

- Actively-targeted polyion complex micelles stabilized by cholesterol and disulfide cross-linking for systemic delivery of siRNA to solid tumors. *Biomaterials* 35 27 7887-7895 (2014)
- 7) S. Quader, H. Cabral, Y. Mochida, T. Ishii, X. Liu, K. Toh, H. Kinoh, Y. Miura, N. Nishiyama, K. Kataoka, Selective intracellular delivery of proteasome inhibitors through pH-sensitive polymeric micelles directed to efficient antitumor therapy. *J. Control. Release* 188 67-77 (2014)
- 8) Y. Mochida, H. Cabral, Y. Miura, F. Albertini, S. Fukushima, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Bundled assembly of helical nanostructures in polymeric micelles loaded with platinum drugs enhancing therapeutic efficiency against pancreatic tumor. *ACS Nano* 8 (7) 6724-6738 (2014)
- 9) Y. Maeda, F. Pittella, T. Nomoto, H. Takemoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Fine-tuning of charge-conversion polymer structure for efficient endosomal escape of siRNA-loaded calcium phosphate hybrid micelles. *Macromol. Rapid Commun.* 35 13 1211-1215 (2014)
- 10) L. Nuhn, S. Gietzen, K. Mohr, K. Fischer, K. Toh, K. Miyata, Y. Matsumoto, K. Kataoka, M. Schmidt, R. Zentel, Aggregation behavior of cationic nanohydrogel particles in human blood serum. *Biomacromolecules* 15 (4) 1526-1533 (2014)
- 11) H. -J. Kim, K. Miyata, T. Nomoto, M. Zheng, A. Kim, X. Liu, H. Cabral, R. J. Christie, N. Nishiyama, K. Kataoka, siRNA delivery from triblock copolymer micelles with spatially-ordered compartments of PEG shell, siRNA-loaded intermediate layer, and hydrophobic core. *Biomaterials* 35 (15) 4548-4556 (2014)
- 12) T. Nomoto, S. Fukushima, M. Kumagai, K. Machitani, Arnida, Y. Matsumoto, M. Oba, K. Miyata, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Three-layered polyplex micelle as a multifunctional nanocarrier platform for light-induced systemic gene transfer. *Nat. Commun.* 5 3545 (2014)
- 13) F. Pittella, H. Cabral, Y. Maeda, P. Mi, S. Watanabe, H. Takemoto, H. -J. Kim, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Systemic siRNA delivery to a spontaneous pancreatic tumor model in transgenic mice by PEGylated calcium phosphate hybrid micelles. *J. Control. Release* 178 18-24 (2014)
- 学会発表等
- 1) 1) 西山伸宏, "生体イメージングを活用したナノ DDS 設計", 3S05a 疾患克服を目指したケミカルバイオフォトンクス技術第 87 回日本生化学会大会(2014 年 10 月 15 日-18 日), 京都国際会館, 京都 2014 年 10 月 17 日(シンポジスト)
- 2) 西山伸宏, "高分子ミセル型ナノ医薬品の研究開発", 新製剤技術とエンジニアリングを考える会 第 12 回技術講演会, 京都国際会館, 京都 2014 年 7 月 16 日(招待講演)
- 3) N. Nishiyama, "Biological functionalities of polymeric micelle systems for targeting cancer", The European Summit for Clinical Nanomedicine 2014 (6th CLINAM 2014) (23-25 June), Congress Center Basel, Basel, Switzerland, June 23, 2014 (Invited Lecture)
- 4) 西山伸宏, "高分子ナノテクノロジーを基盤

とするナノ医薬品の開発", 第 10 回つくばがん遺伝子治療研究会, ステーションコンファレンス東京, 東京 2014 年 6 月 20 日(招待講演)

- 5) 西山伸宏, "がんの診断・治療のための高分子ミセル型 DDS の開発", 日本病院薬剤師会東北ブロック第 4 回学術大会 (2014 年 5 月 31 日-6 月 1 日), 仙台国際センター, 仙台 2014 年 5 月 31 日(シンポジスト)
- 6) N. Nishiyama, "Development of supramolecular nanocarriers for cancer diagnosis and therapy", Emerging Biomaterials 2014 (23 May), KAIST Institute, Korea, May 23, 2014 (Invited Lecture)

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

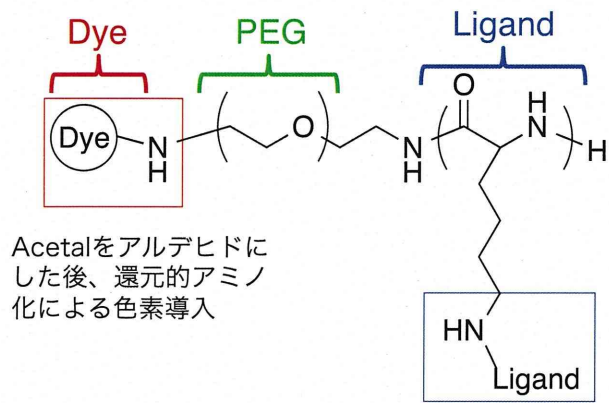


図 1. ポリアミノ酸を基本骨格とする合成リガンドプラットフォーム

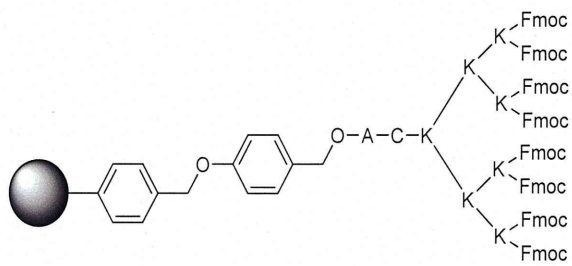


図 2. Fmoc-MAP(8)-Cys(Acm)- $\beta$ Ala-Wang Resin

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

分担研究課題 ナノ化技術を用いたタンパク製剤の効率的な封入方法とその評価法に  
関する研究

研究分担者 興和株式会社 富士研究所主任研究員 小崎 雅人

要旨 タンパク質医薬品の効率的なナノ粒子構造体への封入を目的としている。タンパク質医薬品をナノ粒子構造体へ封入するにあたり、その意義を明らかとし、モデルタンパク質とプラットフォームとなり得るナノ粒子化技術の選定を行い、その検討方針について確認した。

研究協力者

三浦 誠司 興和（株）

#### A. 目的

リゾチームやインスリンなどを代表とし、タンパク製剤の研究開発の歴史は長い。2000年代初頭の抗体医薬品登場とともに、その研究開発は加速しており、2013年には医薬品売上ランキングの上位半分以上をタンパク製剤が占めるに至った。

一方で、近年、抗癌剤を中心に活発な研究がなされているのがナノ粒子製剤である。ナノ粒子製剤は、有効成分をナノ粒子構造体に封入することにより、血中での安定性向上や標的部位へのターゲティングなどを目的とした製剤である。

本研究ではタンパク質医薬品のナノ粒子構造体への効率的な封入方法の検討を最終目標とするが、今年度は検討方針の設定を目的とし検討を行った。

#### B. 研究方法

現在まで上市されたタンパク質製剤の精査

を行い、ナノ粒子製剤とすることによる意義を整理した。その後、モデルタンパク質およびプラットフォームとなり得るナノ粒子技術を選出し、実験的にその検討方針について評価を行った。

以下に、詳細を示す。

- 1) 現在までに、上市されたタンパク質製剤をまとめ、該製剤の課題を整理し、ナノ粒子への封入による課題解決の可能性について考察した。
- 2) タンパク質医薬品の物性について調査を行い、種々の観点からモデルタンパク質として使用の可能性を評価した。
- 3) ポリイオンコンプレックス技術をプラットフォームとし、2)にて選択したモデルタンパク質のナノ粒子化の確認を行った。以下に詳細を示す。

ポリイオンコンプレックスはイオン性高分子（ポリアニオンとポリカチオン）を水中にて混合することにより得られるナノ粒子構造体である。一般に、ポリアニオンまたはポリカチオンの両方または片方は Polyethylene glycol (PEG) などの電荷を

持たない親水性高分子との共重合体として用いられる。ポリオンコンプレックスの形成は、まずアニオンとカチオンが電荷を打ち消し合い、ポリオン領域が疎水性となることから始まる。続いて、生じた両親媒性の会合体がミセル様のナノ粒子構造体を形成すると考えられる (図 1)。

