

Table 1
Summary of analysis of serum glycoproteome with higher ion intensities

Glycopeptide		Charge	Observed MW	Relative peak intensity ^a	Oligosaccharide	Protein (Protein ID)	Theoretical MW
Retention time (min)	m/z ^b				Observed MW	Glycopeptide	Glycopeptide
						Peptide sequence	Oligosaccharide
						Deduced oligosaccharide composition ^c	
<i>Ig gamma-1 chain C region (P01857)</i>							
EEQYNSTYR ^d							
67.3	1479.6	2+	2957.1	13.1	1768.6	[HexNAc]4[Hex]5[Fuc]1	1188.50
67.3	1297.0	2+	2592.0	3.0	1403.5	[HexNAc]3[Hex]4[Fuc]1	1768.64
67.4, 67.6	1398.5	2+	2795.1	33.1	1606.5	[HexNAc]4[Hex]4[Fuc]1	1403.51
67.4, 67.7	1216.0	2+	2429.9	4.3	1241.4	[HexNAc]3[Hex]3[Fuc]1	1606.59
67.7	1317.5	2+	2633.0	27.8	1444.5	[HexNAc]4[Hex]3[Fuc]1	1241.45
67.9	1500.1	2+	2998.1	2.3	1809.6	[HexNAc]5[Hex]4[Fuc]1	1444.53
	1000.4	3+	2998.0				1809.67
67.9	1581.1	2+	3160.2	0.2	1971.7	[HexNAc]5[Hex]5[Fuc]1	1671.72
68.0	1406.6	2+	2811.1	0.9	1622.6	[HexNAc]4[Hex]5	1622.58
68.2, 68.4	1325.5	2+	2649.0	2.8	1460.5	[HexNAc]4[Hex]4	1460.53
68.2	1491.1	2+	2836.1	2.9	1647.6	[HexNAc]5[Hex]3[Fuc]1	1647.61
68.5	1244.5	2+	2486.9	1.4	1298.4	[HexNAc]4[Hex]3	1298.48
69.1	1625.1	2+	3248.1	2.2	2059.6	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]1[Fuc]1	2059.73
	1083.7	3+	3248.1				
69.6	1544.1	2+	3086.2	0.5	1897.6	[HexNAc]4[Hex]4[NeuAc]1[Fuc]1	1897.68
<i>Ig gamma-2 chain C region (P01859)</i>							
EEQYNSTYR ^d							
161.9, 162.2	1747.0	4+	4584.1		1606.6	[HexNAc]4[Hex]4[Fuc]1	2977.49
162.4	1106.5	4+	4422.1		1444.6	[HexNAc]4[Hex]3[Fuc]1	1606.59
							1444.53
EEQYNSTYR ^d							
156.4	1034.3	5+	5166.4		1768.7	[HexNAc]4[Hex]5[Fuc]1	5397.69
156.6, 157.1	1001.8	5+	5004.0		1606.3	[HexNAc]4[Hex]4[Fuc]1	1768.64
							1606.59
<i>Ig gamma-2 chain C region (P01859)</i>							
EEQFNSTIR ^d							
85.4	1463.6	2+	2925.1	6.3	1768.6	[HexNAc]4[Hex]5[Fuc]1	1156.61
85.5	1293.0	2+	2560.0	1.4	1403.5	[HexNAc]3[Hex]4[Fuc]1	1768.64
85.7, 86.3	1382.5	2+	2763.1	19.4	1606.5	[HexNAc]4[Hex]4[Fuc]1	1403.51
85.7, 86.4	1200.0	2+	2397.9	2.8	1241.4	[HexNAc]3[Hex]3[Fuc]1	1606.59
85.7	1565.1	2+	3128.2	0.0	1971.7	[HexNAc]5[Hex]5[Fuc]1	1241.45
86.0	1484.1	2+	2966.2	1.0	1809.6	[HexNAc]4[Hex]4[Fuc]1	1971.72
86.5	1301.5	2+	2601.0	21.8	1444.5	[HexNAc]4[Hex]3[Fuc]1	1809.67
86.5	1390.5	2+	2779.0	0.0	1622.5	[HexNAc]4[Hex]5	1444.53
86.5	1403.0	2+	2804.1	1.8	1647.5	[HexNAc]5[Hex]3[Fuc]1	1622.58
87.0, 87.5	1309.5	2+	2617.0	0.1	1460.5	[HexNAc]4[Hex]4	1647.61
87.6	1228.5	2+	2454.9	0.2	1298.4	[HexNAc]4[Hex]3	1460.53
89.4	1609.1	2+	3216.2	1.6	2059.7	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]1[Fuc]1	1298.48
	1073.1	3+	3216.2				2059.73
90.0	1528.1	2+	3054.2	1.5	1897.6	[HexNAc]4[Hex]4[NeuAc]1[Fuc]1	1897.68
	1019.1	3+	3054.1				
<i>Gamma 3 immunoglobulin constant heavy chain (CA67886)</i>							
EEQYNSTYR ^d							
EEQFNSTYR ^d							
<i>Ig gamma-4 chain C region (P01861)</i>							
EEQFNSTYR ^d							
76.4	1471.6	2+	2941.1	1.0	1768.6	[HexNAc]4[Hex]5[Fuc]1	1172.51
76.5	1289.0	2+	2576.0	0.2	1403.5	[HexNAc]3[Hex]4[Fuc]1	1772.51
76.6, 76.8	1390.6	2+	2779.1	3.4	1606.6	[HexNAc]4[Hex]4[Fuc]1	1768.64
76.5, 76.8	1208.0	2+	2413.9	0.4	1241.4	[HexNAc]3[Hex]3[Fuc]1	1403.51
76.7	1492.1	2+	2982.1	0.2	1809.6	[HexNAc]5[Hex]4[Fuc]1	1606.59
76.9	1309.5	2+	2617.0	3.6	1444.5	[HexNAc]4[Hex]3[Fuc]1	1241.45
77.0	1398.5	2+	2795.1	0.1	1622.6	[HexNAc]4[Hex]5	1809.67
76.9	1917.5	2+	2633.0	0.1	1460.5	[HexNAc]4[Hex]4	1444.53
77.0	1411.1	2+	2820.1	0.3	1647.6	[HexNAc]5[Hex]3[Fuc]1	1622.58
77.4	1236.4	2+	2470.8	0.1	1298.3	[HexNAc]4[Hex]3	1460.53
78.5	1612.1	2+	3232.1	0.3	2059.6	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]1[Fuc]1	1647.61
79.1	1536.1	2+	3070.1	0.1	1897.6	[HexNAc]4[Hex]4[NeuAc]1[Fuc]1	2059.73
							1897.68
<i>Haptoglobin (P00738)</i>							
MVSH ^e INLTTCATINEQWLLTAA ^e							
137.9	1531.7	3+	4592.1		1913.7	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]1	44
	1149.0	4+	4592.0	30.1	1913.6		2678.99

Table 1 (Continued)

Glycopeptide					Oligosaccharide		Protein (Protein ID) ^a	
Retention time (min)	m/z ^b	Charge	Observed MW	Relative peak intensity ^c	Observed MW	Glycopeptide	Peptide	Theoretical MW
					Peptide sequence		Oligosaccharide	
					Deduced oligosaccharide composition ^d			
141.4	1221.8	4+	4883.1	88.7	2204.7	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2		2204.77
137.3	1153.0	4+	4608.1	28.9	1913.7	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]1	M(O)NSHINLTGATLINEQWLLTAK	2694.38 1913.68
140.5, 141.1	1225.8	4+	4899.7	64.3	2204.7	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2		2204.77
	1634.1	3+	4899.7		2204.8			
86.3	1395.0	4+	5576.0	0.1	4118.3	NLFLNHSNATAK ^e		1457.73
87.0	1650.3	4+	6597.3	0.3	5139.6	[HexNAc]8[Hex]10[NeuAc]3		4118.45
87.6	1595.6	4+	6378.3	0.9	4920.6	[HexNAc]10[Hex]12[NeuAc]4		5139.81
87.9	1559.1	4+	6232.3	2.7	4745.5	[HexNAc]9[Hex]11[NeuAc]4[Fuc]1		4920.73
88.6	1504.3	4+	6013.0	0.1	4555.3	[HexNAc]9[Hex]11[NeuAc]4		4774.68
88.9	1467.8	4+	5867.1	4.1	4409.4	[HexNAc]8[Hex]10[NeuAc]4[Fuc]1		4555.60
90.4	1759.6	4+	7034.5	0.2	5576.8	[HexNAc]8[Hex]10[NeuAc]4		4409.54
90.7	1723.1	4+	6888.5	0.5	5430.8	[HexNAc]10[Hex]12[NeuAc]5[Fuc]1		5576.96
91.5	1668.3	4+	6669.4	0.3	5211.6	[HexNAc]9[Hex]11[NeuAc]5[Fuc]1		5430.90
91.7	1631.8	4+	6523.3	0.4	5065.6	[HexNAc]9[Hex]11[NeuAc]5		5211.83
87.8	1124.7	3+	3371.2		1913.5	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]1		5065.77
91.6	1221.7	3+	3662.2		2204.5	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2		1913.68 2204.77
127	1358.6	3+	4072.8	2.2	2278.8	VVLHPNYSQVDIGLIK ^e		1794.00
128.2	1236.9	3+	3707.7	3.1	1913.7	[HexNAc]5[Hex]6[NeuAc]1		2278.81
131.4	1455.6	3+	4363.8	4.8	2569.8	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]1		1913.68
	1052.0	4+	4363.8			[HexNAc]5[Hex]6[NeuAc]2		2569.90
131.8	1333.9	3+	3998.7	89.2	2204.7	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2		2204.77
	1000.7	4+	3998.7		2204.7			
134.1	1532.7	3+	4655.0	7.5	2860.9	[HexNAc]5[Hex]6[NeuAc]3		2861.00
134.1	1164.7	4+	4654.9		2860.9			
126.1	1252.8	3+	3755.5	0.9	2278.8	<i>Transferrin (P02782)</i>		2 ^f
127.0	1131.1	3+	3390.4	1.7	1913.7	CGLVPVLAENYK ^e		1476.73
129.8	1949.9	3+	4046.7	1.6	2569.9	[HexNAc]5[Hex]6[NeuAc]1		2278.81
130.6	1228.2	3+	3681.5	46.8	2204.7	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]1		1913.68
133.1	1446.9	3+	4337.8	0.8	2861.0	[HexNAc]5[Hex]6[NeuAc]2		2569.90
						[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]3		2204.77
143.8	1623.3	3+	4866.9	4.1	2350.8	QQQLFGSNVTDGSGNPLPK ^e		2861.00
143.9	1181.2	4+	4720.9		2204.8	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2[Fuc]1		2516.08
	1574.6	3+	4720.9	50.5	2204.8	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2		2350.83
146.0	1842.0	3+	5523.0	0.9	3007.0	[HexNAc]5[Hex]6[NeuAc]3[Fuc]1		3007.06
146.2	1793.4	3+	5377.3	1.6	2861.2	[HexNAc]5[Hex]6[NeuAc]3		2861.00
95.6	1415.2	3+	4242.7	0.1	2350.8	<i>Ceruloplasmin (P00450)</i>		4 ^g
	1061.7	4+	4242.6		2350.8	EHEGAYEDNTTDFQR		1891.83
96.3	1366.5	3+	4096.6	6.0	2204.8	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2[Fuc]1		2350.83
	1025.2	4+	4096.7		2204.9	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2		2204.77
98.1, 98.5	1633.9	3+	4898.7	0.4	3006.9	[HexNAc]5[Hex]6[NeuAc]3[Fuc]1		3007.06
	1226.0	4+	4899.9		3008.0			
98.8	1585.2	3+	4752.7	0.4	2860.9	[HexNAc]5[Hex]6[NeuAc]3		2861.00
	1189.2	4+	4752.6		2860.8			
127.0	1493.2	3+	4476.6	0.0	2350.6	ENLTAPGSDSAVFPEQGTW		2125.99
127.4	1444.5	3+	4330.6	2.8	2204.6	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2[Fuc]1		2350.83
129.3	1663.3	3+	4987.0	0.2	2861.0	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2		2204.77
						[HexNAc]5[Hex]6[NeuAc]3		2861.00
104.3	1093.9	4+	4371.7	1.4	2350.7	EDYHLQEQNVSNAPLDK ^e		2021.00
	1458.3	3+	4371.8	0.2	2350.8	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2[Fuc]1		2350.83
105.2	1057.4	4+	4225.7	4.5	2204.7	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2		2204.77
	1409.6	3+	4225.6	1.2	2204.6			

