

きる分析手法であり、なかでも二次元 NOESY (2-D nuclear overhauser effect spectroscopy、以下 NOESY) 測定法は高次構造の情報を提供できる測定法として広く利用されている。従って、医薬品の品質に関わる高次構造の解析には<sup>1</sup>H-NMR および NOESY 測定法が有用な手法として適応できるものと考えられる。

本研究事業では、将来登場するであろう複雑な高次構造を有する医薬品を対象とした特性解析手法を確立し、局方医薬品の品質管理での有用性を明らかにすることを目的としている。我々は高次構造を有する医薬品としてインスリンを選択し、起源の異なるペプチド性医薬品の一次構造および高次構造を NMR 法により検討する。昨年度は一次構造の違いを検証した。<sup>1)</sup>

今年度は、3種の起源の異なるインスリンを用いて高次構造の違いを検討するために、空間的に近い水素原子を検出する NOESY 測定法を実施し、得られた NOESY スペクトルの差スペクトルを求めることによって、ヒト、ウシ、ブタのインスリンの溶液状態の高次構造の違いを適切に評価することに成功した。

## B. 研究方法

### 1. 試薬およびサンプル調製法

試薬 : Insulin, Human, Recombinant, Expressed in yeast (CAS# 11061-68-0), Insulin, From Bovine Pancreas (CAS# 11070-73-8) は SIGM-ALDRICH から購入し、Insulin Porcine (CAS# 12584-58-6) は MP Biomedicals から購入した。Acetonitrile-*d*<sub>3</sub>, for NMR (CAS# 2206-26-0)は ACROS から購入し、Sodium 3-(trimethylsilyl)-propionate-2, 2, 3, 3, -*d*<sub>4</sub> (TSP) (CAS# 24493-21-8)は ALDRICH から購入した。水酸化ナトリウム (NaOH), 塩酸 (HCl) は和光純薬の特級を購入した。

サンプル調製 : 各種インスリン (ヒト, ウシ, ブタ) をそれぞれ調製した。Insulin 試薬 (7mg)

を 0.1 N HCl 溶液に溶解し酸性条件下にした後、5 mM TSP / D<sub>2</sub>O 溶液を 70 μl 添加, 0.1N NaOH 溶液にて pH 3.6 になるように調製した。最後に CD<sub>3</sub>CN 溶液を 245 μl 添加し final 700μl (1.7 mM, pH 3.6) になるように<sup>1</sup>H-NMR 用サンプルを調製した。

### 2. <sup>1</sup>H-NMR および NOESY スペクトル測定

NMR 測定装置 : Varian 600 MHz NMR spectrometer に<sup>1</sup>H-NMR 専用コールドプローブを装備した。

測定モード:<sup>1</sup>H-NMR スペクトルおよび NOESY スペクトルの測定は、Presaturation NOESY 法 (one-dimensional <sup>1</sup>H-NOESY spectra, 298 K) を用いて一次元測定法 (<sup>1</sup>H-NMR) および二次元測定法 (NOESY) にて実施した。両スペクトルのケミカルシフトの補正は、TSP のシグナルを -0.016 ppm とした。

3. NOESY スペクトルの差スペクトルの作成  
3種のインスリン (ヒト, ウシ, ブタ) の NOESY スペクトルの FID (Free Induction Decay, 自由誘導減衰)の差を算出しフーリエ変換することで作成した。

A: Insulin human. FID

B: Insulin bovine. FID

C: Insulin porcine. FID

A - B: Insulin human. FID - Insulin bovine. FID

B - C: Insulin bovine. FID - Insulin porcine. FID

A - C: Insulin human. FID - Insulin porcine. FID

## C. 研究結果

### 1. <sup>1</sup>H-NMR 及び NOESY スペクトルの測定

ヒト, ウシ, ブタの3種のインスリン分子種について<sup>1</sup>H-NMR スペクトル及び NOESY スペクトルを各々測定した (図2及び図3)。図2に示すように、3種のインスリン分子種の<sup>1</sup>H-NMR スペクトルでは、インスリン分子にはプロトンの数が377~383個あることから<sup>1</sup>H-NMR スペク

トルでは殆どのシグナルが複雑に分裂している。従って、3種のスペクトルを比較した場合、1~3個のアミノ酸残基の一次構造の違いをスペクトルから区別することは極めて困難である。

NOESY スペクトルは、空間的に近い（直線距離が近く、その距離は5Å以内である）<sup>1</sup>H 同士の相互作用を非対角ピーク（以下、NOE ピーク）として観測できる。3種のインスリンの単独の各 NOESY スペクトルの結果は、高磁場領域（0.5 ~ 4.0 ppm 付近）同士、アミン領域を含む低磁場領域（6.2 ~ 8.0 ppm 付近）同士、および高磁場領域（0.5 ~ 4.0 ppm 付近）とアミン領域を含む低磁場領域（6.2 ~ 9.0 ppm 付近）同士の3つの領域区間の NOE ピークが多く観測され、各インスリン共に複雑な高次構造をとっていることが予測される（図 3）。

## 2. NOESY スペクトルの.fid 差スペクトルの作成

図 3 に示すように3種のインスリンの各々の NOESY スペクトルは、多くの NOE ピークが観測されることから、スペクトル同士を並べて比較し、区別する事は大変困難である。しかし、それぞれのスペクトルを重ね合わせることで、重なりが一致する箇所を消去し、残った NOE ピークの違いを区別できれば、高次構造の違いについて判別が可能となる。そこで、3種のヒト、ウシ、ブタインスリンの NOESY スペクトルにおいて、比較する2種間のスペクトルの NOESY 差スペクトルを作成した（図 4, 図 6, 図 8）。その結果、2種間の NOESY 差スペクトルでは、単独で測定された NOESY スペクトルが同一強度で重なり合う NOE ピーク部分は消去され、一方、どちらかで NOE が観測される場合、または NOE の強度が異なる場合は、NOE ピークとして残って観測された。

### 2-1. ヒトインスリン(A)とウシインスリン(B)の NOESY 差スペクトルの解析 (A-B : 図 4A,

図 4B, 図 4C, 図 4D, 図 5A, 図 5B, 図 5C, 図 5D)

