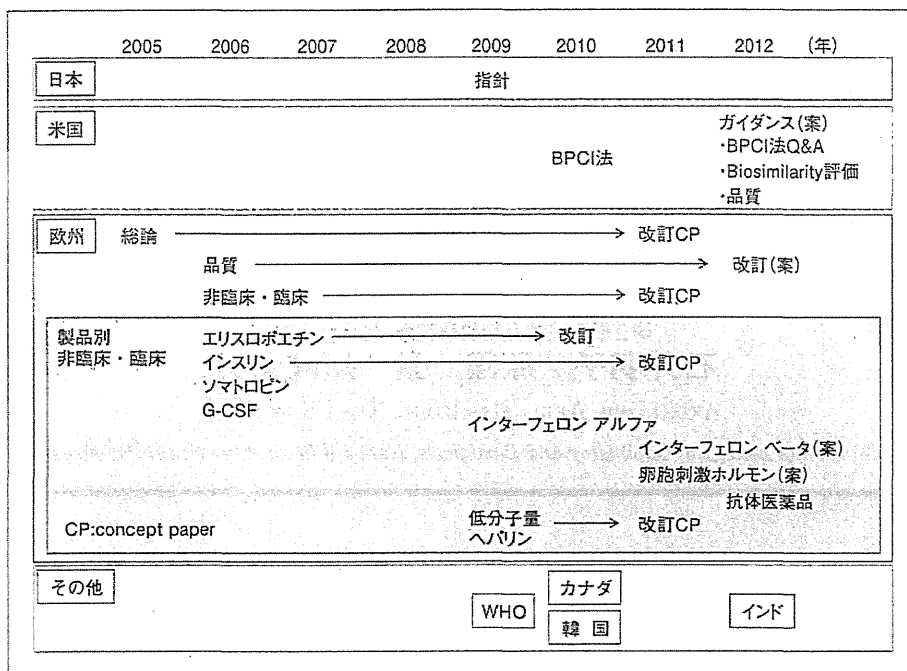


図1 バイオ後続品／バイオシミラーに関するガイドラインの整備状況

語訳であり、量的／質的に同じという意味を持つ。バイオ医薬品の品質特性は製造方法により変動し得るため、開発過程あるいは市販開始後に製造方法の変更が行われる場合、品質・有効性・安全性への影響を評価する必要が生じる。バイオ医薬品の製法変更に関するICH Q5Eガイドラインでは、「同等性／同質性とは、必ずしも変更前および変更後の製品の品質特性が全く同じであるということの意味するものではなく、変更前後の製品の類似性が高いこと、ならびに、品質特性に何らかの差異があったとしても、既存の知識から最終製品の安全性や有効性には影響を及ぼさないのであることが十分に保証できることを意味する。」と定義されている。

バイオ後続品に関する指針では、「同等性／同質性とは、先行バイオ医薬品に対して、バイオ後続品の品質特性がまったく同一であるということの意味するのではなく、品質特性において類似性が高く、かつ、品質特性に何らかの差異があったとしても、最終製品の安全性や有効性に有害な影響を及ぼさないと科学的に判断できることを意味する。」と述べられている。バイオ後続品は、参照品とは異なるセルバンクを出発点とし、参照品とは独立して開発された製造工程により生産されるため、製法変更前後で製品の比較をする場合と比べて、同等／同質であることを示すためには、より多くのデータが求められると考えられる。しかし、品質特性に高い類似性があり、有効性・安全性には悪影響が生じないことを示す、という考え方は、製法変更前後での評価とバイオ後続品の評価で共通しているため、「同等性／同質性」の評価が、バイオ後続品の評価に関する考え方の基本とされてきた。

諸外国においても、わが国におけるバイオ後続品と同様、先行バイオ医薬品と同等／同質の品質、安全性、有効性を有する医薬品として、異なる製造販売業者により開発される医薬品(バイオシミラー)の申請・審査のためのガイドラインや体制の整備が進められている(図1)。

