

載されている。

## ②核酸分解酵素

核酸を分解する作用を持つ医薬品として、Dornase Alfa, Streptodornase(ストレプトドルナーゼ), Ranpirnase およびPegademase が開発されている。

Dornase Alfaは、遺伝子組換え型ヒトデオキシリボヌクレアーゼ I (DNA分解酵素)である。Dornase Alfaは米国において、嚢胞性線維症患者の肺に存在する白血球由来DNAを分解することにより、痰の粘着性や粘度を下げる効果があるとして承認されている。嚢胞性線維症は、米国白人に高頻度に発症する常染色体劣性遺伝である。患者は、塩化物イオンとナトリウムイオンの膜輸送に携わる嚢胞性線維症膜貫通調節(CFTR)タンパク質の遺伝子異常によって脱水症に陥る。その結果、粘液の粘度が高くなり、気管支、肺、すい臓、小腸、肝臓などに分泌物が蓄積し、機能が低下する。

ストレプトドルナーゼは、化膿連鎖球菌が産生するDNA分解酵素である。わが国では、ストレプトキナーゼとの配合剤が使用されていたが、現在は販売中止になっている(後述)。

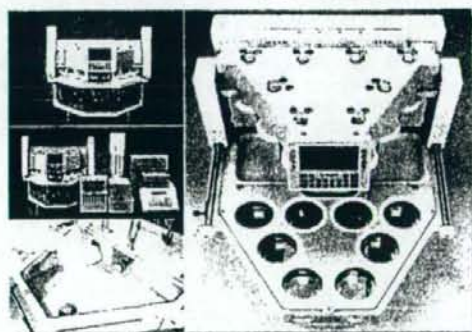
Ranpirnaseは、*Rana pipiens*(ヒョウガエル)由来のリ

ボヌクレアーゼ(RNA分解酵素)である。Ranpirnaseは細胞表面に結合するとエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、tRNAを分解する。その結果、アポトーシスのシグナルが誘導されたり、細胞増殖が抑制されたりする。Ranpirnaseは米国において、切除不能悪性中皮腫の治療薬として希少医薬品に指定されている(2007年1月)。中皮腫(Mesothelioma)は、主に石棉(アスベスト)が原因で発症するといわれている胸部癌の一種である。

Pegademaseは、ウシ由来アデノシンデアミナーゼに平均分子量5,000のモノメトキシポリエチレングリコールを結合させた修飾タンパク質である。アデノシンデアミナーゼは、プリンヌクレオチドの分解経路に属する酵素の1つで、アデノシンや2'-デオキシアデノシンをイノシンおよびデオキシイノシンに分解する。この酵素が欠損すると、アデノシンや2'-デオキシアデノシンが蓄積し、リンパ球が障害される。その結果、免疫不全に陥り、重症感染症を繰り返す(アデノシンデアミナーゼ欠損症)。治療法として遺伝子治療と酵素補充療法があり、Pegademaseは米国において酵素補充療法薬として承認されている。

# 究極の溶出試験グローバルスタンダード

## VK7025 溶出試験器は世界標準の溶出試験器です



USP キャリブレーターでお困りではありませんか?  
溶出試験器間誤差の問題はありませんか?

- VK7025 の特長
- ① フルオープンアクセス
- ② 調整不要のツールセンターベッセル
- ③ 最短ロッドで極小のバドル偏心
- ④ メンテナンス性抜群

バリアン社の溶出試験器なら  
問題解決できます

信頼をお届けする

**UNIFLEX® 株式会社 ユニフレックス**

ホームページ: <http://www.uniflex.co.jp>

東京営業部 〒277-0861 千葉県柏市高田 537-1

TEL.04-7147-3751 FAX.04-7144-8242

大阪営業所 〒533-0033 大阪市東淀川区東中島 1-17-18 新大阪ビル東館 2F

TEL.06-6323-8344 FAX.06-6323-8257

本社 〒113-0033 東京都文京区本郷 3-26-4 ドルミ本郷 7F

TEL.03-3816-1004 FAX.03-3816-1392

DM資料請求カード No.103

## 薬の名前

### ステムを知れば薬がわかる

第21回

#### ③薬物・生理活性物質分解酵素

Glucarpidaseは、遺伝子組換え型グルタミン酸カルボキシペプチダーゼ(*Bacterium Pseudomonas*由来)である。抗がん剤メトトレキサート(Methotrexate)を加水分解して不活性型代謝物に誘導する作用を持つ。メトトレキサートは、腎障害を起こしやすく腎排泄が低下するため、血小板、白血球を減少させ敗血症を引き起こす。Glucarpidaseはメトトレキサートによる毒性に対する救療法としてFDAに承認申請中である。

Epaifapaseは、1-アルキル-2-アセチル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン(1-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; 血小板活性化因子; PAF)アセチルヒドラーゼである。PAFは、血小板活性化、血管透過性亢進、白血球遊走などの多彩な活性を有しており、気管支喘息などのアレルギー疾患などに関与している。PAFアセチルヒドラーゼは、PAFのアセチル基を選択的に加水分解して不活性化する。Epaifapaseは、抗アレルギー薬・抗喘息薬として開発されたが、現在は中断されている。

その他に薬物分解酵素として、ペニシリン系抗菌薬を不活化するPenicillinase(*B.Cereus*由来)がINNに収載されている。

#### ④凝固・線溶系に作用する酵素

本連載第15回(本誌2007年10月号)で取り上げた血液凝固因子、ならびに本連載第18回で取り上げたタンパク質分解酵素型、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター型、および組織プラスミノゲンアクチベーター型血栓溶解剤とは異なる機構で血液凝固活性あるいは血栓溶解性を示す医薬品として、Hemocoagulase(ヘモコアグララーゼ)、Streptokinase(ストレプトキナーゼ)、およびAlfimepraseがある。

ヘモコアグララーゼは、毒蛇(*Bothrops jararca*)の毒液から得た酵素で、トロンビン様作用およびトロンボプラスチン様作用を示す。ヘパリンに拮抗されることなく止血効果をあらわす。わが国では、肺出血、鼻出血、口腔内出血、性器出血、腎出血、創傷よりの出血の止血剤として適応されている(INN未収載)。

ストレプトキナーゼは、化膿連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)が産生するタンパク質で、プラスミノゲンと1:1で複合体を形成し、遊離プラスミノゲンを活性

化する(本連載第18回でストレプトキナーゼをプロテアーゼとして解説したが、プロテアーゼではない。訂正します)。欧米では、血栓溶解剤として使用されている。国内では、ストレプトキナーゼとストレプトドルナーゼの配合剤が、手術後・外傷後の腫脹の緩解、呼吸器疾患・麻酔後に伴う喝痰喝出困難、副鼻腔炎、血栓性静脈炎に適応されていたが、現在は販売されていない。

Alfimepraseは、アメリカマムシ毒に由来するフィブリン分解作用を持つタンパク質で、遺伝子組換え技術によって作られている。血栓溶解剤として開発中である。

#### ⑤その他

その他の酵素性医薬品として、米国ではCollagenaseが使用されている。コラーゲンは動物の結合組織を構成する主要タンパク質成分で、Collagenaseは、コラーゲンを特異的に分解する。米国では、*Clostridium histolyticum*由来Collagenaseが、コラーゲンを分解して廃物を除去することによって肉芽組織形成や、潰瘍あるいは火傷部位の上皮形成を促すとして使用されている。その他の酵素として、ナンキョクオキアミ由来のセリンプロテアーゼであるEufauseaseがINNに収載されている。

以上、今回は、酵素を示すステム「-ase」を持つ医薬品の中から、糖加水分解酵素、核酸分解酵素、薬物・生理活性物質分解酵素、凝固・線溶系に作用する酵素およびその他の酵素を紹介した。

#### ■参考文献

本稿作成に使用した参考文献は、本連載第5回(本誌2006年12月)に記載している。また、以下のサイトを参考にした。

- 1) GlycoWord : <http://www.gak.co.jp/FCCA/indexj.html>
- 2) Enzyme Nomenclature : <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>
- 3) KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes : <http://www.kegg.jp/kegg>

## 薬の名前

## STEMを知れば薬がわかる

Stems used in drug names : For the better understanding of pharmacological actions of drugs

## 第18回

国立医薬品食品衛生研究所

川崎ナナ, 内田恵理子

NANA KAWASAKI, ERIKO UCHIDA

National Institute of Health Sciences

名古屋市立大学大学院薬学研究科

宮田直樹

NAOKI MIYATA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University

## はじめに

本連載第17回(本誌2007年12月号)では、抗悪性腫瘍薬のステムとして、

「-sulfan」:メタンサルホネート系抗悪性腫瘍薬

「-mustine」:β-クロロエチルアミノ構造を持つ抗悪性腫瘍薬

「-tepa」:チオテパ系誘導体

「-ribine」:ピラゾプリン系リボフラニル誘導体

「-trexate」:葉酸類似化合物

「-trexed」:チミジル酸合成酵素阻害薬

「mito-」:細胞核に対して毒性を有する抗悪性腫瘍薬を紹介した。

今回は、生物薬品の第6回目として、酵素性医薬品のステムを紹介する。



## 「-ase」:酵素

「-ase」は、酵素(Enzyme)を示すステムである。「-ase」は、さらに「-uplase」(ウロキナーゼ型プラス

ミノゲンアクチベーター)、「-teplase」(組織プラスミノゲンアクチベーター)、「-diplase」(プラスミノゲンアクチベーターと他の酵素との融合タンパク質)、「-lipase」(リパーゼ活性を持つ酵素)、「-dismase」(スーパーオキシドジスムターゼ活性を持つ酵素)などのサブステムに分けられる。

## (1)「-ase」:タンパク質分解酵素

「-ase」は、タンパク質分解酵素(proteinase)の(サブ)ステムとしても使用される。タンパク質分解酵素を示すサブステム「-ase」を持ち、わが国で承認されている医薬品にKallidinogenase(カリジノゲナーゼ), Serrapeptase(セラペプターゼ), L-Asparaginase(レ-アスバラギナーゼ), Pronase(プロナーゼ), Urokinase(ウロキナーゼ)およびTisokinase(チソキナーゼ)がある。このうち、カリジノゲナーゼ、セラペプターゼおよびウロキナーゼは日局収載品目である。