本研究では、文献を参考に、汎用性の高い Polyethylene glycol - poly Aspartic acid ブロック共重合体 (PEG-P(Asp)) および Polyethylene glycol - poly Glutamic acid ブロック共重合体 (PEG-P(Glu)) を用いた。該ブロック共重合体は PEG のモノアミン誘導体をマクロ開始剤として alpha-Amino Acid N-Carboxyanhydride (NCA) をリビング重合することにより得た (図 2)。以下に概略を示す。Polyethylene glycol-NH<sub>2</sub> (Mw:12,000 / 日本油脂株) 1.2 g (0.1 mmol) および Asp(OBzl)-NCA (Isochem 社) 1.0 g (4 mmol) を N,N-dimethylformamide (DMF / 和光純薬工業株) に溶解し、アルゴン雰囲気下にて 35 ° C, 48 時間反応させた。続いて、反応溶液をヘキサン/酢酸エチル (3 : 2) に滴下し、得られた沈殿を回収した。NMR 測定により Asp(OBzl) の平均ユニット数を算出後、保護基の 5 倍当量の水酸化ナトリウムにより脱保護を行い、PEG-P(Asp) を得た。なお、PEG-P(Glu) についても同様の手順にて作成した。

該高分子と 2) にて選定したモデルタンパク質を混合することによりナノ粒子形成の確認を行った。ナノ粒子の評価としては、25 ° C における平均粒子径および多分散度 (PDI) を ZETA SIZER NANO ZS (Malvern) により測定した。

<倫理面への配慮>

該当無し

## C. 結果と考察

### C.1. タンパク製剤の現状

図 3 に各タンパク製剤名と上市年をまとめた。タンパク製剤は、酵素、ホルモン・サイトカインおよび抗体に分類することができる。また、80-90 年代をホルモン・サイトカイン、2000 年代からを抗体の時代と見ることができる。さらに、野生型のタンパク質に PEG を修飾することにより、血中での安定性を向上した製剤が多く上市されている。このように、血中安定性はタンパク製剤の大きな課題であることが言える。

上述のようにタンパク製剤の血中安定性向上のために PEG 修飾が行われるが、タンパク質の構造に化学修飾を行うために、その生理活性の著しい低下が懸念される。実際に PEG 化インターフェロン (PEGASYS) は血中滞留時間の大幅な延長 (t<sub>1/2</sub> が 7.5 倍) と引き換えに、その生理活性は 1/10 以下となっている<sup>1</sup>。

以上のことから、タンパク医薬品の血中安定性を向上させる方法として化学修飾を施さない方法が理想的である。タンパク医薬品のナノ粒子構造体への封入は、該要求事項を満たしており、有益な方法論であると判断した。

一方で、タンパク製剤のうち抗体についてはそもそも血液由来のタンパク質であることから、その血中安定性は一般に問題とならない。また、酵素やホルモン・サイトカインの大きさが数 nm であるのに対し、抗体は 10 nm 以上と比較的大きい。一般に検討されるナノ粒子サイズ (<200 nm) を考慮すると、封入量が著しく低くなる。このため、ナノ粒子化による利点を十分に享受できるのは、酵素またはホルモン・サイトカインに限定されることが考えられた。

## C. 2. モデルタンパク質の設定

表 1 にモデルタンパク質として可能性のあるタンパク医薬品をまとめた。物性、文献情報、DDS 応用例や入手の容易さ等を考慮し、リゾチームおよびインスリンをモデルタンパク医薬品として選定した。特に、リゾチームの等電点は 11 付近とカチオン性であるのに対し、インスリンの等電点は 5 付近とアニオン性である。このため、本研究の幅広いタンパク医薬品への応用が期待できる。

## C. 3. ポリオンコンプレックスを用いたタンパク質医薬品のナノ粒子化

C. 2 にて選定したモデルタンパク質の内、リゾチームについてポリオンコンプレックスを用いたナノ粒子化について検討を行った。

### C. 3. 1 高分子合成

リゾチームはカチオン性であるため、アニオン性の PEG-ポリアミノ酸ブロック共重合体 (PEG-P(Asp) および PEG-P(Glu)) の合成を行った。代表的な NMR の結果を図 4 に示す。PEG 末端の CH<sub>3</sub>O 基を基準に、各アミノ酸のユニット数を算出した。その結果、概ね目的のユニット数のブロック共重合体 (PEG-P(Asp) 35 および PEG-P(Glu) 40) が得られた。

### C. 3. 2 リゾチームのナノ粒子化

文献<sup>2</sup>を参考にリゾチームのナノ粒子化を行った。C. 3. 1 にて合成した高分子とリゾチームをそれぞれ 4 mg/mL となるように精製水に溶解し、高分子のカルボキシル基とリゾチームのアルギニンおよびリジン残基が等量となるように混合した。

平均粒子径および PDI の測定結果を図 5 に示

す。PEG-P(Asp) および PEG-P(Glu) 共に、平均粒子径 50 nm 付近の粒子が得られた。文献では、PEG-P(Asp) 15 を用いて 50 nm 付近の粒子が得られており、アミノ酸ユニット数の粒子径への影響が小さいことが示唆された。一方で、PEG-P(Asp) に比べ PEG-P(Glu) はやや大きい粒子を与えた。この原因としては、Glu が Asp に比べ炭素が多く疎水性が強いために、粒子形成時の会合力が強かった可能性が考えられた。

PDI については 0.016 (PEG-P(Asp)) および 0.015 (PEG-P(Glu)) と非常に低く、非常に粒度分布の狭い単分散な粒子が得られていることが示唆された。

以上のように、リゾチームをポリオンコンプレックスとしてナノ粒子化することは可能であった。また、その粒子径および PDI、またアミノ酸の違いやユニット数による影響を考慮すると、非常に安定に粒子調製が可能と考えられた。このため、単純なリゾチームを用いたポリオンコンプレックスは、タンパク製剤のナノ粒子化検討のモデルケースとしては、検討の余地が非常に少ないため適さない可能性が考えられた。

一方で本結果は、ポリオンコンプレックスがタンパク製剤のナノ粒子化に非常に有効であり、堅牢な調製方法を与える可能性が示唆される結果でもある。このことから、ポリオンコンプレックスを基本に、機能性を付与した汎用性の高いタンパク製剤ナノ粒子化技術として方向性を再検討することが好ましいと考えられた。特にポリオンコンプレックスは、PLGA ナノ粒子など、その他のナノ粒子技術に比べ精密な分子設計が可能であり、機能性の付与が容易であるという特徴がある。今後は、封入するタンパク製剤の特性を考慮し、環境に応答する ON/OFF 機能の付与を視野に入れ、検討方

針の再考を行うこととする。

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

#### D. 結論

本研究ではタンパク質医薬品のナノ粒子構造体への効率的な封入方法の検討を最終目標とし、検討方針の設定および可能性の評価を行った。

その結果、プラットフォームとしてのポリイオンコンプレックスの有効性を示したものの、モデルケースとしては適さないと考えられた。今後は、ポリイオンコンプレックスを基本とし、機能性付与を視野に入れた、新たな検討方針を設定する予定である。

#### <参考文献>

- 1) EU patent: EP 0 809 996 A2
- 2) Yuan, X., Harada, A., Yamasaki, Y., Kataoka, K.: Stabilization of lysozyme-incorporated polyion complex micelles by the omega-end derivatization of poly(ethylene glycol)-poly(alpha, beta-aspartic acid) block copolymers with hydrophobic groups. *Langmuir*, **29**: 2668-2674 (2005).