これまで、EMAが先導的にガイドライン整備を進め、2005年以降、総論的ガイドラインに加えて、品質に関するガイドライン、非臨床・臨床試験に関するガイドライン、および、製品群別の非臨床・臨床試験に関するガイドラインを継続的に公表している⁴⁾。2009年にはWHO⁵⁾、2010年にカナダ⁶⁾および韓国⁷⁾、2012年にはインド⁸⁾でもガイドラインが公表された。米国では、2010年にバイオシミラーの規制要件を定めた法律(Biological Price Competition and Innovation Act of 2009: BPCI法)が成立したことを受けて、2012年2月にFDAからガイダンス案が公開されており⁹⁾、今後、世界的にバイオシミラー開発が加速することが予想される。

表2に各極におけるバイオ後続品／バイオシミラーの呼称と定義、および、主なガイドラインを示す。各極での定義は類似しており、すでに製造販売承認を与えられているバイオ医薬品と同等／同質の医薬品であるという考え方に相違はないが、適用対象とする製品群、先行バイオ医薬品(参照品: reference product)の要件、参照品との同等性／同質性を示すために求められる要件、参照品との互換性あるいは代替に関する考え方に多少の相違がある場合があるので、わが国のバイオ後続品と海外のバイオシミラーはイコールではないことに留意する。

一部の国では、後から開発された製品を、参照品との

表2 バイオ後続品/バイオシミラー 各極での呼称、定義、および、ガイドライン

国/地域	呼称	定義	法律または主なガイドライン
日本	バイオ後続品 Follow-on Biologics	国内ですでに新有効成分含有医薬品として承認されたバイオテクノロジー応用医薬品(先行バイオ医薬品)と同等/同質の品質、安全性、有効性を有する医薬品として、異なる製造販売業者により開発される医薬品	バイオ後続品の承認申請について 平成21年3月4日 薬食発第0304004号 【2009年】
欧州	Similar Biological Medicinal Products (Biosimilar Medicines)	A biosimilar medicine is a medicine which is similar to a biological medicine that has already been authorised (the 'biological reference medicine').	Directive 2001/83/EC(amended by 2003/63/EC) 【2003年】 Guideline on Similar biological medicinal products CHMP/437/04 【2005年】
米国	Biosimilar Biological Products	Biosimilar or Biosimilarity means that "the biological product is highly similar to the reference product notwithstanding minor differences in clinically inactive components," and that "there are no clinically meaningful differences between the biological product and the reference product in terms of the safety, purity, and potency of the product."	Biological Price Competition and Innovation Act 【2010年】 Guidance for Industry: Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product (DRAFT) 【2012年】
カナダ	Subsequent Entry Biologics (SEBs)	A biologic drug that enters the market subsequent to a version previously authorized in Canada, and with demonstrated similarity to a reference biologic drug	Guidance for sponsors: Information and Submission Requirements for Subsequent Entry Biologics (SEBs) 【2010年】
韓国	Biosimilar Products	A "biosimilar product" is a biological product that is comparable to already marketed reference products in terms of quality, safety and efficacy.	Guideline on the evaluation of biosimilar products 【2010年】
インド	Similar Biologics	A biological product/ drug produced by genetic engineering techniques and claimed to be "similar" in terms of safety, efficacy and quality to a reference biologic, which has been granted a marketing authorization in India by Drug Controller General of India on the basis of a complete dossier, and with a history of safe use in India.	Guidelines on Similar Biologics: Regulatory Requirements for Marketing Authorization in India 【2012年】
WHO	Similar Biotherapeutic Products (SBPs)	A biotherapeutic product which is similar in terms of quality, safety and efficacy to an already licensed reference biotherapeutic product	Guidelines on Evaluation of Similar Biotherapeutic Products (SBPs) 【2009年】

同等性/同質性評価を実施することなく、新薬の承認申請に際して求められるデータパッケージより少ないデータで承認するシステムがあり¹⁰⁾、そのような製品がバイオシミラーと呼ばれることもある¹¹⁾。しかし、バイオシミラーという言葉が最初に提唱したEMAは、EMAガイドラインの定義に合わないものをバイオシミラーと呼ぶことについて、強い懸念を示している¹²⁾。バイオシミラーに関する各国ガイドラインの定義を見ると、同等性/同質性評価を経ずに開発・承認された製品をバイオシミラーと呼ぶことは、やはり適切ではないだろう。バイオシミラーを取り上げた文献等では、どのようなデータにより

承認された製品であるかが明確でない場合もあるので、バイオシミラーと書かれていても、開発過程で参照品との同等性/同質性評価が行われたものとは限らないことにも注意が必要である。

