

LC-MS/MS Analysis

The HPLC system (LC20AD series, Shimadzu Co., Kyoto, Japan) consisted of a binary pump, autosampler, column oven maintained at 40°C and X Bridge C18 column (2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm, Waters, MA, USA). The mobile phase was a mixture of solvent A (0.2% formic acid in Milli-Q water) and solvent B (0.2% formic acid in acetonitrile) and used a flow rate of 0.3 ml/min. The following gradient was used for the plasma analyses: hold at 10% B for 0.2 min, increase linearly to 30% B over 2.6 min, then increase to 90% B over 0.2 min, hold for 1.3 min, decrease to 10% B over 0.1 min, hold for 1 min, increase to 90% B for 0.1 min, hold for 1.2 min, decrease to 10% B for 0.1 min, and hold for 2 min. The following gradient was used for the subcutaneous tissue samples: hold at 10% B for 0.2 min, increase linearly to 30% B over 2.8 min, then increase to 90% B over 0.1 min, hold for 0.5 min, decrease to 10% B for 0.1 min, and hold for 1.8 min.

The detection was performed using a QTRAP5500 mass spectrometer (Applied Biosystems Sciex, Framingham, MA, USA) with an ESI source operating in the positive ion mode. Multiple reaction monitoring (MRM) of SR-0379 used the m/z 534.1 → 217.2 transition. The following optimized MS conditions were used: curtain gas (nitrogen), gas 1 (air) and gas 2 (air) in portions of 30, 30 and 30, respectively; ion spray voltage of 4500 V; source temperature of 600°C; declustering potentials of 126 V for SR-0379 and 126 V for IS; collision energies of 29 eV (m/z 534 → 217.2) for SR-0379 and 29 eV (m/z 534.4 → 217.2) for IS.

Optimization of Stability in Plasma

SR-0379 samples (nominal concentrations of 10 and 800 ng/ml) were prepared in blank rat plasma (EDTA). The samples were mixed after adding three times their mass of 4% phosphoric acid. The short-term matrix stability was assessed by analyzing the samples after storing at -80°C, 4°C and room temperature for 24 hours.

Pretreatment of Plasma Samples

A 5-μL aliquot of a SR-0379 working solution in 50% methanol/H₂O at various concentrations (5 – 1000 ng/ml) was mixed with 1500 μL phosphoric acid (4%). Next, 495 μL of rat plasma and 10 μL of the internal standard solution (5000 ng/ml) were added. The solution was vortexed for 10 s and centrifuged at 10,000 × *g* for 5 min. The supernatant was transferred to an Oasis HLB μElution plate that had been previously activated by successive applications of 0.3 ml methanol and 0.3 ml Milli-Q water. This plate was then washed with 0.3 ml of Milli-Q water. The peptide adsorbed onto the surface of the plate was eluted with 150 μL of acetonitrile-water-trifluoroacetic acid (75:25:1). A 10 μL aliquot was transferred to the LC-MS/MS system.

Pretreatment of Subcutaneous Tissue Samples

A 5 μL aliquot of a SR-0379 working solution in 50% methanol/H₂O at various concentrations (5 - 1000 ng/g tissue) was mixed with 750 μL phosphoric acid (4%). Next, 250 μL of a subcutaneous tissue sample (20% homogenate) and 10 μL of an internal standard solution (5000 ng/ml) were

added to the above mixture. The solution was vortexed for 10 s and centrifuged at 10,000 × *g* for 5 min. The supernatant was transferred to an Oasis HLB μElution plate that had been activated by successive applications of 0.3 ml of methanol and 0.3 ml of Milli-Q water. The plate was then washed with 0.4 ml of Milli-Q water. The adsorbed peptide was eluted on the surface using 150 μL of acetonitrile-water-trifluoroacetic acid (75:25:1). A 10 μL aliquot was transferred to the LC-MS/MS system.

Method Validation

The method validation evaluated the specificity, linearity, lower limit of quantitation (LLOQ), precision, accuracy, and extraction recovery. The specificity was evaluated based on whether an interference peak eluted at the same retention time as for the analytes in a blank sample. The calibration curves were constructed over the SR-0379 concentration range from 5 to 1000 ng/ml for plasma and from 5 to 1000 ng/g for tissue. The intra-assay precision and accuracy were evaluated by replicating five QC samples on the same day. The inter-assay precision and accuracy were evaluated by analyzing QC samples across three separate days. The extraction recovery was determined by comparing to a blank plasma or subcutaneous tissue sample containing analytes added after the pretreatment.

Method Application for a Pharmacokinetic Study in Rats

Male SD rats weighing 250-350 g were used for the following pharmacokinetic studies. SR-0379 (200 μg/kg) was dissolved in saline and administered to the rats *via* a single *i.v.* bolus injection. Blood samples were collected 2, 5, 10, 15 and 30 min after dosing. SR-0379 (1 mg/ml for 50 μL/rat) was transdermally administered throughout the full depth of the rat skin. Blood samples were collected after 0.5, 1, 2, 4, 8 and 24 hours. Subcutaneous tissue samples were collected after 0.5, 1 and 24 hours. The SR-0379 concentrations in both the plasma and subcutaneous tissues were measured *via* LC-MS/MS. The study was discussed and approved by the Ethics Committee.

RESULTS

LC-MS/MS Analysis

(Fig. 1A) shows a typical positive ion ESI mass spectrum for SR-0379. The ion peaks at m/z 445.0, 534.1, 667.2 and 889.3 correspond to the 6+, 5+, 4+, 3+ ions, respectively. The 5+ ion showed the highest sensitivity. The product ion spectrum for the 5+ ion is shown in (Fig. 1B). High collision energies were found to yield intense product ions.

Typical SRM chromatograms were obtained using the blank (0 ng/ml) and the lowest calibration standard (5 ng/ml) in rat plasma (Fig. 2). No interfering peaks from endogenous substances were observed at the SR-0379 retention times.