#### E. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表等

論文発表等 (総説も含みます)

なし

学会発表等

なし

報道発表等

なし

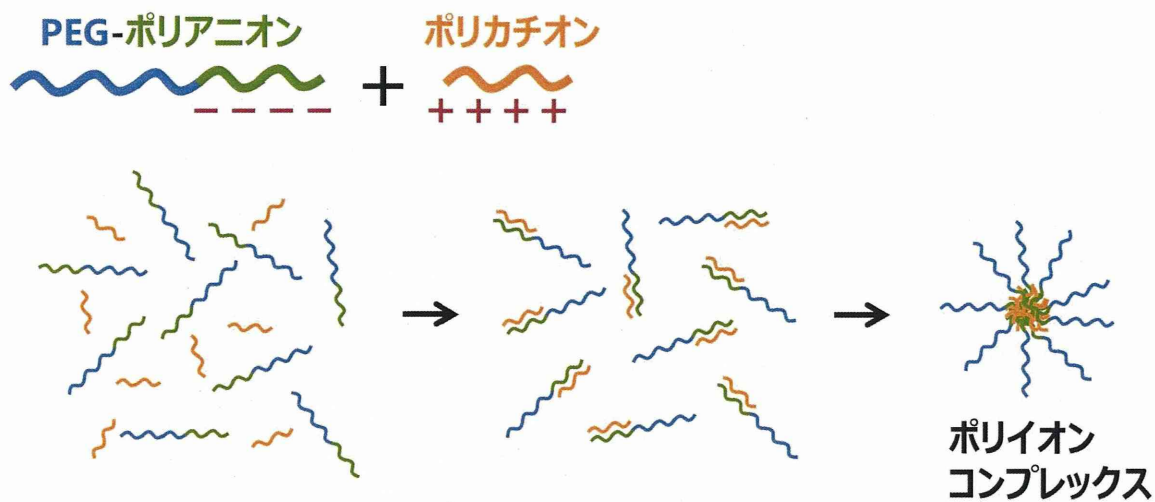


図1 ポリオンコンプレックスの形成過程

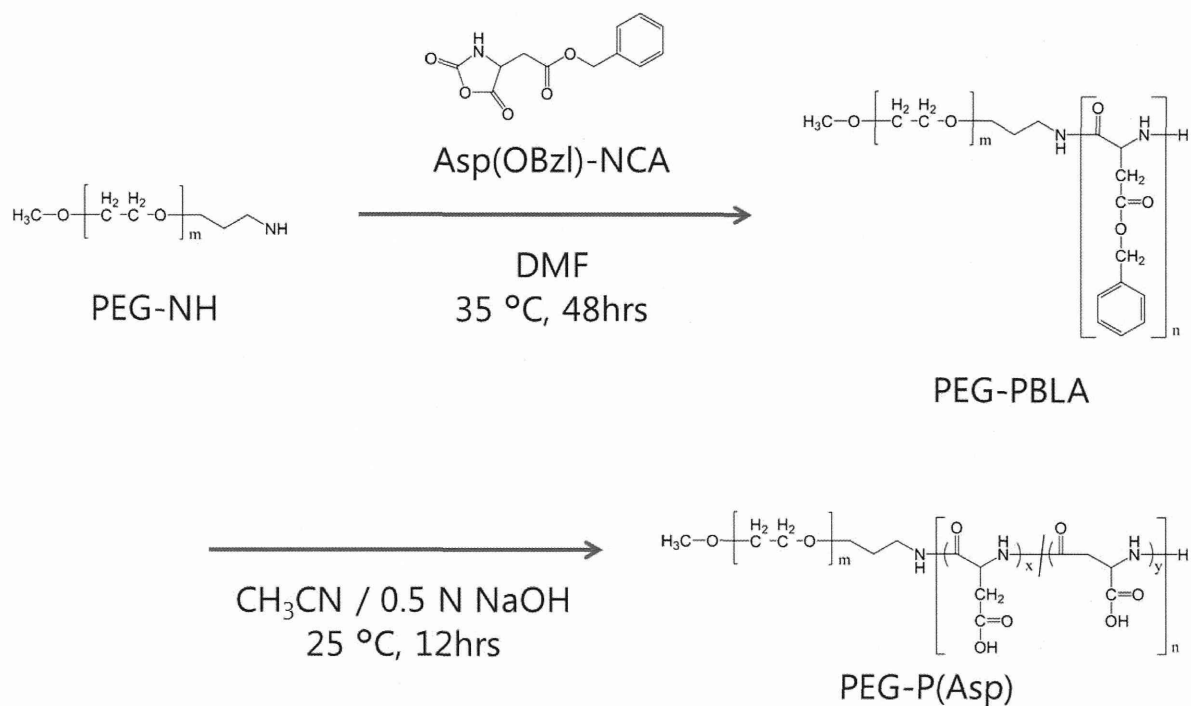


図2 PEG-P(Asp) 合成スキーム

PEG-PBLA : PEG-Poly(beta-benzyl-L-aspartate)



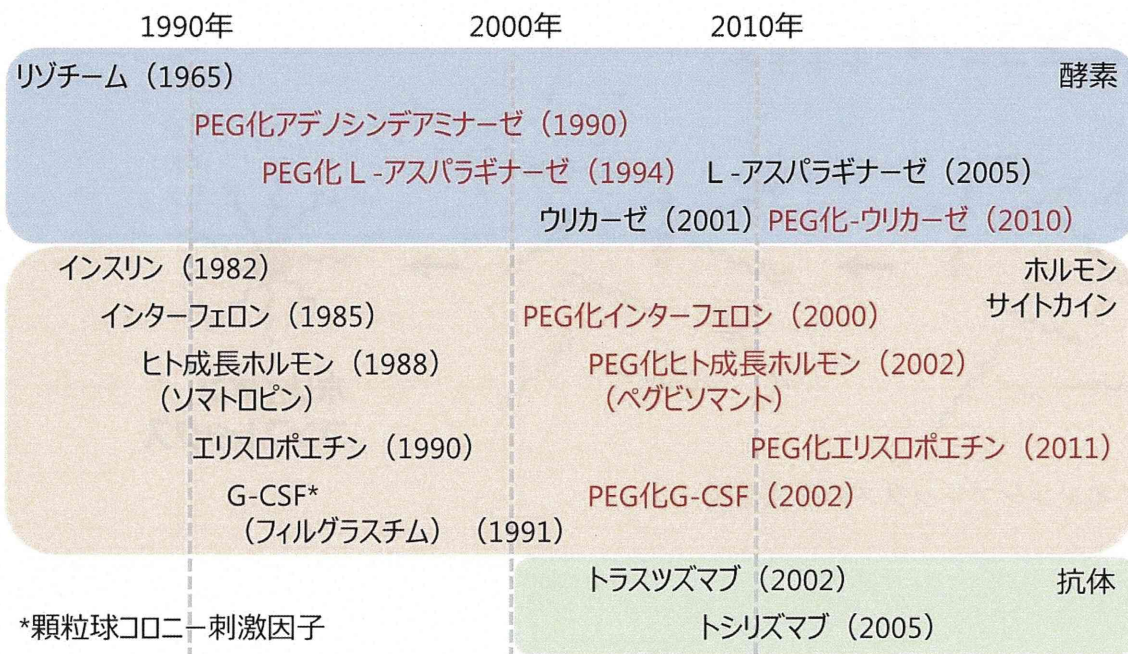


図3 タンパク製剤の上市状況

表1 モデルタンパク質候補

薬物	対象疾患	大きさ (kDa)	DDS応用例	価格	DDS 応用例	備考
インスリン	糖尿病	5.8	PEG化	4万円/50 mg	PEG化	アニオン性
リゾチーム	慢性副鼻腔炎等	14	PEG化	9万円/10 g	PEG化	カチオン性
インターフェロン	腎癌, 白血病 B型・C型肝炎 等	17-30	PEG化	100万円/mg	PEG化	—
エリスロポエチン	腎性貧血	37-42	PEG化	9万円/10 µg	PEG化	—
抗体	各種疾患	150-170	ターゲティング	1.2万円/10 mg	ターゲティング	—

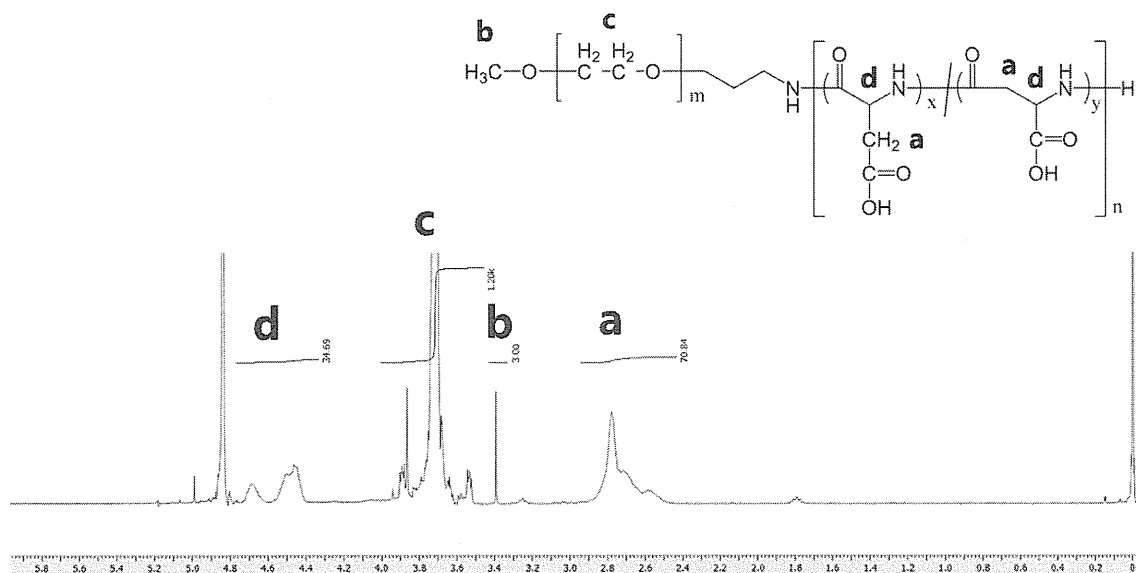


図4 高分子合成結果 (H<sup>1</sup>-NMR)