Table 1 (Continued)

Glycopeptide					Oligosaccharide	Protein (Protein ID)	Theoretical MW
Retention time (min)	m/z ^a	Charge	Observed MW	Relative peak intensity ^b	Observed MW ^c	Glycopeptide Peptide sequence Deduced oligosaccharide composition ^d	Peptide Oligosaccharide
106.6	1294.6	4+	5174.2	1.2	3153.2	[HexNAc]5[Hex]6[NeuAc]3[Fuc]2	3153.12
106.8, 107.4	1258.0	4+	5027.9	2.0	3006.9	[HexNAc]5[Hex]6[NeuAc]3[Fuc]1	3007.06
107.7	1221.5	4+	4881.8	1.9	2860.8	[HexNAc]5[Hex]6[NeuAc]3	2861.00
						<i>Alpha-1-antitrypsin (P01008)</i>	3 ^e
						YLGNATAIEFLPDEGK	1754.89
154.6	1369.6	3+	4105.7	2.2	2350.8	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2[Fuc]1	2350.83
154.8	1320.9	3+	3959.7	140.6	2204.8	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2	2204.77
						<i>Alpha-2-HS-glycoprotein (P02765)</i>	2 ^e
						VCQDCPLLAFLNDR	1772.81
136.9	1326.9	3+	3977.7		2204.8	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2	2204.77
						<i>Alpha-2-macroglobulin (P01023)</i>	6 ^e
						VSNQTLISLFTVLDVPR	2162.17
187.9, 188.8	1505.3	3+	4512.7	5.1	2350.6	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2[Fuc]1	2350.83
188.3	1456.7	3+	4367.0	22.5	2204.8	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2	2204.77
						<i>Beta-2-glycoprotein 1 (P02749)</i>	4 ^e
						VYKPSACNNSLYK	1467.75
83.5	1273.8	3+	3818.5	1.5	2350.8	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2[Fuc]1	2350.83
83.6	1225.2	3+	3672.5	6.9	2204.8	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2	2204.77
85.2	1492.6	3+	4474.6	0.3	3006.9	[HexNAc]5[Hex]6[NeuAc]3[Fuc]1	3007.06
85.4	1443.9	3+	4328.6	0.5	2860.8	[HexNAc]5[Hex]6[NeuAc]3	2861.00
						LGNWSAMPSCR	1250.54
109.7	1152.8	3+	3455.3		2204.7	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2	2204.77
						<i>Complement C3 (P01024)</i>	3 ^e
						TYLTPATNHMGNVTFIPANR	2254.15
121.0	1265.9	3+	3794.6	5.4	1540.4	[HexNAc]2[Hex]7	1540.53
121.2	1211.8	3+	3632.5	47.8	1378.4	[HexNAc]2[Hex]6	1378.48
121.6	1157.8	3+	3470.4	10.2	1216.3	[HexNAc]2[Hex]5	1216.42
						<i>Hemopexin (P02790)</i>	5 ^e
						SWPAVGNCSALR	1404.65
115.3	1252.8	3+	3755.5	0.7	2350.8	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2[Fuc]1	2350.83
115.8	1204.1	3+	3609.4	10.3	2204.7	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2	2204.77
						ALPQIQNVTSLLGCTI	1735.86
115.8	1314.5	3+	3940.4	10.3	2204.5	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2	2204.77
						<i>Ig alpha-1 chain C region (P01876)</i>	2 ^e
						<i>Ig alpha-2 chain C region (P01877)</i>	4 ^e
165.2, 165.7	1157.8	4+	4627.2	8.0	1663.6	LSIHRPALEDLLIGSEANLTCLTGLR	2963.58
165.8	1117.3	4+	4465.0	15.4	1501.4	[HexNAc]5[Hex]4	1663.61
165.9	1046.0	4+	4180.0	5.6	1216.4	[HexNAc]5[Hex]3	1501.56
169.2	1220.3	4+	4877.2	48.8	1913.6	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]1	1216.42
168.8, 169.4	1256.9	4+	5023.5	1.3	2059.9	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]1[Fuc]1	1913.68
169.9	1179.8	4+	4715.3	4.0	1751.7	[HexNAc]4[Hex]4[NeuAc]1	2059.73
170.0	1169.6	4+	4674.2	5.1	1710.6	[HexNAc]3[Hex]5[NeuAc]1	1751.62
169.0	1271.2	4+	5080.8	21.0	2117.2	[HexNAc]5[Hex]5[NeuAc]1	1710.60
	1017.2	5+	5081.0		2117.4		2116.76
169.9	1230.4	4+	4917.5	11.8	1954.0	[HexNAc]5[Hex]4[NeuAc]1	1954.70
173.1	1293.2	4+	5168.8	9.0	2205.2	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2	2204.77
						PALEDLLIGSEANLTCLTGLR ^e	2357.21
174.4	1287.2	3+	3858.6	14.3	1501.4	[HexNAc]5[Hex]3	1501.56
176.7	1424.6	3+	4270.9	65.8	1913.7	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]1	1913.68
176.4	1492.5	3+	4474.5	20.5	2117.3	[HexNAc]5[Hex]5[NeuAc]1	2116.76
						<i>Ig alpha-2 chain C region (P01877)</i>	4 ^e
						TPLTANITK	957.55
84.1	1006.8	3+	3017.2	3.7	2059.7	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]1[Fuc]1	2059.73
	1509.6	2+	3017.2		2059.6		
84.1	1074.4	3+	3220.3	4.8	2262.8	[HexNAc]5[Hex]5[NeuAc]1[Fuc]1	2262.81
	1611.2	2+	3220.3		2262.8		
87.2	1103.8	3+	3308.3	1.3	2350.8	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2[Fuc]1	2350.83
						<i>Ig mu chain C region (P01871)</i>	5 ^e
						YKNSDISSTR ^e	1283.61

Table 1 (Continued)

Glycopeptide					Oligosaccharide	Protein (Protein ID)	Theoretical MW
	Retention time (min)	m/z	Charge	Observed MW	Observed MW	Glycopeptide	Peptide
							Oligosaccharide
							Deduced oligosaccharide composition
59.7	1115.5	3+	3343.4	40.7	2059.7	[HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]1[Fuc]1	2059.73
60.3	1183.1	3+	3546.4	16.4	2262.8	[HexNAc]5[Hex]5[NeuAc]1[Fuc]1	2262.81

^a Underlines indicated that these ions were assigned by elucidating data-dependent MS/MS of LC/ESI MS/MS of human serum digest.

^b Centroid peak intensity (count per sec) in integrated MS spectra during glycopeptide eluting period.

^c Oligosaccharide compositions were deduced from molecular weights.

^d Number of potential N-glycosylation sites.

^e Missed cleavage or unexpected digestion.

^f Other ions with same m/z overlapped.

^g Mass spectra were shown in Fig. 7A–K.

All masses are monoisotopic. Cysteine residue was carboxymethylated. Potential N-glycosylation sites were underlined. M(O), oxidized methionine; Fuc, fucose; Hex, hexose; HexNAc, N-acetylhexosamine; NeuAc, N-acetylneuraminic acid

or mono/diagalacto-biantennary complex-type glycan. Integrated mass spectra of fraction A, B and C were shown in Fig. 5B–D.

Haptoglobin has four potential N-glycosylation sites. We performed peptide mapping using a tryptic digest of haptoglobin under a chromatographic condition similar to that of human serum. Fig. 6A and A' show TIC obtained by LC/MS/MS with mass range m/z 1000–2000 and EIC of data-dependent MS/MS at m/z 204.05–205.15, respectively. Glycopeptides for four potential glycosylation sites were assigned by elucidating MS/MS spectra (spectra were not shown). Glycopeptides of NLFLN²⁰⁷HSEN²¹¹ATAK containing two N-glycosylation sites were eluted in fraction E as two glycosylated forms (Fig. 5B) and fraction E' as one glycosylated form (Fig. 6C). The former glycosylated form was more abundant than the later form. These glycosylation sites could not be characterized separately by trypsin digestion. Glycopeptides of VVLPHPN²⁴¹YSQVDIGLIK and MVSHHN¹⁸⁴LTTGATLINEQWLLTTAK were eluted in fractions F and D, respectively (Fig. 5D and E). From the molecular masses of oligosaccharides we inferred that a majority of oligosaccharides in haptoglobin are di-, tri-, and tetra-

antennary forms and that some oligosaccharides were not fully saturated with NeuAc, and few glycans were fucosylated.

Using the data of relative retention times, accurate m/z values and charge states obtained by peptide mapping of commercially available glycoproteins, we confirmed already assigned glycopeptides and further assigned undetected glycopeptides (IgG3/IgG4 and two sites of ceruloplasmin), with the exceptions of one of the glycopeptides from ceruloplasmin, intensity of which was only noise levels.

3.5. Site-specific glycosylation analysis

To analyze the heterogeneity of glycosylation at each site, we performed an additional LC/MS in which switching to MS/MS was not allowed (Fig. 2C). Utilizing the information of retention time, accurate m/z and charge state of assigned glycopeptides by LC/MS/MS, corresponding glycopeptides were assigned in LC/MS data by mass chromatogram. When two or more glycoforms were detected, mass spectrometric heterogeneity was calculated using

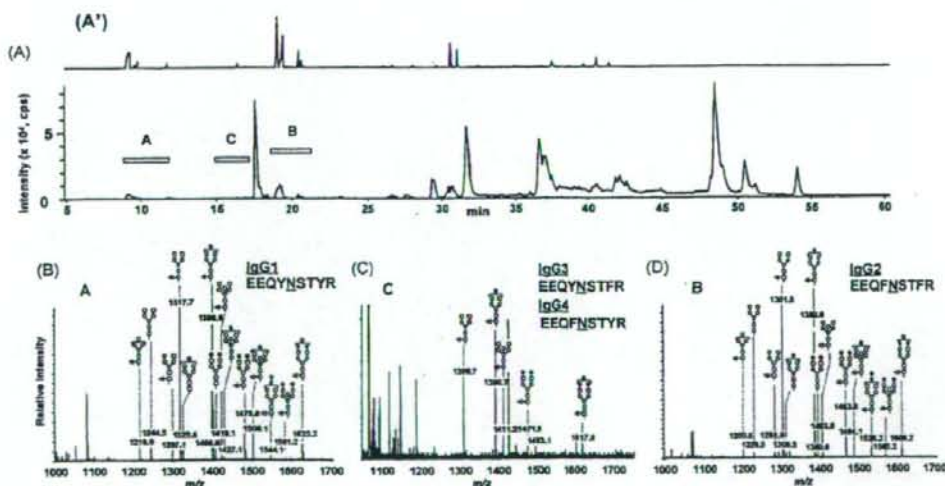


Fig. 5. Peptide map of commercially available human polyclonal IgG. (A) TIC (m/z 1000–2000) obtained by LC/MS/MS of trypsin-digested IgG. (A') EIC (m/z 204.05–204.15) obtained by data-dependent MS/MS. (B) Mass spectrum of peak A, which was assigned as glycopeptides of EEQYNSTYR of IgG1 (P01857). (C) Mass spectrum of peak C, which would be glycopeptides of EEQYNSTFR of IgG3 (CAA67886) and/or EEQFNSTYR of IgG4 (P01861). (D) Mass spectrum of peak B, which was assigned as glycopeptides of EEQFNSTFR of IgG2 (P01859).