Optimization of Short-term Stability in Plasma

The short-term stability of SR-0379 in plasma was assessed by analyzing the samples (10 and 800 ng/ml) after storing at -80°C, 4°C, and room temperature for 24 hours. The normal plasma concentrations (nominal concentrations of 10 and 800 ng/ml) were below the limit of quantification

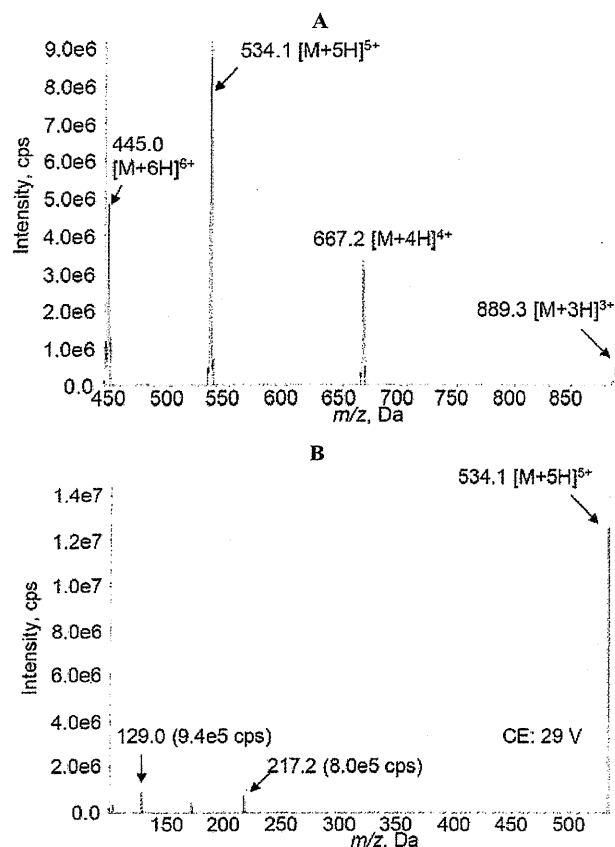


Fig. (1). Positive-ion electrospray mass spectra of SR-0379: (A) precursor ion scan and (B) product ion mass spectra obtained from $[M + 5H]5+$ (m/z 534.1).

Table 1. Stability of SR-0379 for 24hr on Each Condition

Nominal Concentration (ng/ml)	Conditions		Observed Value (ng/ml)	RR (%)
			Individual	
10	Normal Plasma	RT	No Peak	-
		4°C	2.89	28.9
		-80°C	9.77	97.7
	4%Phosphoric acid/Plasma (3/1, v/v)	RT	7.32	73.2
		4°C	9.37	93.7
		-80°C	10.2	102.0
800	Normal Plasma	RT	31.6	4.0
		4°C	126	15.8
		-80°C	851	106.4
	4%Phosphoric acid/Plasma (3/1, v/v)	RT	733	91.6
		4°C	848	106.0
		-80°C	891	111.4

and equal to 31.6 ng/ml after storing at room temperature (Table 1). Thus, SR-0379 was determined to be unstable in

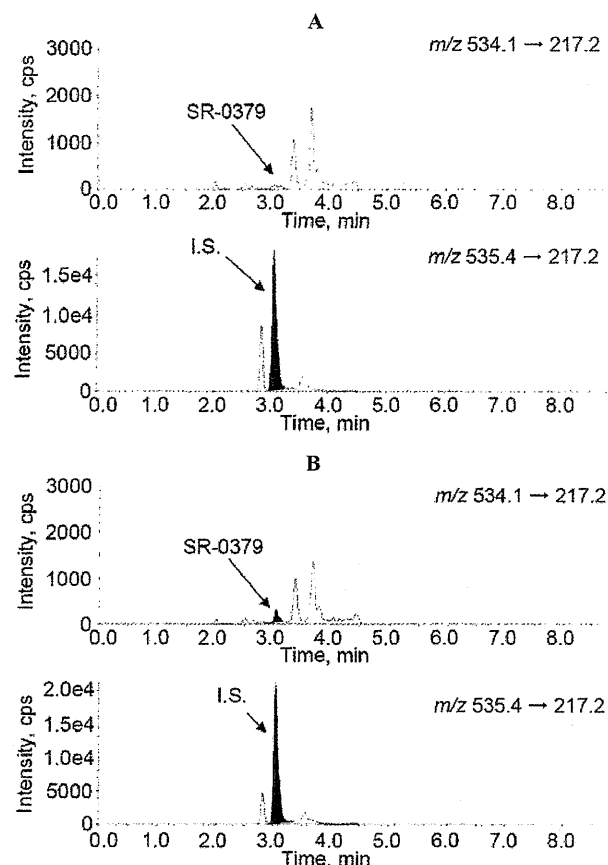


Fig. (2). Selected reaction monitoring ion chromatograms of (A) a rat plasma spiked with an internal standard (500 ng/ml) and (B) rat plasma spiked with both SR-0379 (5 ng/ml) and the internal standard (500 ng/ml). The SRM transitions were m/z 534.1 \rightarrow 217.2 for SR-0379 and m/z 535.1 \rightarrow 217.2 for the internal standard.

rat plasma. Adding 4% phosphoric acid to the plasma sample stabilized the SR-0379. This method development study demonstrated that LC-MS/MS was sufficiently suitable for detecting SR-0379 in 4% phosphoric acid/plasma (3/1, v/v) to proceed with the method validation.

Pretreatment of the Plasma and Subcutaneous Tissue Samples

Solid-phase extraction (SPE) was used as the sample preparation method. During the method development, a variety of SPE cartridges were investigated for both the plasma and subcutaneous tissue sample pre-treatments. Oasis HLB μ Elution plates provided the highest recovery amongst the SPE cartridges tested.

Method Validation

The specificity was determined by analyzing blank plasma samples from three male rats and three female rats and the pooled plasma of different rats. The assay was linear across the range from 5 to 1000 ng/ml (Table 2). The lower limit of quantification (LLOQ) in rat plasma was determined to be 5 ng/ml. The within-run CVs were 5.4, 8.9, 6.0 and 5.4% ($n=5$ for each) for the 5, 10, 50 and 800 ng/ml LLOQ,

Table 2. Linearity of Calibration Curves for the Determination of SR-0379 Concentrations in Rat Plasma

Nominal Concentration (ng/ml)	Back-calculated Value (ng/ml)	RE (%)	Back-calculated Value (ng/ml)	RE (%)	Back-calculated Value (ng/ml)	RE (%)
5	4.94	-1.2	5.06	1.2	4.93	-1.4
10	9.90	-1.0	10.4	4.0	10.2	2.0
20	21.7	8.5	18.6	-7.0	20.2	1.0
50	49.0	-2.0	43.3	-13.4	47.9	-4.2
100	97.6	-2.4	101	1.0	106	6.0
200	190	-5.0	199	-0.5	195	-2.5
800	801	0.1	834	4.3	803	0.4
1000	1030	3.0	1110	11.0	981	-1.9
Correlation coefficient (<i>r</i>)	0.9988		0.9964		0.9993	
Regression formula	$y = 0.00382x + 0.000174$		$y = 0.00375x - 0.000175$		$y = 0.00391x + 0.00140$	
Weighting: $1/x^2$						