ヒトインスリンおよびウシインスリンの NOESY スペクトルについて差スペクトルを求めた（図 4）。その結果、高磁場領域（0.5 ~ 4.0 ppm 付近）同士およびアミン領域を含む低磁場領域（6.2 ~ 7.7 ppm 付近）同士、高磁場領域（0.5 ~ 4.0 ppm 付近）とアミン領域を含む低磁場領域（6.2 ~ 7.7 ppm 付近）同士で幾つかの NOE ピークが観察された（図 4A, 図 4B, 図 4C, 図 4D）。図 4C で示されたヒトインスリンの高次構造を特徴づける代表的な NOE ピークについて、相当するアミノ酸残基（6.37 vs 7.11 ppm）同士の距離を X 線結晶構造から求めた（図 5A）。また、ウシインスリンについても同様のアミノ酸の空間的な距離を X 線結晶構造から求めて（図 5B）、NOE 差スペクトルから得られた空間的相互作用の検証を行った。ヒトインスリンの NOE ピークに相当する A 鎖のアスパラギン酸（N）の N<sup>δ</sup>H（A18 N の N<sup>δ</sup>H, 6.37 ppm）と A 鎖のチロシン（Y）の C<sup>δ</sup>H（A14 Y の C<sup>δ</sup>H, 7.11 ppm）の原子間距離は 4.02 Åであった（図 5A）。一方、ウシインスリンにおいてヒトインスリンと同様のアミノ酸残基の水素原子同士の原子間距離は 8.52 Åであり、その水素原子間距離は 5 Å以上であった（図 5B）。従って、ヒトインスリンで観測された A18 N と A14 Y の水素原子同士の NOE ピークの相関は、ウシインスリンでは相関が示されないことが X 線結晶構造解析の結果から確認できた。

一方、図 4D で示されたウシインスリンの高次構造を特徴づける代表的な NOE ピークについて、相当するアミノ酸残基（2.94 vs 6.97 ppm）同士の距離を X 線結晶構造から求めた（図 5C）。また、ヒトインスリンについても同様のアミノ酸の空間的な距離を X 線結晶構造から求めて（図 5D）、NOE 差スペクトルから得られた空間的相互作用の検証を行った。ウシインスリンの NOE ピークに相当する B 鎖のフェニルアラニ

ン (F) の  $C^\beta H$  (B1 F の  $C^\beta H$ , 2.94 ppm) と A 鎖のタイロシン (Y) の  $C^\delta H$  (A14 Y の  $C^\delta H$ , 6.97 ppm) の原子間距離は 4.52 Å であった (図 5C). 一方, ヒトインスリンにおいてウシインスリンと同様のアミノ酸残基の水素原子間の距離は 18.44 Å であり, その水素原子間距離は 5 Å 以上であった (図 5D). 従って, ウシインスリンで観測された B1 F と A14 Y の水素原子同士の NOE ピークの相関は, ヒトインスリンでは相関が示されないことが X 線結晶構造解析の結果から確認できた.

## 2-2. ウシインスリンとブタインスリンの NOESY 差スペクトルの解析 (B-C : 図 6A, 図 6B, 図 6C, 図 7A, 図 7B)

ウシインスリンおよびブタインスリンの NOESY スペクトルについて差スペクトルを求めた. その結果, 高磁場領域 (0.5 ~ 2.5 ppm vs 0.5 ~ 4.0 ppm 付近) 同士およびアミン領域を含む低磁場領域 (6.2 ~ 7.7 ppm 付近) 同士で幾つかの NOE ピークが観察された (図 6A, 図 6B, 図 6C). 図 6B で示されたウシインスリンの高次構造を特徴づける代表的な NOE ピークに示されているアミノ酸残基の水素原子の相関 (1.51 vs 4.12 ppm) について, 空間的な相互作用の距離を X 線結晶構造から解析した (図 7A). ウシインスリンの NOE ピークに相当する B 鎖のアラニン (A) の  $C^\beta H$  (B14 A の  $C^\beta H$ , 1.51 ppm) と B 鎖のロイシン (L) の  $C^\alpha H$  (B11 L の  $C^\alpha H$ , 4.12 ppm) の原子間距離は 4.40 Å であった (図 7A). 従って, ウシインスリンでは B14 A と B11 L の水素原子同士の NOE ピークの相関が見られることが X 線結晶構造解析の結果から確認できた.

一方, 図 6B で示されたブタインスリンの高次構造を特徴づける代表的な NOE ピークに示されているアミノ酸残基の水素原子の相関 (0.54 vs 1.13 ppm) について, 空間的な相互作用の距離を X 線結晶構造から解析した (図 7B).

ブタインスリンの NOE ピークに相当する A 鎖のイソロイシン (I) の  $C^\delta H$  (A2 I の  $C^\delta H$ , 0.54 ppm) と B 鎖のロイシン (L) の  $C^\alpha H$  (B11 L の  $C^\alpha H$ , 1.13 ppm) の原子間距離は 4.27 Å であった (図 7B). 従って, ブタインスリンでは A2 I と B11 L の水素原子同士の NOE ピークの相関が見られることが X 線結晶構造解析の結果から確認できた.

## 2-3. ヒトインスリンとブタインスリンの NOESY 差スペクトルの解析 (A-C : 図 8A, 図 8B, 図 8C, 図 8D, 図 9A, 図 9B)

ヒトインスリンおよびブタインスリンの NOESY スペクトルについて差スペクトルを求めた (図 8). その結果, 高磁場領域 (0.5 ~ 4.0 ppm 付近) 同士, アミン領域を含む低磁場領域 (6.2 ~ 7.7 ppm 付近) 同士および高磁場領域 (0.5 ~ 4.0 ppm 付近) とアミン領域を含む低磁場領域 (6.2 ~ 7.7 ppm 付近) で幾つかの NOE ピークが観察された (図 8A, 図 8B, 図 8C, 図 8D). 図 8C に示されたヒトインスリンの高次構造を特徴づける代表的な NOE ピークに示されているアミノ酸残基の水素原子の相関 (6.45 vs 7.35 ppm) について, 空間的な相互作用の距離を X 線結晶構造から解析した (図 9A). ヒトインスリンの NOE ピークに相当する A 鎖のアスパラギン (N) の  $N^\delta H$  (A18 N の  $N^\delta H$ , 6.45 ppm) と A 鎖のチロシン (Y) の  $C^\delta H$  (A14 Y の  $C^\delta H$ , 7.35 ppm) の原子間距離は 4.02 Å であった (図 9A). 従って, ヒトインスリンでは A18 N と A14 Y の水素原子同士の NOE ピークの相関が見られることが X 線結晶構造解析により確認できた.

一方, 図 8D に示されたブタインスリンの高次構造を特徴づける代表的な NOE ピークに示されているアミノ酸残基の水素原子の相関 (0.88 vs 6.75 ppm) について, 空間的な相互作用の距離を X 線結晶構造から解析した (図 9B). ブタインスリンの NOE ピークに相当する A 鎖

のインロイシン (I) の C<sup>δ</sup>H (A2 I の C<sup>δ</sup>H, 0.88 ppm) と A 鎖のチロシン (Y) の C<sup>β</sup>H (A19 Y の C<sup>β</sup>H, 6.75 ppm)の原子間距離は 3.63 Åであった(図 9B). 従って, プタインスリンでは A2 I と A19 Y の水素原子同士の NOE ピークの相関が見られることが X 線結晶構造解析の結果から確認できた.