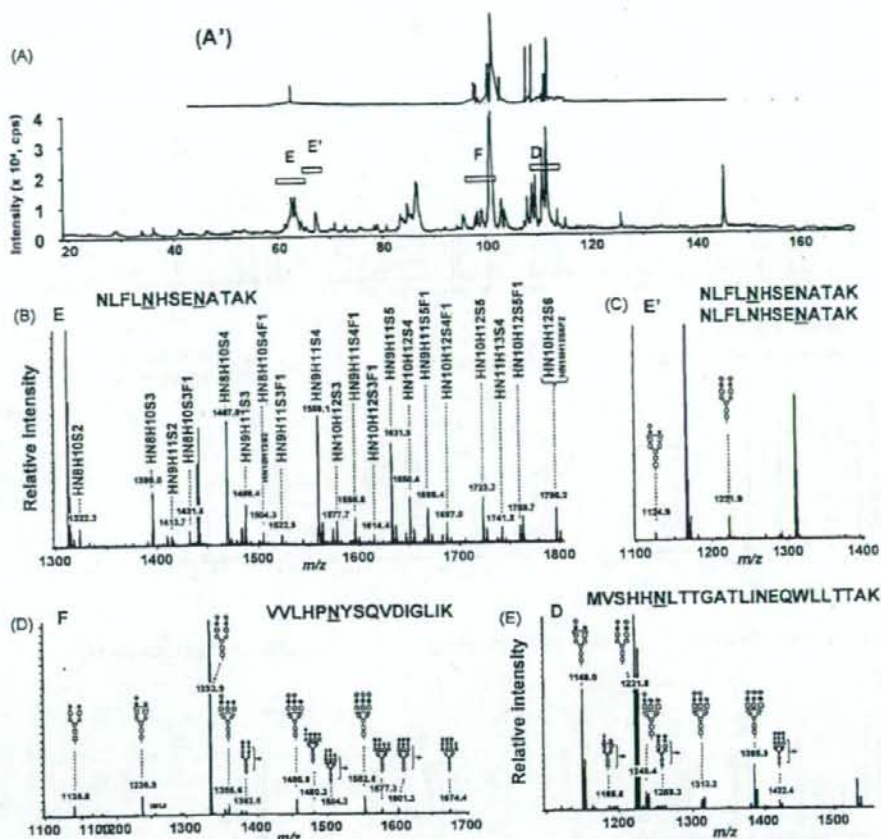


Fig. 6. Peptide map of commercially available human haptoglobin. (A) TIC (m/z 1000–2000) obtained by LC/MS/MS of trypsin-digested haptoglobin. (A') EIC (m/z 204.05–204.15) obtained by data-dependent MS/MS. (B) Mass spectrum of peak E, which was assigned as glycopeptides of NLFLN²⁰⁷HSEN²¹¹ATAK attached to one N-glycan. (C) Mass spectrum of peak E', which was assigned as glycopeptides of NLFLN²⁰⁷HSEN²¹¹ATAK attached to two N-glycans. (D) Mass spectrum of peak F, which was identified as VVLHPN²⁴¹YSQVDIGLIK. (E) Mass spectrum of peak D, which was identified as MVSHHNL¹⁹¹TTGATLINEQWLLTTAK. H, hexose; HN, *N*-acetylhexosamine; S, *N*-acetylneuraminic acid; F, fucose.

integrated mass spectra during the periods eluting the glycopeptides with same peptide. In Fig. 7, we show integrated mass spectra of fraction A–K (Fig. 2C) as the mass spectrometric heterogeneity of glycosylation in IgG1 (Fig. 7A), IgG2 (Fig. 7B), IgG3/IgG4 (Fig. 7C), haptoglobin (Fig. 7D–F), transferrin (Fig. 7G and H) and ceruloplasmin (Fig. 7I–K). Centroid ion intensity (count/sec) of each glycopeptide at the most intense isotope distribution was used as relative peak intensity. The mass spectrometric heterogeneity of the Fc-glycosylation sites of IgG1 (Fig. 7A) and IgG2 (Fig. 7B) was consistent with those of the commercially available polyclonal IgG (Fig. 5B and D) and previous reports [29]. The glycosylation pattern of haptoglobin at each site was similar to that of the commercially available haptoglobin except that peak intensities of minor glycoforms were noise level (Figs. 6B–E and 7D–F). The glycosylation of transferrin (Fig. 7G and H) at each site was consistent with previous reports [29]. Three glycopeptides of the four expected ones derived from ceruloplasmin could be assigned on the chromatogram of the serum sample (Fig. 7I–K), and their glycosylation patterns were in agreement with those in our pre-

vious reports [28]. Table 1 summarized LC retention time, m/z and charge, relative peak intensities of assigned glycopeptides in LC/MS. No O-glycosylated peptides were detected in this study. It would be due to low amount of O-glycosylation in serum and huge sample complexity.

4. Discussion

Alteration of glycans in several serum glycoproteins is a potential marker for several diseases. Several glycomic approaches to the diagnosis using mass spectrometric techniques have been proposed. The most common procedure involves analyzing the liberated glycans by MALDI-TOF MS or LC/ESI-MS, but this method provides no information on the glycosylation sites or protein sources. Another approach involves mass spectrometric analysis of glycopeptides resulting from proteolytic digestion. The enrichment of glycopeptides is useful due to their low ionization efficiency, but loss of glycopeptides cannot be avoidable. In the present study, we performed LC/MS(MS) with high resolution separation to obtain

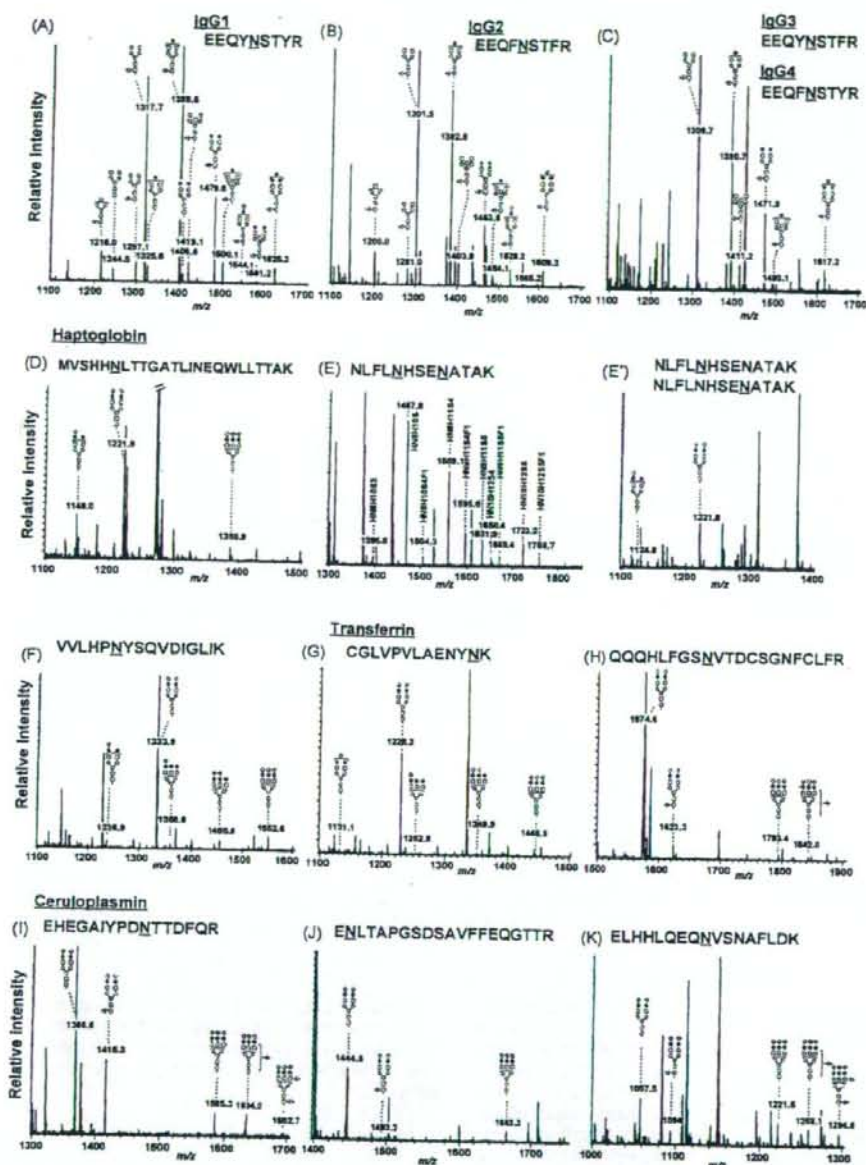


Fig. 7. Mass spectrometric heterogeneity of glycosylation in abundant serum glycoproteins. Integrated mass spectra obtained by the additional LC/MS of human serum digest. (A) IgG1; (B) IgG2; (C) IgG3/IgG4; (D–F) haptoglobin ((D) diglycosylated; (E), monoglycosylated); (G and H) transferrin; (I–K) ceruloplasmin.

mass spectrometric glycosylation profiles at each glycosylation site of abundant glycoproteins in human serum.

MS/MS spectra are useful for detection and assignment of glycopeptide ions. Because MS/MS spectra of glycopeptide precursor ions have abundant carbohydrate B-ions, such as m/z 204 ([HexNAc+H]⁺), and 366 ([HexHexNAc+H]⁺), presence of these ions

is a useful indication of the selection of glycopeptide precursor ions. MS/MS spectra of glycopeptide also contain ions of peptide and peptide plus glycans and several b- and y-series fragment ions of peptide backbone when using Qq-TOF mass spectrometer. These allow us to differentiate the glycopeptide ions with different peptide backbone and further to deduce peptide containing

N-linked glycosylation sites by database search. When MS/MS spectra of the glycopeptides obtained in a data-dependent manner were poor for detection of peptide fragment ions, improvement of MS/MS spectra quality by integrating several similar MS/MS spectra into one spectrum was effective. Composition of attached glycan can be deduced from molecular weight of glycan. Utilizing the data of site-specific glycosylation analysis of commercial glycoproteins (IgG, haptoglobin and ceruloplasmin) allowed us assign the corresponding glycopeptides in complex LC/MS/MS chromatogram.