Table 3. Intra-day Reproducibility of the QC Samples for the Determination of SR-0379 Concentrations in Rat Plasma

	Nominal Concentration (ng/ml)			
	5	10	50	800
	Observed Value (ng/ml)			
Mean	4.96	10.1	50.1	814
SD	0.27	0.9	3.0	44
CV (%)	5.4	8.9	6.0	5.4
RE (%)	-0.8	1.0	0.2	1.8

respectively (Table 3). The between-run CVs were 7.4, 8.4, 5.5 and 4.9% (n=15), respectively, for these samples (Table 4). The within-day and between-day validation parameters meet the FDA Good Laboratory Practice criteria for an analytical method validation.

Pharmacokinetic Study

A profile of the SR-0379 concentration in plasma versus time after an intravenous injection is shown in (Fig. 3A). The SR-0379 concentration in the plasma rapidly decreased. The pharmacokinetic parameters for SR-0379 are presented in (Table 5). The area under the concentration to time curve ($AUC_{0-\infty}$) was 667 ng·min/ml, and the obtained elimination half-life ($t_{1/2}$) was 4.8 min.

Table 4. Inter-day Reproducibility of the QC Samples for the Determination of SR-0379 Concentrations in Rat Plasma

Assay date		Nominal Concentration (ng/ml)			
		5	10	50	800
		Observed Value (ng/ml)			
Day 1	1	4.97	10.1	52.5	743
	2	4.55	9.86	45.1	856
	3	5.20	8.86	50.2	802
	4	5.21	10.7	52.4	830
	5	4.89	11.1	50.3	839
Day 2	1	5.29	10.2	50.4	806
	2	5.29	11.0	49.1	849
	3	5.71	10.2	46.7	828
	4	5.86	8.96	52.3	857
	5	5.00	9.08	48.4	849
Day 3	1	5.45	8.63	50.4	757
	2	5.80	10.4	43.7	765
	3	5.64	9.33	46.2	794
	4	5.58	9.76	46.5	782
	5	4.86	8.84	47.8	868
Overall mean (n=15)		5.29	9.80	48.8	815
SD		0.39	0.82	2.7	40
CV (%)		7.4	8.4	5.5	4.9
RE (%)		5.8	-2.0	-2.4	1.9

The SR-0379 concentrations in plasma were below the limit of quantification after a single application of SR-0379 (1 mg/ml, 50 μ l) to a full-depth excisional wound. A profile of the subcutaneous tissue concentration versus time for SR-0379 after a single dermal application (1 mg/ml, 50 μ l) to a full-depth excisional wound is shown in (Fig. 3B). The SR-0379 concentration in the subcutaneous tissue samples was 13.1 μ g/g tissue at 30 minutes after the application. The concentration in the subcutaneous tissue gradually decreased.

DISCUSSION

In this study, we developed a method for the quantitative analysis of a functional peptide, SR-0379, in rat plasma and tissue using LC/MS with an ion trap [10-12].

These peptides are unstable in biological fluids, such as plasma and urine [13, 14]. EDTA, a metalloproteinase inhibitor, can be added to the samples to prevent their degradation when determining the concentration [15]. In this study, the stability of SR-0379 spiked into plasma was investigated.

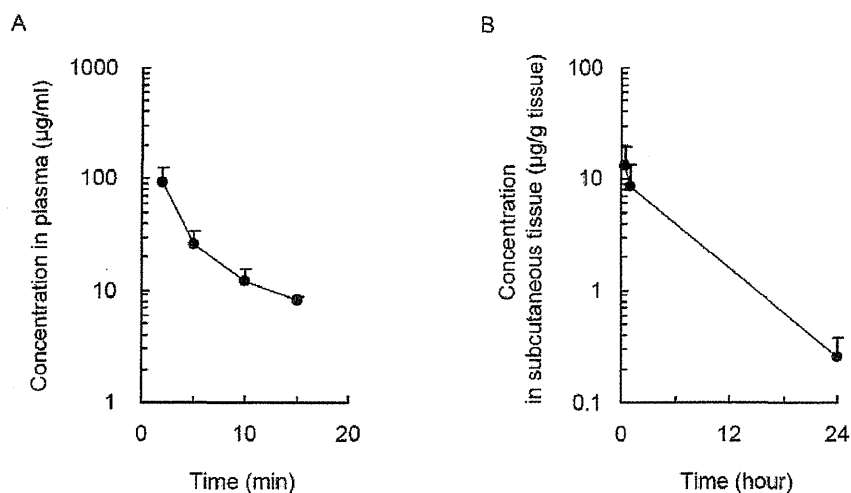


Fig. (3). (A) Curve of the plasma concentration versus time after the intravenous administration of SR-0379 (200 µg/kg) to the rats. N=4 per group. (B) Curve of the subcutaneous tissue concentration versus time after the dermal application of SR-0379 (1 mg/ml, 50 µl) to a full-depth wound in the rat skin. N=4 per group.

Table 5. PK Parameters of SR-0379 in Rat Plasma after Single Intravenous Administration of SR-0379 to Intact Skin Rats (Group 1, Dose: 200 µg/kg)

Parameters	
$t_{1/2}$ (min)	4.8
AUC _{0-t} (ng·min/ml)	626
AUC _{0-∞} (ng·min/ml)	667
C ₀ (ng/ml)	217
CL _{total} (ml/min/kg)	300
Vd (ml/kg)	922
Vd = Dose (ng/kg) / C ₀ (ng/ml)	

The results indicated that SR-0379 was unstable in plasma even with EDTA. 4% phosphoric acid was added to improve the stability of SR-0379. Thus, a simple method for determining peptides in biological matrices was established.

The objective of this study was to characterize the pharmacokinetics of SR-0379 using this LC-MS/MS technology. The SR-0379 concentration decreased rapidly following a single intravenous injection of 2 µg/kg into male rats, and an elimination half-life ($t_{1/2}$) of 4.8 min was obtained. SR-0379 has numerous biological activities that are important to wound healing and this peptide is being developed for topical use to treat diabetic, burn and other incurable ulcers. The terminal half-lives ($t_{1/2\beta}$) ranged from 5.0 to 7 min after administering human basic fibroblast growth factor (FGF2) intravenously to mice in doses of 2.5, 5, 10 µg/kg [16]. The stability of SR-0379 is comparable to that of growth factors such as FGF2.