#### D. 考察

昨年度は, ペプチド性医薬品の新たな品質評価の解析手法として, 3 種類のインスリンの複雑な <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを統計解析処理することにより, 種差の違いに伴う数個のアミノ酸の一次配列の違いを解析することに成功した. ペプチド性医薬品の薬理活性は分子の高次構造に大きく依存しているが, 高次構造は従来の分析方法での評価は難しいのが現状である. しかし, ペプチドを溶液状態で測定した <sup>1</sup>H-NMR スペクトルは, アミノ酸残基の一次構造情報に加えて溶液中の高次構造を含む分子の立体構造に関わる情報が多く含まれており, 医薬品の品質に関わる高次構造の解析には <sup>1</sup>H-NMR が有用な手法として考えられる. ペプチド性医薬品は, SDS-PAGE, CE, MS, HPLC, NMR 等により物理化学的特性を評価する. また, 当該医薬品が適切な高次構造を有していることは生物活性の発現に必須であることから, 上記評価に加えて高次構造の均一性は生物活性から評価されている.

我々は, 新たな品質評価手法の開発を目指して NMR 法による解析手法をペプチド性医薬品への品質管理に応用すべく研究を行ってきた. 今年度は, 3 種のインスリン分子種 (ヒト, ウシ, ブタ) を用いて, アミノ酸配列が異なるペプチド性医薬品の異なる高次構造の解析に対し, NMR 法による NOESY 測定法が有効であるか検討した.

NMR 法の測定手法の中で, 水素原子の相対

配置について空間的に近い水素原子同士の相互作用を検出する NOESY 測定法を実施し, 比較する 2 種の NOESY スペクトルの差を算出する NOESY 差スペクトルを求めることで, 本実験のインスリン分子種の高次構造の違いについて検討した. 本実験で用いた 3 種のインスリンは, 全て 51 個のアミノ酸残基から構成されており, ヒトのアミノ酸配列に対してウシのアミノ酸配列は 3 箇所異なり, ブタのアミノ酸配列は 1 箇所異なっている (図 1). 図 3 に示すように, これらの NOESY スペクトルを測定し比較した場合, それぞれについて検出された NOE ピークは多数あり, その違いについて判別をすることは難しいが, NOESY 差スペクトルを求めることによって NOE ピークの違いについての判別が可能であることを示すことができた (図 4-9).<sup>2,3)</sup> 以上, 各分子種の NOESY スペクトルについて NOESY 差スペクトルを求めることにより, 幾つかの種に特徴的な NOE ピークが検出され, これらを同定することによって立体構造の違いを区別することができた. 従って, 本解析手法が異なる高次構造の評価手法に有用であることが示唆された.

現在, 高次構造の類似度を定量化するために相同性スコアの算出方法を検討中である.

#### E. 結論

我々は, NMR の新たな分析応用を目指して研究を実施している. 現在までの研究結果では, <sup>1</sup>H-NMR スペクトルと統計解析手法を組み合わせた新たな特性解析手法が, 医薬品の物理化学的特性に基づいた品質評価手法への応用できると期待される.<sup>4)</sup>

本研究では, 複雑な高次構造を有するペプチド性医薬品に着目し, その一例として, アミノ酸配列の異なる 3 種のインスリンを用いて, NOESY スペクトルを測定し, その NOESY 差スペクトルを求めることによって, 高次構造の違い

いを判別することに成功した。本研究の高次構造に対するアプローチはペプチド性/タンパク質医薬品のみならず他の高分子医薬品の解析に有効であると考えられる。

今後は、医薬品の安定性について、これまでの研究手法を用いて医薬品の分解や、分解に伴って生成する不純物の生成機構の経時的変化を評価する手法を検討する予定である。

#### F. 参考文献

1. Ohno A, Kawanishi T, Okuda H, Fukuhara K., A New Approach to Characterization of Insulin Derived from Different Species Using <sup>1</sup>H-NMR Coupled with Multivariate Analysis. *Chem Pharm Bull* (Tokyo). 2012, 60(3): 320-4
2. Jiráček J, Záková L, Antolíková E, Watson CJ, Turkenburg JP, Dodson GG, Brzozowski AM., Implications for the active form of human insulin based on the structural convergence of highly active hormone analogues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010, 107(5):1966-70.
3. Bocian W, Sitkowski J, Bednarek E, Tarnowska A, Kawecki R, Kozerski L., Structure of human insulin monomer in water/acetonitrile solution. *J Biomol NMR*. 2008, 40(1): 55-64.
4. Ohno, A.; Kawasaki, N.; Fukuhara, K.; Okuda, H.; Yamaguchi, T., Time-dependent changes of oxytocin using <sup>1</sup>H-NMR coupled with multivariate analysis: A new approach for quality evaluation of protein/peptide biologic

drugs. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2009**, *57* (12), 1396-9.

#### G. 健康危険情報

なし。

#### H. 研究発表

##### 1. 論文発表

A. Ohno, T. Kawanishi, H. Okuda, K. Fukuhara, A New Approach to Characterization of Insulin Derived from Different Species Using <sup>1</sup>H-NMR Coupled with Multivariate Analysis, *Chem. Pharm. Bull.* **60** (3) 320—324 (2012)

##### 2. 学会発表

Ohno, A., Kawanishi, T., Okuda, H., Fukuhara, K., New approach for quality evaluation for insulins derived from different species using <sup>1</sup>H NMR coupled with multivariate analysis, 242th American Chemical Society National Meeting & Exposition, (2011.8) (Denver, CO, USA)

Ohno, A., Kawanishi, T., Okuda, H., Fukuhara, K., A New NMR-based Quality Evaluation of Biopolymer Drugs, 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (2011.11) (Shinjyuku-ku, Tokyo)