We preliminarily performed LC/MS/MS of serum tryptic digest to locate glycopeptides and assign by data-dependent MS/MS. Using LC retention time, accurate m/z and charge state of assigned glycopeptides, we successfully determined mass spectrometric heterogeneity of 23 glycosylation sites in 15 glycoproteins by LC/MS analyze using digest corresponding 0.3 μ l of serum. Although there have been many reports on the analysis of human serum digest to show the glycosylation sites of abundant serum glycoproteins [30–33], less has been reported on their glycosylation. Glycopeptides detected in this study were those derived from glycoproteins which are present at about 0.2–5 mg/ml in human serum, and only glycopeptides with higher ionization efficiency were detected. Thus, it was suggested that detection limit of our method without sample enrichment procedure would be >0.2 mg/ml. It was thought that sample complexity, ionization suppression of low abundant glycopeptides and necessity of high quality of MS/MS spectrum for database searching reduced sensitivity. In order to characterize more glycosylation sites, combination of glycopeptide enrichment and depletion of abundant serum proteins is needed.

Acknowledgements

This study was supported in part by a Grant-in-Aid from the Ministry of Health, Labor, and Welfare, a Grant-in-Aid from the Ministry of Education, Culture, Sports and Technology, and Core Research for the Evolutional Science and Technology Program (CREST), Japan Science and Technology Corp (JST).

References

- [1] A. Varki, *Glycobiology* 3 (1993) 97.
- [2] Z. Yang, W.S. Hancock, *J. Chromatogr. A* 1053 (2004) 79.
- [3] R.B. Parekh, R.A. Dwek, B.J. Sutton, D.L. Fernandes, A. Leung, D. Stanworth, T.W. Rademacher, T. Mizuuchi, T. Taniguchi, K. Matsuta, et al., *Nature* 316 (1985) 452.
- [4] L.A. Omtvedt, L. Royle, G. Husby, K. Sletten, C.M. Radcliffe, D.J. Harvey, R.A. Dwek, P.M. Rudd, *Arthr. Rheum* 54 (2006) 3433.
- [5] R. Dube, C.A. Rook, J. Steele, R. Brealey, R. Dwek, T. Rademacher, J. Lennard-Jones, *Gut* 31 (1990) 431.
- [6] H.H. Freeze, *Glycobiology* 11 (2001) 129R.
- [7] M. Ferens-Sieczkowska, K. Zwierz, A. Midro, I. Katnik-Prastowska, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* 50 (2002) 67.
- [8] S. Thompson, E. Dargatzis, G.A. Turner, *Cancer Lett.* 66 (1992) 43.
- [9] R. Saldova, L. Royle, C.M. Radcliffe, U.M. Abd Hamid, R. Evans, J.N. Arnold, R.E. Banks, R. Hutson, D.J. Harvey, R. Antrobus, S.M. Petrescu, R.A. Dwek, P.M. Rudd, *Glycobiology* 17 (2007) 1344.
- [10] Y. Otake, I. Fujimoto, F. Tanaka, T. Nakagawa, T. Ikeda, K.K. Menon, S. Hase, H. Wada, K. Ikenaka, *J. Biochem. (Tokyo)* 129 (2001) 537.
- [11] B. Kossowska, M. Ferens-Sieczkowska, R. Gancarz, E. Passowicz-Muszynska, R. Jankowska, *Clin. Chem. Lab. Med.* 43 (2005) 361.
- [12] G.A. Turner, *Adv. Exp. Med. Biol.* 376 (1995) 231.
- [13] N. Okuyama, Y. Ide, M. Nakano, T. Nakagawa, K. Yamanaka, K. Moriwaki, K. Murata, H. Ohigashi, S. Yokoyama, H. Eguchi, O. Ishikawa, T. Ito, M. Kato, A. Kasahara, S. Kawano, J. Gu, N. Taniguchi, E. Miyoshi, *Int. J. Cancer* 118 (2006) 2803.
- [14] M.A. Comunale, M. Lowman, R.E. Long, J. Krakover, R. Phillip, S. Seeholzer, A.A. Evans, H.W. Hann, T.M. Block, A.S. Mehta, *J. Proteome Res.* 5 (2006) 308.
- [15] J.E. Hansen, J. Iversen, A. Lihme, T.C. Bog-Hansen, *Cancer* 60 (1987) 1630.
- [16] R.R. Drake, E.E. Schwiegler, G. Malik, J. Diaz, T. Block, A. Mehta, O.J. Semmes, *Mol. Cell Proteomics* 5 (2006) 1957.
- [17] Y. Wada, M. Tajiri, S. Yoshida, *Anal. Chem.* 76 (2004) 6560.
- [18] M. Tajiri, S. Yoshida, Y. Wada, *Glycobiology* 15 (2005) 1332.
- [19] P. Hagglund, J. Bunkenborg, F. Elortza, O.N. Jensen, P. Roepstorff, *J. Proteome Res.* 3 (2004) 556.
- [20] J.F. Nemeth, G.P. Hochgesang Jr., L.J. Marnett, R.M. Caprioli, *Biochemistry* 40 (2001) 3108.
- [21] J.P. Hui, T.C. White, P. Thibault, *Glycobiology* 12 (2002) 837.
- [22] K. Hakansson, H.J. Cooper, M.R. Emmett, C.E. Costello, A.G. Marshall, C.L. Nilsson, *Anal. Chem.* 73 (2001) 4530.
- [23] O. Krokhin, W. Ens, K.G. Standing, J. Wilkins, H. Perreault, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 2020.
- [24] U.M. Demelbauer, M. Zehli, A. Plemati, G. Allmaier, A. Rizzi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 1575.
- [25] M. Wuhret, C.H. Hokke, A.M. Deelder, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 1741.
- [26] A. Harazono, N. Kawasaki, T. Kawanishi, T. Hayakawa, *Glycobiology* 15 (2005) 447.
- [27] S. Itoh, N. Kawasaki, A. Harazono, N. Hashii, Y. Matsushita, T. Kawanishi, T. Hayakawa, *J. Chromatogr. A* 1094 (2005) 105.
- [28] A. Harazono, N. Kawasaki, S. Itoh, N. Hashii, A. Ishii-Watabe, T. Kawanishi, T. Hayakawa, *Anal. Biochem.* 348 (2006) 259.
- [29] Y. Wada, P. Azadi, C.E. Costello, A. Dell, R.A. Dwek, H. Geyer, R. Geyer, K. Kakehi, N.G. Karlsson, K. Kato, N. Kawasaki, K.H. Khoo, S. Kim, A. Kondo, E. Lattova, Y. Mechref, E. Miyoshi, K. Nakamura, H. Narimatsu, M.V. Novotny, N.H. Packer, H. Perreault, J. Peter-Katalinic, G. Pohlentz, V.N. Reinhold, P.M. Rudd, A. Suzuki, N. Taniguchi, *Glycobiology* 17 (2007) 411.
- [30] J. Bunkenborg, B.J. Pilch, A.V. Podtelejnikov, J.R. Wisniewski, *Proteomics* 4 (2004) 454.
- [31] T. Liu, W.J. Qian, M.A. Grisenko, D.G. Camp 2nd, M.E. Monroe, R.J. Moore, R.D. Smith, *J. Proteome Res.* 4 (2005) 2070.
- [32] Y. Wang, S.L. Wu, W.S. Hancock, *Glycobiology* 16 (2006) 514.
- [33] P. Hagglund, R. Matthiesen, F. Elortza, P. Hojrup, P. Roepstorff, O.N. Jensen, J. Bunkenborg, *J. Proteome Res.* 6 (2007) 3021.

総説

抗体医薬の現状と展望

川西 徹

要約: 抗体医薬は今現在最も活発に開発が行われている医薬品群の一つである。その背景としては、(1)異種タンパク質としての抗原性の壁を乗り越えるキメラ抗体あるいはヒト化抗体、ヒト抗体製造技術の完成、(2)ゲノム創薬による医薬品開発の標的となる数多くの疾患関連遺伝子および疾患関連タンパク質の解明、の2点があげられる。現在上市されている抗体医薬のほとんどは構造的にはIgGサブクラスであり、薬効からは主に抗腫瘍薬と免疫調節薬に分類されるが、今後は機能的に必要なコンポーネントに小型化した抗体や、細胞表面の受容体等と結合し細胞内情報伝達を引き起こすアゴニスト抗体、あるいは分子標的薬のコンポーネントとしての利用等、抗体医薬の利用は拡大してゆくことが予想される。しかしながら、これら次世代抗体医薬の開発にあたっては、薬理作用の解析、あるいは安全性予測という面で種差の壁があり、化学合成医薬品で通常用いられる齧歯類動物を主体とした非臨床試験による評価には限界がある。したがって、ヒト初回投与前の安全性予測においては、適切なインビトロ試験系の構築、適切な動物を用いたインビボ試験、さらにはトランスジェニック動物や相同タンパク質等を利用した試験等を組み合わせた試験による解析が必要であり、薬理学者の智恵と経験が必要とされる。

1. はじめに

現在大学学部用の薬理学教科書を眺めてみると、タンパク質性高分子医薬品に関する記述は極めて限られたものであり、1000ページ弱の標準的教科書でみれば、占める割合は10ページにも満たないものがほとんどである。さらにその対象を抗体医薬に絞ると、抗腫瘍薬あるいは免疫調節薬の項の末尾に小さく扱われているだけで、多いものでも、あわせて2ページにも満た

ない。しかし眼を新薬開発の世界に転じると、今現在最も注目されている医薬品群の一つは抗体医薬であり、さらには従来の化学合成医薬品では治療が困難であった疾病治療の標準的治療薬の地位を確立しつつある抗体医薬も出現しており、近い将来、薬物治療の教科書の書き換えは必至の状況である。そこで、本稿では、このような抗体医薬開発ブームがおこった背景、代表的な抗体医薬を概説するとともに、今後現れることが予想される抗体医薬、さらには抗体医薬開発の今後の課題、および課題解決において薬理学の果たすべき役割について概説したい。

2. 今なぜ抗体医薬か?

21世紀初頭の現在、最も活発に開発が行われ、欧米を中心として新薬申請が活発な医薬品群の一つは抗体医薬である。振り返れば、抗体医薬開発ブームは1980年代に一度おこっている。その契機はKohler and Milsteinによるハイブリドーマを利用したモノクローナル抗体作製技術の確立にあった(1)。この技術によって、抗原に選択的に結合する抗体の効率的な生産が可能となり、癌治療への応用等が試みられた。しかしハイブリドーマモノクローナル抗体は、通常マウス由来の免疫グロブリンでありヒトに対しては異種タンパク質であるため抗原性が強く、ヒト体内で作られる中和抗体による作用の減弱、あるいはアナフィラキシーショックのため、医薬品としての利用は限定されたものとなった。

一方、現在の抗体医薬開発ブームは以下の2つを理由として生じたといえる。第一に組換えタンパク質作製技術、あるいはトランスジェニック動物作製技術等のバイオテクノロジーの飛躍的進歩により、キメラ抗体、ヒト化抗体等の遺伝子工学利用抗体の作製が可能

となったことである(2,3)。これらの技術によって、従来のモノクローナル抗体が異種タンパク質であるゆえに生じた問題を回避できるようになった。

抗体医薬開発ブームが起こった第二の理由は、ゲノム創薬の本格化があげられる。ゲノム創薬は、生体の遺伝子あるいはタンパク質の構造、機能情報をもとに、医薬品シーズを発見、設計する医薬品開発手法であるが、今現在は疾病関連遺伝子あるいは疾病関連タンパク質の発見/特定、さらには疾病に至るメカニズムの解明は相次いでいるものの、これらの情報をもとに疾病治療用医薬品を効率的にデザインする手法の完成にまでは至っていない。その点で、疾病関連タンパク質に選択的に結合する抗体を生体の免疫系を利用して作製し、選別することにより最適の医薬品シーズを発見する手法は、様々な疾患関連タンパク質に対して共通に応用できる技術である。また、現在抗体医薬の開発に多くの企業が注力している理由としては、このような抗体医薬の開発の成功率の高さがあげられ、実際米国において第I相臨床試験が実施されたもののうち上市に至った割合は低分子化合物では約5%であるのに対し、抗体医薬では約20%という報告もある(4)。