The SR-0379 concentration in rat plasma was below the limit of quantification after a single dermal application (1 mg/ml, 50 µl) to a full-depth excisional wound. Topical treatments have the advantages of avoiding adverse systemic

effects while increasing concentration at the target site. In contrast, the SR-0379 concentration in the subcutaneous tissue was 13.1 µg/g of tissue 30 min after its application (1 mg/ml, 50 µl) to a full-depth excisional wound. The concentration in the subcutaneous tissue gradually decreased. It was suggested that the SR-0379 degraded locally.

A highly sensitive and specific LC-MS/MS assay with a lower limit of quantification (LLOQ) of 5 ng/ml was developed and validated to quantify SR-0379 in rat plasma. The lower limit of quantification of hepcidin-25 and ramoplanin was 5 ng/ml and 10 ng/ml, respectively [17, 18]. Most bioanalytical assays for peptides show an LLOQ between 0.5 and 10 ng/ml, with some lower LLOQs mainly for smaller peptides. Lower LLOQ of SR-0379 has achieved by using QTRAP5500 mass spectrometer. This method was fully validated and possessed acceptable linearity, accuracy, and both intra- and inter-assay precisions. Furthermore, this method is useful for performing pharmacokinetic studies in rats.

CONFLICT OF INTEREST

Ryuichi Morishita is a founder and stockholder of AnGes MG. The Department of Clinical Gene Therapy is financially supported by AnGes MG, Novartis, Shionogi, Boehringer and Rohto. The Division of Vascular Medicine and Epigenetics is financially supported by Bayer.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partially supported by a Health Labour Sciences Research Grant in Japan.

REFERENCES

- [1] Nishikawa, T.; Nakagami, H.; Maeda, A.; Morishita, R.; Miyazaki, N.; Ogawa, T.; Tabata, Y.; Kikuchi, Y.; Hayashi, H.; Tatsu, Y.; Yumoto, N.; Tamai, K.; Tomono, K.; Kaneda, Y. Development of a novel antimicrobial peptide, AG-30, with angiogenic properties. *J. Cell. Mol. Med.*, 2009, 13, 535-546.
- [2] Nakagami, H.; Nishikawa, T.; Tamura, N.; Maeda, A.; Hibino, H.; Mochizuki, M.; Shimamoto, T.; Moriya, T.; Morishita, R.; Tamai,

- K.; Tomono, K.; Kaneda, Y. Modification of a novel angiogenic peptide, AG30, for the development of novel therapeutic agents. *J. Cell. Mol. Med.*, 2012, 16(7), 1629-1639.
- [3] Eckert, R. Road to clinical efficacy: challenges and novel strategies for antimicrobial peptide development. *Future Microbiol.*, 2011, 6(6), 635-651.
- [4] Fjell, C.D.; Hiss, J.A.; Hancock, R.E.; Schneider, G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2012, 11(1), 37-51.
- [5] Li, Y.; Xiang, Q.; Zhang, Q.; Huang, Y.; Su, Z. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*, 2012, 37(2), 207-215.
- [6] Jiang, S.Y.; Jiao, J.; Zhang, T.T.; Xu, Y.P. Pharmacokinetics study of recombinant hirudin in the plasma of rats using chromogenic substrate, ELISA, and radioisotope assays. *PLoS One*, 2013, 8(6), e64336.
- [7] Wang, Y.; Qu, Y.; Bellows, C.L.; Ahn, J.S.; Burkey, J.L.; Taylor, S.W. Simultaneous quantification of davalintide, a novel amylin-mimetic peptide, and its active metabolite in beagle and rat plasma by online SPE and LC-MS/MS. *Bioanalysis*, 2012, 4(17), 2141-2152.
- [8] Sands, H.; Li, J.; Duggaraju, R.; Kolan, H.R.; Donegan, M.; Elove, G.A.; Thakur, M.L. Biodistribution and pharmacokinetics of 131I-labeled LEX 032, a recombinant hybrid of antichymotrypsin. *Drug Metab. Dispos.*, 1997, 25(5), 631-636.
- [9] Liu, Z.; Ren, C.; Jones, W.; Chen, P.; Seminara, S.B.; Chan, Y.M.; Smith, N.F.; Covey, J.M.; Wang, J.; Chan, K.K. LC-MS/MS quantification of a neuropeptide fragment kisspeptin-10 (NSC 741805) and characterization of its decomposition product and pharmacokinetics in rats. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2013, 926, 1-8.
- [10] Vatanserver, B.; Lahrchi, S.L.; Thiocone, A.; Salluce, N.; Mathieu, M.; Grouzmann, E.; Rochat, B. Comparison between a linear ion trap and a triple quadrupole MS in the sensitive detection of large peptides at femtomole amounts on column. *J. Sep. Sci.*, 2010, 33(16), 2478-2488.
- [11] Miyachi, A.; Murase, T.; Yamada, Y.; Osonoi, T.; Harada, K. Quantitative analytical method for determining the levels of gastric inhibitory polypeptides GIP1-42 and GIP3-42 in human plasma using LC-MS/MS/MS. *J. Proteome Res.*, 2013, 12(6), 2690-2699.
- [12] Michalski, A.; Damoc, E.; Lange, O.; Denisov, E.; Nolting, D.; Muller, M.; Viner, R.; Schwartz, J.; Remes, P.; Belford, M.; Dunyach, J.J.; Cox, J.; Horning, S.; Mann, M.; Makarov, A. Ultra high resolution linear ion trap Orbitrap mass spectrometer (Orbitrap Elite) facilitates top down LC MS/MS and versatile peptide fragmentation modes. *Mol. Cell. Proteomics*, 2012, 11(3), O111.013698.
- [13] De Spiegeleer, B.; Van Dorpe, S.; Vergote, V.; Wynendaele, E.; Pauwels, E.; Van De Wiele, C.; Garcia-Solis, P.; Solis-Sainz, J.C. *In vitro* metabolic stability of iodinated obestatin peptides. *Peptides*, 2012, 33(2), 272-278.
- [14] Ocak, M.; Helbok, A.; Rangger, C.; Peitl, P.K.; Nock, B.A.; Morelli, G.; Eek, A.; Sosabowski, J.K.; Breeman, W.A.; Reubi, J.C.; Decristoforo, C. Comparison of biological stability and metabolism of CCK2 receptor targeting peptides, a collaborative project under COST BM0607. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2011, 38(8), 1426-1435.
- [15] Alebic-Kolbah, T.; Demers, R.; Cojocar, L. Dalbavancin: Quantification in human plasma and urine by a new improved high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2011, 879(25), 2632-2641.
- [16] Zhang, Q.; Wang, G.J.; Sun, J.G. Pharmacokinetics of recombinant human basic fibroblast growth factor in rabbits and mice serum and rabbits aqueous humor. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2004, 25(8), 991-995.
- [17] Murao, N.; Ishigai, M.; Yasuno, H.; Shimonaka, Y.; Aso, Y. Simple and sensitive quantification of bioactive peptides in biological matrices using liquid chromatography/selected reaction monitoring mass spectrometry coupled with trichloroacetic acid clean-up. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2007, 21(24), 4033-4038.
- [18] Ewles, M.F.; Turpin, P.E.; Goodwin, L.; Bakes, D.M. Validation of a bioanalytical method for the quantification of a therapeutic peptide, ramoplanin, in human dried blood spots using LC-MS/MS. *Biomed. Chromatogr.*, 2011, 25(9), 995-1002.