#### I. 知的財産権の出願・登録状況

登録および登録予定共になし。

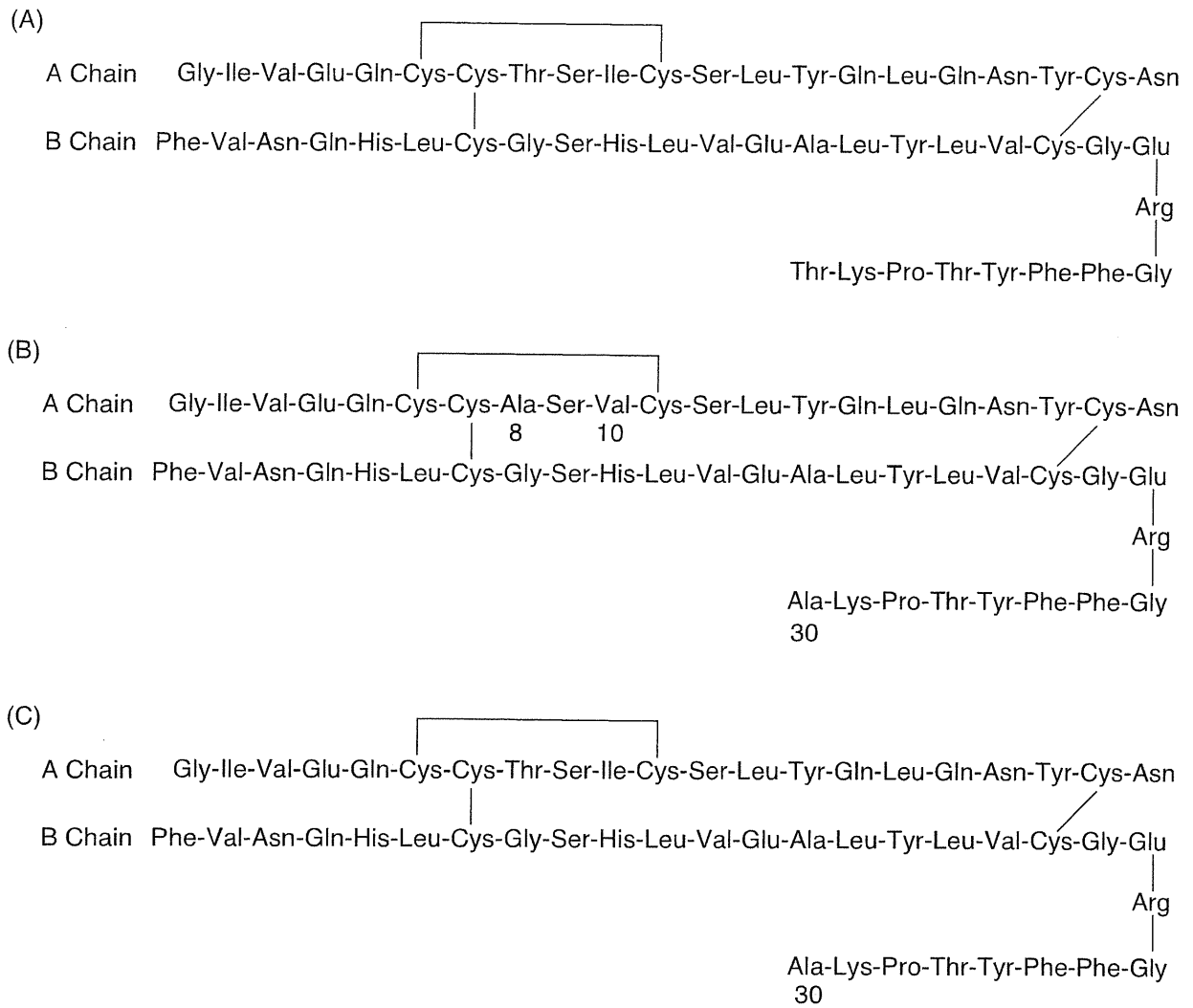


図 1. ヒト (A), ウシ (B), ブタ (C) のインスリンのアミノ酸配列

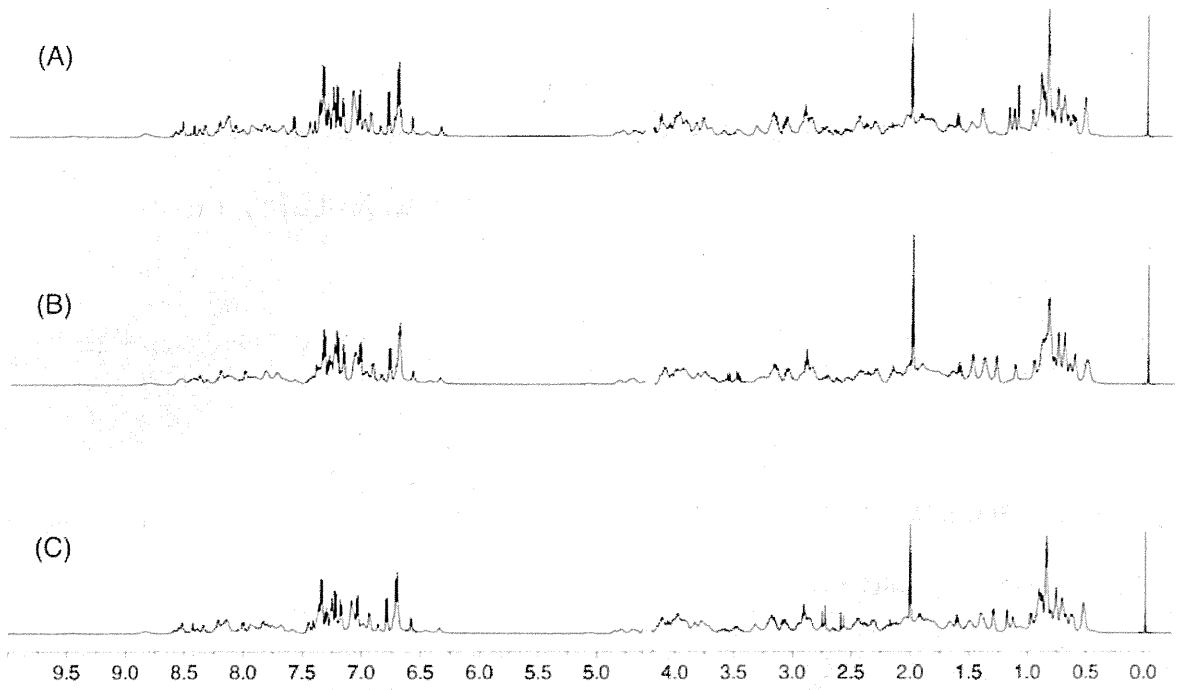
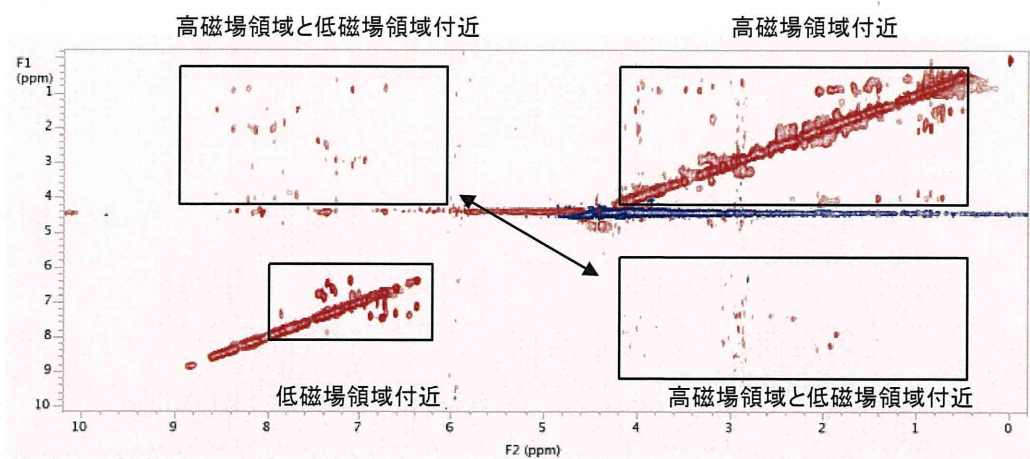
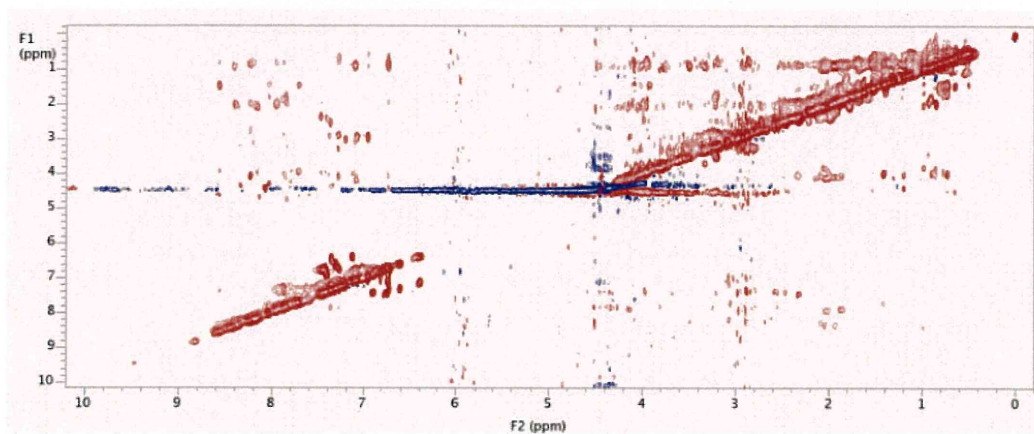