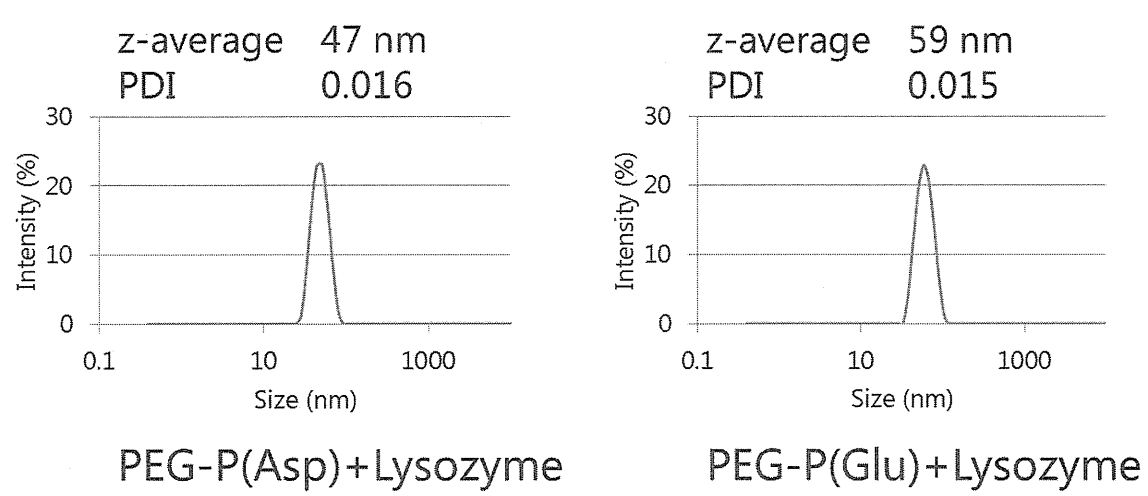


図5 平均粒子径およびPDI

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

先端的分析評価法を用いた製剤開発及び製造工程管理に関する研究

研究分担者 香取 典子 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部

要旨：医薬品設計段階及び実製造プロセスにおける分析評価に関する課題についてスクリーニングを行ない、有用性が高いと考えられた製剤特性及び製造工程を評価する先端的分析評価手法について以下の検討を行った。1)液剤等の溶解型製剤の可溶/析出評価法の効率化・迅速化を目的として、動的散乱法を用いた粒度分布測定装置の有用性を評価した。2)弱塩基性化合物における食事の影響を評価可能な In vitro の評価系を、溶出試験装置を用いて構築した。3)薬物の脱塩・フリー化の有無を予測できる脱塩判定式を、塩化合物の固有溶解度および酸解離定数より導いた。4)連続造粒工程において、リスクアセスメントにより製剤品質に影響を与える重要品質特性を特定した。また PAT ツールを用いた連続造粒工程のリアルタイムモニタリングについて、適切な測定部を試作、測定を行った。いずれの評価手法も良好な結果が得られたが、まだ限定的な適用のため、改善の必要性があると考えられた。

研究協力者	長田 裕臣 田辺三菱製薬（株）
森島 健司 参天製薬（株） 製剤開発センター長	CMC 本部分析研究所 山田 裕之 田辺三菱製薬（株）
岡本 智之 参天製薬（株） 製剤開発センター 主任研究員	CMC 本部分析研究所 石川 英司 大日本住友製薬（株）
西村 豊実 参天製薬（株） 製剤開発センター 研究員	技術研究本部 松井 康博 大日本住友製薬（株）
廣島 高志 武田薬品工業（株） 開発分析研究所	技術研究本部 村上 貴之 大日本住友製薬（株）
鶴城 大 武田薬品工業（株） 開発分析研究所	技術研究本部 山本 貢史 大日本住友製薬（株）
森口 和信 武田薬品工業（株） 開発分析研究所	技術研究本部 夏山 晋 （株）パウレック 研究開発部
堀本 眞吾 田辺三菱製薬（株） CMC 本部分析研究所	長門 琢也 （株）パウレック 研究開発部 細野 哲矢 （株）パウレック 研究開発部
大島 大樹 田辺三菱製薬（株） CMC 本部分析研究所	小出 達夫 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 主任研究官

坂本 知昭 国立医薬品食品衛生研究所  
薬品部 主任研究官  
檜山 行雄 国立医薬品食品衛生研究所  
薬品部 客員研究員

## A. 目的

医薬品製剤開発に関するガイドライン (ICH Q8) では、製剤開発において、科学的根拠及び品質リスクマネジメントに基づくより体系的なアプローチである QbD (Quality by design) が推奨されている。QbD アプローチでは、有効性および安全性に影響する製剤の重要品質特性を明らかにして、製剤開発研究時及び経験的に得られた情報、知識をもとに適切な管理戦略を構築することとなる。そのため、技術的な課題として製剤の品質特性を解析するための適切な評価手法、また同時に製造工程を理解するための評価手法が必要となる。そこで本研究は、製剤開発及び製造工程管理に必要な製剤の品質に影響する重要品質特性の評価手法及び製造工程中でリアルタイムに重要品質特性のモニタリングが可能な工程評価手法 (Process Analytical Technology, PAT) を開発し、実用化するために、製品設計段階及び実製造プロセスにおける分析評価に関する課題についてスクリーニングを行ない、有用性が高いと思われた先端的分析評価手法について以下の検討を行った。

製剤開発における製剤特性を評価する先端的手法 ; 1) 溶解型製剤の可溶/析出評価法の効率化・迅速化を目的とした動的散乱法を用いた粒度分布評価 ; 2) 弱塩基性化合物における食事の影響を評価可能な In vitro の溶出試験評価系の構築 ; 3) 塩化合物の固有溶解度 ( $C_0$ ) および酸解離定数 ( $pK_a$ ) より脱塩・フリー化の有無を予測できる脱塩判定式の作成 ; 4) 製造工程を管

理する先端的手法として、連続製造工程におけるリスクアセスメント及び PAT ツールを用いた連続製造工程のリアルタイムモニタリングについて検討を行った。

## B. 研究方法

### B. 1. 溶解型製剤の可溶/析出評価法の効率化・迅速化を目的とした動的散乱法を用いた粒度分布評価

配合変化により析出し白濁することが明らかになっているモデル化合物を対象とし、目視での評価では捉えきれないナノレベルでの現象を動的散乱法により評価を行った。

本研究では、分析装置として大塚電子社製ゼータ電位・粒径測定システム ELSZ1000 を用いた。測定試料はモデル化合物として市販点眼液 A と防腐剤として汎用されているベンザルコニウム塩化物溶液の混合溶液を選択した。点眼液 A とベンザルコニウム塩化物溶液の混合比率を変えた調製物 A-1 (点眼液 A50%)、A-2 (点眼液 A50%、ベンザルコニウム塩化物 5%)、A-3 (点眼液 A50%、ベンザルコニウム塩化物 50%) を調製した。粒子径ガラスセル (光路長 10mm) に試料を 2 mL 充填し、ELSZ1000 にて粒子径測定を行った。測定後、付属のソフトウェアを用いて粒度分布解析を行った。

### B. 2. 弱塩基性化合物における食事の影響を評価可能な In vitro の溶出試験評価系の構築

医薬品開発において、食事による in-vivo 挙動の影響評価は投与のタイミングや Bioavailability の観点から重要である。特に弱塩基性化合物においては、胃 (酸性) 条件下での過飽和が Bioavailability により影響を与える可能性があり、食事による影響を大きく受けることが想定される。本研究では、弱塩基性

化合物である化合物 A の即放性錠剤を使用し、弱塩基性化合物における食事の影響を評価可能な In vitro の評価系を、溶出試験装置を用いて構築した。

装置構成は、溶出試験用のミニベッセル 2 個に 2 個のポンプ(補充液充填用及び溶液排出用)を繋いだものを用意し、それぞれ溶出用ベッセル及び補充液用ベッセルとした。