傷治すたんばく質

大阪大大学院医学系研究科の研究チームは、床擦れなど、皮膚の傷が悪化し治療が難しくなった潰瘍を治し、抗菌効果もある新たなたんばく質の合成に成功したと発表した。2014年度から医師主導で臨床試験(治験)を始めるという。

27日付の米オンライン科学誌「プロスワン」に掲載された。傷や潰瘍がある部位で血管が新たにできれば、酸素や栄養が行き渡って皮膚細胞が増殖しやすくなり、治りが早くなる。同研究科大学院生の富岡英樹さんらは、血管を作る働きをするヒトの遺伝子を探す中で、抗菌性も持ったたんばく質を発見。このたんばく質の構造を調べ、効果が高く、安価に作れるたんばく質の開発に挑んだ。

抗菌作用も 阪大が合成、治験へ

人為的に曹中にけがをさせたラット5匹の傷に垂らし、傷の面積の変化をみると、生理食塩水を垂らしただけのラットと比べ8日目で平均1.5倍、傷の治りが早かったという。安全性を動物実験で調べているが、血中ですぐ分解するため、副作用はほぼないと研究チームはみている。開

発したたんばく質は「SRO379」と名付けた。

皮膚の潰瘍は、寝たきりの患者の他、糖尿病やリウマチの患者で多くみられる。細菌が繁殖しやすいが、消毒剤は皮膚細胞にダメージを与え、抗生物質は使い続けると多剤耐性菌を増やすという問題点があるという。SRO379は従来の薬と異なり、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)など多剤耐性菌にも抗菌作用があるといい、富岡さんは20年ごろの新薬開発を目指している。

【斎藤広子】

国立大学法人大阪大学大学院医学系研究科
健康発達医学寄附講座における
治験薬製造のための事前検証
(製剤化、試験法設定、安定性評価)

ナガセ医薬品株式会社
研究開発部

目次

1. 表題
2. 目的
3. 実施施設
4. 研究責任者等の名称
5. 実施日
6. 製剤化検討
 - 6.1. 処方検討
 - 6.1.1 実施の目的及び概要
 - 6.1.2 実施内容
 - 6.1.3 実施結果
 - 6.2. 製造方法及び品質評価
 - 6.2.1 実施の目的及び概要
 - 6.2.2 実施内容
 - 6.2.3 実施結果
 - 6.3. 容器の選定
 - 6.4. 個装箱の検討
7. 市場製品の調査及び容器評価
 - 7.1. 実施の目的及び概要
 - 7.2. 類似する外用液剤の調査
 - 7.3. 本品用容器の選定
 - 7.4. 機能性の調査
8. 試験法の設定及び分析法バリデーション
 - 8.1. 原薬の受入試験
 - 8.1.1 試験法の設定
 - 8.1.2 分析法バリデーションの概要
 - 8.1.3 分析法バリデーションの結果
 - 8.2. 製剤の出荷試験
 - 8.2.1 試験法の設定
 - 8.2.2 分析法バリデーションの概要
 - 8.2.3 分析法バリデーションの結果

9. 安定性試験

9.1. 試験検体

9.2. 保管条件

9.3. 試験項目

9.4. 試験結果

10. 標準物質の調製

10.1. 標準物質の調製方法

10.2. 標準物質の品質評価

10.3. 標準物質の品質評価結果

1. 表題

国立大学法人大阪大学大学院医学系研究科健康発達医学寄附講座における治験薬製造のための事前検証（製剤化，試験法設定，安定性評価）

2. 目的

国立大阪大学大学院医学系研究科との請負契約書及び仕様書に基づき，SR-0379外用液（創傷治癒ペプチド）の治験薬製造のための事前検証として，製剤化（処方，製品仕様等設計），試験法の設定及び試作品の安定性評価を実施することを目的とした。

3. 実施施設

名称：ナガセ医薬品株式会社 伊丹工場

所在地：兵庫県伊丹市千僧4-323

- ・製剤化検討：ナガセ医薬品株式会社 研究開発部 試製室
- ・試験法設定：ナガセ医薬品株式会社 研究開発部及び品質管理部分析室
- ・安定性評価：ナガセ医薬品株式会社 研究開発部 分析室

4. 研究責任者等の名称

研究総括責任者：ナガセ医薬品株式会社 研究開発部 篠田雅充

研究責任者：ナガセ医薬品株式会社 研究開発部 井上小枝

試験責任者：ナガセ医薬品株式会社 研究開発部 鶴山貴世

試験実施者：ナガセ医薬品株式会社 研究開発部 飯田規之，坂上明美，柴田千鶴

5. 実施日

試験開始日：2014年2月10日

試験終了日：2014年3月31日

6. 製剤化検討

6.1. 処方検討

6.1.1. 実施の目的及び概要

SR-0379 外用液（以下、本品と略す）の処方設計を行う。本品は、SR-0379（以下、原薬と略す）0.01% (0.1mg/mL), 0.1% (1mg/mL), 0.3% (3mg/mL) 及び1% (10mg/mL) の、4種の濃度での治験薬製造を予定している。そこで、これら4種の濃度の外用液について、製剤pHの設定検討を実施した。