図2. ヒト (A), ウシ (B), ブタ (C) のインスリンの $^1\text{H-NMR}$  スペクトル

(A)



(B)



(C)

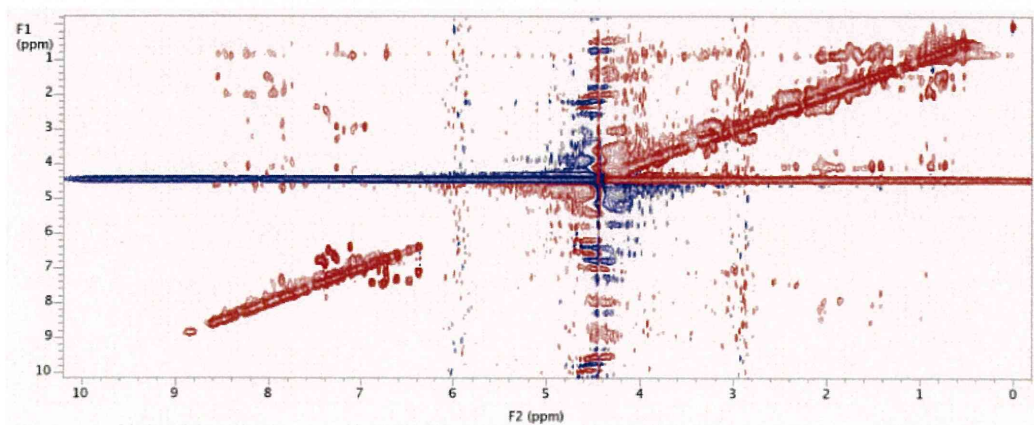
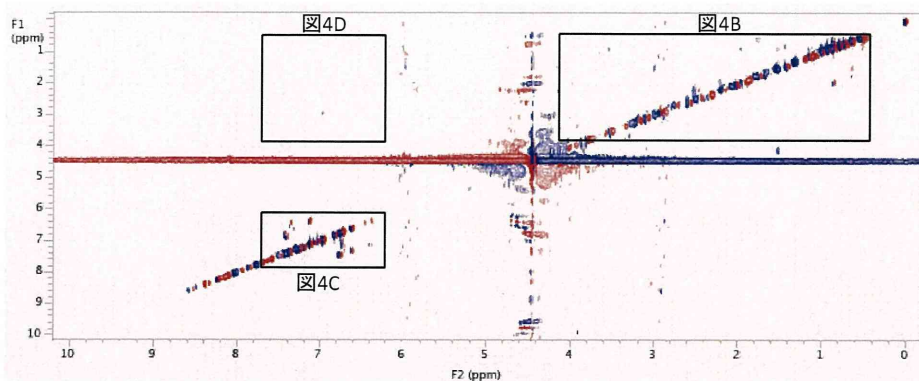


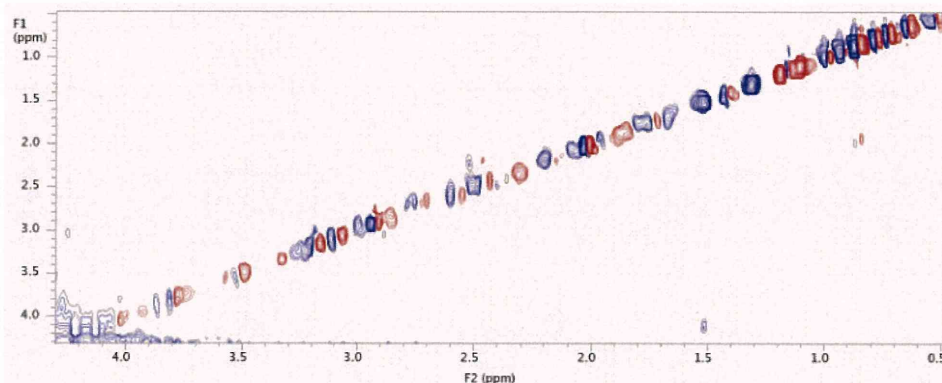
図3. ヒト (A), ウシ (B), ブタ (C) のインスリンの NOESY スペクトル  
全体領域 (0.0 - 10.0 ppm vs 0.0 - 10.0 ppm)



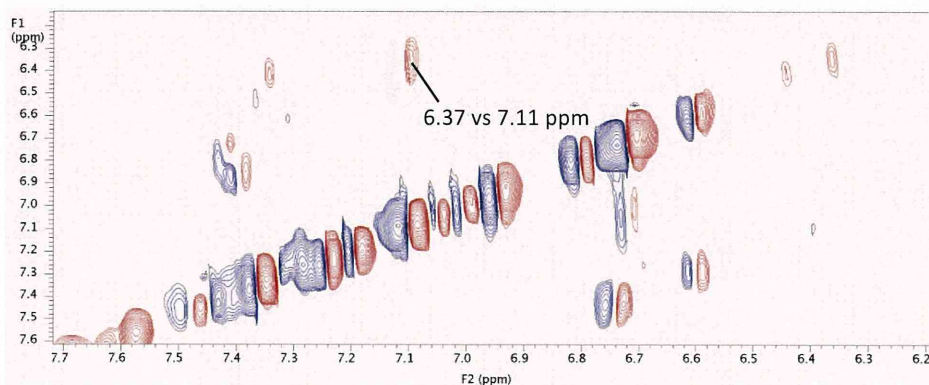
(A) 全体領域 (0.0 - 10.0 ppm)



(B) 高磁場領域の拡大図 (0.5 - 4.0 ppm vs 0.5 - 4.0 ppm)



(C) 低磁場領域の拡大図 (6.2 - 7.7 ppm vs 6.2 - 7.7 ppm)



(D) 高磁場領域と低磁場領域の拡大図 (0.5 - 4.0 ppm vs 6.2 - 7.7 ppm)