3. 遺伝子工学利用抗体の作製法

キメラ抗体とは遺伝子組換え技術を用いてマウスモノクローナル抗体の定常 constant (C) 領域をヒト抗体の C 領域に置き換えた抗体である。一方ヒト化抗体は抗体タンパク質の三次元構造をもとに、抗原に結合する相補性決定領域 complementarity determining region (CDR) の1から3を残して、それ以外の部分である抗体のフレーム領域 frame region (FR) を全てヒト抗体に置き換えたものである(図1)。以下に、マウスハイブリドーマ細胞から遺伝子組換え法によるキメラ抗体、ヒト化抗体の作製法を紹介する。

キメラ抗体作成の第一ステップは、マウス抗体産生ハイブリドーマからのマウス抗体をコードする遺伝子のクローニングである。通常ハイブリドーマ細胞より RNA を抽出し、cDNA を作製後、ブラクハイブリダイゼーション法あるいは PCR 法により抗体遺伝子をクローニングする方法、あるいは RNA より直接 PCR 法により抗体遺伝子をクローニングする方法が用いられている。次にクローニングしたマウス抗体の可変 (V) 領域遺伝子にヒトの C 領域遺伝子を連結し、適当な発現ベクターに挿入して培養細胞で生産する。また、抗体産生ハイブリドーマのマウス抗体 C 領域をヒト抗体 C 領域に組み換える相同組換え法やトランスジェニックマウスによっても作成される。

ヒト化抗体遺伝子の作製はさらに複雑なステップである。第一ステップではクローニングしたマウス抗体 V 領域における抗原との結合に寄与する CDR 配列とヒト抗体 V 領域におけるアイソタイプ固有のアミノ酸配列をもつフレームワーク領域 (FR) から成る V 領域をコードする遺伝子を構築する。これにヒトの C 領域遺伝子を連結し、構築された抗体 heavy (H) 鎖および light (L) 鎖遺伝子が挿入された発現ベクターを製造用動物細胞に導入し、遺伝子組換え抗体を発現する。製造細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣由来の CHO 細胞、マウスミエローマ由来の NS0 細胞および SP2/0 細胞等が用いられることが多い(5)。

このようにヒト化抗体は高度な遺伝子組換え技術を利用して製造されるが、CDR 配列部分はマウス由来である。そこですべてヒト由来の完全ヒト抗体の作成法が開発された。主な方法としては2種類あり、一つはファージディスプレイ法、一つはヒト抗体作製用トランスジェニックマウス法である。前者のファージディスプレイ法は大腸菌ウイルスの一つである M13 や T7 などの繊維状ファージのコートタンパク質 (gp3p

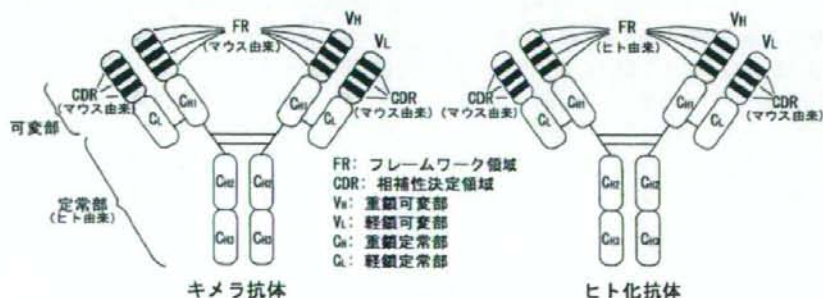


図1 キメラ抗体およびヒト化抗体の構造

表1 日米欧における既承認抗体医薬一覽¹⁾

名称	商品名	種類	標的	主な適応疾患	承認をうけた年度			抗体生成頻度 ²⁾
					米国	欧州	日本	
抗腫瘍薬								
Rituximab	Rituxan, MabThera	キメラ抗 IgG1κ	CD20	B細胞性非ホジキンリンパ腫	1997	1998	2001	<1%
Trastuzumab	Herceptin	ヒト化抗体 IgG1κ	HER2	転移性乳がん	1998	2000	2001	0.1%
Denileukin Diftitox	Ontak	融合タンパク質 IL2 + Diphtheria toxin	IL2R	皮膚T細胞リンパ腫	1999	NA ³⁾	NA	8%
Gemtuzumab ozogamicin	Myotarg	ヒト化抗体 IgG4κ (カリケアマイシン結合)	CD33	急性骨髄性白血病	2000	NA	2005	<2%
Alenzumab	Camphar, MabCampath	ヒト化抗体 IgGακ	CD52	B細胞性慢性リンパ性白血病	2001	2001	NA	
Ibrutinomab Iuxetan	Zevalin	マウス抗体 IgG1κ (60Y 標識)	CD20	B細胞性非ホジキンリンパ腫	2002	2004	NANA	
Iodine 131 Tositumomab	Bexxar	マウス抗体 IgG2aλ (I ¹³¹ 標識)	CD20	非ホジキンリンパ腫	2003	NA	NA	
Cetuximab	Erlotinib	キメラ抗体 IgG1κ	EGFR	頭頸部癌, 結腸・直腸癌	2004	2004	NA	5%
Bevacizumab	Avastin	ヒト化抗体 IgG1	VEGF	結腸・直腸癌	2004	2005	2007	ND
Panitumumab	Vectibix	ヒト化抗体 IgG2κ	EGFR	結腸・直腸癌	2006	NA	NA	
免疫調節薬								
Muromonab-CD3	Orthoclone OKT3	マウス抗体 IgG2a	CD3	腎移植後の急性拒絶反応	1986	NA	1991	-80%
Daclizumab	Zenapax	ヒト化抗体 IgG1κ	CD25	腎移植後の急性拒絶反応	1997	1999	NA	
Basiliximab	Simulect	キメラ抗体 IgG1κ	CD25	腎移植後の急性拒絶反応	1998	1998	2002	<2%
Infliximab	Remicade	キメラ抗体 IgG1κ	TNFα	関節リウマチ	1998	1999	2002	10-57%
Etanercept	Enbrel	融合タンパク質 TNFαR + Fc	TNFα	関節リウマチ関節リウマチ	1998	2000	2005	
Adalimumab	Humira	ヒト抗体 IgG1κ	TNFα	関節リウマチ	1998	2002	2003	NA
Etalizumab	Rapiva	ヒト化抗体 IgG1κ	CD11	尋常性乾癬	2003	2004	NA	NA
Oralizumab	Xolair	ヒト化抗体 IgG1κ	IgE	喘息	2003	2003	2005	NA
Alefacept	Amevive	融合タンパク質 LFA3 + Fc	CD2	尋常性乾癬	2003	NA	NA	
Natalizumab	Tysabri	ヒト化抗体 IgG4κ	α4integrin	多発性硬化症	2004	2006	NA	
Abatacept	Orencia	融合タンパク質 CTLA4 + Fc	CD80/CD86	関節リウマチ	2005	NA	NA	
Toclizumab	Actemra	ヒト化抗体 IgG1κ	IL6R	キヤプスルマン病	NA	NA	2005	
Eculizumab	Soliris	ヒト化抗体 IgG2/4κ	CSa	発作性夜間血色素尿症	2007	2007	NA	
その他								
Abciximab	ReoPro	キメラ抗体 IgG1 (Fab)	GP1Ib/IIla	心筋虚血	1994	NA	NA	7-19%
Palivizumab	Synagis	ヒト化抗体 IgG1κ	RSVFPprotein	RSウイルス感染	1998	1999	2002	<1%
Ranibizumab	Lucentis	ヒト化抗体 IgG1κ (48K フラグメント)	VEGF-A	加齢黄斑変性	2006	2007	NA	

1) 文献9より改定, 2) 文献10中の値, 3) NA: 未承認

や g10p など) の N 末端側にファージの感染性を失わないよう外来遺伝子を融合タンパク質として発現させるシステムである。一度に 10^8 種類以上ともいわれる多種類の分子種を呈示したライブラリーを構築でき、また粒子ごとに目的の機能や性質をもった分子種を選択できる。この技術を用いて外来遺伝子として抗体の結合部位である 2 つのポリペプチド鎖 V_H と V_L を短いリンカーで直列につないだ単鎖 Fv single-chain Fv (scFv) をファージにディスプレイさせたものが抗体ファージライブラリーである。そしてファージライブラリーから特異的抗体ファージをスクリーニングする。これを最終的にファージから切り離したものがファージディスプレイ抗体である (6, 7)。

完全ヒトモノクローナル抗体取得のもう一つの方法は、ヒト抗体を産生するトランスジェニック動物の利用である。内因性 Ig をノックアウトしたマウスに機能的なヒトの Ig 遺伝子を導入すれば、マウス抗体の代わりに多様な抗原結合能を持つヒト抗体が産生されると考えられる。さらにこのマウスを免疫すればヒトモノクローナル抗体を従来のハイブリドーマ法で得ることが可能である。既に KM マウス、KW マウス、HAC マウス等のヒト抗体産生用マウスが開発され、完全ヒト抗体の製造に利用されている (8)。

4. 遺伝子工学利用抗体医薬の利点

2. においてキメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体の利点として、異種タンパク質ゆえの抗原性の克服について言及したが、表 1 に日米欧で認可をうけている抗体医薬に対するヒトでの抗体の検出頻度を記した。この数字から明らかなように、ハイブリドーマ抗体医薬では、極めて高い頻度の抗体医薬に対する抗体の出現が報告されている。一方、キメラ抗体においてはフレームワークを含む可変領域が抗原性を残しているため、抗体によって高い抗体生成が報告されている製品はあるものの、ハイブリドーマ抗体に比べれば全般的に抗体生成頻度は低い。ヒト化抗体は、理論的には抗原性を示す部位はマウス由来の CDR 配列のみであり、比較的低い数字が報告されている (10)。

このような中和抗体の生成とも関連することであるが、ハイブリドーマ抗体については、ヒト抗体と比較してヒト血中半減期が極めて短いことが指摘されてきた (ヒト抗体: 23 日、ハイブリドーマ抗体: 1-3 日)。また、組換えキメラ抗体、ヒト化抗体においては、ハイブリドーマ抗体に比べると、一般に血中半減期が長いことが報告されている。このメカニズムが最近になって明らかになってきた。即ち、母親から胎児に液性

免疫を伝える機構を担う IgG 胎児性 Fc 受容体 (FcRn) は、成長後も免疫グロブリンの体内循環を担うことにより血中半減期の延長に役だっていること、さらには疾病治療用抗体医薬の血中半減期の改善に、IgG の Fc 領域と FcRn との相互作用が利用できることが明らかにされている (11, 12)。

5. 既に上市されている主な抗体医薬

現在までに日米欧で認可された抗体医薬を表 1 にまとめた。対象疾患は様々であるが、大別すると主に抗腫瘍薬、および免疫調節薬に分類される。抗腫瘍薬としてはリツキシマブ、トラスツズマブ、ゲムツズマブ、オゾガマイシン、ベバシズマブ等は、現在標準的治療に使用される医薬品としての評価を得るまでになっている。また免疫調節薬のなかで、インフリキシマブはメトトレキセートの併用薬として関節リウマチの治療に使用されることが多い。さらにヒト型遺伝子組換え可溶性 TNF α 受容体-Fc 融合タンパク質のエタネルセプトは、IgG ではなく抗体の Fc 領域を利用した人工タンパク質であるが、メトトレキセートとの併用の必要のない関節リウマチ治療薬である。加えて日本発であるヒト化抗 IL-6 受容体抗体トシリズマブ (中外製薬と大阪大学の共同開発) は、キャスルマン病治療薬として認可されたが、関節リウマチへの適用拡大を目指した試験で好成績を得たとされている。

