

Agilent NanoDis システムメソッド 開発ガイド

著者

Dr. Emre Türeli
MyBiotech

Dr. Karen Krauel-Göllner
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

現代の医薬品開発における目下の大きな課題の1つが、新薬候補物質の難水溶性です。ナノ粒子製剤は、水溶性の低い製剤のバイオアベイラビリティを向上させる魅力的な解決策です。溶出試験研究は、*in vitro* 条件下で期待される生体内バイオアベイラビリティを特徴付けるための最も重要なメソッドの1つです。したがって、ナノ粒子開発プロセスで期待される高いバイオアベイラビリティを有するリード製剤の選択を容易にするには、効率的な溶出試験メソッドが必要不可欠です。また、製品ライフサイクルのその後のステージで実施する品質管理にとっても重要です。そのため、溶解製剤と非溶解製剤の分離が、すべての溶出試験研究の最も重要な要素の1つです。

ナノ粒子は非溶解性物質と考えられ、溶出試験液から分離する必要があります。現在の溶出試験法では、溶出試験研究に使われる装置とは無関係に、ナノ粒子の溶出試験液からの分離が非効率的で、これが悩みの種となっています。さらに、サンプリングプロセスで溶出試験液からナノ粒子を分離するには、従来の製剤に用いられる標準のろ過メソッドでは不十分です。メンブレンタイプのフィルタによるろ過は、非溶解性 API の分離に一般的に用いられる方法です。ポアサイズ 0.22 μm または 0.45 μm のシリンジフィルタも使われますが、この方法にも課題があります。平均粒子径が 500 nm 以下の小さい粒子はすべてフィルタを詰まらせるか、破るか、すり抜けてしまい、非常に高い溶出率が出る結果となります。0.02 μm など、ポアサイズの小さいフィルタもありますが、特に溶出試験液に高濃度のナノ粒子がある場合には、サンプリングプロセスですぐに目詰まりを起こしてしまいます。ナノ粒子の非効率的な分離によって、分離プロセスを経ても溶出試験液にナノ粒子が残ってしまい、溶出試験プロファイル分析で不正確に高い測定結果がもたらされることになるのです。要するに、開発ラボで用いられる既存の溶出試験プロセスはいずれも、ろ過手段が不適切なため、*in vivo* でのナノ製剤の挙動を予測するには不十分です。

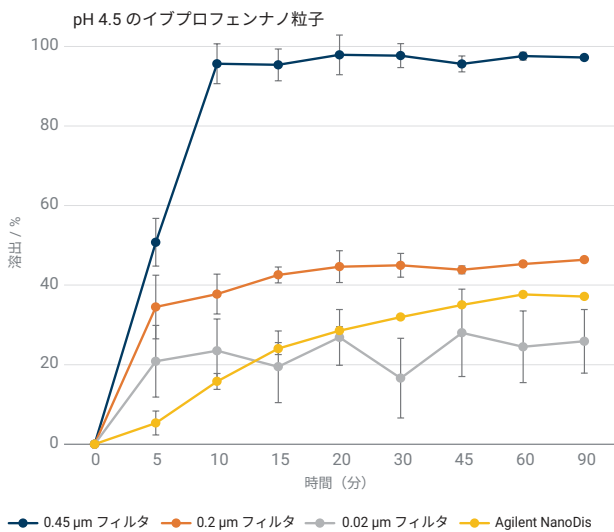


図 1.複数のシリンジフィルタ (0.45 μm、0.2 μm、0.02 μm) と Agilent NanoDis システムによる、pH 4.5 の酢酸バッファ中のプロピフェンナノ粒子 200 mg/900 mL の溶出試験プロファイル

Agilent NanoDis システムによる溶出試験

Agilent NanoDis システムのろ過原理は、従来の溶出試験器を組み合わせ、ろ過プロセスの自動化を目的としたクロスフローろ過 (CFF) に基づいています。NanoDis システムは CFF の利点を活かしてナノ粒子を溶出試験液から分離します。CFF は開放型のろ過システムであることから、ケーキ層の形成を防ぎ、ナノ粒子がフィルタに押し込まれることがありません。デッドエンドろ過でしばしば目詰まりが引き起こされるのは、ナノ粒子がフィルタに押し込まれることが原因です。また、CFF フィルタメ