本品は、事前情報として、①原薬に抗菌効果がある、②原薬は水に溶けやすく水に溶解させたpHは約3 (2mg/mL) である、③本製剤は生理食塩水に溶解させて事前研究が実施されていることが、確認されている。

これらを踏まえて、以下の基本設計にて処方検討を実施した。

- ・原薬濃度：0.01% (0.1mg/mL), 0.1% (1mg/mL), 0.3% (3mg/mL), 1% (10mg/mL)
- ・添加剤：塩化ナトリウム (0.9%)
- ・保存剤：添加しない
- ・pH調整：塩酸又は水酸化ナトリウムを用いる
- ・pH範囲：3.0～6.0付近にて検討

6.1.2. 実施内容

1) 使用原料

以下の原材料を用いて検証を行った。

原料	製造業者	ロット番号
SR-0379 *	大阪大学大学院提供品	Y01011C1
塩化ナトリウム	ナカライテスク	V3H1038
0.1mol/L 塩酸	ナカライテスク	L3H7333
0.01mol/L 塩酸	ナカライテスク	L2T5368
0.1mol/L 水酸化ナトリウム	ナカライテスク	L3T9251
0.01mol/L水酸化ナトリウム	ナカライテスク	L3P8535

*Peptide Content 82.5%

2) 処方案

以下の処方にて、各pHにおける本品の安定性を評価した。

【1%製剤】

原料	検体ロット		
	Z0204	Z0205	Z0206
SR-0379※	500mg	500mg	500mg
塩化ナトリウム	450mg	450mg	450mg
0.1mol/L, 0.01mol/L 塩酸	適量	適量	適量
0.1mol/L, 0.01mol/L 水酸化ナトリウム	適量	適量	適量
精製水	適量	適量	適量
全量	50mL	50mL	50mL
pH	3.0	5.0	7.0

【0.1%製剤】

原料	検体ロット		
	Z0207	Z0208	Z0209
SR-0379※	50mg	50mg	50mg
塩化ナトリウム	450mg	450mg	450mg
0.1mol/L, 0.01mol/L 塩酸	適量	適量	適量
0.1mol/L, 0.01mol/L 水酸化ナトリウム	適量	適量	適量
精製水	適量	適量	適量
全量	50mL	50mL	50mL
pH	3.0	5.0	7.0

【0.01%製剤】

原料	検体ロット		
	Z0210	Z0211	Z0212
SR-0379※	5mg	5mg	5mg
塩化ナトリウム	450mg	450mg	450mg
0.1mol/L, 0.01mol/L 塩酸	適量	適量	適量
0.1mol/L, 0.01mol/L 水酸化ナトリウム	適量	適量	適量
精製水	適量	適量	適量
全量	50mL	50mL	50mL
pH	3.0	5.0	7.0

※ SR-0379 は、Peptide Content (%) により含量換算する。

3) 製造方法

- ① 飽和酢酸カリウム水溶液を用いて、相対湿度 30%以下で安定な空間を作り、SR-0379 を 2 時間以上、調湿させる。
- ② ①の SR-0379 を 2g (下記の計算により採取量を求める) 秤量し、精製水に溶解させて正確に 100mL とする。
秤取量 = $2g \times 100/a$
a : peptide content (%)
- ③ ②の溶液を正確に 10mL 量り取り、精製水で正確に 100mL とする。
- ④ ③の溶液を正確に 10mL 量り取り、精製水で正確に 100mL とする。
- ⑤ それぞれ Z0104~Z0106:②, Z0107~Z0109:③, Z0110~Z0112:④の溶液を 25mL ずつ正確に投入する。これらの容器に塩化ナトリウム 450mg を投入し、攪拌溶解させる。
- ⑥ 各検体を 0.1mol/L 塩酸, 0.01mol/L 塩酸, 0.1mol/L 水酸化ナトリウム, 0.01mol/L 水酸化ナトリウムでそれぞれ pH3, 5, 7 に pH 調整を行った後、精製水にて全量 50mL とする
- ⑦ 全試作品をガラス製サンプル管に入れる

4) 安定性評価 保管条件

試作品各々を下記の条件に保管し、安定性の評価を行った。

保管条件	保管期間
5℃, なりゆき湿度	6日, 10日
60℃, なりゆき湿度	6日, 10日

5) 評価項目及び試験方法

各時点において以下の試験を実施した。

評価項目	判定基準 (仮)
性状	無色澄明
pH	(実測値の測定)
含量 (残存率)	95%以上
類縁物質	(実測値の測定)

試験方法

- ① 性状 : 目視により確認
- ② pH : pHメーターにより測定
- ③ 含量 :

・ 試料溶液の調製 :

本品を試料溶液とする。

ただし、1%製剤については、試料溶解液にて10倍希釈する。

- ・標準溶液の調製：
約 24mg (相対湿度 30%以下の条件下で 2 時間以上調湿後) を量り，試料溶解液を加えて溶かし，正確に 20mL とする。
- ・試料溶解液：
0.1%トリフルオロ酢酸を含む，水／アセトニトリル混液 (9：1)
- ・HPLC条件：
検出器：紫外吸光光度計 220nm
カラム：COSMOSIL Protein-R Packed Column 4.6×250mm
ガードカラム：COSMOSIL Protein-R Guard Column 4.6×10mm
カラム温度：40℃付近の一定温度
サンプルクーラー：5℃付近の一定温度
移動相：グラジエント
移動相 A：トリフルオロ酢酸 1mL に水 1000mL を加えて混和した液
移動相 B：トリフルオロ酢酸 1mL にアセトニトリル 1000mL を加えて混和した液
移動相の送液：移動相 A 及び移動相 B の混合比を次のように変えて濃度勾配制御する。

注入後の 時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0 ~ 5	95	5
5 ~ 40	95 → 60	5 → 40
40 ~ 45	95	5

流量：1.2 mL/min

ニードル洗浄液：アセトニトリル／水の混液 (4：1)

注入量：50 μL

④ 類縁物質：

- ・試料溶液の調製：
本品を試料溶液とする。
ただし，1%濃度処方については，試料溶解液にて10倍希釈する。
- ・試料溶解液：
0.1%トリフルオロ酢酸を含む水／アセトニトリル混液 (9：1)
- ・HPLC条件：
含量測定と同条件にて実施する
- ・類縁物質質量算出方法：
得られたクロマトグラムより，面積百分率にて各類縁物質質量を測定する