カリジノゲナーゼは、血液中のキニノーゲンに特異的に作用してキニンを遊離するキニノゲナーゼ(カリクレイン)の1種で、ブク臓由来のものが医薬品として使用されている。遊離したキニンは、末梢血管の拡張なら

## ステムを知れば薬がわかる

薬100問

びに微小循環速度の亢進を介して血流増加作用を示す。わが国でカリジノゲナーゼは、高血圧症、メニエール症候群、閉塞性血栓血管炎(ビュルガー病)における末梢循環障害の改善および更年期障害、網脈絡系の循環障害改善薬として適用されている。

セラペプターゼは、セラチア(*Serratia*)属細菌から精製したタンパク質分解酵素である。わが国では、手術後および外傷後、慢性副鼻腔炎、乳汁うっ滞における腫脹の緩解、ならびに気管支炎、肺結核、気管支喘息の喀痰咯出困難および麻酔後の喀痰咯出困難に適用される。

L-アスパラギナーゼは、321個のアミノ酸残基からなるサブユニット4つで構成されるタンパク質である。血中のL-アスパラギンを分解し、アスパラギン要求性腫瘍細胞を栄養欠乏状態にすることによって抗腫瘍作用を発揮する。日本および米国では急性白血病(慢性白血病の急性転化を含む)および悪性リンパ腫の治療に用いられている。

プロナーゼは、放線菌*Streptomyces griseus*が産生するタンパク質分解酵素である。わが国では、胃内視鏡検査における胃内粘液の溶解除去や消化異常症状の改善を目的に使用されている。また、イソプロテレノールとの混合剤が持続性気管支拡張・粘液溶解剤に適用されている。

その他「-ase」を持つ品目で、海外で承認されている医薬品にRasburicase(ラスブリカーゼ)、Streptokinase(ストレプトキナーゼ)、Pegaspargaseがある。

ラスブリカーゼは、*Saccharomyces cerevisiae*から産生される遺伝子組換え尿酸オキシダーゼである。悪性腫瘍あるいは化学療法に起因して発現する高尿酸血症治療薬として欧米で使用されている。わが国では2007年にJANに収載された。

Pegaspargaseは、大腸菌で産生されたL-アスパラギナーゼに、分子量約5,000のポリエチレングリコールを共有結合させたPEG化タンパク質で、米国で承認されている。なお、「Peg-」はポリエチレングリコール(PEG)が結合していることを意味する接頭語である(本連載第5回(本誌2006年12月号)参照)。

その他タンパク質分解酵素を示すサブシステム「-ase」を持つ医薬品としてINNには、Brinase、Ocrase、Promelase、Sfericaseが収載されている。

INNには「-ase」を持たないタンパク質分解酵素もいくつか収載されている。わが国で承認されている医薬品

ではBromelain(プロメライン)がある。プロメラインは、パイナップルの果汁、または葉茎の搾汁より調製したタンパク質分解酵素で、手術後および外傷の腫脹の緩解、慢性気管支炎や気管支喘息の喀痰困難の改善、熱傷や化膿創などの創傷面の壊死組織の分解除去・洗浄およびそれに伴う治癒促進に用いられている。

「-ase」を持たないタンパク質分解酵素性医薬品としては、欧州で承認され、JAN収載品目でもあるChymotrypsin(キモトリプシン)や、米国で承認されているChymopapainもある。その他、INNにはBatroxobin、Defibrotide、Fibrinolysin(human)、Sutlainsが収載されている。

タンパク質分解酵素には血栓溶解系に関与するものもある。循環血液中には血栓溶解作用を持つプラスミンの前駆体であるプラスミノゲンが存在する。循環血液中のプラスミノゲンは、プラスミノゲンアクチベーターによって560番目のアルギニンと561番目のバリンの間が切断されて、活性型のプラスミンとなる(図1)。プラスミンは、血栓の主成分であるフィブリンを分解することにより血栓を溶解する。哺乳類のプラスミノゲンアクチベーターは、ウロキナーゼ型のプラスミノゲンアクチベーターと組織型のプラスミノゲンアクチベーターに大別される。前者は古くは尿中に見出されたことから、現在でも単にウロキナーゼと呼ばれる。

ウロキナーゼは、セリンプロテアーゼの1つで、411個のアミノ酸残基からなる糖タンパク質である。ウロキナーゼは、プロウロキナーゼ(411個のアミノ酸残基からなる1本鎖糖タンパク質、分子量約55,000)として産生された後に、プラスミンやカリクレインによって158番目のリジンと159番目のイソロイシンの間が限定分解されることによって生じるA鎖(N末端側ペプチド、分子量約22,000)およびB鎖(C末端側ペプチド、分子量33,000)からなる2量体タンパク質である。ウロキナーゼは、活

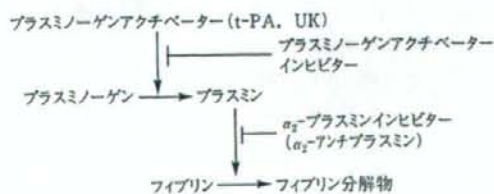


図1 血栓溶解機構  
t-PA: 組織プラスミノゲンアクチベーター  
UK: ウロキナーゼ

性型高分子量ウロキナーゼ(分子量約55,000)または、さらに分解された低分子量ウロキナーゼ(分子量約31,500)として存在する。

INNに収載されているウロキナーゼは、「A plasminogen activator isolated from human sources」とあるようにヒト由来である。わが国で承認され、日局に収載されているウロキナーゼは、ヒト尿から精製した高分子量型ウロキナーゼである。わが国では、急性心筋梗塞における冠動脈血栓の溶解剤として適用されている。ヒト尿由来ウロキナーゼは欧州でも承認されており、EPに収載されている。EP収載ウロキナーゼは高分子量および低分子量ウロキナーゼを含むものである。

米国で承認されているウロキナーゼは、尿由来ではなく、組織培養(新生児腎細胞)由来のもので、分子量約32,000の低分子量ウロキナーゼである。また、INNにはUrokinase Alfaが収載されており、これは遺伝子組換え型糖タンパク質で、非ヒト哺乳動物由来細胞で産生された高分子量ウロキナーゼである。

欧米で血栓溶解剤として使用されているストレプトキナーゼも、プラスミノゲンアクチベーターである。ストレプトキナーゼは、黄色ブドウ球菌由来のタンパク質分解酵素で、プラスミノゲンをプラスミンに活性化する。わが国では販売されていない。

## (2)「-uplase」：ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター

「-uplase」はウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター(urokinase-type plasminogen activator)に共通のサブシステムで、JANにはNasaruPlase(ナサルブラーゼ(細胞培養))が収載されている。

ナサルブラーゼは、ヒトプロウロキナーゼと同一のアミノ酸配列を持つ糖タンパク質である。ナサルブラーゼは、ヒト腎臓に由来する2倍体細胞の培養により繊維芽細胞をクローン化し、株化した細胞で産生される。急性心筋梗塞における冠動脈血栓の溶解を効能とした血栓溶解剤として承認されている。

ナサルブラーゼと同一のアミノ酸配列を持ち、糖鎖が異なる品目として、INNにNasaruPlase Betaが収載されている。これは、マウス細胞で産生される遺伝子組換え糖タンパク質である。NasaruPlaseは、Alfaが収載されず、Betaが収載されている唯一の例である。その他、「-uplase」を持つ品目としてINNにはSaruplaseが収載されている。

## (3)「-teplase」：組織プラスミノゲンアクチベーター類

「-teplase」は、組織プラスミノゲンアクチベーター(t-PA)類(tissue-type plasminogen activator)に共通のサブシステムである。t-PAは、ウロキナーゼと同様にプラスミノゲンの560番目のアルギニンと561番目のバリンの間を切断することによって、プラスミノゲンをプラスミンに活性化する(図1)。t-PAは、主に血管内皮細胞で産生される527個のアミノ酸残基からなる分子量約70,000の1本鎖糖タンパク質で、分子内の3カ所(Asn117, 184, 448)に糖鎖が結合している。N末端側から、フィンガードメイン、EGFドメイン、クリングル1ドメイン、クリングル2ドメイン、Catalyticドメインから構成されている(図2)。t-PAは、プラスミンによりCatalyticドメイン上の275番目のアルギニンと276番目のイソロイシンの間が切断されると、重鎖(N末端側)と軽鎖(C末端側)からなる2本鎖t-PAになる。2本鎖t-PAになると十分な活性を発揮するが、1本鎖でも2本鎖t-PAの約1/10の酵素活性を有する。t-PAがウロキナーゼと大きく異なる点は、フィブリン親和性を有する点である。t-PAは血栓に特異的に結合してプラスミノゲンを活性化するので、血栓溶解効率が高い。これに対してウロキナーゼは、循環血液中のプラスミノゲンを活性化するために、生じたプラスミンが特異的インヒビター( $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター等)で失活したり、出血傾向を引き起こしたりする。t-PAの高いフィブリン親和性には、フィンガードメインとクリングル2ドメインが関与しているといわれている。

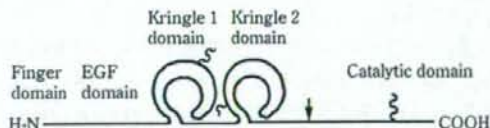
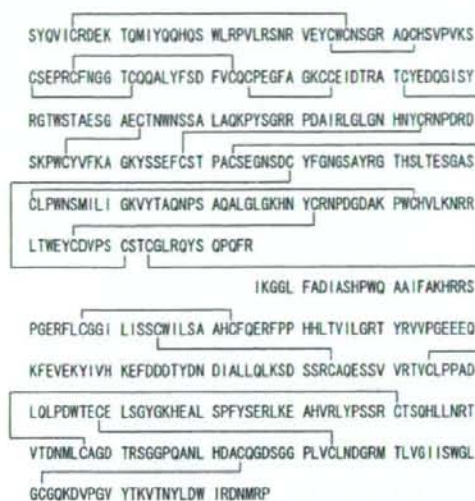