ンブレンのポアサイズは、製剤のナノ粒子の粒子径に応じて選択できます。NanoDis システムでは、ナノ粒子を含む溶出試験液を CFF フィルタを通して送り出し、これによって、粒子を取り除いたろ液が Agilent 850-DS 溶出試験サンプリグステーションに集められます。ろ過の効率性とろ液収集に要する時間は、製剤と溶出試験液中のナノ粒子濃度によって異なります。しかし、NanoDis システムであれば、ろ過が困難な製剤であってもろ過速度 10 mL/min を上回り、溶出試験サンプルの定量分析を行うのに十分なサンプル量が得られ、サンプリグ間隔も非常に短く抑えられます。

フィルタメンブレンのタイプとポアサイズの選択

溶出試験研究に用いるクロスフローフィルタのタイプとポアサイズは、ナノ粒子の大きさやタイプに応じて、また、完全な分離が行えるよう選択する必要があります。これらの仕様によって、未溶解のナノ粒子による干渉を受けることなく、溶解した製剤の測定が可能になります。

CFF メンブレンには、さまざまな化学的構造を持つものが多数あります。適切な化学的構造を選択してナノ粒子や API がフィルタに吸着するのを防ぐには、フィルタのバリデーション試験を行う必要があります。フィルタのバリデーションは、CFF メンブレンと同じ化学的構造を持つ標準のシリンジフィルタで行えます。一方、API フィルタのバリデーション試験の場合、既知濃度の API を溶出試験液に溶解し、ポアサイズ 0.45 μm などのシリンジフィルタでろ過してから分析します。ナノ粒子製剤のフィルタのバリデーション試験には、ポアサイズの大きいシリンジフィルタが必要となる点に留意する必要があります。

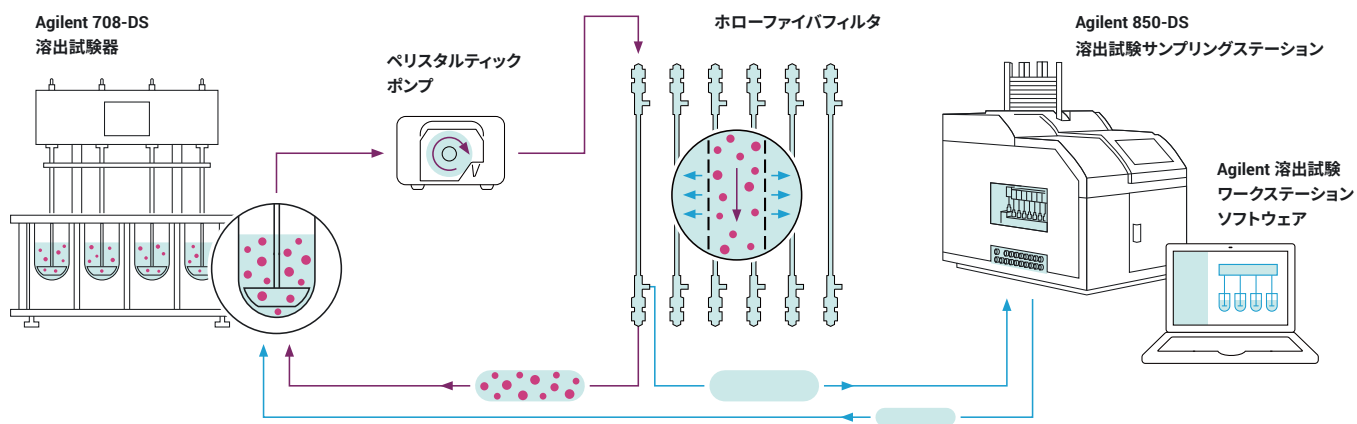


図 2. Agilent 溶出試験ワークステーションソフトウェア (DWS) によって管理し、すべての作業を電子的に文書化する、USP 対応の Agilent 708-DS 溶出試験器と 850-DS 溶出試験サンプリグステーションによって溶解した API と分散したナノ粒子の分離を流れの方向とともに示した NanoDis システムの図式表示

既知濃度の溶出試験液に分散させたナノ粒子製剤を適切なポアサイズのシリンジフィルタでろ過し、ナノ粒子がフィルタを確実に透過するようにします。ろ過前とろ過後の API を定量分析し、ナノ粒子のフィルタへの吸着量を算出します。

製剤の平均粒子径を第一に考慮する必要がある一方で、粒子サイズ分布と溶出試験液中の粒子サイズ分布も考慮すべき重要なパラメータです。不均一粒子製剤では、サンプル中に存在する最小粒子の粒子径が平均粒子径より極めて小さい場合や、その逆の場合（サンプル中に存在する最大粒子の最大粒子径が平均粒子径より格段に大きいなど）があります。また、特に、製剤粒子を、FeSSIF や FaSSIF といった生体関連試験液に *in vivo* で分散した場合、粒子表面にコロナが形成される場合があり、これによって粒子径が大きくなります。