食事の影響の評価は、化合物 A の錠剤(30 mg)を溶出試験用ベッセルに入れ、表 1 に記載の条件で胃内を模した溶出試験を実施した。その後、2 つのポンプを稼働し、補充液を溶出用ベッセルに送液するとともに、溶出用ベッセルからの排出も開始した。この排出液を一定時間ごとに採取し、HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 法によって、化合物 A の溶解量を測定し、時間-溶解量プロファイルを作成した。得られた絶食時及び節食時の溶解量プロファイルと比較することにより、食事の影響の有無を評価した。また、絶食時においては、溶出試験用ベッセル内の様子を目視で観察することにより、析出の有無を確認した。

### B. 3. 塩化合物の $C_0$ および $pK_a$ より脱塩・フリー化の有無を予測できる脱塩判定式の作成

製剤中における原薬の脱塩・フリー化の挙動と溶出性など製剤品質への影響を調査すると共に、脱塩・フリー化メカニズムに関する考察を行い、原薬の塩選定方針や製剤添加剤の選定に関する標準的な品質特性解析法の開発を試みた。本年度は、固体中での脱塩・フリー化における湿度の影響を調査すると共に、溶解度に関する 2 種の式より脱塩境界式を算出し、原薬の  $C_0$  と  $pK_a$  より製剤中での脱塩リスクを判定できる脱塩判定図を作成した。

原薬は、固有溶解度(分子型の溶解度)が数

$\mu\text{g/mL}$  程度の弱塩基性化合物の塩 15 種(塩化合物 a~o) をモデル化合物として使用した。添加剤は、一般的な製剤で使用される添加剤の中から 12 種を選択した。

固体中における脱塩・フリー化の検証は各塩化合物と同量の添加剤をメノウ乳鉢で強く混合した。15 種の塩化合物の単体および各添加剤との混合品を  $60^\circ\text{C}/75\%RH$  で 3 時間保存し、粉末 X 線回折測定を行った。低湿度下での脱塩・フリー化挙動を調査するため、塩化合物と添加剤の 1:1 配合品を  $60^\circ\text{C}/$ シリカゲル(実測値:  $17\%RH$ ) で 3 時間保存し、粉末 X 線回折測定を行い、 $60^\circ\text{C}/75\%RH$  保存での結果と比較した。

水中における脱塩・フリー化の検証として数 mg の各塩化合物を窪みの付いたガラスプレート上に取り、水 1 滴を加え、スパーテルの先で数分間かき混ぜた。その溶解過程を実体顕微鏡で確認した後、綿棒で水分のみを吸い取り除去した。この操作を数回繰り返した後、残った未溶解物の粉末 X 線回折測定を行った。

### B. 4. 連続製造工程におけるリスクアセスメント及び PAT ツールを用いた連続製造工程のリアルタイムモニタリング

近年、医薬品製造において低コストで高品質の製品を製造可能な連続製造が注目されている。しかし連続湿式造粒における製剤開発例、特に QbD アプローチを採用した例はほとんど示されていない。そこで連続湿式造粒で QbD アプローチを採用した製剤開発を行うこととした。今年度は連続造粒工程のリスクアセスメントによる品質リスクの特定を行うとともに、連続造粒プロセスにおける物質特性について PAT を活用したモニタリングを実践し、その測定可能性について考察した。

水分量のモニタリングについては、近赤外分光技

術を用い、結合液供給速度を変化させた場合の湿潤粉体の水分値を計測した。連続造粒は連続混合造粒機(CTS-MiGRA (株)パウレック)を用いた。表 2 に連続造粒処方および操作条件を示す。はじめに結合液供給速度の高い条件(Run1)、続いて少ない条件(Run2)で実施した。連続混合造粒機の出口に専用シュートを試作して、近赤外分析装置(株)ビートセンシング社製 BeatSensor GP2)の測定プローブを取り付けた。シュート形状は粉粒体が一旦滞留するような勾配とし、測定プローブ先端には滞留した粉が堆積するような粉溜まり部を設け、ここに測定対象物を静止させて計測する構造とした。さらに溜まった粉が新しく入れ替わるようエアパーージ機構を設けて間欠的にエアパーージをした。近赤外分析装置測定条件およびエアパーージ等測定部の条件を表 2 に示す。なお、排出口から定期的な湿潤顆粒のサンプリングを行い、オフラインにより水分値測定を行った。水分計はザルトリウス社製 MA150 を用い、水分測定条件は 80°C、15min で行った。

粒子径モニタリングは表 3 に示す処方および製造条件で連続造粒を行い、連続造粒機の出口配管にバッチプロセスで用いる粒度分布測定装置を接続した。結合液供給速度をパラメータとした。結合剤液はヒドロキシプロピルセルロース水溶液とした。粒度分布測定装置は排出口の真下に設置した。粒度分布測定装置には Particle-Viewer(株)パウレック製)を用いた。

#### <倫理面への配慮>

本研究は生物材料等を使用していないため、倫理面への配慮が必要な案件はない。

### C. 結果

C.1. 溶解型製剤の可溶/析出評価法の効率化・迅速化を目的とした動的散乱法を用いた粒度

分布評価

調製物 A-1 ~ A-3 について、ELSZ1000 にて得られた粒度分布解析結果を図 1 に示した。調製物 A-3 では目視による白濁および粒度分布測定でピークが検出された。一方で、製品 A-2 では目視では澄明だが、粒度分布測定でピークが検出された。目視では検出できない薬物の配合変化による不溶性微粒子を、動的散乱法では検出できる可能性が示された。

C.2. 弱塩基性化合物における食事の影響を評価可能な In vitro の溶出試験評価系の構築

取得した化合物 A の溶解量プロファイルを図 2 に示す。胃内を模した溶出試験では、摂食時よりも絶食時の方が高い溶解量を示した。腸内を模した溶出試験では、絶食時において、溶解量が顕著に減少し、目視でも析出が認められた。従って、化合物 A が過飽和を生じた後、析出したことが明らかとなった。一方、摂食時においては、溶解度の減少に伴う溶解量の減少が見られた。

絶食時及び摂食時の溶解量プロファイルの曲線下面積 (AUC) をそれぞれ求めたところ、 $AUC_{絶食時}=264 \text{ mg}\cdot\text{min}$ 、 $AUC_{摂食時}=201 \text{ mg}\cdot\text{min}$  であり、両者の比は  $AUC_{絶食時}/AUC_{摂食時}=1.3$  であった。化合物 A の in-vivo データでは、時間-血中濃度曲線の AUC 比は 1.03 (In-vivo においては食事の影響はなし) であったことから、in-vivo の AUC 比に近い結果を得ることが出来た。

C.3. 塩化合物の  $C_0$  および pKa より脱塩・フリー化の有無を予測できる脱塩判定式の作成

15 種の難溶性の弱塩基性化合物の塩 (原薬) と一般的な 12 種類の添加剤との配合性の結果、原薬は添加剤との配合により脱塩する化合物 A 群と、脱塩しない化合物 B 群に分類された。(表

4) また、両化合物群の水中での溶解挙動を調査した結果、化合物 A 群と化合物 B 群では溶解特性が異なり、固体中での脱塩と水中での溶解特性には相関があることが明らかとなった。また、保存湿度に関する調査結果から、脱塩スピードは原薬や添加剤の種類によって相違する可能性が示唆された。

水への溶解に関する 2 種の式を用いて、原薬の  $C_0$ 、 $pK_a$  及び対イオン種から成る脱塩判定図 (図 3) を考案した。これにより、製剤中における原薬の脱塩・フリー化を理論的に予測することが可能となった。

#### C. 4. 連続製造工程におけるリスクアセスメント及び PAT ツールを用いた連続製造工程のリアルタイムモニタリング

連続造粒工程のリスクアセスメント結果から、含量均一性、溶出性及び錠剤硬度が高リスクと考えられ、予備混合粉末の含量均一性及びに造粒品の粒度分布、密度、水分が品質に大きな影響を与える可能性のある p-CMA (Potential Critical Process Parameter) と考えられた。リスクアセスメントの結果抽出された p-CMA に影響を与える可能性のある工程パラメータ (p-CPP) を抽出するために Fishbone diagram による分析 (図 4) を行った。本研究の対象は連続製造工程であり、予備混合粉末の混合均一性は前工程にあたることから本研究の対象外とし、造粒物の粒度分布、密度、水分に影響を与える因子を特定した。

連続造粒工程において、結合液供給速度と排出口からサンプリングした湿潤体のオフラインでの水分値は良好な相関が確認された。供給機による精密な定量切出し性能と連続造粒機による高い溶液分散混合性能が示され、また得られた水分値についてもほぼ理論値に近い数