図2 t-PAの構造

- フィンガードメイン：1～43番目
- EGFドメイン：44～91番目
- クリングル1ドメイン：92～173番目
- クリングル2ドメイン：180～261番目
- Catalyticドメイン：276～527番目
- ~~~~~：糖鎖
- ↓：プラスミン限定分解部位

サブシステム「-teplase」を持ちわが国で承認されている医薬品として、Alteplase(アルテプラーゼ)、Monteplase(モンテプラーゼ)およびPamiteplase(パミテプラーゼ)がある。



N117, N184, N448: 糖鎖結合

図3 アルテプラゼの一次構造、ジスルフィド結合と糖鎖結合部位

アルテプラゼは、遺伝子組換えヒト組織プラスミノゲンアクチベーターで、CHO細胞によって産生される(図3)。虚血性脳血管障害急性期に伴う機能障害の改善(発症後3時間以内)および急性心筋梗塞における冠動脈血栓の溶解(発症6時間以内)に適用される。アルテプラゼは、海外でも承認されており、EPおよびUSPにも収載されている。わが国では日局収載候補品目になっている。

t-PAは、血中からの消失が速く、静脈投与する場合は点滴投与が必要とされている。t-PAの肝臓での代謝には、クリングル1ドメイン上のAsn117に結合している高マンノース型糖鎖やEGFドメインが関与していると考えられている。そこで、血中での滞留時間を延長させるために、遺伝子工学的にt-PAを改変する研究が進められた。現在ではさまざまな改変型t-PAが血栓溶解薬として使用されている。

モンテプラゼは、t-PAの84番目のシステインをセリンに変換した改変型t-PAで、ペビーハムスター腎細胞により産生される。わが国では急性心筋梗塞における冠動脈血栓の溶解(発症後6時間以内)および不安定な血行動態を伴う急性肺塞栓症における肺動脈血栓の溶解に適用されている。

パミテプラゼは、t-PAのクリングル1ドメインを欠失させることによって血中半減期を延長し、かつt-PAが2本鎖に解離しないように天然型t-PAのN末端から275番目のアルギニンをグルタミン酸に変換してフィブリン親和性を回復させた改変型t-PAで、CHO細胞によって産生される。パミテプラゼは、急性心筋梗塞における冠動脈血栓の溶解(発症後6時間以内)に適用されている。

サブシステム「-teplase」を持つその他の品目としてJANには、Duteplase(デュテプラゼ)、Lanoteplase(ラノテプラゼ)、Silteplase(シルテプラゼ)、Nateplase(ナテプラゼ)、およびEcolteplase(エコルテプラゼ)が収載されている。欧米では、TenecteplaseとRetepaseが承認されているが、いずれもJAN未収載である。

Tenecteplaseは、CHO細胞で産生されるt-PA改変体で、103番目および117番目のアミノ酸残基がそれぞれアスパラギンおよびグルタミンに変換され、さらに296~299番目のアミノ酸残基がアラニンに変換されている。Retepaseは、クリングル2ドメインとCatalyticドメインからなる改変体で、大腸菌で産生される糖鎖非結合タンパク質である。

その他サブシステム「-teplase」を持つ医薬品として、INNにはAnistreplaseおよびDesmotepaseが収載されている。

「-ase」の項で述べたTisokinase(チソキナーゼ)は、t-PAを示すサブシステム「-teplase」を持たないが、天然型t-PAである。チソキナーゼは、527個のアミノ酸残基からなる糖タンパク質で、ヒト肺由来する2倍体繊維芽細胞で産生される。血栓溶解剤として承認されている。

#### (4)「-diplase」: プラスミノゲンアクチベーターと他の酵素との融合タンパク質

「-diplase」はプラスミノゲンアクチベーターと他の酵素との融合タンパク質に与えられたサブシステムである。サブシステム「-diplase」を持つ品目として、AmediplaseがINNに収載されている。Amediplaseは、t-PAのクリングル2ドメインとプロウロキナーゼのC末端側ドメインから構成される遺伝子組換えキメラ型プラスミノゲンアクチベーターである。

#### (5)「-lipase」: リパーゼ活性を持つ酵素

リパーゼ(lipase)活性を持つ酵素にはサブシステム

「-lipase」が与えられている。リパーゼはグリセロールエステルを加水分解し、脂肪酸を遊離する酵素である。サブシステム「-lipase」を持ちINNに収載されている品目として、遺伝子組換えヒト胆汁酸塩活性化リパーゼであるBucelipase Alfaや、*Rhizopus arrhizus*が産生するリパーゼRizolipaseがある。

#### (6)「-dismase」：スーパーオキシドジスムターゼ活性を持つ酵素

「-dismase」は、スーパーオキシドジスムターゼ(Superoxide dismutase)活性を持つ酵素に共通のサブシステムである。スーパーオキシドジスムターゼは、異性化酵素(isomerase)の1種で、スーパーオキシドアニオンラジカルの不均化反応(下式)を触媒する。



スーパーオキシドジスムターゼは、細胞内に発生したスーパーオキシドアニオンラジカル濃度を低下させることにより、DNA、膜脂質、タンパク質、炭水化物の酸化的損傷を抑制し、酸素障害を防御している。サブシステム「-dismase」を持ちINNに収載されている品目として、LedismaseとSudismaseがある。また、「-dismase」

を持たないが、INNに収載されているOrgoteinは赤血球由来スーパーオキシドジスムターゼである。そのPEG化体PegorgoteinもINNに収載されている。

システム「-ase」を持つその他の酵素性医薬品として、INNやJANには多くの糖分解酵素も収載されている。それらは本連載の第21回で紹介する予定である。

以上、今回は、酵素を示すシステム「-ase」を持つ医薬品の中から、タンパク質分解酵素、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター類、組織プラスミノゲンアクチベーター類、プラスミノゲンアクチベーターと他の酵素との融合タンパク質、リパーゼおよびスーパーオキシドジスムターゼ活性を持つ酵素を紹介した。

#### 参考文献

本稿作成に使用した参考文献は、本連載第5回(本誌2006年12月号)に記載している。また、以下の文献を参考にした。

- 1) 一瀬白帝編著：図説、血栓・止血・血管学、血栓症制圧のために、中外医学社、2005
- 2) 池田康夫編著：血栓症治療ハンドブック改訂第3版、メディカルレビュー社、1999
- 3) 鈴木宏治、松田道生編：止血・血栓・線溶、中外医学社、1994



## 直打用賦形薬 無水リン酸水素カルシウムGS(GSカリカ)

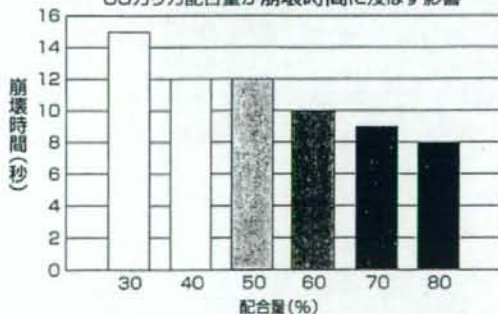
### 特長

- 崩壊時間 —— “極めて早い崩壊”(速崩壊)
- 混合均一性 —— 良好
- 直打 —— 連続打錠可能
- 小型の錠剤 —— 可能
- JP/USP/EP —— 3局対応

錠剤1錠中(200mg)の成分	
成分名	配合量(%)
アセトアミノフェン	5
GSカリカ	30 40 50 60 70 80
結晶セルロース	61 51 41 31 21 11
クロスカルメロースナトリウム	3
ステアリン酸マグネシウム	1

打錠条件：φ8 200mg錠 打錠圧力：10KN

GSカリカ配合量が崩壊時間に及ぼす影響



コメント：GSカリカ30%配合処方では崩壊時間15秒の早い崩壊を示す。GSカリカ配合量の増加に伴い、崩壊時間はより短くなる。

**協和化学工業株式会社**

東京都中央区日本橋本町3-9-4 TEL.03-3667-8037

## ヘパリン不純物問題とその対応

川崎ナナ

Nana KAWASAKI

国立医薬品食品衛生研究所室長

### 1 はじめに

ヘパリンナトリウムは健康な食肉獣、主にブタの腸から得られるグリコサミノグリカン硫酸化エステルナトリウム塩で、ウロン酸(L-イズロン酸またはD-グルクロン酸)及びグルコサミンの2糖繰り返し構造からなり、2糖あたり平均2~2.5個の硫酸エステル基が結合している(図1A)。<sup>1)</sup>ヘパリンナトリウムは、アンチトロンビンⅢと結合することによって第Ⅱa因子(トロンビン)や第Ⅹa因子などの凝固因子を阻害し、血液凝固阻止作用を示す。そのため、血液透析その他の体外循環装置使用時の抗凝固剤として、世界各国で用いられている。ヘパリンナトリウムは医療上極めて重要な医薬品であり、日本薬局方(日局)をはじめ米国薬局方や欧州薬局方にも収載されている。またヘパリンナトリウムは、低分子量ヘパリンの原料としても用いられている。2007年秋から2008年にかけて、主に米国において、ヘパリンナトリウムを投与された患者に死亡例を含む深刻な有害事象が頻発した。本稿ではヘパリン有害事象の概略、原因物質の特性、並びにヘパリンナトリウムの安全性確保と安定供給を目指した日本の対応について概説する。

### 2 ヘパリンナトリウム不純物による有害事象

2007年11月以降米国において、バクスター社製造ヘパリンナトリウムの静脈急速大量投与

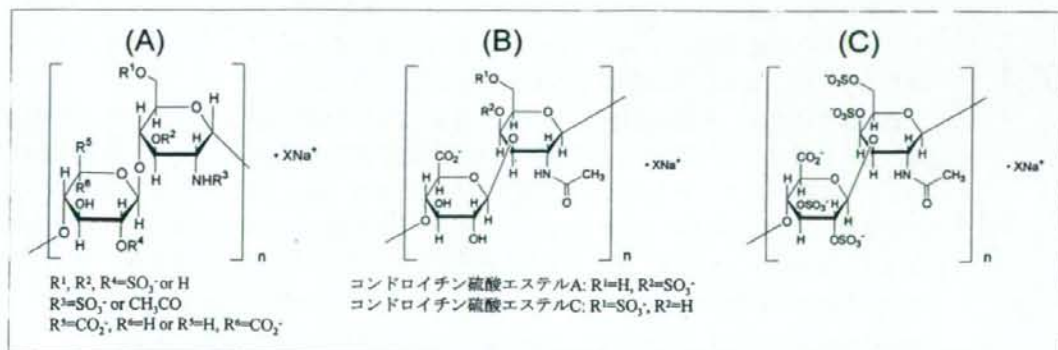


図1 ヘパリンナトリウム(A)、コンドロイチン硫酸エステルA及びC(B)並びにOSCS(C)の構造



表1 ヘパリンナトリウム製剤による有害事象の発生から日局一部改正まで<sup>2,3)</sup>

2007年	11/19	米国で最初の有害事象報告
2008年	1/17	バクスター社9ロットリコール
	2/28	バクスター社全製品リコール
	3/5	FDAがヘパリン様物質の混入を発表
	3/6	FDAがNMRとCEを用いたスクリーニング法をWebsiteに公開 ドイツ RotexMedica 社が有害事象に関連するヘパリンをリコール
	3/8	予防的措置として国内ヘパリンメーカー3社が自主回収
	3/10	厚労省「ヘパリンナトリウム製剤等の品質の確保の徹底等について」事務連絡
	3/19	FDAが混入物がOSCSであることを公表
	4/14	厚労省「医薬品等の品質の確保及び安定供給について」医政局長・医薬食品局長通知
	4/17, 18	国際ヘパリン会議(ワシントン市郊外)
	4/22	安全対策調査会 日局試験法案作成のための研究班立ち上げ
	5/8	ヘパリン対応会議(参加:厚労省, 国立衛研, 総合機構, ヘパリン製造販売業者)
	6/4	PDG(ポートランド市)
	6/19, 20	ヘパリンワークショップ(ストラズブル市)
	7/1	日局部会
	7/31	日局一部改正告示 厚労省「日本薬局方外医薬品規格2002の一部改正について」医薬食品局長通知

を受けた患者に、血圧低下や頻脈等を伴うアレルギー反応が頻発した。<sup>2,3)</sup> 2008年1月17日バクスター社はヘパリンナトリウム9ロットを回収したが、ヘパリンによるアレルギー反応の発生は治まらなかった(表1)。2月28日、バクスター社はすべての製品をリコールし、3月以降、米国における副作用の発生頻度は減少した(2008年4月13日までに米国では81名の患者の死亡が報告された)。しかし、ドイツでも別のメーカーが製造したヘパリンを投与された患者にアレルギー反応が発生したことから、ヘパリンによる副作用は国際的な問題へと発展した。ヘパリンの副作用として、これまでも血小板減少症などが知られていたが、今回発生した副作用はそれらとは明らかに異なるものであった。

2008年3月、米国食品医薬品局(FDA)は問題となったヘパリンにはヘパリン様物質が混入されていることを発表し、同時に<sup>1</sup>H核磁気共鳴スペクトル測定法(<sup>1</sup>H NMR)とキャピラリー電気泳動法を用いたヘパリン様物質スクリーニング法をホームページに公開した。<sup>4)</sup> 各国の規制当局やヘパリン製造販売業者等によって、この方法を用いたヘパリンナトリウムの分析が実施された結果、ヘパリン様物質が混入した原薬は少なくとも世界12か国に広がっていることが判明した。<sup>2)</sup> 後にこのヘパリン様物質は、高度に硫酸エステル化されたコンドロイチン硫酸エステル(over-sulfated chondroitin sulfate; OSCS)であることが明らかにされた。<sup>5)</sup> 各国が混入が認められた製品を回収するなどの措置をとったことから、ヘパリン供給不足への懸念が広がり、ヘパリンの安定供給が国際的な課題となった。