適切なポアサイズを選択にあたっては、一般的に、表 1 を参考にしています。

表 1. メンブレンポアサイズを選択

平均粒子径 (nm)	メンブレンポアサイズ (kDa)
<10	10
10~25	50
25~50	100
50~150	300
>150	500

粒子サイズ分布が広い場合、またはサンプル中に小さい粒子が存在する二峰性分布の場合、CFF フィルタメンブレンのポアサイズを状況に応じて適切に調整する必要があるとともに、最小粒子径の粒子画分も考慮する必要があります。もう 1 つの重要なパラメータが、溶出試験液に界面活性剤が用いられる場合に形成されるミセルの粒子径です。溶解した API のミセルも CFF メンブレンで保持できます。したがって、メンブレンのポアサイズは、ミセルサイズに応じて選択する必要があります。フィルタのバリデーション試験の詳細は、参考文献セクション¹ および Repligen 社のウェブサイト²でもご確認いただけます。



図 3. クロスフローフィルタを用いた Agilent NanoDis システム

装置パラメータとソフトウェアパラメータ

溶出試験メソッド開発プロセスで溶出試験液からナノ粒子を効率的に分離するのに欠かせないのが、装置パラメータとソフトウェアパラメータの最適化です。

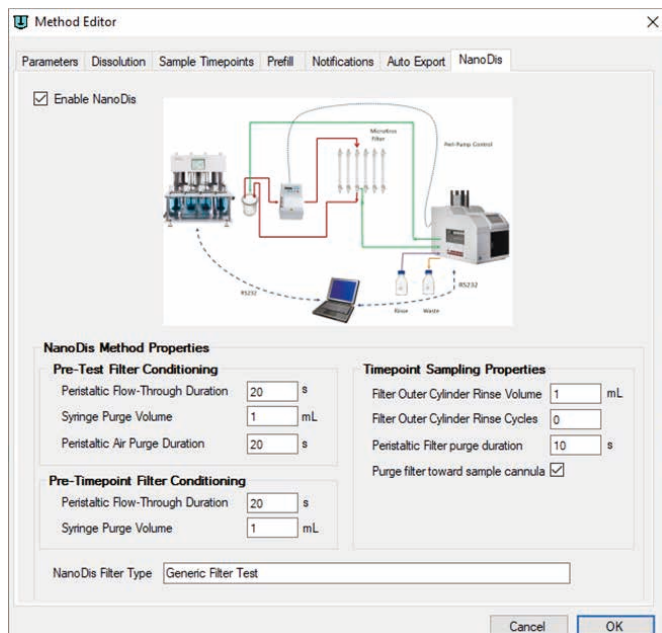


図 4. Agilent 溶出試験ワークステーションソフトウェア NanoDis Tab のスクリーンショット

NanoDis システムを管理するのが、Agilent 溶出ワークステーションソフトウェア (DWS) です。以下に示すのは、メソッド開発プロセスの実行に必要な重要なパラメータ設定の概要です。

NanoDis システムのメソッドは、溶出試験の開始に先立つフィルタプレコンディショニングと、実際の溶出試験の実行の 2 段階で行われます。溶出試験実施時の各タイムポイントの前に、必ずフィルタプレコンディショニングステップを実行します。通常、次のような順序で行います。

第 1 段階：フィルタプレコンディショニング

ポンプ速度：ポンプ速度は、ペリスタルティックポンプを手動で調整します。CFF の膜間圧は、流量を上げることで上昇させることができ、上昇させることで、ろ液の透過を高められます。つまり、収集するろ液サンプル量は、流量を上げれば増加させられるということです。

予備テストフィルタコンディショニング：予備テストフィルタコンディショニングは、既存の溶出試験液でフィルタを湿らせるために行うものです。これは、溶出試験開始前と溶出試験ベッセルに製品を投入する前に行います。CFF メンブレンでろ過した溶出試験液はそのまま溶出試験ベッセルに戻します。したがって、溶出試験液が予備テストフィルタコンディショニングで目減りすることはありません。予備テストフィルタコンディショニングステップ終了時に、溶出試験液が完全にベッセルに戻るよう、CFF メンブレンを通して空気をバージします。

予備テストフィルタコンディショニングは、最初のタイムポイントに向けて CFF メンブレンを準備するという意味で重要です。予備テストフィルタコンディショニングをしっかり行わないと、最初のタイムポイントでサンプル量が十分に得られません。溶出率 (%) を正確に割り出すには、適切なサンプル量を得ることが重要です。