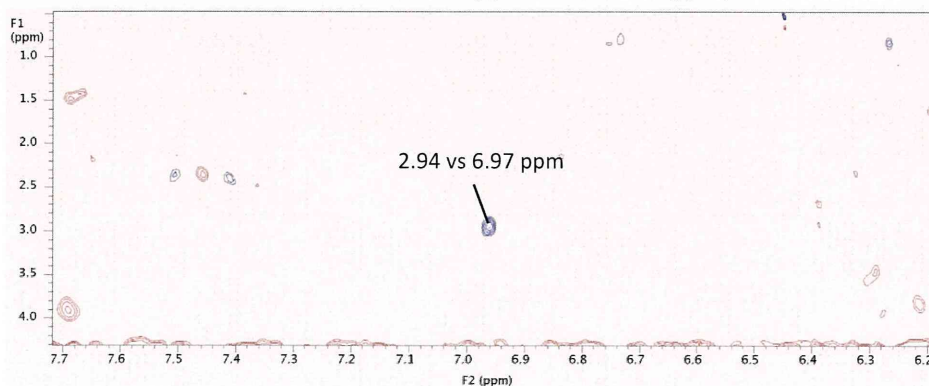
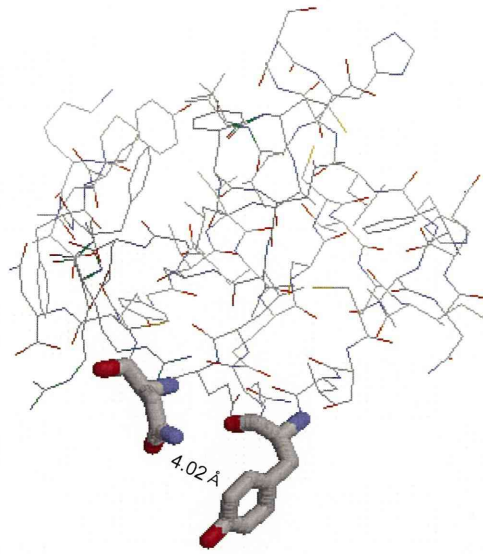


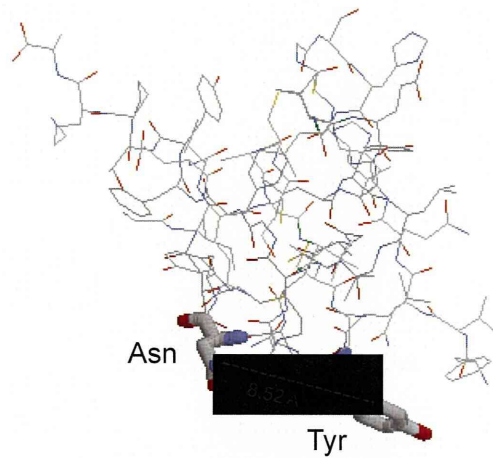
図 4. ヒト(赤色)とウシ(青色)のインスリンの NOESY 差スペクトル(A-B)