我が国では当初、米国で回収の対象となった製品は中国SPL社が製造した原薬を使用したものとの情報があり、国内では中国SPL社製原薬は使用されていなかったことから対応はとられていなかった。<sup>3)</sup> しかし、3月に米国SPL社製原薬を使用した製品も対象とされていることが判明し、国内3社が自主回収を行った。ヘパリンは医療現場で欠くことのできない医薬品であり、各方面からヘパリン製剤の安全性の確保と安定供給に関する要望が相次いだ。4月22日、安全対策調査会が開催され、①米国で多発したヘパリン製剤投与による有害事象は、OSCSが原因物質ではないかと強く疑われていること、②詳細な有害事象発生の機構は不明であるが、FDAが公表している試験検査法を参考として、ロット毎に適切な検査によってOSCSが含ま

れていないことを確認すること、③厚生労働省は欧米の規制当局と連携しつつ、国立医薬品食品衛生研究所(国立衛研)の協力も得て、OSCSの試験検査方法について製造販売業者に対し適切な指導を行うこと、などの結論が出された。

### 3 非天然物 OSCS の混入

イタリア G. Ronzoni 研究所, Momenta Pharmaceuticals 社, マサチューセッツ工科大 Sasisekharan 教授, レンセラー工科大学 Linhardt 教授及び FDA のグループは、有害事象が多発したロットの NMR スペクトルの 2 ppm 付近に通常のヘパリンナトリウムからは検出されないシグナルの存在を認めた。また通常のヘパリンは、ヘパリナーゼによってウロン酸とグルコサミンからなるオリゴ糖に分解されるが、問題のヘパリンナトリウムから生じたオリゴ糖の量は通常のヘパリンを消化して生じるオリゴ糖の量より少ないことに気づいた。彼らはヘパリンに未知の物質が混入されていると考え、問題のヘパリンからエタノール沈澱やヘパリンの亜硝酸分解によって、ヘパリン様物質を単離した。さらに、各種 2 次元 NMR スペクトルを測定することによって、このヘパリン様物質は高度に硫酸エステル化されたコンドロイチン硫酸エステル(OSCS)であることをつきとめた。<sup>5)</sup>

天然に存在するコンドロイチン硫酸エステルは、グルクロン酸と *N*-アセチルガラクトサミンの 2 糖繰り返し構造からなり、2 糖あたり 1~3 個の水酸基が硫酸エステル化されている。コンドロイチン硫酸エステルは、硫酸エステル基の位置と数によって A, B, C, D, E, H 及び K に分類されている。<sup>6)</sup> 我が国において、眼の充血、感音性難聴及び関節痛に適応されているコンドロイチン硫酸エステルは、A 及び C である(図 1 B)。また、コンドロイチン硫酸エステル B はデルマトン硫酸エステルとも呼ばれ、ブタ皮膚に存在することからヘパリンに不純物として混入していることが古くから知られていた。しかしながら、有害事象を引き起こしたヘパリンナトリウムに混入していた OSCS は、2 糖単位に 4 つ存在する水酸基がすべて硫酸エステル化された非天然型のコンドロイチン硫酸エステルであった(図 1 C)。<sup>1,5)</sup>

OSCS は千葉大学薬学部で既に研究されていた物質で、ヘパリンと同様に凝固因子 II a 及び Xa を阻害する活性を持つことは 1998 年に丸山らによって報告されていた。<sup>7)</sup> FDA らのグループは、高度に硫酸エステル化されたコンドロイチンを合成し(合成 OSCS)、ヘパリンに混入していた OSCS と各種 NMR スペクトルが一致することを確認した。また、あらかじめ OSCS の硫酸エステル基を除去した後、コンドロイチナーゼを作用させてオリゴ糖に分解し LC/MS を行うことにより、OSCS はコンドロイチン構成 2 糖単位であるグルクロン酸( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)*N*-アセチルガラクトサミンからなっていることを確認した。

つぎに、彼らは OSCS が有害事象の原因物質であるかどうかを検証した。<sup>8)</sup> ヒト血漿及び第 XII 因子欠失血漿を用いた実験やモデル動物を用いた検討により、OSCS は第 XII 因子の活性化を通してカリクレインを活性化すること(その結果、血管作用物質ブラジキニンが遊離され、血圧が低下する)、また補体由来ペプチド(アナフィラトキシン)C3a と C5a を産生すること(その結果、アナフィラキシーが誘導される)が明らかとなった。さらに、合成 OSCS を投与されたブタでは、血圧低下や心拍数増加などの有害事象と関連する症状が誘発されることが確認された。

高度に硫酸エステル化された多糖類が免疫反応を誘発することは、以前から知られていた。ヘパリン有害事象が発生する以前に欧州では、変形性関節疾患治療薬として Arteparon が使用されていたが、合併症を引き起こすことから販売中止になっていた。Arteparon は、構造的には OSCS と一致する。こうして OSCS は、有害事象を誘発した原因物質であると結論づけられた。

#### 4 日局一部改正

4月17, 18日, ワシントン市郊外においてFDA主催国際ヘパリン会議が開催された。日本, 中国, オーストラリア, 欧州数カ国等, 世界13カ国から査察関係者及び分析科学者が集まり, 今後の対応について話し合われた。分析セッションでは, OSCSのスクリーニング法として<sup>1</sup>H NMRが最も有用であること, またキャピラリー電気泳動やHPLC等他の分析法も利用可能であることが確認された。さらに今後各国の薬局方は連携して, ヘパリン不純物問題に対応していくことが確認された。厚生労働省も直ちに日局各条ヘパリンナトリウム改正に向けて動き出し, 厚生労働省, 国立衛研, 医薬品医療機器総合機構(総合機構), 近畿大学, 名古屋市立大学からなる日局試験法案作成のための研究班を立ち上げた。

国立衛研は, OSCS混入ヘパリンナトリウムから陰イオン交換HPLCにより, 試験法作成のためのOSCSを単離した(図2A)。そして, 精製OSCSとFDAより供与されたOSCS標準物質の2次元NMRスペクトルが一致することを確認した。つぎに, FDAが提案したスクリーニング法を基に試験法案が作成され, 国立衛研及び近畿大学薬学部掛樋一見教授の研究室において精製OSCSを用いた分析法バリデーションが実施された。さらに, 試験法案作成研究班と国内ヘパリン製造販売業者により試験法案が議論され, 国立衛研, 近畿大学及び製造販売業者により試験法案に対する共同検定が実施されることとなった。<sup>1,2)</sup>

試験法案の実行には, システム適合性に用いる日局OSCS標準品が不可欠だった。OSCS混入ヘパリンからOSCSを精製し供給し続けることは量的に限界があることから, 合成OSCSを用いる案が浮上し, 国立衛研と千葉大学大学院薬学研究院戸井田敏彦教授の研究室との共同研究により, 精製OSCSと合成OSCSの品質特性の比較が行われた。システム適合性確認のための分析条件において両者は同様な結果を与えることから, 合成OSCSは日局標準品として使用可能であることが確認された。<sup>3)</sup>

産官学による共同研究が実施される一方で, 厚生労働省及び総合機構は欧米の規制当局や米国薬局方及び欧州薬局方との連携に努めた。日本の提案によりPharmacopoeial Discussion Group (PDG)においてヘパリン試験が議題に取り上げられ, その後も引き続き各国の規制当局

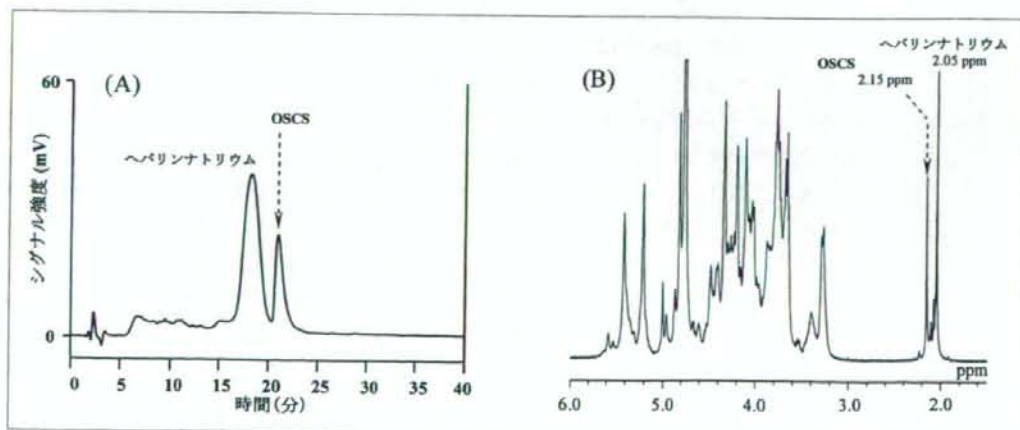


図2 イオン交換 HPLC(A)と<sup>1</sup>H NMR(B)によるヘパリンナトリウム中の OSCS の検出

及び薬局方との間で情報交換が行われた。最終的に、米国薬局方はヘパリンナトリウムの確認試験として<sup>1</sup>H-NMR及びキャピラリー電気泳動法を実施することとなり、欧州薬局方は製造過程において<sup>1</sup>H-NMRまたはキャピラリー電気泳動法による試験を実施することとなった。

分析法バリデーション及び共同検定の結果から、日局試験法案作成研究班は特異性及び検出限界ともに優れている<sup>1</sup>H-NMRを日局純度試験として採用することとし、ヘパリン製造販売業者の協力を得ながら試験法最終案を作成した(図2B)。7月1日、薬事・食品衛生審議会日本薬局方部会が開催され、試験法最終案が承認された。意見公募を経て、7月31日、日局が一部改正され、各条ヘパリンナトリウムに純度試験(5)OSCSが追加された。<sup>10</sup>同時に局方外医薬品規格2002が改正され、ヘパリンカルシウムの純度試験に<sup>1</sup>H-NMRによるOSCSの分析が追加された。<sup>11,12</sup>

## 5 おわりに

厚生労働省、国内大学薬学部研究者及びヘパリン製造販売業者の迅速な対応により、日局が一部改正され、OSCS含量がNMRによる検出限界以下であることが保証されたヘパリン製剤が供給されるようになった。こうして、医療の場を巻き込んだヘパリン問題は収束に向かった。今回の問題は、日局、米国薬局方、及び欧州薬局方の各条の部ヘパリンナトリウムに抗Xa活性測定や抗凝固活性等の生物活性試験が採用され、構造を確認する規格及び試験法が設定されていなかったこと、そしてその規格をすりぬけることによって生じた例であった。今回の問題を契機に、各薬局方は構造確認のための試験法の重要性を再認識することとなった。しかし一方で、薬局方の純度試験は環境から混入する物質、製造工程由来不純物もしくは目的物質関連不純物に対して設定するものであり、本来混入しないはずの非天然物に対して設定するべきものではないとの意見も一部にはある。それでも、各国の薬局方及びヘパリン製造販売業者はヘパリンの安全性確保と安定供給を目指し、<sup>1</sup>H-NMRやキャピラリー電気泳動法よりも簡便かつ頑健な試験法として、また他のグリコサミノグリカン硫酸エステルを包括的に検出できる試験法として、陰イオン交換HPLC、単糖組成分析、抗IIaと抗Xa活性の割合を求める活性試験、オリゴ糖分析等の可能性を検討している。今後もグリコサミノグリカン硫酸エステルの構造解析、活性及び毒性に関する研究の進展や、試験法に関する世界の動向に目を向けていく必要があるだろう。

### 引用文献

- 1) 橋井則貴ほか、医薬品研究、39、651-659(2008)。
- 2) Kishimoto T. K. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 358, 2457-2467(2008)。
- 3) 松田 勉、日下部哲也、医薬品研究、39、607-612(2008)。
- 4) <http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/default.htm>。
- 5) Guerrini M. *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 26, 669-675(2008)。
- 6) Sugahara K., Yamada S., *Trends Glycosci. Glycorechnol.*, 12, 321-349(2000)。
- 7) Maruyama T. *et al.*, *Carbohydr Res.*, 306, 35-43(1998)。
- 8) 掛樋一見ほか、医薬品研究、39、印刷中(2008)。