2. バイオ後続品/バイオシミラー に対する各国の規制要件

(1) バイオ後続品/バイオシミラーの開発および評価の特徴

図2に示すように、バイオ後続品/バイオシミラーの

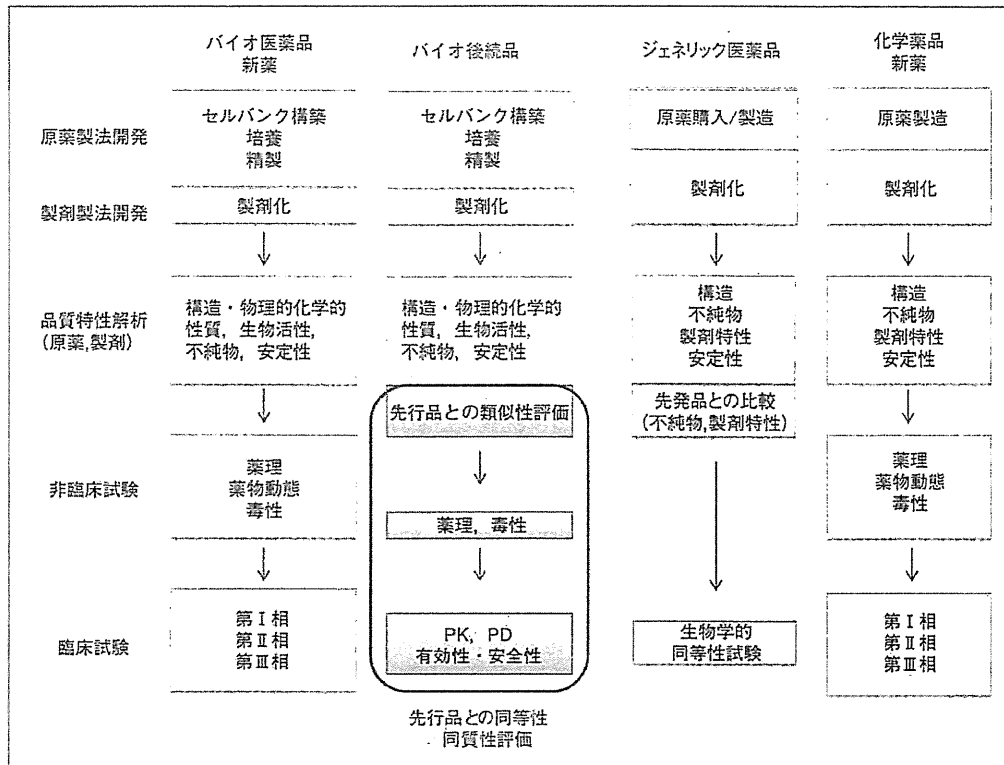


図2 医薬品の開発過程(典型的な例)

開発過程は、新有効成分含有医薬品や化学薬品後発品(ジェネリック医薬品)とは異なっている。バイオ後続品／バイオシミラーの開発では、原則として、①新薬と同様に、原薬および製剤の製造方法を開発すること、②新薬と同様の品質特性解析に加えて、参照品との品質比較試験により、バイオ後続品／バイオシミラーと参照品の品質特性が高い類似性を持つことを示すこと、③非臨床・臨床試験により、バイオ後続品／バイオシミラーが参照品と同等／同質の有効性・安全性を有することを示すこと、が必要である。

新有効成分含有医薬品の開発と比較すると、バイオ後続品／バイオシミラーの開発では、品質特性解析において、参照品との比較試験が必要となる一方、臨床での有効性・安全性が確立された参照品と品質特性に関して高い類似性を持つことを根拠として、必要とされる非臨床・臨床試験は軽減される。わが国の指針では臨床試験の内容は、その時点までの同等性／同質性の評価結果に依存し、品質特性の比較試験、非臨床試験、ならびに、薬物動態(PK)、薬力学(PD)、およびPK/PDに関する臨床試験の結果から、バイオ後続品／バイオシミラーが参照品と同等／同質の有効性・安全性を有することが十分説明できる場合は、有効性を比較するための臨床試験を省