下記に示す開始パラメータは、予備テストフィルタコンディショニングに用いることができます。

動作	推奨設定
ペリスタルティックポンプ送液時間 フィルタを通して溶出試験液を送り出す時間 (秒)	240 秒
シリンジバージ容量 タンジェンシャルフローフィルタの外部シリンダから排出されてベッセルへ戻される容量 (mL)	4 mL
ペリスタルティックポンプエアバージ持続時間 ペリスタルティックポンプを逆流させて試験液をベッセルに戻し、フィルタ中央部コアを空にします	50 秒

第 2 段階：溶出試験

溶出試験は、ベッセルに剤形を投入して開始します。NanoDis システムを用いる場合は、溶出試験シーケンスが若干変わります。各タイムポイントの前には、再度フィルタをコンディショニングする必要があり、この作業をタイムポイントが来る直前に完了させます。

タイムポイント前のフィルタコンディショニングの変数

動作	推奨設定
ペリスタルティックポンプ送液時間 フィルタを通して溶出試験液を送り出す時間 (秒)	100 秒
シリンジバージ容量 タンジェンシャルフローフィルタの外部シリンダから排出されてベッセルへ戻される容量 (mL)	2 mL

サンプリングタイムポイントのプロパティ

動作	推奨設定
吸い込み損失容量 正確な時間にサンプリングできるようにするための、サンプリングカニューレの先からコードル (850-DS) までのチューブの容量	3.5 mL
サンプル量 サンプルトレイに分注されるサンプル量	1.0 ~ 5 mL (分析によって異なる)
フィルタ外部シリンダの洗浄液量 フィルタ外部シリンダに送られる洗浄液量。 総バージ量 = バージ量 + フィルタ外部シリンダに送られる洗浄液量	4 mL
ペリスタルティックポンプフィルタバージ持続時間 サンプリング後、フィルタ中央部コアの試験液がベッセルへバージされて戻されます。このパラメータで、ペリスタルティックポンプがフィルタ中央部コアのバージを行う時間の長さを指定します。送液方向は、サンプルカニューレ方向のバージフィルタチェックボックスによって制御します。	30 秒
シリンジバージ シリンジバージサイクルによって、フィルタ外部シリンダと、シリンジ流路のフィルタとベッセル間のすべてのチューブを空にします。シリンジバージ容量 = フィルタ外部シリンダの洗浄液量 + バージ量	4 mL
フィルタ外部シリンダの洗浄サイクル タイムポイント終了時に、フィルタの外部コアを洗浄液で洗浄できます。値をゼロに設定して洗浄サイクルを回避することもできます。	4 mL を 1 ~ 3 回

ヒントとコツ

メンブレンの最初の使用、クリーニングおよび保管

CFF メンブレンは、ポア構造維持のため、グリセロールに湿潤させた状態で出荷されます。メンブレンを最初に使用する際には、少なくとも 500 mL の精製水でメンブレンを洗い流すことを推奨します。あるいは、溶出試験液で洗い流すこともできます。連続して実施する溶出試験の間の洗浄に、ナノ粒子製剤に応じて、精製水、アルコール溶液（エタノール 20 % またはイソプロパノール 20 %）または 0.1 N 水酸化ナトリウムを用いることができます。メンブレンは、室温で、0.1 N 水酸化ナトリウムなどの適切な保管液に湿潤させて保管するのが良いでしょう。これにより、微生物の発生と繊維の乾燥を防ぐことができます。

メンブレンの完全性試験

CFF メンブレンの完全性試験は、対象とする平均粒子径を持つ標準のナノ粒子を用いて制御され、対象とする CFF メンブレンのポアサイズに調整されます。PLGA-Lumogen ナノ粒子を用いれば、サンプル中の色の有無によってメンブレンの完全性を視覚化できます。

メンブレンの閉塞試験

CFF メンブレンの閉塞は、水による溶出試験を行い、透過サンプル量を定量化することで見極められます。

参考文献

1. Filter Validation Protocol: Agilent 850-DS Dissolution Sampling Station. *Agilent Technologies technical overview*, publication number 5991-3341EN, **2013**.
2. Repligen 'Find a Spectrum Hollow Fiber Filter' selection tool (<https://www.repligen.com/resources/configurators/selection-tools/find-hollow-fiber-filter>).

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに
変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2020
Printed in Japan, October 26, 2020
5994-2347JAJP
DE.1479976852