- 9) 川崎ナナほか、医薬品研究、39、印刷中(2008)。
- 10) 官報号外第166号、厚生労働省告示第417号。
- 11) 薬食発第0731015号厚生労働省医薬食品局長通知、日本薬局方外医薬品規格2002の一部改正について。
- 12) 橋井則貴ほか、医薬品研究、39、660-664(2008)。

## Mass spectrometric analysis of carbohydrate heterogeneity for the characterization of glycoprotein-based products

糖タンパク質医薬品の特性・品質評価における  
質量分析法を用いた糖鎖不均一性解析

Nana, Kawasaki\*; Satsuki, Itoh; Noritaka, Hashii;  
Akira, Harazono; Daisuke, Takakura; and Teruhide, Yamaguchi  
National Institute of Health Sciences 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501  
Tel: 81-03-3700-9074; Fax: 81-03-3700-9084; E-mail: nana@nihs.go.jp

(Received on February 24, 2008, accepted on May 7, 2008)

*Key Words: liquid chromatography/mass spectrometry, glycoprotein, oligosaccharide, glycopeptide*

### Abstract

Analysis of the carbohydrate heterogeneity of glycoprotein-based substances is crucial for establishing the nomenclature and definition of biological substances, ensuring consistency in the quality of these products, comparatively assessing the products obtained after the implementation of changes in the manufacturing process, and developing biosimilar or follow-on biological products. Liquid chromatography/mass spectrometry is recognized as one of the most useful techniques for analyzing the carbohydrate heterogeneity of glycoprotein substances. Here, we demonstrate the utility of LC/MS for analyzing the carbohydrate heterogeneity by using some representative glycoproteins such as tissue-plasminogen activator, a monoclonal antibody, the follicle-stimulating hormone, and human chorionic gonadotropin. Further, we demonstrate that MS-based glycoprotein analysis has potential applications in glycomics.

### A. Introduction

Recent advances in the field of biotechnology have enabled the development of various proteins, protein derivatives, and fusion proteins for use as drugs in medicine. Most biotechnological drugs that have been approved in Japan in 2007 are glycoprotein derivatives; these drugs include Alglucosidase Alfa, Bevacizumab, Darbepoetin Alfa, and Idursulfase (1). The carbohydrate moieties present in most glycoprotein derivatives are known to affect the biological activity of these substances. Glycan analysis is therefore considered important for the characterization and evaluation of the quality of drugs.

Analysis of the carbohydrate heterogeneity of glycoproteins is becoming increasingly important. The heterogeneity of glycan moieties is a crucial factor to be

### 要約

糖タンパク質医薬品の糖鎖の不均一性解析は、医薬品の命名・定義、品質の恒常性確保、並びに製造方法変更及びバイオ後続品開発の際の同等性・同質性評価において重要である。液体クロマトグラフィー/質量分析法は、糖タンパク質医薬品の糖鎖不均一性解析法として最も有用性の高い分析法の一つとして知られている。本稿では、組織プラスミノゲンアクチベータ、モノクローナル抗体、卵巣刺激ホルモン及びヒト絨毛性性腺刺激ホルモンなどの代表的糖タンパク質の分析例を示しながら、糖鎖不均一性解析におけるLC/MSの有用性を概説する。また、質量分析法を用いた糖タンパク質解析法をグライコミクスに応用した例を紹介する。

### A. はじめに

遺伝子組換え技術の進展に伴い、様々なタンパク質、タンパク質改変体、あるいは融合タンパク質が医薬品として開発されている。2007年に日本で承認されたバイオ医薬品の多くは、アルグルコシダーゼ アルファ、ベバシズマブ、ダルベポエチン アルファ、及びイデュルスルファーゼのような糖タンパク質である(1)。多くの糖タンパク質医薬品の糖鎖が生物活性等に影響を与えることが知られていることから、特性解析や品質評価における糖鎖解析は重要である。

さらに別の側面からも、糖鎖不均一性解析の重要性が認識されるようになってきた。すなわち、糖鎖不均一性は、医薬品を命名・定義する上で重要であるということである。医薬品の名称は、基原や臨床効果に基づき、世界保健機関

considered for establishing the nomenclature and definition of glycoprotein-based substances. The International Nonproprietary Names (INN) committee of the World Health Organization (WHO) proposes names for new drugs on the basis of the origins and clinical effects of the drugs (2). Different names are proposed for drugs containing different amino acid sequences. Glycoproteins that contain identical amino acid sequences but comprise different glycoforms are distinguished from each other by the use of Greek letters such as alfa and beta. For instance, epoetins, whose amino acid sequences are identical to that of human erythropoietin, are assigned different Greek letters on the basis of differences in their glycoforms. As of 2007, the INN had recognized 9 different epoetins and had assigned them letters from alfa to zeta. The terms "epoetin alfa" and "epoetin beta" are used to refer to epoetins consisting of the alfa and beta glycoforms, respectively; these drugs are marketed as different substances in Japan. However, the degree of glycosylation is known to change during various manufacturing processes; hence, a method for comparative assessment of the degree of glycosylation is required for the development of biosimilar or follow-on biological products as well as for the implementation of changes in the processes adopted for the manufacture of glycoprotein-based products. The establishment of the general criteria to be considered and of a relevant method for analyzing carbohydrate heterogeneity is a high-priority issue related to the manufacture of glycoprotein products in the United States, European Union, and Japan.

The methods most commonly used for analyzing the carbohydrate heterogeneity of glycoprotein substances are high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection (3), capillary electrophoresis, fluorescence-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) (4), and high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) (5). Recently, mass spectrometry (MS) has gained popularity as a method for analyzing the carbohydrate heterogeneity of glycoproteins (6). Although MS is advantageous in that it can provide structural information in considerable detail, it has limitations with regard to reproducibility and quantification. Investigations focusing on these limitations should be performed in order to extend the applications of MS to the analysis of glycans in glycoprotein substrates. Here, we demonstrate the utility of MS, especially liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (LC/ESI-MS) for analyzing the carbohydrate heterogeneity in glycoprotein-based substances. Further, we discuss the applications of MS-based analyses in glycomics.