略できることがあるとされている。

ジェネリック医薬品の開発と対比して考えると、バイオ後続品／バイオシミラーの開発では、限定的ではあるものの通例、非臨床試験、ならびに、薬物動態(PK)、薬力学(PD)等に関する臨床試験が必要とされる点が特徴である。ジェネリック医薬品では、品質特性解析により、有効成分が先発品と化学的に同一であることが確認され、生物学的同等性試験により、先発品と同一の用量において有効成分の血中濃度推移が先発品と同等であることが確認できれば、臨床において先発品と同じ作用が期待できると考えられる。これに対して、有効成分が不均一性に富む複雑な高分子であるバイオ医薬品(5.品質評価 参照)では、先行品と有効成分が同一であることを証明することは現実的ではないので、品質特性の相違が臨床的に意味のある差を生じるものではないことについての検証が必要となる。不純物に関して、バイオ医薬品では、目的物質由来不純物や宿主細胞由来タンパク質のように、製法に依存した分子が含まれることから、先行品との不純物プロファイルの比較による安全性の検証や特性解析結果のみから安全性への影響を評価することは現実的ではない。さらに、免疫原性のように、品質特性解析や非臨床試験では、先行品との違いを十分に検


証できないと考えられている安全性上の懸念があることも、臨床試験が必要とされる一因である。

このような特徴を踏まえ、バイオ後続品／バイオシミラーの開発を考える上で重要な点として、以下の2点があげられる。1つは、参照品との「同等性／同質性」を検証する方策である。バイオ後続品／バイオシミラーに関する各極のガイドラインには、申請製品が参照品と同等／同質の医薬品であるための前提や、同等／同質であることを示すために必要なデータについて、それぞれの規制当局が議論を重ねた結果が記載されている。2つ目は、品質管理戦略の構築である。製造工程と品質の理解・管理に関しては、新有効成分含有医薬品と同じレベルの内容が求められるため、バイオ後続品／バイオシミラーの製造販売企業には、組換えタンパク質生産・品質管理に関する高い技術力が必要である。バイオ後続品／バイオシミラーの開発においても、新薬開発と同様に、頑健性のある製造工程を構築し、独自に実施する非臨床・臨床試験に限られたなかにおいても、有効性・安全性と品質特性および工程や試験法の関連に関する理解に基づき、適切な品質管理戦略を構築する必要がある。

(2) バイオ後続品／バイオシミラーに関するガイドライン

表3に、日本¹³⁾、欧州¹⁴⁾、米国¹⁵⁾、カナダ⁶⁾、韓国⁷⁾、インド⁸⁾、およびWHO⁹⁾におけるバイオ後続品／バイオシミラーに関するガイドラインの比較を示す。ガイドラインの適用対象は、組換えタンパク質医薬品が中心である。参照品については、日本と欧州では、現在のところ自国での承認製品に限定しているが、その他では、自国承認製品以外の利用も可能であるとしている。ただし、インドおよびWHOでは、自国で参照品となる先行バイオ医薬品が承認されていない場合でも、海外承認製品を参照として開発されたバイオシミラーの承認申請を認める可能性を示しているのに対して、米国、カナダ、韓国では、自国で承認された参照品があることが前提で、一定の条件が満たされる場合にのみ、一部の試験において、自国承認製品との関連が明らかな海外承認製品を参照品として利用することを認める、としている。

以下に、日本、欧州、および、米国におけるバイオ後続品／バイオシミラーの規制要件について、各極のガイドラインの記載をもとに概説する。




Stability Testing Center

Dual Storage 安定性試験検体二重保存


それは、貴社のビジネスリスク、検体保存リスクを確実に低減します。

サービスご提供前 (貴社のみでの保存の時)


貴社




安定性試験保存開始



災害発生!



試験中断




試験継続

計画通りの
申請・承認
販売開始

弊社

一部検体お預かり



検体ご返送 (一部)

一部は引き続き
お預かりし
保存を継続

- ・ オーディット受け入れ実績多数
- ・ リスクベースに基づく保存プロセス
- ・ メーカーならではの安心のバリデート空間

NAGANO SCIENCE

ナガノサイエンス株式会社
医薬品安定性試験プロセス開発センター (STC)

〒560-0082 大阪府豊中市新千里東町1-4-2 千里ライフサイエンスセンタービル17F
TEL: 06-6836-2650 FAX: 06-6836-2654
URL: <http://www.naganoscience.co.jp> Mail: info@naganoscience.co.jp

DM資料請求カードNo37