値を示した。このオフラインの水分値と近赤外分析スペクトルで水分予測検量線を作成した。なお、多変量解析には 1300~1600nm の水の吸収域を用いたところ非常に高い相関を得ることができた。この予測モデルを用いて Run1 および Run2 条件における水分値を予測した結果を図 5 に示す。エアパージによる外乱を除くと結合剤供給速度の変化とともに予測水分が増加した。このことから近赤外による測定によって水分含量を良好に予測していると考えた。

連続造粒による粒子径モニタリングにおける平均粒子径  $D_{50}$  の推移を図 6 に示す。造粒初期の供給量増加による平均粒子径の増加および供給停止時の平均粒子径の減少を捉えていた。しかし途中の水分量の増加による平均粒子径の増加は捉えていなかった。そこで得られた湿潤顆粒を流動層にて乾燥させ、その顆粒を篩法によって粒度分布を測定した。その結果、結合剤供給速度が増加するとともに乾燥顆粒の平均粒子径は大きくなる傾向を示していた。このことから湿潤顆粒についても結合液供給速度が速いほど、平均粒子径が大きいと考えられ、結合液供給速度を増加させている途中の結果は実際に生成する造粒物変化を反映できていないと考えられた。

#### D. 考察

製剤開発における製剤特性を評価する先端的な手法として、動的散乱法を用いた粒度分布、弱塩基性化合物における食事の影響を評価可能な溶出試験、塩化合物の脱塩・フリー化の有無を予測できる脱塩判定式の作成について検討を行った。これらの検討からは良好な結果が得られたが、適用例がまだ少ないため、まだ改善の余地があると思われる。これらの評価系は製剤開発時における製剤設計の際に欠かせない

情報を提供できる可能性があり、製剤開発の迅速化、効率化が望めるようになると考える。

また製造工程を管理する先端的手法として、連続製造工程におけるリスクアセスメント及びPATを用いた連続製造工程のリアルタイムモニタリングについて検討を行った。工程中のモニタリングを行うためには、オフラインの場合と異なり、流動する粉体を測定するための対策が必要となる。近赤外による水分モニタリングの場合、測定対象物を静止させて計測する構造を導入することにより、モニタリングを可能としたが、粒度モニタリングでは配管途中に粒度分布計の測定プローブを設置したところ閉塞が生じ、プロセスに悪影響を及ぼした。そのため配管外に測定プローブを設置したが、十分な結果が得られなかったことから代表的なサンプリングができていなかったと考えられた。測定部分ができるだけ多くの湿潤造粒物を測定できるような工夫が必要と考える。

#### E. 結論

製剤開発における製剤特性を評価する先端的手法を検討し、以下の結果が得られた。

動的散乱法により、目視では確認できない析出した粒子を捉えることができ、水性点眼液の析出評価法として動的散乱法が有用であることを見出すことができた。

飽和・析出を生じる弱塩基性化合物製剤の食事の影響を評価するために、パドル法及びポンプを組み合わせ構築した評価システムは、弱塩基性薬物の食事の影響を評価するために有用なツールであると考えられた。

原薬の  $C_0$ 、 $pK_a$  及び対イオン種から成る脱塩判定図を考案した。これにより、製剤中における原薬の脱塩・フリー化を理論的に予測することが可能となった。

また製造工程を管理する先端的手法として、連続製造工程におけるリスクアセスメント及びPATツールを用いた連続造粒工程のリアルタイムモニタリングについて検討を行い、以下の結果が得られた。

連続造粒工程の p-CMA として粒度分布、密度、水分を抽出し、それらに影響を与える p-CPP の抽出を行った。

連続造粒プロセスにおいて、近赤外分光法により造粒物の水分含量モニタリングを行ったところ、造粒物中の水分量の変化を捉えることができた。粒子径モニタリングについてはまだ十分な結果が得られず、代表的なサンプリングをできるような工夫が必要であることが明らかとなった。

#### F. 健康危機情報

無し

#### G. 研究発表等

##### 論文発表等

- 1) 香取典子、坂本知昭、小出達夫、「日本薬局方における品質試験と製造工程管理：プロセス解析工学 (PAT) と新たな品質パラダイム」、レギュラトリーサイエンス学会誌、4(2)、177-187 (2014)