このように、多くの抗体医薬が疾病治療に有効であることが示され、新薬として脚光をあびている。

6. 今後開発が予想される次世代抗体医薬

以上のように、抗体医薬は欧米を中心に既に数多くの製品が承認されているが、既承認抗体医薬は融合タンパク質型以外の製品では、いずれも構造的には IgG のサブクラスに属し、機能的にも構造的にも分離可能な 2 つのモジュール: 1) 抗体認識部位である V 領域: 2) 抗体が抗原に結合した後の CDC (Complement Dependent Cytotoxicity 補体依存性細胞障害: 抗体が細胞膜表面上の抗原決定基に特異的に結合して、補体の介助のもとで、その細胞に傷害を与えること) 活性あるいは ADCC (Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity 抗体依存性細胞傷害: IgG クラス抗体の Fc 領域が T 細胞、NK 細胞、好中球、マクロファージ上の Fc 受容体を介して、これらエフェクター細胞を活性化し、抗体の可変領域が結合した細胞を殺すこと) 活性等の反応を惹起するエフェクター機能を担う Fc 領域から構成されている。しかしこのような IgG 抗体医薬の分子量は 10 万をこえる巨大分子であるた

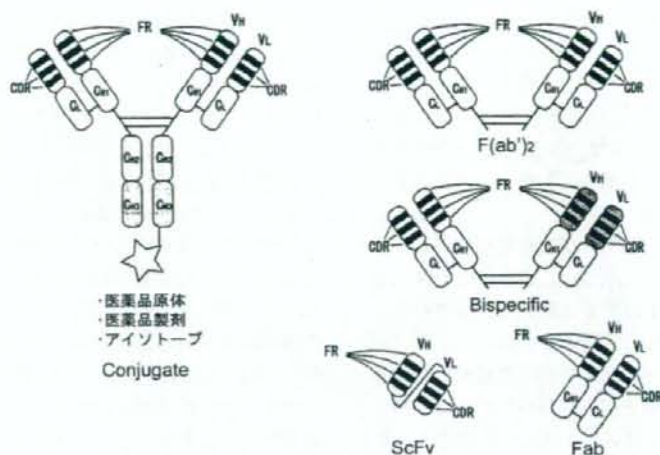


図2 今後出現すると思われる次世代抗体医薬
(文献13より改変)

め、血中から組織への移行はきわめて遅い。その解決策としてファージディスプレイなどの方法を用いたScFvタイプ、あるいはFabタイプ、F(ab')₂タイプ等、サイズを小さくし、生体内移行性を増大する抗体医薬の検討が行われている(図2)。さらには、異なる抗原特異性を有する抗体に由来するFabフラグメントをつなぎ、2つの特異性 bispecific を有する F(ab')₂ タイプの医薬品としての利用も試みられている。一方このような低分子抗体は、既存の化学合成医薬品原体、あるいは医薬品製剤に結合させることにより、これら医薬品に標的性を付与させることが可能となるので、今後分子標的薬開発のコンポーネントとしての利用も活発化することが予想される。

以上のような抗体のアミノ酸配列部分の改変以外に、糖鎖改変抗体の作製も試みられている。既承認の抗体医薬のほとんどはIgG型であり、Fc部分のCH2領域にアスパラギン結合型のコンプレックス型糖鎖を持つ糖タンパク質である。抗体の糖鎖は共通のコア部分に、修飾が異なる30種類以上のオリゴ糖の末端がついた混合物であるが、この糖鎖の付け根に付いているフコースがなくなるとADCC活性が動物レベルで100倍上昇する。したがって、抗体のFc領域に結合している糖鎖からフコース残基を除去すると、高いADCC活性が誘導される(14, 15)。

以上のような、構造的に新しいタイプの抗体医薬とともに、作用機構の上でも新しいタイプの抗体医薬の創製が活発化するものと考えられる。即ち、従来の抗

体医薬の多くは疾病関連タンパク質への親和性を利用し、(1)これらタンパク質を中和、(2)酵素や受容体等の反応をブロック、(3)細胞膜の標的タンパク質に結合しFc領域のエフェクター機能による細胞傷害等によって薬理作用を発現する。しかし次世代の抗体医薬としては、細胞表面受容体等(例えばトロンビン受容体、エリスロポエチン受容体、成長ホルモン受容体、FAS、CD20、CD28)に結合し、アゴニストとして細胞内情報伝達を引き起こすことを目指したアゴニスト抗体の開発も精力的に行われている。

7. 次世代抗体医薬の薬理作用の解析および安全性評価

以上のように、抗体医薬開発は広汎かつ活発に行われているが、昨年3月このような抗体医薬の安全性評価法の信頼を揺るがす臨床試験事故が起こった。問題となった医薬品候補化合物はTリン球表面のCD28に結合するヒト化モノクローナル抗体TGN1412で、ドイツのTeGenero社によって開発されていた抗CD28アゴニスト抗体(スーパーアゴニスト)であった。従来のモノクローナル抗体では、単独でT細胞を活性化できないが、このスーパーアゴニストは結合部位の違いから単独でT細胞を活性化させ、T細胞の増殖およびサイトカイン産生を誘導することができるとされ、B細胞慢性リンパ球白血病等の血液系の悪性腫瘍や関節リウマチ等の慢性炎症性疾患の治療薬として開発が進められていた(16, 17)。初回臨床試験は0.1

mg/kg の静脈投与で実施されたが、被験者6名全員に重度のサイトカイン放出症候群が生じ、多臓器不全に陥った。症状は極めて重篤であったものの、救命処置により幸い死亡には至らなかった(18)。この事故が臨床試験の専門家を混乱に陥れたのは、この薬は欧州規制当局 EMEA によりオーファン薬として指定をうけ、治験申請についても当然のことながら規制当局からの承認をうけていたことである。

事故の原因分析は、英国および欧州規制当局によって詳細に実施されている(19, 20)。まずこの治験に使われたロットについての品質面の詳細な分析の結果、不純物等の品質の問題による事故でないことが明らかにされた。そこで、検討はヒト初回投与試験における投与方法と用量の妥当性を中心に行われた。まず投与方法についてであるが、カニクイザルでの実験が1時間をかけた点滴注射で行われたのに対して、ヒト初回投与試験では短時間(1-5分)の静注を行った点は、サイトカイン放出症候群を招いた原因として充分考えられるポイントである。一方初回臨床試験の投与用量であるが、カニクイザルでの28日間反復投与試験結果で、5 mg/kg および 50 mg/kg 投与によりリンパ球の活性化、それを反映した IL-5、IL-6 の上昇がみられたものの、これらの作用は薬理作用と考え、それ以外には特段の有害作用はみられなかったと判断、無毒性量 NOAEL を 50 mg/kg とし、この数字をもとに安全率を 500 倍とって決定したものであり(21)、従来の評価法の基準からすると必ずしも間違いとはいえない。しかし、英国 National Institute of Biological Standards and Control (NIBSC) の報告では、TGN1412 の作用のインビトロ検出系を新たに構築、その解析結果によると、カニクイザルのリンパ球では TGN1412 による細胞増殖やサイトカイン産生は検出されないが、ヒトリンパ球ではどちらも検出できアゴニスト作用が確認できること、しかもその濃度作用曲線はベル型を示し、至適濃度は 2-10 $\mu\text{g/ml}$ であることを見だしている(22)。この結果は、カニクイザルの実験ではヒトの作用の予測が困難な場合があることを示している。

バイオテクノロジー応用タンパク質性医薬品の安全性評価については、(1)従来の医薬品のほとんどは物質的にも天然のヒトタンパク質に限りなく近いことを目標に設計されている、(2)したがって生理的条件と同様な暴露条件なら、作用は予測可能である、(3)齧歯類動物を中心とした非臨床試験は、種差の壁により薬理作用および毒性の解析は困難な場合が少なくない、(4)試験動物にとって被験物質は異種タンパク質であり、中和抗体の生成等によって正確な作用プロファイ

ルの解析は困難である。したがって、これら医薬品の非臨床安全性試験ガイドライン(23)では、動物を用いる非臨床試験の有用性は化学合成医薬品の場合に比べて限られるとされ、また、ヒト型標的タンパク質を発現させたトランスジェニック動物、あるいは相同タンパク質による検討を推奨している。このガイドラインが運用され、既に7年が経過しているが、トランスジェニック動物あるいは相同タンパク質は、未だ推奨の段階に終わっているのが実状である。一方、アゴニスト抗体は天然の生理活性物質とは異なる薬理作用を示すことが期待されて作製されるタンパク質であり、生物学的な実験なしに作用の予測は困難である。また低分子抗体はヒト抗体と同様の特異性を有しているとしても、ヒト抗体では分布しえない体内部位に分布し作用する。したがって、今後これらの新しいタイプの抗体医薬をヒトに投与するにあたっての作用の解析は、適切なインビトロ系の構築、適切な種の動物を用いたインビボ解析、さらに可能な場合は相同タンパク質あるいはトランスジェニック動物等の利用によって、作用機構の解析、濃度作用相関あるいは用量作用相関の解析を行うことが必要である。EU ではすでに、これらハイリスク薬のヒト初回臨床試験において考慮すべき要件をまとめたガイドラインを作成しており、投与量を決定する場合は、最小子測生物学的影響量 Minimal Anticipate Biological Effect Level (MABEL) に基づくこと等の推奨を盛り込んでいる(24)。

8. おわりに

抗体医薬の開発は活発に行われており、近い将来薬理学の教科書にも大幅に取り入れる必要が生じるであろう。さらに今後構造面からも作用機構からも新しいタイプの抗体医薬開発が活発化することが予想される。このような次世代抗体医薬の開発においては薬理作用の解析、および安全性予測のためには、インビボ、インビトロ実験系を駆使した薬理作用の解析が重要であり、その解析には薬理学者の智恵と経験が必要とされる。

謝辞：本総説に関わる研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業に対する助成金によるものである。ここに謝意を表す。

文 献

- 1) Kohler G, et al. *Nature*.1975;256:495-497.
- 2) Morrison SL, et al. Chimeric immunoglobulin genes: Immunoglobulin genes. Academic Press;1989.p.260-278.
- 3) Roguska MA, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;9:969-973.
- 4) Chapman K, et al. *Nature Rev*. 2007;6:120-126.
- 5) Chu L, et al. *Curr Opin Biotechnol*. 2001;12:180-187.
- 6) Winter G, et al. *Ann Rev Immunol*. 1994;12:433-455.
- 7) Burton DR, et al. *Adv Immunol*. 1994;57:191-280.
- 8) 石田 功. *実験医学*. 2002;20:846-851.
- 9) 山口照英, 他. 谷本学校毒性質問箱. 2007;10. (印刷中)
- 10) Koren E, et al. *Curr Pharm Biotechnol*. 2002;3:349-360.
- 11) Lobo ED, et al. *J Pharm Sci*. 2004;93:2645-2668.
- 12) Roopenian DC, et al. *Nature Rev*. 2007;7:715-725.
- 13) VanDijk MA, et al. *Monoclonal Antibody-Based Pharmaceuticals: Pharmaceutical Biotechnology 2nd Ed*. Taylor & Francis;2002. p.283-299.
- 14) Shinkawa T, et al. *J Biol Chem*. 2002;278:3466-3473.
- 15) Shields RL, et al. *J Biol Chem*. 2002;277:26733-26740.
- 16) Beyersdorf N, et al. *Ann Rheum Dis*. 2005;64 Suppl 4 : iv91-95.
- 17) Margulies DH. *J Exp Med*. 2003;197:949-953.
- 18) Suntharalingam G, et al. *N Engl J Med*. 2006;355:1018-1028.
- 19) Early stage clinical trial taskforce; Joint ABPI/BIA report. [cited; Available from: http://www.abpi.org.uk/information/pdfs/BIAABPI_taskforce2.pdf]
- 20) Expert group on phase one clinical trials: Final report. [cited; Available from: http://www.dh.gov.uk/en/Publicationsandstatistics/Publications/PublicationsPolicyAndGuidance/DH_063117]
- 21) Kenter MJ, et al. *Lancet*. 2006;368:1387-1391.
- 22) Stebbings R, et al. *J Immunol*. 2007;179:3325-3331.
- 23) バイオテックノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価. [cited; Available from: http://www.pmda.go.jp/fich/s/s6_00_2_22.pdf]
- 24) Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human clinical trials with investigational medicinal products. [cited; Available from: <http://www.emca.europa.eu/pdfs/human/swp/2836707enfin.pdf>]