6.1.3. 実施結果

結果を以下の表、詳細を添付資料(1)に示す。

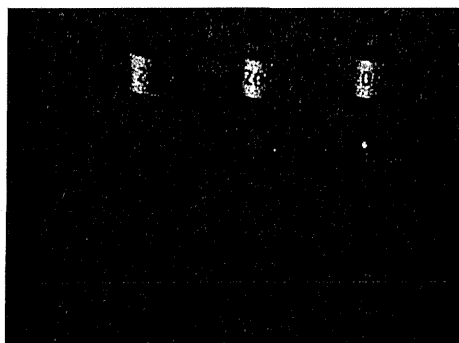
濃度	Lot	設定 pH	保管温度	保管期間	性状	pH	残存率 (%)※2	総類縁物質 (%)
1%	Z0204	3	調製直後	-	無色澄明の液	3.05	-	-
			5°C	6d	無色澄明の液	3.12	100	1.12
				10d	無色澄明の液	3.08	99.9	0.69
			60°C	6d	無色澄明の液	3.14	97.9	1.13
				10d	無色澄明の液	3.13	98.5	1.78
			Z0205	5	調製直後	-	無色澄明の液、泡立つ	5.01
	5°C	6d			無色澄明の液、泡立つ	5.02	100	0.72
		10d			無色澄明の液、泡立つ	4.98	99.8	0.77
	60°C	6d			無色澄明の液、泡立つ	5.11	99.8	1.19
		10d			無色澄明の液、泡立つ	5.08	99.9	1.26
	Z0206	7			調製直後	-	僅かに白濁した液、泡立つ	6.97
			5°C	6d	僅かに白濁した液、泡立つ	6.95	100	0.71
				10d	僅かに白濁した液、泡立つ	6.90	99.3	0.71
			60°C	6d	僅かに白濁した液、泡立つ	6.99	96.4	3.84
				10d	僅かに白濁した液、泡立つ	6.92	95.6	4.74
0.1%			Z0207	3	調製直後	-	無色澄明の液	3.17
	5°C	6d			無色澄明の液	3.23	100	0.72
		10d			無色澄明の液	3.25	100.8	2.03
	60°C	6d			無色澄明の液	3.23	104.9	1.51
		10d			無色澄明の液	3.21	99.6	1.78
	Z0208	5			調製直後	-	無色澄明の液、僅かに泡立つ	5.07
			5°C	6d	無色澄明の液、僅かに泡立つ	5.24	100	1.17
				10d	無色澄明の液、僅かに泡立つ	5.29	99.7	0.87
			60°C	6d	無色澄明の液、僅かに泡立つ	5.34	104.4	1.50
				10d	無色澄明の液、僅かに泡立つ	5.42	99.5	1.79
			Z0209	7	調製直後	-	無色澄明の液、泡立つ	6.96
	5°C	6d			無色澄明の液、泡立つ	6.93	100	1.21
		10d			無色澄明の液、泡立つ	6.78	99.5	1.11
	60°C	6d			無色澄明の液、泡立つ	7.21	100.3	4.24
		10d			無色澄明の液、泡立つ	7.05	95.1	6.02
0.01%	Z0210	3			調製直後	-	無色澄明の液	3.21
			5°C	6d	無色澄明の液	3.30	100	0.00
				10d	無色澄明の液	3.29	99.3	0.00 *
			60°C	6d	無色澄明の液	3.33	97.8	0.00 *
				10d	無色澄明の液	3.31	98.9	0.00 *
			Z0211	5	調製直後	-	無色澄明の液、極僅かに泡立つ	5.17
	5°C	6d			無色澄明の液、極僅かに泡立つ	5.56	100	0.00
		10d			無色澄明の液、極僅かに泡立つ	5.83	98.8	0.00 *
	60°C	6d			無色澄明の液、極僅かに泡立つ	6.67	95.7	0.00 *
		10d			無色澄明の液、極僅かに泡立つ	6.47	93.4	1.94 *
	Z0212	7			調製直後	-	無色澄明の液、極僅かに泡立つ	6.85
			5°C	6d	無色澄明の液、極僅かに泡立つ	6.65	100	0.00 *
				10d	無色澄明の液、極僅かに泡立つ	6.61	100.0	0.00 *
			60°C	6d	無色澄明の液、極僅かに泡立つ	7.28	94.4	5.48 *
				10d	無色澄明の液、極僅かに泡立つ	6.99	92.6	9.83 *

※2:5°C6日保管品に対する含量%を残存率として算出

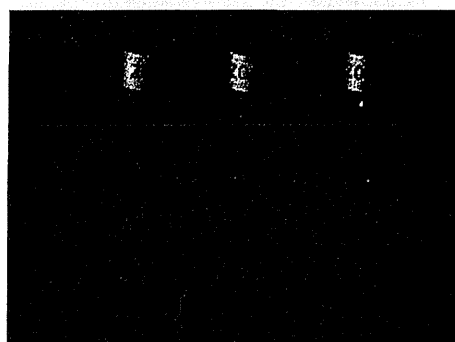
* 製剤の濃度が0.01% (0.1mg/mL) と低濃度であることから、他の濃度と比較して、低濃度の類縁物質は検出できなかったと考えられる

この結果から、下記が確認された。

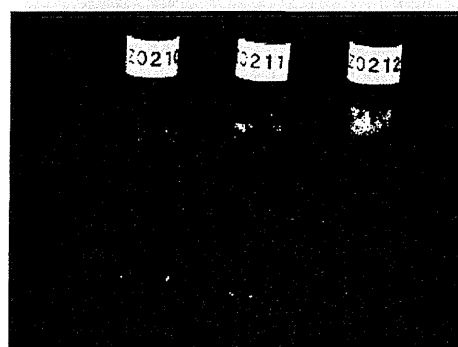
- ・pHが上昇するに従い、類縁物質が増加する
- ・いずれの濃度製剤も、pHが上昇するに従い (pH5以上) 液性に“泡立ち”が確認された
- ・1%製剤のpH7では、明らかな粘性も認められた。



1%製剤 (左から, pH3, 5, 7),



0.1%製剤 (左から, pH3, 5, 7),



0.01%製剤 (左から, pH3, 5, 7),

図 性状写真 (激しく振った後の性状)

これらの結果より、本品のpHは、“pH5.0”以下が望ましいと考えられ、委託者との協議の結果、本品の処方は、pHは4.0に設定した。

6.2. 製造方法及び品質評価

6.2.1. 実施の目的及び概要

本品の濃度0.01%, 0.1%, 0.3%, 1%濃度について試作(0.5Lスケール)を実施し, 製造方法を設定する.