##### 学会発表等

- 1) 大島大樹、長田裕臣、山田裕之：難溶性原薬の脱塩・フリー化に関する研究。日本薬剤学会第 29 回年会 (2014. 5. 20-22, 埼玉)。

##### 報道発表等

無し

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

無し



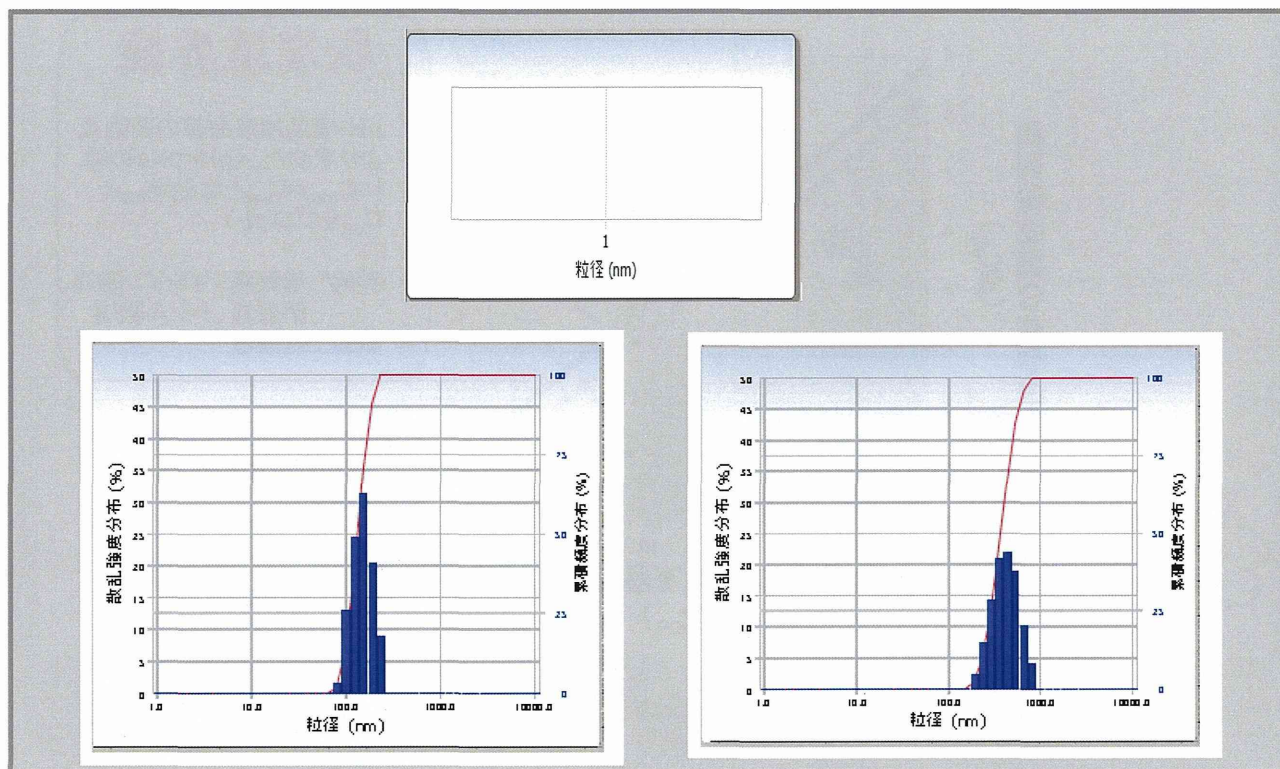


図 1. 粒度分布解析結果  
左 ; A-1、中央 ; A-2、右 ; A-3

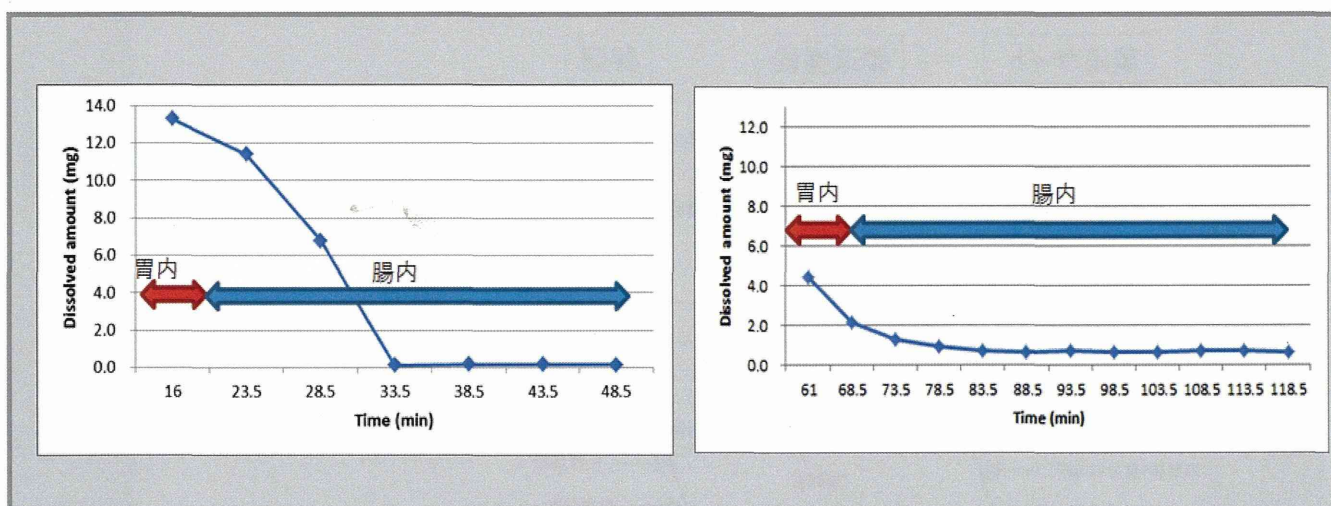
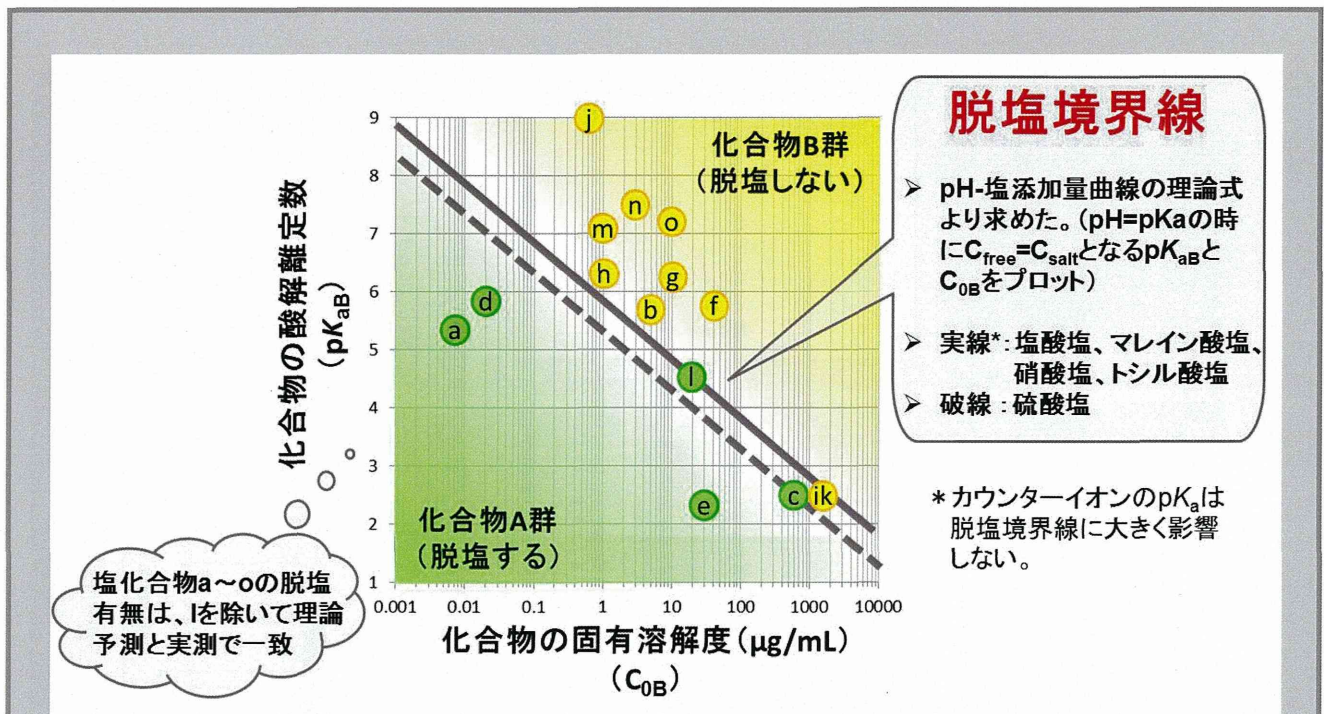


図 2. 化合物 A の(左) 絶食時及び(右) 摂食時を模した試験条件における溶出プロファイル  
(赤矢印は胃内部を模した溶出試験における溶解量、  
青矢印の範囲は腸内部を模した溶出プロファイルをそれぞれ示す)



対イオンが2価である塩化合物の pH-塩添加量プロットは、次式で示される。

$$C_{salt} = \frac{10^{-pH} - 10^{pH-14}}{\left( \frac{10^{-pK_{a1}} - pK_{a2}}{10^{-2pH} + 10^{-pK_{a1}} - pH + 10^{-pK_{a1}} - pK_{a2}} \right) \left( 2 + \frac{10^{-pH}}{10^{-pK_{a2}}} \right) - \frac{10^{-pH}}{10^{-pK_{aB}} + 10^{-pH}}}$$