(WHO)の医薬品国際一般名称 (INN) 委員会が命名する(2)。アミノ酸配列が異なる医薬品には、異なる名称が与えられる。ペプチド部分が同一でグリコフォームが異なる医薬品は、名称の後に alfa や beta などの異なるギリシャ文字が追加されて、区別される。例えば、ヒトエリスロポエチンと同一のアミノ酸配列を持つエポエチンには、グリコフォームの違いで異なるギリシャ文字が与えられており、現在 INN にはアルファからゼータまで9種類のエポエチンが収載されている。日本で販売されているエポエチン アルファ及びエポエチン ベータは、それぞれアルファグリコフォーム及びベータグリコフォームを持つ異なる医薬品である。しかし、グリコフォームは製造工程が変わると変化するため、製造方法の変更やバイオ後続品の開発にあたっては、糖鎖不均一性の同等性・同質性評価が要求される。そのために、米国、ヨーロッパ及び日本において、糖タンパク質医薬品の糖鎖の不均一性をどの程度解析すべきか等の基本的考え方、並びに解析のための適切な方法を確立することが、バイオ後続品開発における重要課題となっている。

糖タンパク質医薬品の糖鎖の不均一性解析法としてよく利用されている方法は、HPLC/蛍光検出法(3)、キャピラリー電気泳動法、蛍光標識糖鎖電気泳動法 (FACE) (4)及び高速陰イオン交換クロマトグラフィー/パルス電流検出法 (HPAEC-PAD) (5)であろう。さらに最近、質量分析法 (MS) が不均一性解析に利用されるようになってきた(6)。MSは、多くの構造情報を提供できる点で優れているが、定量性や再現性に問題がある。今後、定量性や再現性について新たな手法が導入されれば、糖鎖試験法としての有用性はさらに広がるものと思われる。本稿では、糖タンパク質の糖鎖不均一性解析法としてのMS、特に液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化質量分析法 (LC/ESI-MS) の有用性について概説する。さらに、MSをグライコミクスに応用した例についても紹介する。

## B. LC/MS of proteolytic glycoproteins

Peptide mapping is performed to confirm amino acid sequences and identify posttranslational modifications for the structural characterization of almost all recombinant proteins, and it is used to test the quality of these substances. In recent studies, LC/MS has frequently been employed for peptide mapping. The MS-based peptide mapping of proteolytic glycoproteins enables not only the analysis of amino acid sequences but also the detection of site-specific glycosylation (7-10). As an example of peptide mapping, here, we describe the MS-based peptide mapping that has previously been performed for tissue-plasminogen activator (t-PA) (11), which is an anticoagulant, and for a monoclonal antibody (12).

### 1) t-PA

t-PA is a single-chain glycoprotein consisting of 527 amino acid residues (molecular weight (MW): approximately 70,000). It contains 3 potential N-glycosylation sites—at Asn117, Asn184, and Asn448—and is attached to Fuc at Thr61 (Fig. 1) (13,14). The order of domains present in this protein from the N-terminal end is as follows: finger, epidermal growth factor (EGF), kringle 1, kringle 2, and catalytic domains. The single polypeptide is converted to a heterodimer through plasmin-mediated cleavage at Arg275-Ile276. t-PA is rapidly cleared from the blood, and high-mannose-type oligosaccharides that

## B. 糖タンパク質消化物の LC/MS

ペプチドマッピングは、タンパク質部分の一次構造や翻訳後修飾を確認するための方法として、多くの遺伝子組換えタンパク質医薬品の特性解析及び品質試験に用いられている。最近では、LC/MS がペプチドマッピングによく利用されるようになってきた。LC/MS を用いて糖タンパク質消化物マッピングを行うと、アミノ酸配列だけでなく、部位特異的な糖鎖の不均一性も同時に確認することができる(7-10)。LC/MS を用いたペプチドマッピングの代表例として、以下に、血栓溶解剤である組織プラスミノゲンアクチベータ (t-PA) (11) とモノクローナル抗体(12)のペプチドマッピングを紹介する。

### 1) t-PA

t-PA は、527 個のアミノ酸残基からなる分子量約 7 万の 1 本鎖糖タンパク質で、分子内の 3 箇所 (Asn117, 184, 448) に N 結合型糖鎖が、また、Thr61 にフコースが結合している (Fig. 1) (13,14)。t-PA は、N 末側から、フィンガードメイン、EGF ドメイン、クリングル 1 ドメイン、クリングル 2 ドメイン、catalytic ドメインから構成されている。t-PA は、プラスミンにより Arg 275-Ile276 が切断されると 2 本鎖 t-PA になる。t-PA は、血中からの消失が早く、肝臓での代謝には、クリングル 1 ドメイン上の Asn117 に結合している高マンノース型糖鎖や EGF ドメインが関与していると考えられている (15,16)。

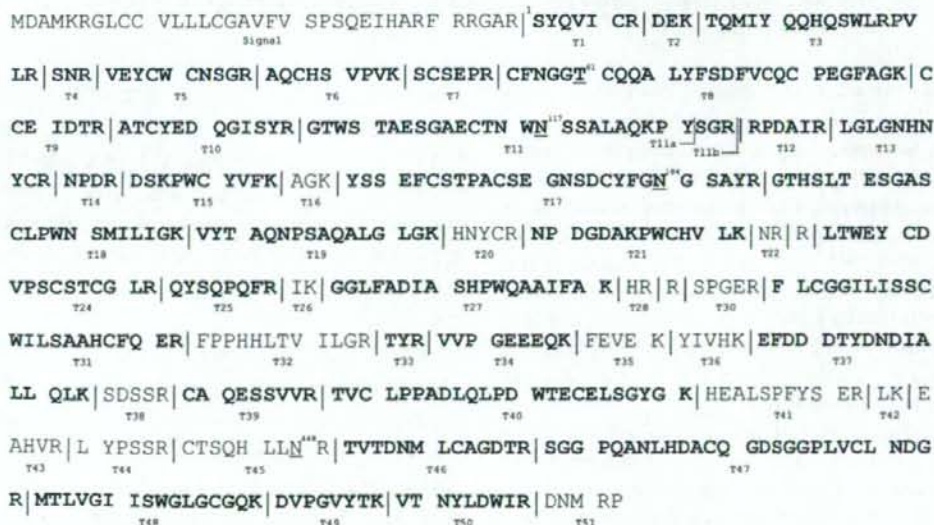
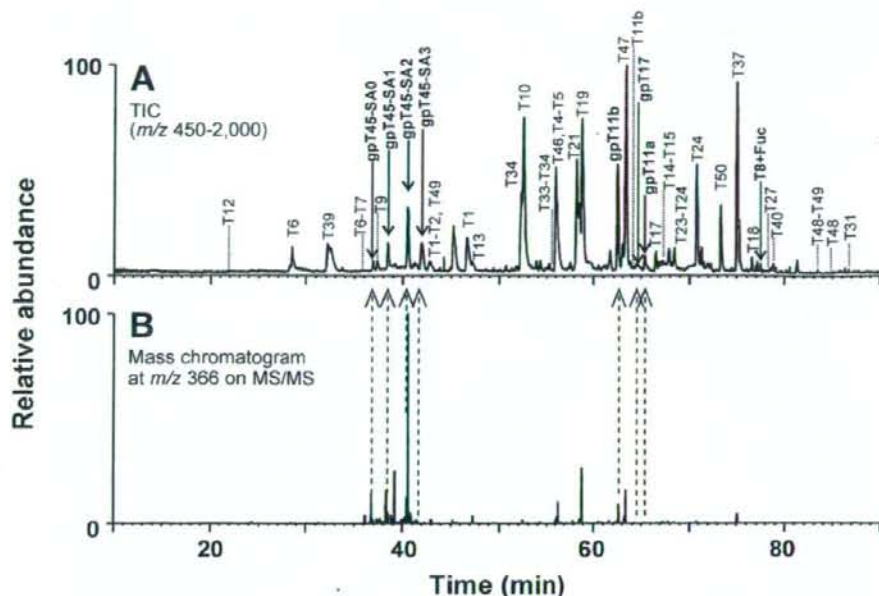


Fig. 1. Amino acid sequences of t-PA and tryptic peptides T1-T51. Boldface type indicates the peptides identified by the database search analysis with the SEQUEST search engine (Thermo Fisher Scientific). Potential N-glycosylation sites are underlined. Thr61 is fucosylated.



**Fig. 2. Mass spectrometric peptide map of tryptic digest of carboxymethylated t-PA from human melanoma cell (Wako Pure Chemical Industries).** (A) Total ion chromatogram (TIC) obtained by a single MS scan ( $m/z$  450–2,000) in the positive ion mode. (B) Mass chromatogram at  $m/z$  366 obtained by MS/MS. LC, Paradigm MS4 system (Michrom Bioresources); column, L-column (C18, 150 × 0.075 mm, 3  $\mu$ m, Chemicals Evaluation and Research Institute); flow rate, 300 nl/min; A buffer, 0.1% formic acid/2% acetonitrile; B buffer, 0.1% formic acid/90% acetonitrile; gradient condition, 2–45% of B (100 min); MS, LTQ-FT (Thermo Fisher Scientific); electrospray voltage, 1.8 kV (positive ion mode).

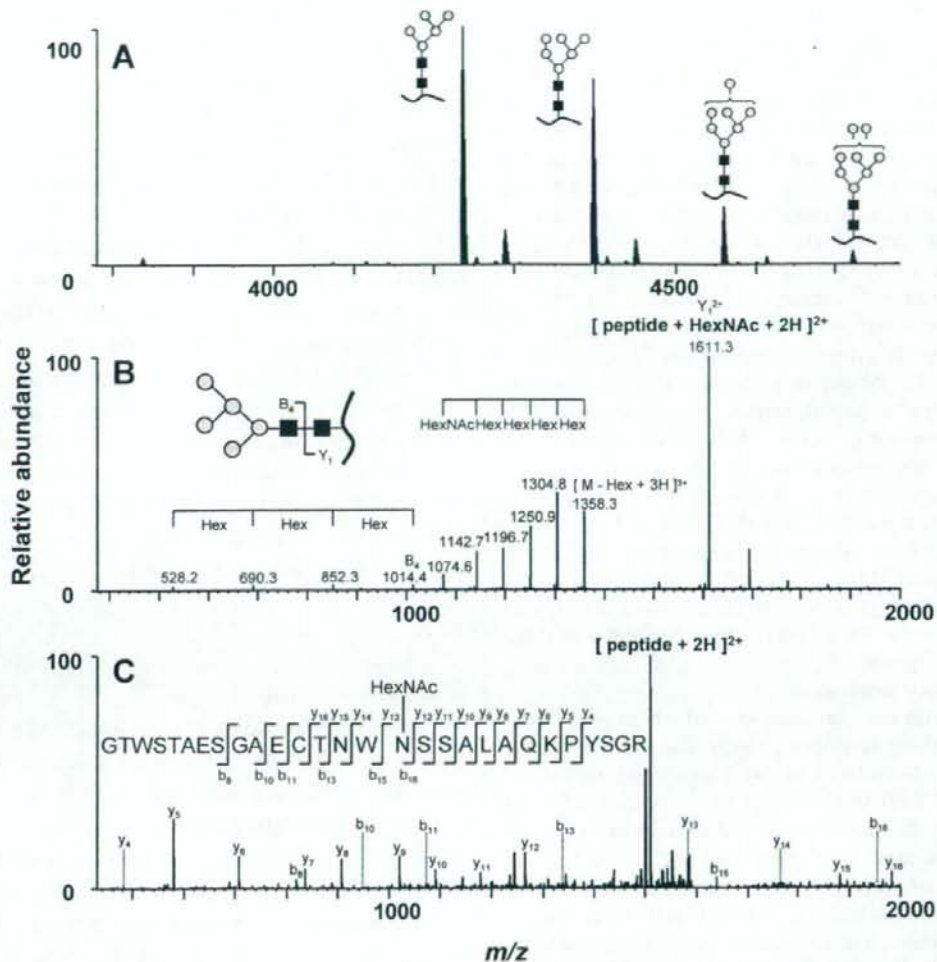
are present at the Asn117 residues of the kringle 1 and EGF domains are involved in its rapid clearance via the liver (15,16). Site-specific glycosylation analysis as well as amino acid sequencing is important for the characterization of t-PAs. Alteplase, which is marketed worldwide, is a glycoprotein consisting of an amino acid sequence identical to that of human t-PA. Two t-PA analogs (monateplase and pamiteplase) that have been genetically modified in order to prolong their half-life in blood are also marketed in Japan, and 2 other analogs, namely, reteplase and tenecteplase, have been approved in the United States and the European Union (17).