PDB: 3I3Z

Insulin Human (A-B)  
6.37 vs 7.11  
A18 N vs A14 Y

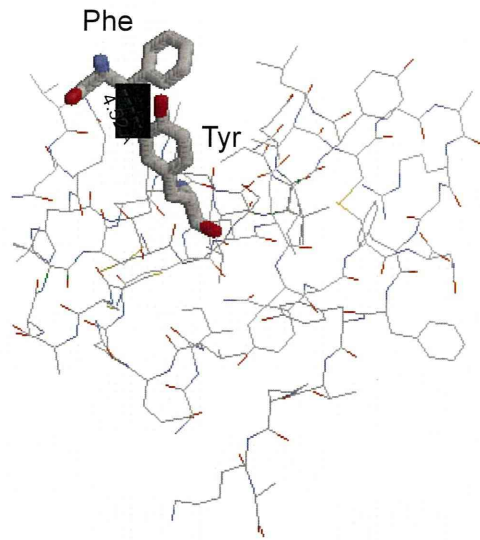
図 5A. ヒトのインスリンに特徴的なアミノ酸の X 線結晶構造解析



PDB: 2A3G

Insulin Bovine (A-B)  
A 18 N vs A14 Y

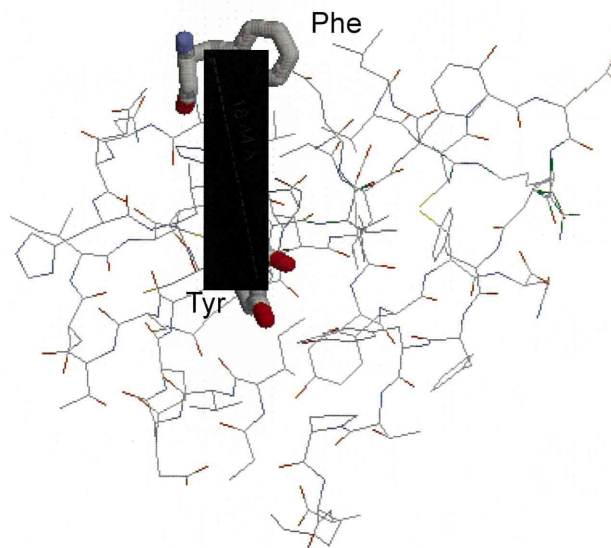
図 5B. ウシのインスリンに特徴的なアミノ酸の X 線結晶構造解析



PDB: 2A3G

Insulin Bovine (A-B)  
2.94 vs 6.97  
B1 F vs A14 Y

図 5C. ウシのインスリンに特徴的なアミノ酸の X 線結晶構造解析

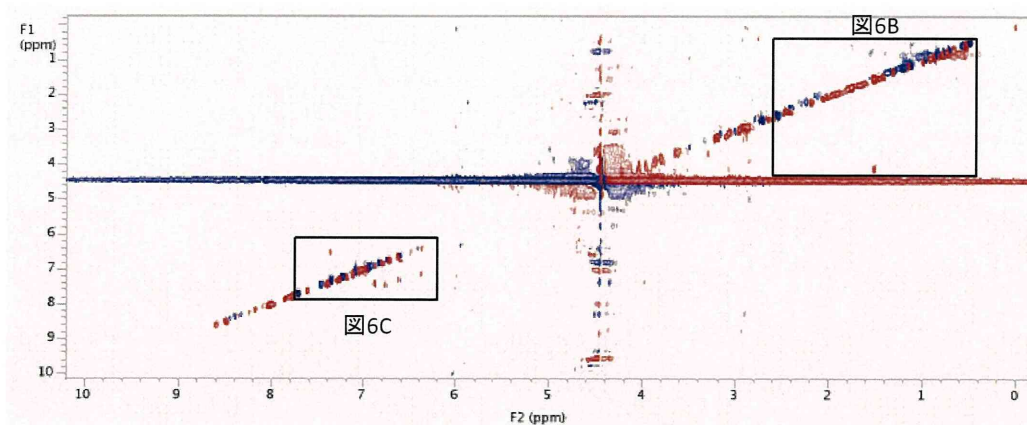


PDB: 3I3Z

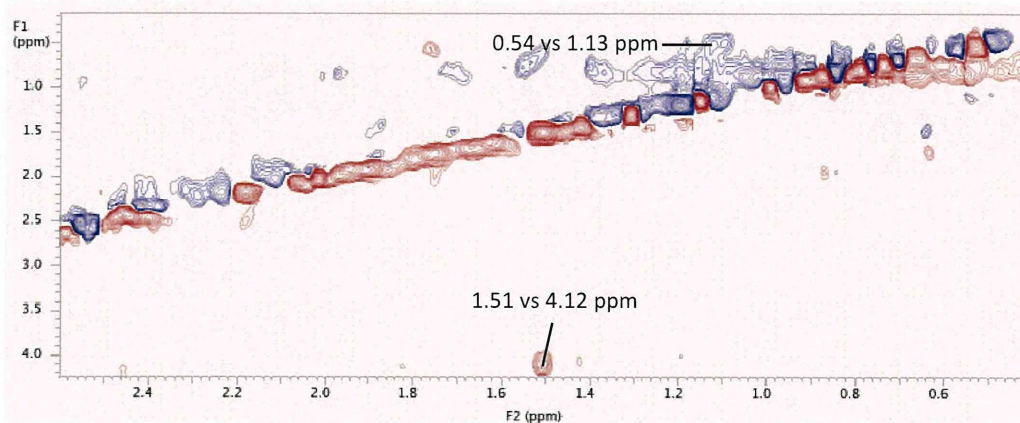
Insulin Human (A-B)  
B1 F vs A14 Y

図 5D. ヒトのインスリンに特徴的なアミノ酸の X 線結晶構造解析

(A) 全体領域 (0.0 - 10.0 ppm)



(B) 高磁場領域の拡大図 (0.5 - 2.5 ppm vs 0.5 - 4.0 ppm)



(C) 低磁場領域の拡大図 (6.2 - 7.7 ppm vs 6.2 - 7.7 ppm)

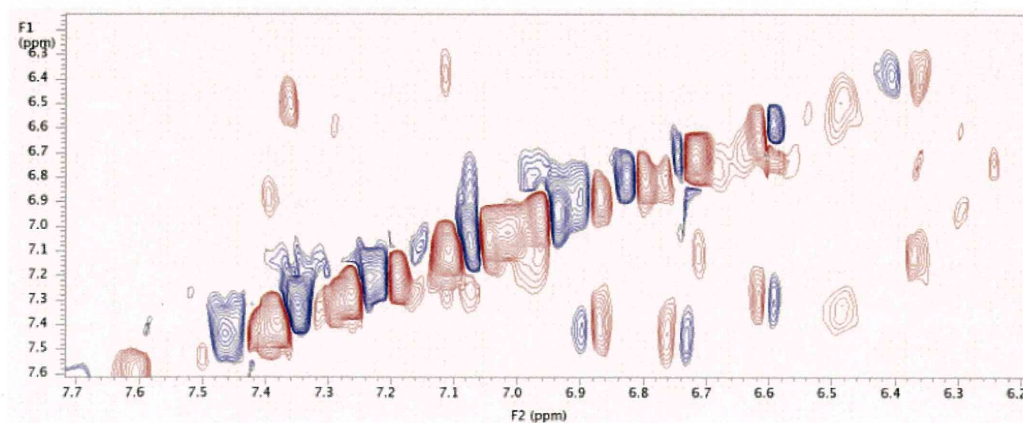
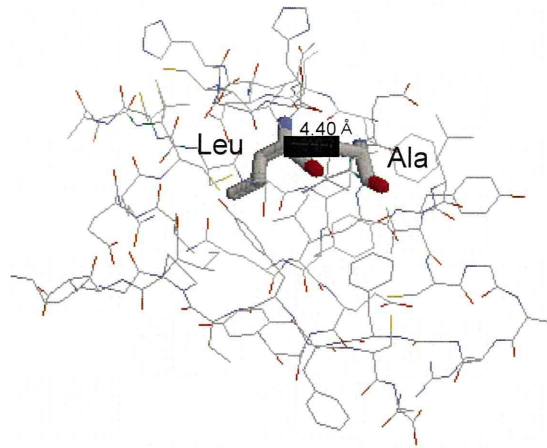


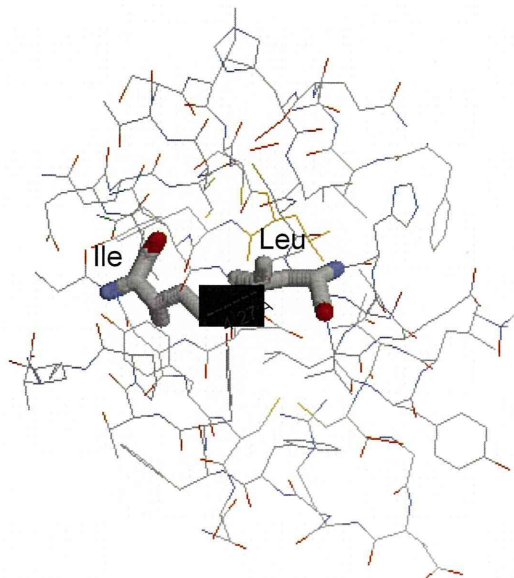
図 6. ウシ(赤色)とブタ(青色)のインスリンの NOESY 差スペクトル(B-C)