6.2.2. 実施内容

1) 使用原料

以下の原材料を用いて検証を行った.

原料	製造業者	ロット番号
SR-0379 *	American Peptide	N131003
塩化ナトリウム	ナカライテスク	V3H1038
0.1mol/L 塩酸	ナカライテスク	L3R9080
0.1mol/L水酸化ナトリウム	ナカライテスク	03T9251

*Peptide Content : 78.3%

2) 処方

以下の処方にて実施した.

原料	1%	0.3%	0.1%	0.01%
	Z0301	Z0304	Z0302	Z0303
SR-0379※	5000mg	1500mg	500mg	50mg
塩化ナトリウム	4.5g	4.5g	4.5g	4.5g
0.1mol/L 塩酸	適量	適量	適量	適量
0.1mol/L 水酸化ナトリウム	適量	適量	適量	適量
精製水	適量	適量	適量	適量
全量	500mL	500mL	500mL	500mL
pH	4.0	4.0	4.0	4.0

※ SR-0379 は, Peptide Content (%)により含量換算する.

3) 製造方法

① 飽和酢酸カリウム水溶液を用いて、相対湿度 30%以下で安定な空間を作り、SR-0379 を 2 時間以上、調湿させる。

② ①の SR-0379 を下記の量採取する。

$$\text{採取必要量} = \text{各理論量} \times 100/a$$

a: peptide content (%)

製剤	1%	0.3%	0.1%	0.01%
	Z0301	Z0304	Z0302	Z0303
SR-0379 理論量	5000mg	1500mg	500mg	50mg

③ 塩化ナトリウム 4.5g (4 製剤とも) を秤量する。

④ ②③を各々溶解容器に入れ、水を各々450g 入れ、攪拌溶解させる。

⑤ 0.1mol/L 塩酸又は 0.1mol/L 水酸化ナトリウムにて pH4.0 に調整する。

⑥ 各々全量を 500mL とする (比重 1.00, 質量で合わせる)。

⑦ 本品用スプレー容器に 10mL ずつ充填し、巻締める。

6.2.3. 実施結果

設定した製法により、液調製が可能であった。またこれらの品質評価結果は以下のとおりであった。微生物限度に関する詳細を添付資料 (2)、その他の結果の詳細を添付資料 (11) に示す。

品質評価結果

試験項目	規格 (案)	0.01%	0.1%	0.3%	1%
		Z0303	Z0302	Z0304	Z0301
性状	無色澄明の液	無色澄明の液	無色澄明の液	無色澄明の液	無色澄明の液
確認試験	保持時間が同様	保持時間が同様	保持時間が同様	保持時間が同様	保持時間が同様
pH	3.0~5.0	4.05	4.03	4.15	4.03
類縁物質	2%以下	0.000	0.845	0.592	0.620
含量	表示量に対し 90~110%	91.4	101.9	97.8	100.2
微生物限度	総好気性微生物数 10 ² CFU/mL 以下	0 cfu/mL	0 cfu/mL	0 cfu/mL	0 cfu/mL
	総真菌数 10 ¹ CFU/mL 以下	0 cfu/mL	0 cfu/mL	0 cfu/mL	0 cfu/mL
	特性微生物*	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず

*黄色ブドウ球菌, 緑膿菌

6.3. 容器の選定

容器の選定については8項，容器の安定性評価については10項に詳細を記載した。

6.4. 個装箱の検討

8項に示すとおり，本品の容器は“スプレータイプ樹脂容器”とした。

メーカー	阪本印刷
紙材質	JET スター 310g/m ²

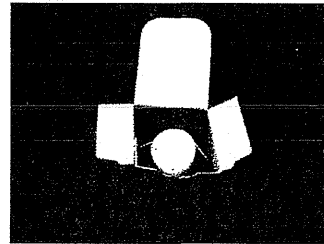
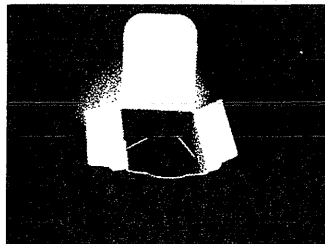
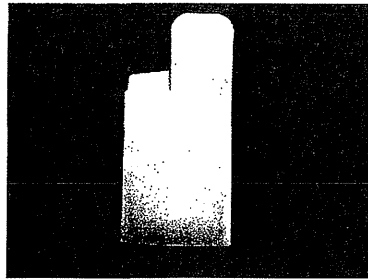


図 本品の個装箱とボトルを入れた状態

7. 市場製品の調査及び容器評価

7.1. 実施の目的及び概要

本品は、難治性皮膚潰瘍患者に一定量を適用する外用液剤となる。そこで、市販の外用液剤を参考にして、本品の容器を設計する。

7.2. 類似する外用液剤の調査

類似する外用液剤として、医療用医薬品、外用液剤の仕様を調査した。

既存の外用液剤（ローション）は多くの製品で用法・用量が“適量を取り、患部に塗布”とされている。本品については、適用量が一定量となる容器が望ましいとの委託先要望により、そのような用法用量の製剤を調査した。

その結果、“フィブラストスプレー250, 500”において、用法・用量が規定されていた。（平成26年4月版 保険薬事典）。添付文書及び容器の使用方法説明書を添付資料(3)に示す。

製品例)

商品名	会社名	用法・用量	仕様
ダラシンTローション1%	佐藤製薬	適量を1日2回、患部に塗布	20mL PP
アクアチムローション1%	大塚製薬	適量を1日2回、患部に塗布	20mLプラスチック
フィブラスト スプレー250	科研製薬	例：5噴霧（主薬量として30 μg）	スプレーノズル 付きガラス 容器
フィブラスト スプレー500	科研製薬		

7.3. 本品用の容器の選定

フィブラストスプレーは、“1回 噴霧量0.06mL、用法用量は5噴霧、容量は2.5mL又は5mL”である。

容器の選定にあたっては本条件を参考にし、以下の容器を選択した。

仕様	本品の容器	フィブラストスプレー
形状	スプレータイプ	スプレータイプ
容器	白色プラスチック容器	透明ガラス容器
噴霧量/1回	0.05 mL	0.06 mL
噴霧量から換算した使用可能回数	10mL充填として、200回	250製剤(2.5mL)：41回 500製剤(5mL)：83回
メーカー	大成化工株式会社	—
構成	ボトル	PE
	スプレー	PP, PE, ステンレススプリング