Figure 2A shows a tryptic map of t-PA (derived from human melanoma cells), as observed in a single MS scan. Each peak in the map was identified by running the MS<sup>n</sup> data that was acquired in a data-dependent manner through a database search (with 85% amino acid coverage). Fucosylated T8 (T8+Fuc), non-glycosylated T11b, glycosylated T11b (gpT11b), and non-glycosylated T17 were successfully identified by using the possible

t-PA はアミノ酸配列だけでなく、部位特異的な糖鎖不均一性の確認が必要な医薬品の一つといえよう。現在、国内外で販売されているアルテプラゼは、ヒト t-PA と同じアミノ酸配列を持つ糖タンパク質医薬品である。さらに、血中での滞留時間を延長させるために、遺伝子工学的に t-PA を改変した医薬品が国内では 2 品目 (モンテプラゼ、パミテプラゼ)、欧米でも異なる 2 品目 (reteplase, tenecteplase) が販売されている (17)。

Fig. 2A に、シングル MS スキャンで得られた t-PA (ヒト黒色腫細胞由来) のトリプシン消化物マップを示す。マップ上の各ピークは、データ依存的に取り込まれた MS<sup>n</sup> データを用いたデータベース検索によって帰属した (アミノ酸配列の 85% を確認した)。また、Asn に HexNAc (203 Da), Ser/Thr に dHex (146 Da) が結合している可能性を追加してデータベース検索することによって、Fuc 結合 T8 (T8+Fuc)、糖鎖非結合 T11b、糖鎖結合 T11b (gpT11b)、及び糖鎖非結合 T17 を同定することができた。データベース検索では T45 を





**Fig. 3.** Mass spectra of glycopeptide T11b. (A) Deconvoluted mass spectrum acquired at elution position of glycopeptides T11b (62.22–62.68 min). (B) MS/MS spectrum acquired from  $[M+3H]^{3+}$  ( $m/z$  1411.94) as a precursor ion. Carbohydrate structure was deduced from the fragment pattern. (C) MS/MS/MS spectrum acquired from  $[peptide+GlcNAc+2H]^{2+}$  ( $m/z$  1611.3) as a precursor ion. The peptide sequence and glycosylation site were identified by the database search analysis.

modifications of HexNAc (203 Da) on Asn and dHex (146 Da) on Ser/Thr. The final peptide, i.e., T45, could not be identified by a database search. However, using the glycan-distinctive  $Hex_1HexNAc_1^+$  ions ( $m/z$  366) that yielded peaks in the MS/MS, the acquisition positions of the glycopeptide MS data were mapped (Fig. 2B). The T45 glycopeptides (gpT45) were separated into 4 peaks based on the number of sialic acid residues present in the glycans (gpT45-SA0-SA3).

Figure 3A shows the deconvoluted mass spectrum

特定できなかったが、MS/MSによって生じた糖鎖に特徴的なイオン  $Hex_1HexNAc_1^+$  ( $m/z$  366) を用いることによって、糖ペプチドのMSデータが取り込まれている位置を特定することができた (Fig. 2B)。糖ペプチド T45 (gpT45) は、シアル酸結合数によって異なる4つのピークに分離されていた (gpT45-SA0-SA3)。

Fig. 3Aは、糖ペプチド gpT11b のマススペクトルをデコンボリューションしたものである。主なイオンの計算質量から、高マンノース型糖鎖 (Man-5、-6、-7及び-8) の結合が

of gpT11b. The linkages of Man-5, Man-6, Man-7, and Man-8 were deduced from the calculated masses of the predominant ions. Figure 3B shows the MS/MS spectrum acquired using  $[M+3H]^{3+}$  ( $m/z$  1411.9) as a precursor ion; this spectrum suggests that the attachment of Man-5 is determined by the product ions. MS/MS reveals that peptide fragments attached to the reducing-end GlcNAc residue generally arise from N-glycosylated peptides. Further, MS/MS/MS reveals that these peptide-related ions yield b- and y-ions via cleavage of the peptide backbone (18). The peptide sequence can be deduced by running these fragments through a database search. The ion at  $m/z$  1611.3 in Fig. 3B can be assigned to  $[\text{peptide} + \text{GlcNAc} + 2H]^{2+}$  of T11b. As shown in the MS/MS/MS spectrum obtained using the peptide-related ion as a precursor (Fig. 3C), the sequence of peptide T11b could be confirmed from the b- and y-ions arising from the peptide region.

Thus, through the peptide mapping by LC/MS/MS, it was confirmed that Asn117, 184, and 448 of t-PA were attached to high-mannose-type oligosaccharides, monosialylated, biantennary oligosaccharide, and bi- and triantennary oligosaccharides containing 0-3 Neu-Acs, respectively. These results were consistent with those in previous reports.

## 2) Monoclonal antibody

Monoclonal antibody-derived biological substances are being developed globally, and as of November 2007, the INN had named 144 monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies produced in cells such as CHO cells by biotechnological techniques are now being used as drugs. These antibodies are categorized on the basis of their origin as murine, chimeric, humanized, and human-derived antibodies. In 2007, 3 chimeric antibodies (Basiliximab, Infliximab, and Rituximab) and 5 humanized ones (Tocilizumab, Bevacizumab, Palivizumab, Trastuzumab, and Gemtuzumab Ozogamicin) were approved in Japan. The CH<sub>2</sub> domain in the H-chain of IgGs is commonly attached to an N-linked oligosaccharide. Since the antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) of most antitumor drugs derived from IgG1 is influenced by core fucosylation in the N-linked oligosaccharide attached to the CH<sub>2</sub> domain (19), it is necessary to analyze the carbohydrate heterogeneity and to establish a test for glycan characterization in order to apply monoclonal antibody-based drugs. The test for glycan characterization could be replaced with an *in vivo* assay if the glycan profile is found to be strongly associated with the *in vivo* activity of the drug. The establishment of a quantitative and qualitative method for glycan characterization that can be used as an alternative to animal experiments is crucial for the development of glycoprotein-based drugs.

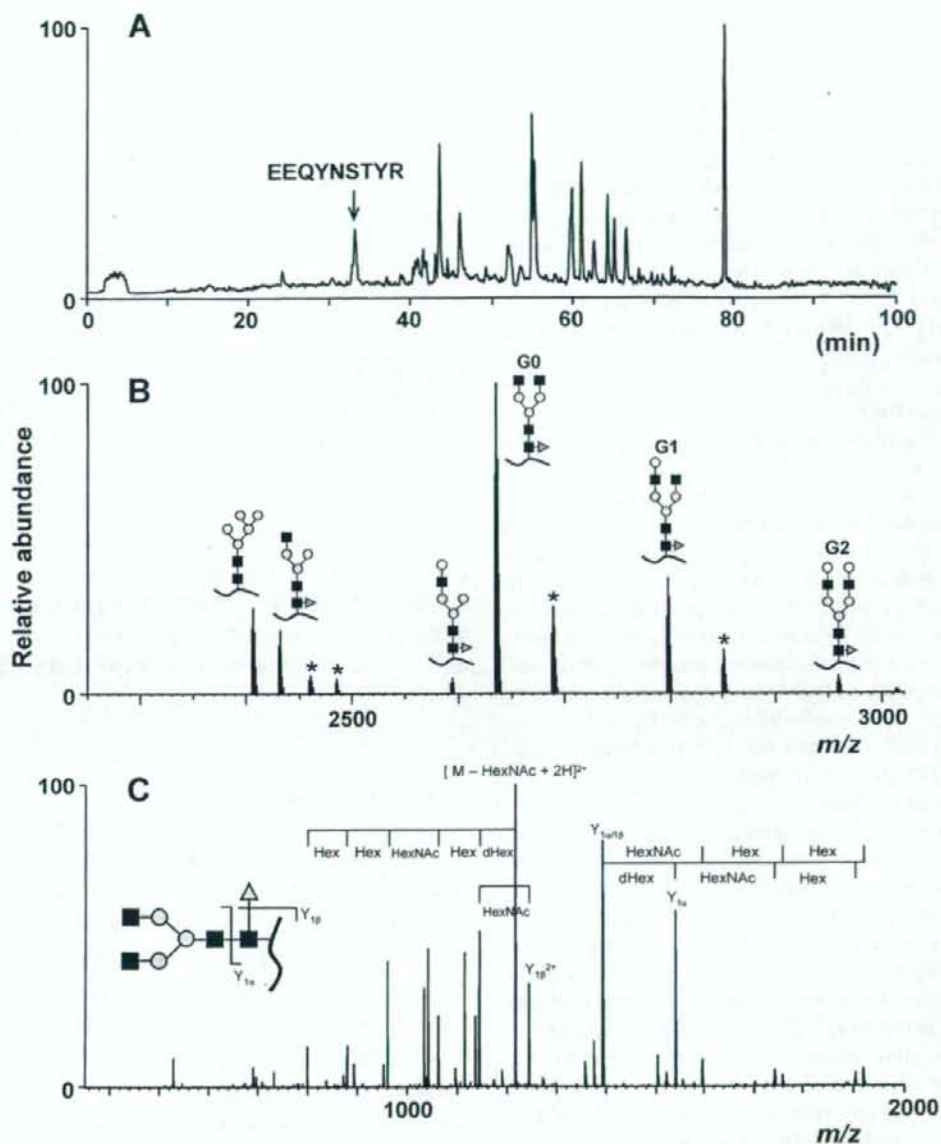
推定された。Fig. 3Bは、 $[M+3H]^{3+}$  ( $m/z$  1411.9)を前駆イオンとして得られたMS/MSスペクトルで、生じたフラグメントから、Man-5であることが確認された。N結合型糖鎖付加ペプチドのMS/MSでは、ペプチドに還元末端GlcNAcが結合したイオンが生じることが多い。これらのペプチド関連イオンを前駆イオンとしてさらにMS/MS/MSを行うと、ペプチド部分が開裂してb-及びy-イオンが生じる(18)。これらのフラグメントを使ってデータベース検索すると、ペプチドの配列を推定することができる。Fig. 3Bでは、 $m/z$  1611.3のイオンをT11bの $[\text{peptide} + \text{GlcNAc} + 2H]^{2+}$ と帰属することができる。Fig. 3Cは、このイオンを前駆イオンとして得られたMS/MS/MSスペクトルである。ペプチド部分から生じたb-及びy-イオンから、ペプチドT11bの配列を確認できる。