著者プロフィール

川西 徹 (かわにし とおる)

国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 部長, 博士 (薬学). ◇1977年東京大学大学院薬学系研究科修士課程修了, 同年国立衛生試験所 (現国立医薬品食品衛生研究所) 安全性生物試験研究センター薬理部研究員 (この間, カリフォルニア大学パークレー校, ノースカロライナ大学チャペルヒル校で博士研究員), 同安全性生物試験研究センター病理部室長, 同生物薬品部室長, 同生物薬品部長を経て2006年4月より現職. ◇専門領域: 医薬品評価科学 (一般薬理, 薬物代謝, 化学物質リスクアセスメント, 細胞毒性評価法開発, 顕微鏡画像解析法開発, 細胞内生化学現象の可視化技術開発, 生物薬品特性解析法開発, 製剤評価法開発)

特集

川崎病—第32回近畿川崎病研究会—

<特別講演2>

小児における抗サイトカイン薬の功罪

Kawanishi Toru

川西 徹*

*国立医薬品食品衛生研究所薬品部

●●●
はじめに

21世紀初頭の現在、最も活発な開発が行われている医薬品群の1つは抗体医薬である¹⁾。実際、最近日米欧で承認された新規生物製剤の中で、抗体医薬の割合は高い。

歴史を紐解くと、1980年代初頭に第一次抗体医薬ブームがあった。これはMilsteinらによるモノクローナル抗体作製技術の確立²⁾を契機としたものである。しかし、マウスハイブリドーマ抗体はヒトにとって異種蛋白質であるために様々な問題が起き、普及には至らなかった。ところが近年、遺伝子組み換え技術が発達し、マウス由来の相補性決定領域(complementarity-determining region; CDR)を含むFab領域以外をヒト由来IgGに置き換えたキメラ抗体の作製技術が確立された。さらに、CDR以外をすべてヒト型に置き換えたヒト化抗体、完全ヒト抗体、標的部位に親和性をもつ蛋白質にIgGのFc領域を結合させた人工融合蛋白質までもが作製可能となった(図1)。こうしてハイブリドーマ抗体時代に異種蛋白質ゆえに生じた問題が回避されるようになった。

抗体医薬開発ブームのもう1つの理由としては、医薬品開発技術の現状がある。すなわち、いま現在はゲノム創薬関連技術の進歩によって疾患関連蛋白質などは多く発見されているものの、これらを作用部位とする疾病治療用医薬品を効率的にデザインする手法の完成までには至っていない。一方、生体の免疫系を利用して、標的蛋白質に対する種々の抗体を作製、その中から適切な薬理作用を示す抗体をスクリーニング系で

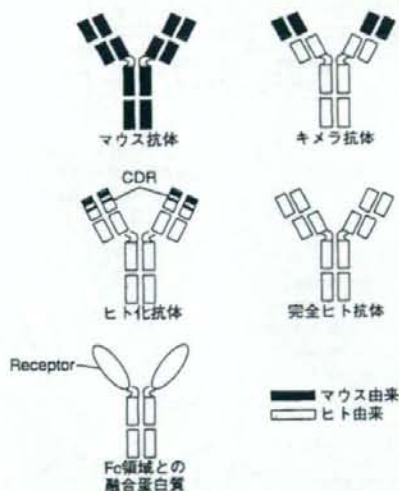


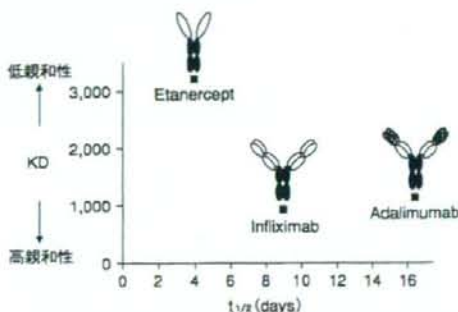
図1 遺伝子工学応用モノクローナル抗体の分類
CDR: complementarity-determining region.

選別する方法は、医薬品シーズとしての特異的リガンドの作製方法として優れている。

最近、臨床試験を開始した抗体医薬ではハイブリドーマ抗体はほとんどなく、キメラ抗体やヒト化抗体が増加し、さらにヒト蛋白、ヒト化免疫グロブリンに移行する傾向にある(図2)³⁾。

日米欧で承認された抗体医薬、融合蛋白質医薬品を比較すると、日本で認可されていないものも多い。適応疾患としては関節リウマチを含めた免疫系が関係する疾患、および癌が多い。

FcRnとの親和性
Etanercept < Infliximab, Adalimumab



	Ka1 (1/Ms)	Kd1 (1/s)	KD=Kd1/Ka1 (nM)
Etanercept	4.34E+04	0.139	3,200
Infliximab	1.98E+05	0.183	924
Adalimumab	1.92E+05	0.217	1,130

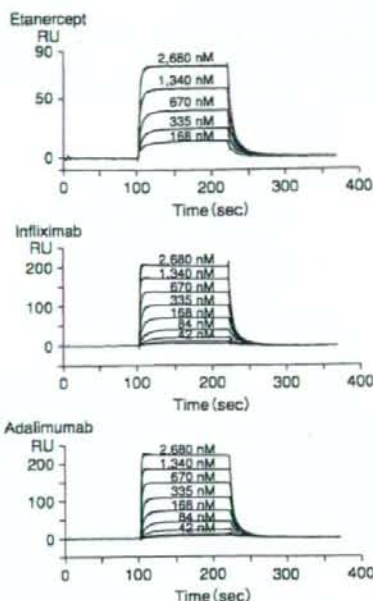


図3 FcRnと各種抗体医薬品の結合親和性

FcとFcRnの結合親和性は、Fc部分以外の構造にも影響を受ける。
ヒトでの血中半減期(t_{1/2})の値は、文献5に基づく。

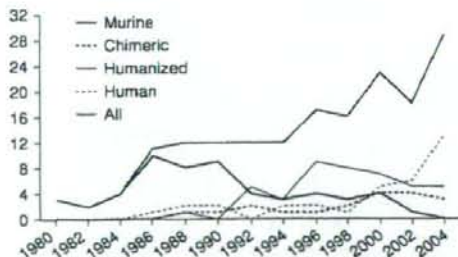


図2 臨床治験に入った治療用抗体の数
(文献3より引用)

これら抗体医薬に対する抗体出現頻度においては、明らかにハイブリドタイプでは高頻度に抗体が出現し、キメラ抗体では少ない傾向にある⁴⁾。

また、ハイブリドタイプは血中濃度半減期が短く、キメラ抗体、ヒト化抗体は長い傾向にある。これには2つの要因が考えられる。第一は異種蛋白質に対する抗原抗体反応による生体からの除去、第二は血管内皮細胞にある胎児性Fc receptor (FcRn)が抗体のFc部分と結合し、体内で抗体をリサイクルさせるシステ

ムの存在である。ヒトFcRnはヒト抗体と結合性が高く、抗体の血中濃度維持に大きな役割をもつとされている^{5,6)}。

われわれは、FcRnとエタネルセプト(ヒト融合蛋白質)、インフリキシマブ(キメラ抗体)、アダリムマブ(ヒト抗体)の結合親和性を測定した(図3)。血中半減期が比較的短いエタネルセプトは結合親和性が低い。一方、血中半減期の長いアダリムマブは結合親和性が高い。インフリキシマブの血中半減期は比較的短い。FcRnとの結合親和性は高いことが明らかとなった。血中半減期が短い原因は、インフリキシマブがキメラ抗体(=異種蛋白質)であるためと思われる。

●●● ●抗サイトカイン抗体

いま現在わが国で認可されている抗体医薬の中で川崎病治療薬としての適用が考えられるものは、TNF-α (TNF)抗体とIL-6受容体抗体であろう。

1. TNF抗体

TNFは、主として活性化マクロファージから放出され、細胞膜上のTNF受容体と結合することで細胞の増

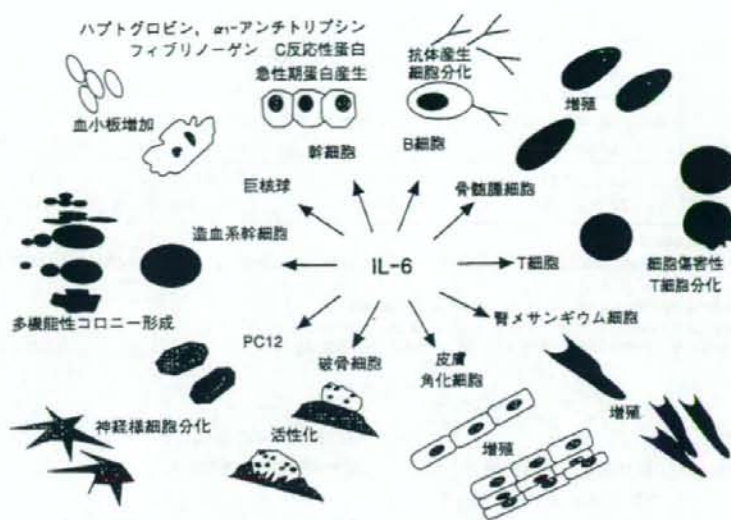


図4 インターロイキン6の生理作用

(文献7より引用)

殖、分化、アポトーシスといった一連の作用を現すサイトカインである。

生体にとってTNFは感染防御、抗腫瘍効果を有し、生体防御機構に必要な不可欠な内在性物質であるが、TNFの過剰発現により関節リウマチ、自己免疫疾患の発症・病態悪化が引き起こされる。また、これらの疾患患者では血中や体内局所のTNF濃度が高いことが報告されている。この過剰なTNFをTNF抗体などの阻害薬で中和することが、薬効の原理となる。

一方、TNF阻害薬により免疫力が低下し、感染症や発癌率が増加するなど、有害作用として、TNF受容体が関与する病気を招来することもある。

現在のところ、わが国で臨床応用されているTNF抗体類には、インフリキシマブ(キメラ型TNF抗体)、エタネルセプト(可溶性TNF受容体キメラ)、アダリムマブ(ヒトTNF抗体)がある。

1) インフリキシマブ

インフリキシマブはクローン病を適応としたオーファンドラッグとして認可された後、関節リウマチ(RA)、ベーチェット病による難治性網膜ぶどう膜炎に適応拡大されている。