図3 原薬の脱塩判定図

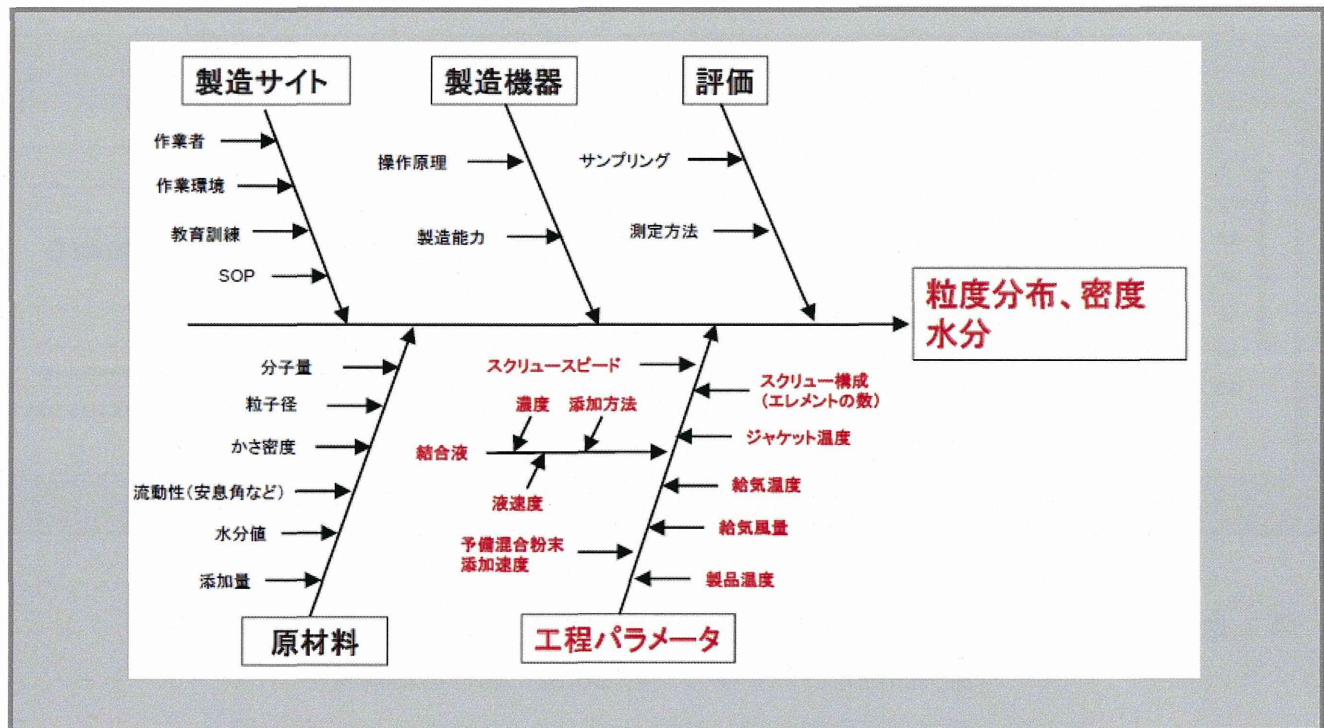


図4 Fishbone diagram 分析結果

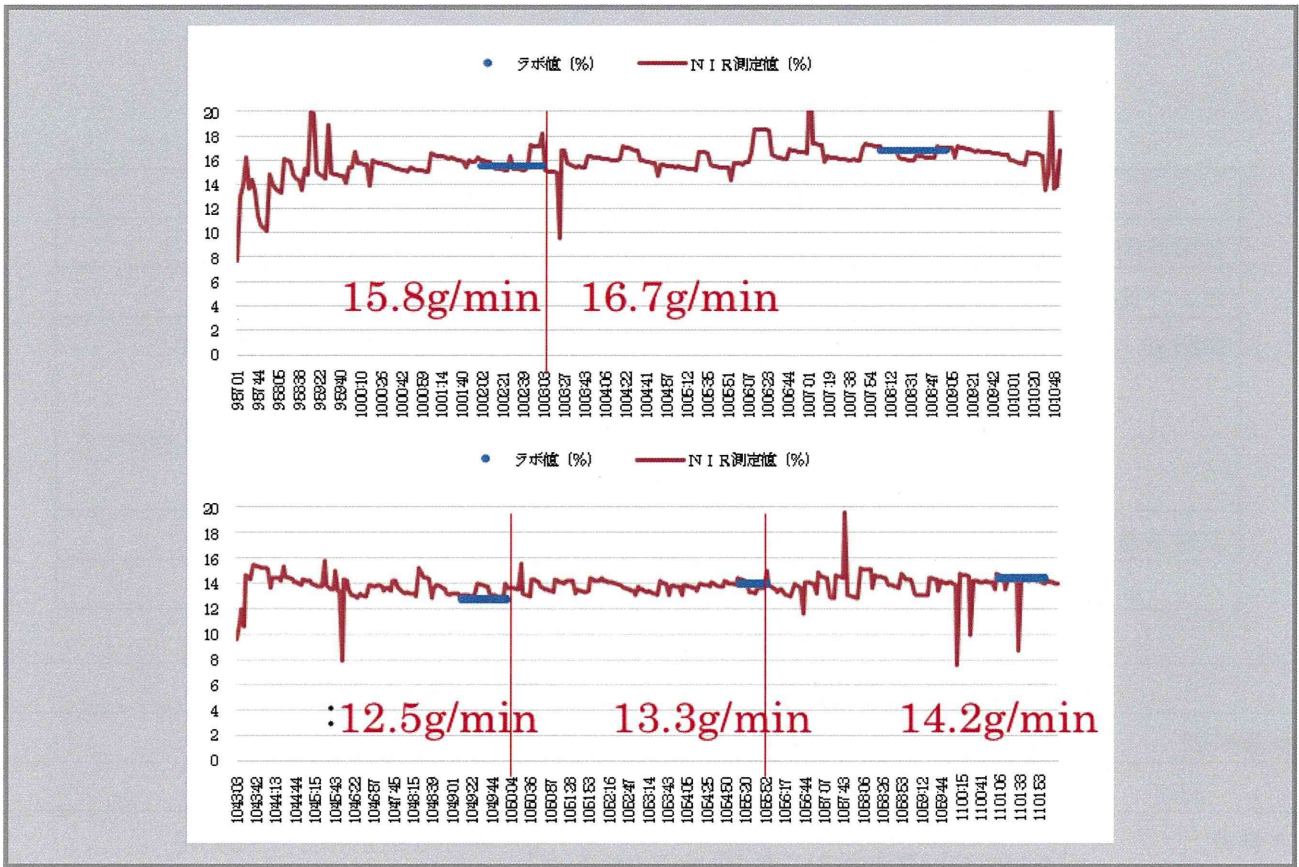


図5 近赤外分光法による水分予測結果  
上 ; Run1、 下 Run2

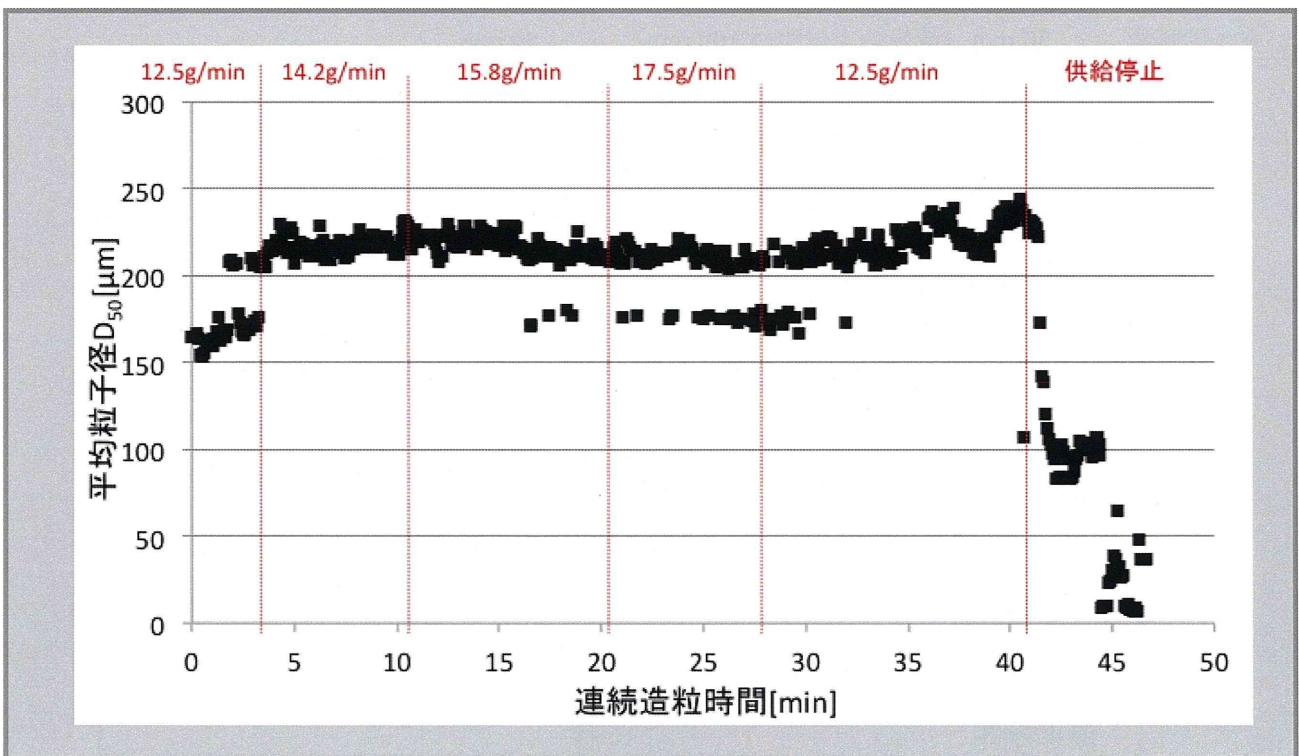


図6 連続造粒中の平均粒子径の推移

表1 (上) 絶食時及び(下) 摂食時を模した溶出試験条件

	胃内を模した溶出試験	腸内を模した溶出試験
試験時間	16分	16-51分
ポンプ流速	-	4 mL/min
試験液	0.01 M 塩酸	16-31分: 2倍濃縮した FaSSIF 31-51分: FaSSIF pH調整: 水酸化ナトリウム溶液を送液することにより、pH 6.5に調整
試験液量	250 mL	250 mL
パドル回転数	50 rpm (最後の1分間は100 rpm)	50 rpm

	胃内を模した溶出試験	腸内を模した溶出試験
試験時間	61分	61-121分
ポンプ流速	-	4 mL/min
試験液	0.15% CTAB を添加した Blank FaSSGF	61-76分: 2倍濃縮した FeSSIF 76-121分: FeSSIF pH調整: 水酸化ナトリウム溶液を送液することにより、pH 5.8に調整
試験液量	250 mL	250 mL
パドル回転数	50 rpm (最後の1分間は100 rpm)	50 rpm

表2 水分含量モニタリング条件

連続造粒処方 原料供給量 結合液供給量 (水)	5kg/H、乳糖、コーンスターチ、HPC-L Run. 1 :15.8/16.7g/min Run. 2 :12.5/13.3/14.2g/min
操作条件 センターブレード回転数 スクレーパブレード回転数	6000/min (正面向かって時計方向) 60/min (正面向かって反時計方向)
近赤外分析条件 スキャン回数 測定周期	ポリクロメータ回折格子 拡散反射 10回 2秒
測定部の条件 サンプリング部容積 ページ時間 停止時間	Φ8×5 1秒 15秒