以上のようにLC/MS/MSを用いたペプチドマッピングによって、t-PAのAsn117, 184, 及び448にそれぞれ高マンノース型糖鎖, モノシアルリル2本鎖型糖鎖, 及びシアル酸を0-3個含む2及び3本鎖型糖鎖が結合していることが確認された。この結果は、既知の結果とよく一致している。

## 2) モノクローナル抗体

モノクローナル抗体を基原とする医薬品の開発が世界中で進められており、2007年11月現在、INNに144品目が記載されている。現在医薬品として用いられているモノクローナル抗体は、遺伝子組換え技術によってCHO細胞などを用いて製造されたものである。モノクローナル抗体は基原によって、マウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、及びヒト抗体などに分類される。現在国内では、キメラ抗体3品目(バシリキシマブ, リツキシマブ, インフリキシマブ)及びヒト化抗体5品目(トシリズマブ, ベバシズマブ, パリシズマブ, トラツズマブ, ゲムツズマブオゾガマイシン)が承認されている。IgGのH鎖のCH<sub>2</sub>ドメインには共通してN結合型糖鎖が結合している。この位置に結合しているN結合型糖鎖のコア構造の有無は、IgG1を基原とする抗腫瘍薬の抗体依存性細胞傷害活性(ADCC活性)に影響を及ぼすことから(19)、このようなモノクローナル抗体の承認申請にあたっては、糖鎖不均一性解析と糖鎖試験法の設定が必要になるだろう。特に、糖鎖試験の結果と*in vivo*活性試験の間に相関がある場合は、糖鎖試験法を*in vivo*活性試験におきかえられる可能性があり、動物実験代替法として、糖鎖を定性的かつ定量的に分析する試験法を設定することは重要であろう。

Fig. 4Aは、あるモノクローナル抗体製剤のトリプシン消化物マップである。32分前後に検出されているピークがH鎖



**Fig. 4. Mass spectrometric peptide map of tryptic digest of the carboxymethylated monoclonal antibody.** (A) TIC obtained by single MS scan ( $m/z$  450–2,000) in the positive ion mode. (B) Deconvoluted mass spectrum at the elution position of the glycopeptides (32.57–33.66 min). \* Non-glycopeptide signal (C) Representative MS/MS spectrum acquired from  $[M+2H]^{2+}$  ( $m/z$  1318.04) as a precursor ion. Analytical condition: see Fig. 2.

Figure 4A shows the tryptic map of a commercially available monoclonal antibody-based drug. The peak detected at 32 min was assigned to the glycopeptide derived

に由来する糖ペプチドのピークと帰属された。このペプチドに結合している糖鎖は、デコンホリューションしたマスマスペクトル上のプロトン化分子の計算質量から、Man-5及び2本

from the H-chain. On the basis of the calculated masses of the protonated molecules in the deconvoluted mass spectrum, the glycans attached to the peptide were predicted to be Man-5 and biantennary oligosaccharides (Fig. 4B). The structure of each glycan was deduced from the corresponding peak in the MS/MS spectra that were acquired using individual protonated molecules as precursors. The glycan distribution in IgG, which was determined by performing LC/MS/MS, was identical to that reported previously (20). Figure 4C shows the MS/MS spectrum obtained for agalactosyl biantennary oligosaccharides as a representative spectrum that was used for structural characterization.

### C. Glycan profiling

Profiling of the glycans released from glycoproteins is employed as an alternative method for analyzing the carbohydrate heterogeneity of glycoprotein-derived substances. This method provides additional information regarding the heterogeneity and structural details of these substances. It is useful for evaluating the consistency in the degree of glycosylation among product batches, for comparatively assessing products obtained by implementing changes in the manufacturing process, and for developing biosimilar or follow-on biological products. We demonstrate the applicability of LC/MS using monoclonal antibodies and the follicle-stimulating hormone (FSH) to glycan profiling.

#### 1) Monoclonal antibody

N-linked oligosaccharides released from the monoclonal antibody-based product described in the previous section were analyzed using an LC/MS system equipped with a graphitized carbon column (21-23). Figure 5 shows the glycan profile, as determined by performing a single MS scan for the glycans. It is difficult to distinguish the peptides attached to different glycan isomers by performing MS-based peptide mapping because glycopeptide isomers are coeluted. In contrast, LC permits separation of the liberated glycans on the basis of their subtle structural differences. Thus, LC/MS of glycans provides additional information regarding the carbohydrate heterogeneity of glycoproteins, including isomers. On the basis of the masses of the protonated molecules identified and the fragment peaks arising in the MS/MS spectra, the carbohydrate structures responsible for the peaks were predicted as shown in the image inset in Fig. 5. Table 1 shows the relative peak areas of the glycans, as were calculated by glycan profiling, using single MS scans of the released glycans (Fig. 5) and glycopeptides (Fig. 4B). These peak ratios were found to be almost identical, with the exception of Man-5, whose intensity determined

糖鎖糖鎖であることが示唆された (Fig. 4B)。検出された各種ペプチドの糖鎖部分の構造は、各プロトン化分子を前駆イオンとした MS/MS より推定した。本分析により得られた糖鎖の分布は、既に報告されている IgG の糖鎖の分布とよく一致していた (20)。代表的スペクトルと構造帰属例として、アガラクトシル 2 本鎖の MS/MS スペクトルを Fig. 4C に示す。

### C. 糖鎖プロファイリング

糖タンパク質性医薬品の糖鎖不均一性解析法としてよく利用されるもう一つの方法は、タンパク質から切り出した糖鎖のプロファイリングである。この方法は、糖鎖の不均一性や詳細構造に関する多くの情報が得られることから、ロット間の糖鎖の恒常性評価や、製造方法変更もしくはバイオ後続品開発における同等性・同質性評価法として有用である。糖鎖プロファイリングに LC/MS を用いた例として、モノクローナル抗体と卵巣刺激ホルモン (FSH) を分析した例を紹介する。

#### 1) モノクローナル抗体

前項のペプチドマッピングで使用した市販のモノクローナル抗体製剤から、N 結合型糖鎖を切り出し、グラファイトカーボンカラムを接続した LC/MS システムを用いて分析した (21-23)。Fig. 5 は、シングル MS スキャンで得られた糖鎖プロファイルである。糖ペプチドの LC/MS では、糖鎖異性体が結合したペプチドはほぼ同じ位置に溶出されるので、異性体同士を区別することは難しいが、遊離糖鎖の LC/MS では、糖鎖異性体は構造上のわずかな違いで分離されるので、異性体を含む多くの不均一性情報を得ることができる。Fig. 5 に見られる各ピークの糖鎖構造は、シングル MS で得られたプロトン化分子の質量と MS/MS で得られたフラグメントから図中の構造のように推定された。Table 1 は、糖ペプチドのシングル MS で得られたプロトン化分子のピーク面積比と (Fig. 4B)、糖鎖の LC/MS で得られた各糖鎖のピーク面積比 (Fig. 5) を比較した結果である。Man-5 が結合したペプチドのピーク面積が高く観測されたことを除き、おおよそ一致していた。