投与方法は、通常1kg当たり3mg(RA)、5mgを点滴静注する。初回投与後、2週、6週間に投与し、以降8週間間隔で投与する。RAではメトトレキサート製剤と併用される。

2) アダリムマブ

アダリムマブはヒトTNF抗体で、RAを適応症として認可されている。通常、成人に40mgを2週間に1回皮下注射する。80mgまでの増量が可能である。

3) エタネルセプト

エタネルセプトは可溶性TNF受容体にIgGのFc領域を結合させたキメラ蛋白質で、RAを適応症として認可されている。成人に10~25mgを1日1回、週に2回皮下注射を行う。アダリムマブに比較して、投与頻度が多いのは、エタネルセプトの血中半減期が短いことによると考えられる。

2. インターロイキン6 (IL-6) 受容体抗体

IL-6は大阪大学で発見、受容体の同定、研究がなされたサイトカインで、様々な細胞に作用し、免疫系を調節する(図4)7)。IL-6もRA、多発性骨髄腫、キャスルマン病、クローン病、全身性若年性エリテマトーデスなどが関連疾患として挙げられ、川崎病でもIL-6が上昇しているとする報告があり、今後IL-6の調節を行うという治療戦略が試みられると思われる。当初、TNF抗体と同様に、IL-6中和抗体が上記疾患の治療薬として検討されたが成功せず、可溶性、膜結合性IL-6受容体両方に親和性をもち、これら受容体へのIL-6の結合を阻害するIL-6受容体抗体を治療薬に用いることで、疾病治療が可能となった。

表1 抗TNF抗体薬による悪性腫瘍および感染症の増強

Adverse event	Odds ratio (95% confidence interval)*			
	All doses of anti-TNF antibody therapy vs placebo	Low-dose anti-TNF antibody therapy vs placebo ¹	High-dose anti-TNF antibody therapy vs placebo ²	High-dose ² vs low-dose ¹ anti-TNF antibody therapy
≥1 Malignancy	3.3 (1.2-9.1)	1.4 (0.3-5.7)	4.3 (1.6-11.8)	3.4 (1.4-8.2)
≥1 Serious infection	2.0 (1.3-3.1)	1.8 (1.1-3.1)	2.3 (1.5-3.6)	1.4 (1.0-2.0)

TNF: tumor necrosis factor.

* : Pooled odds ratio based on a fixed-effects Mantel-Haenszel model for the all-doses estimate and based on high-dose/low-dose stratification.

¹ : Infliximab, ≤3 mg/kg every 4 weeks, or adalimumab, 20 mg/wk.² : Infliximab, ≥6 mg/kg every 8 weeks, or adalimumab, 40 mg every other week.

報告された悪性腫瘍発生例29例中4例が悪性リンパ腫、126例の重大感染症。

(文献9より引用)

1) トシリズマブ⁹⁾

トシリズマブはキャスルマン病を対象疾患としてオーファンドラッグとして既に認可されていたが、2008年にRA、多関節に活動性を有する若年性特発性関節炎、全身型若年性特発性関節炎にまで適応拡大された。

わが国において2~20歳を含む若年者の治験データを提出して認可された薬剤である。

●●●●
●抗サイトカイン薬の有害作用

TNFを中和、あるいはIL-6の作用を阻害するなど免疫系を抑制することから、敗血症、肺炎、日和見感染症を含む重篤な感染症を引き起こす可能性があり、これらの疾患の発生は抗サイトカイン薬の臨床治験でも一定の比率で報告されている。結核の発生も指摘されている。

また、蛋白質性医薬品でしばしば認められるアナフィラキシーショック、間質性肺炎、肝機能障害、遅発性過敏症、ループス様症候群、白血球・好中球減少なども懸念される。また、因果関係は明確ではないが、トシリズマブで腸管穿孔の報告がある。

これら抗サイトカイン薬の典型的副作用は重篤な感染症である。BongartzらはRAでインフリキシマブとアダリムマブを対象に腫瘍の増悪、感染症についてメタ解析を行い、インフリキシマブあるいはアダリムマブが悪性腫瘍および感染症を増強することを示した⁹⁾。悪性腫瘍はプラセボに対し、全投与量で3.3倍、低用量で1.4倍と用量依存性がある。また、感染症でもそれぞれ2倍、1.8倍と用量依存性があり、TNF抗体薬は悪性腫瘍および感染症を増強することを示している。

解析対象は悪性腫瘍29例(うち4例が悪性リンパ腫)、重大感染症126例である(表1)⁹⁾。

●●●●
●抗サイトカイン薬の小児への適用

1. インフリキシマブ

抗体医薬の小児に対する欧米での認可状況をみると、2006年にFDAはインフリキシマブの小児クローン病の適応を認可した。このほか、米国では成人におけるRA、強直性脊椎炎、乾癬性関節炎の適応が認められている。

小児における有害作用としてはhepatosplenic T cell lymphomaが報告されているが、小児での発症に関しては評価が定まっていない。また、インフリキシマブ投与中にはワクチン接種を中止するよう明記されている。さらに貧血、血便、白血球減少、ほてり、ウイルス感染、好中球減少などが小児で頻度が高いとされているが、全体的には成人、小児とも同様の報告がある。

2. エタネルセプト

エタネルセプトはメトトレキサート無効の若年性RAに関して認可されている。治験資料としては4歳以上のデータが提出され、有効とされている。投与中、ワクチン接種を控えることはインフリキシマブと同様である。頭痛、嘔気、嘔吐、腹痛など軽度の有害作用発現率が高いと報告されているが、市販後調査での頻度は比較するデータがなく、現状では小児であるがゆえに危険とするものではない。

投与量は、体重当たりでは成人と同量になる。

3. アダリムマブ

アダリムマブは、米国では成人RAを適応症として2週間に1回、40 mgを皮下注射するという用法・用

Freeze-Drying of Proteins in Glass Solids Formed by Basic Amino Acids and Dicarboxylic Acids

Ken-ichi IZUTSU,*^a Saori KADOYA,^b Chikako YOMOTA,^a Toru KAWANISHI,^a Etsuo YONEMOCHI,^b and Katsuhide TERADA^b

^aNational Institute of Health Sciences; 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan; and ^bFaculty of Pharmaceutical Sciences, Toho University; 2-2-1 Miyama, Funabashi, Chiba 274-8510, Japan.

Received August 1, 2008; accepted October 11, 2008; published online October 15, 2008

The purpose of this study was to produce and characterize glass-state amorphous solids containing amino acids and organic acids that protect co-lyophilized proteins. Thermal analysis of frozen solutions containing a basic amino acid (e.g., L-arginine, L-lysine, L-histidine) and a hydroxy di- or tricarboxylic acid (e.g., citric acid, L-tartaric acid, DL-malic acid) showed glass transition of maximally freeze-concentrated solute at temperatures (T_g) significantly higher than those of the individual solute solutions. Mixing of the amino acid with some dicarboxylic acids (e.g., oxalic acid) also suggested an upward shift of the transition temperature. Contrarily, combinations of the amino acid with monocarboxylic acids (e.g., acetic acid) had T_g 's between those of the individual solute solutions. Co-lyophilization of the basic amino acids and citric acid or L-tartaric acid resulted in amorphous solids that have glass transition temperatures (T_g) higher than the individual components. Mid- and near-infrared analysis indicated altered environment around the functional groups of the consisting molecules. Some of the glass-state excipients protected an enzyme (lactate dehydrogenase, LDH) from inactivation during freeze-drying. The glass-state excipient combinations formed by hydrogen-bonding and electrostatic interaction network would be potent alternative to stabilize therapeutic proteins in freeze-dried formulations.

Key words freeze-drying; protein formulation; amorphous; stabilization; glass

Freeze-drying is a popular method of ensuring the stability of proteins that are not stable enough in aqueous solutions during the period required for storage and distribution.^{1,2} Various freeze-dried protein formulations contain excipients (e.g., sugars, polymers, and amino acids) that protect proteins from physical and chemical changes. Disaccharides (e.g., sucrose, trehalose) are the most popular among them because they stabilize proteins both thermodynamically and kinetically in aqueous solutions and freeze-dried solids.^{3–5}

The development of freeze-dried protein formulations containing amino acids is often more challenging than the development of formulations with saccharides because of the varied physical and chemical properties (e.g., crystallinity, glass transition temperature) of the freeze-dried amino acids, as well as their tendency to form complexes with other ingredients.⁶ Many amino acids are considered to protect proteins basically in similar mechanisms with disaccharides. They thermodynamically stabilize protein conformation in aqueous solutions and probably in frozen solutions by being preferentially excluded from the immediate surface of proteins.⁷ Glass-state amorphous solids formed by freeze-drying of the disaccharides or some amino acids protect proteins from structural changes thermodynamically by substituting surrounding water molecules.⁸ They also reduce chemical degradation of freeze-dried proteins kinetically by reducing the molecular mobility.^{2,8} In addition, some amino acids (e.g., L-arginine) also prevent protein aggregation in aqueous solutions prior to the drying process and after reconstitution.⁹ Choosing appropriate counterions that form glass-state solid should be one of the key factors in designing amino acid-based amorphous freeze-dried formulations.^{10,11} For example, glass transition temperatures (T_g) of freeze-dried L-histidine salts depend largely on the counterions.¹² Co-lyophilization of L-arginine and multivalent inorganic acids (e.g., H_3PO_4 , H_2SO_4) results in glass-state amorphous solids

that protect proteins during the process and storage (e.g., tissue plasminogen activator formulation, PDR 2003).¹³ Some organic acid and inorganic cation combinations (e.g., sodium citrates) also form high glass transition temperature amorphous solids.¹⁴ Various functional groups (e.g., amino, carboxyl, hydroxyl) in the constituting molecules contribute significantly to form the glass-state amorphous salt solids.¹⁵ Producing glass-state amorphous solids by freeze-drying of amino acid and organic acid combinations, and their application in pharmaceutical formulations are interesting topics to explore.¹⁵

The purpose of this study was to produce stable amorphous solids that protect proteins by freeze-drying combinations of amino acids and organic acids. The physical properties of frozen solutions and freeze-dried solids containing the popular excipients and model chemicals were studied. The effect of the excipient combinations on the freeze-drying of lactate dehydrogenase (LDH) was also examined.

Experimental

Materials LDH (rabbit muscle) was obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO, U.S.A.). Succinic acid was produced by Kanto Chemical Co. (Tokyo, Japan). L-(+)-Tartaric acid, DL-malic acid, and other chemicals were of analytical grade and were purchased from Wako Pure Chemical (Osaka, Japan). The protein solutions were dialyzed against 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), and then centrifuged (1500 g × 5 min) and filtered (0.45 μ m, polyvinylidene difluoride (PVDF), Millipore) to remove insoluble aggregates before the freeze-drying study.

Freeze-Drying A pH meter (HM-60G, TOA-DKK Co., Tokyo, Japan) was used to determine the pH of the aqueous solutions at 25 °C. A freeze-drier (Freezvac 1C, Tozai-Tsusho, Tokyo, Japan) was used to lyophilize the aqueous solutions. Aliquots of aqueous solutions (250 μ l) in flat-bottom glass vials (10 mm diameter) were frozen by immersion in liquid nitrogen. The solutions were freeze-dried without shelf temperature control (20 h), and then at 35 °C (8 h). Solid samples for diffuse-reflection near-infrared analysis were prepared by freeze-drying the aqueous solutions (2 ml) in glass vials (21 mm diameter).

Thermal Analysis Thermal analysis of frozen solutions and dried solids

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: izutsu@nihs.go.jp