PDB: 2A3G

Insulin Bovine (B-C)  
1.51 vs 4.12  
B14 A vs B11 L

図 7A. ウシのインスリンに特徴的なアミノ酸の X 線結晶構造解析

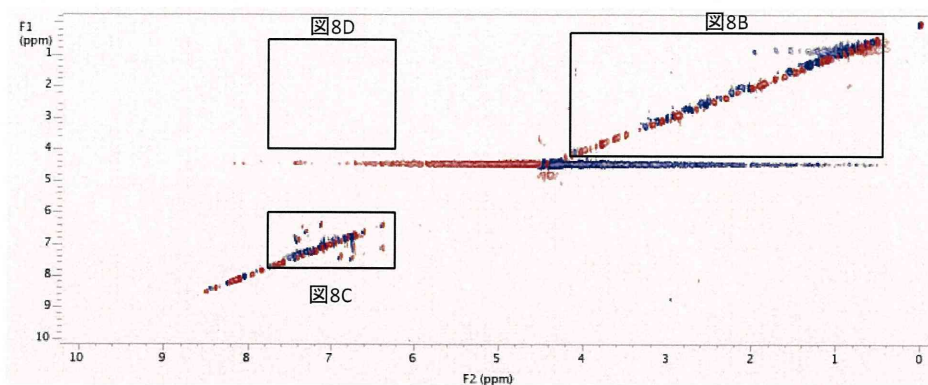


PDB: 3T2A

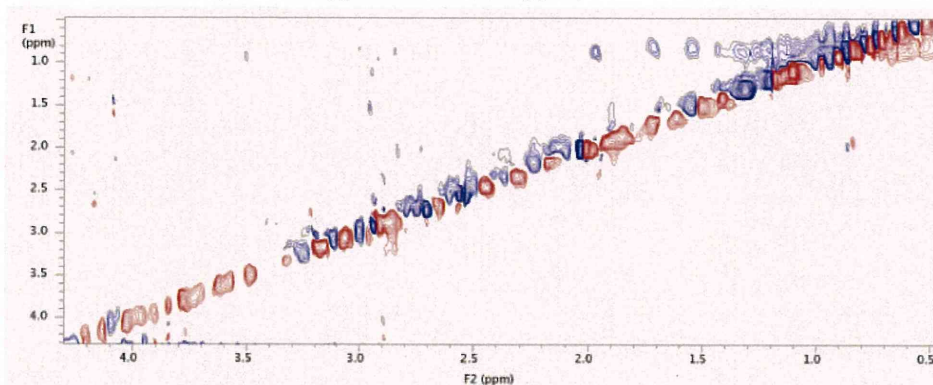
Insulin Porcine (B-C)  
0.54 vs 1.13  
A2 I vs B11 L

図 7B. ブタのインスリンに特徴的なアミノ酸の X 線結晶構造解析

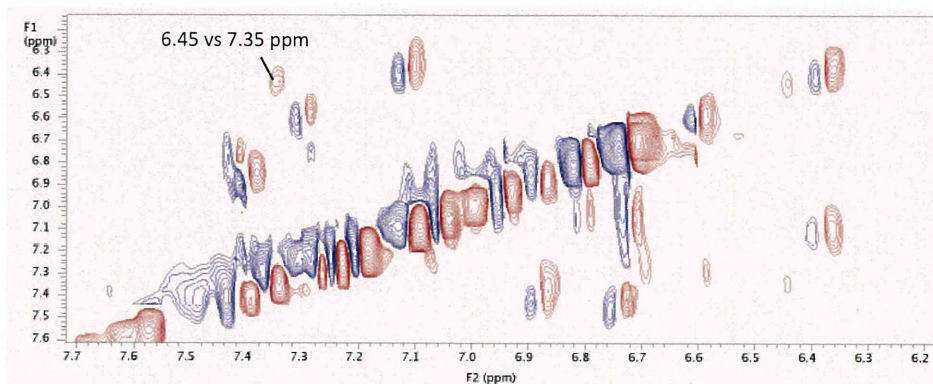
(A) 全体領域 (0.0 - 10.0 ppm)



(B) 高磁場領域の拡大図 (0.5 - 4.0 ppm vs 0.5 - 4.0 ppm)



(C) 低磁場領域の拡大図 (6.2 - 7.7 ppm vs 6.2 - 7.7 ppm)



(D) 高磁場領域と低磁場領域の拡大図 (0.5 - 4.0 ppm vs 6.2 - 7.7 ppm)

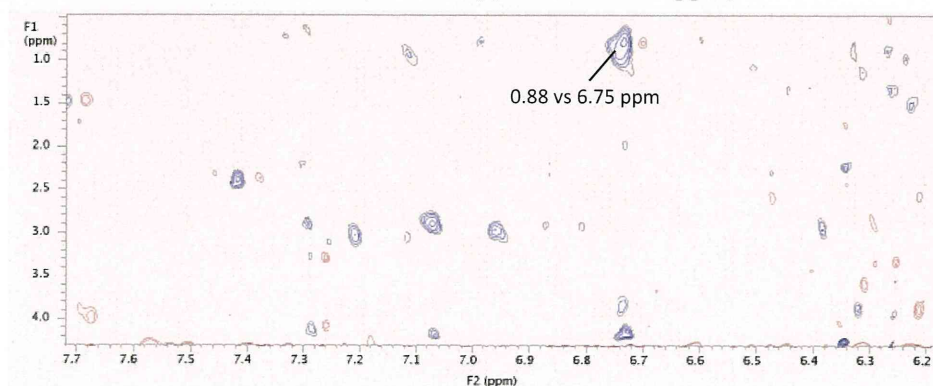
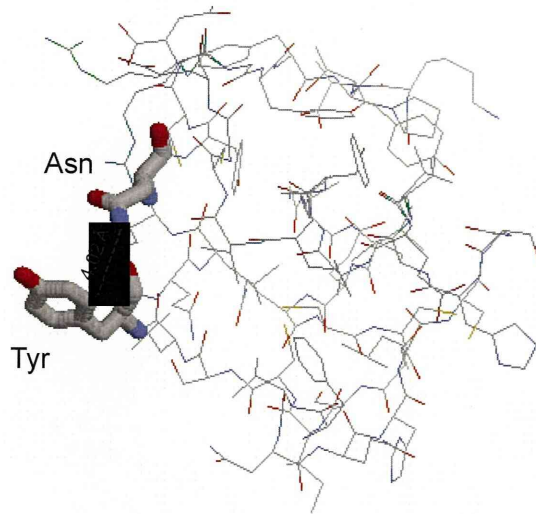


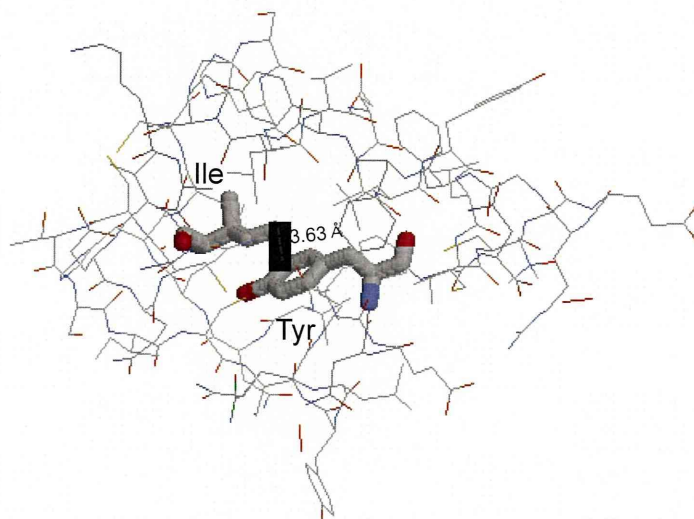
図 8. ヒト(赤色)とブタ(青色)のインスリンの NOESY 差スペクトル(A-C)



PDB: 3I3Z

Insulin Human (A-C)  
6.45 vs 7.35  
A18 N vs A14 Y

図 9A. ヒトのインスリンに特徴的なアミノ酸の X 線結晶構造解析



PDB: 3T2A

Insulin Porcine (A-C)  
0.88 vs 6.75  
A2 I vs A19 Y

図 9B. ブタのインスリンに特徴的なアミノ酸の X 線結晶構造解析

## 生物薬品の試験法及び各条規格の改正に関する研究

分担研究者	川崎 ナナ	国立医薬品食品衛生研究所	生物薬品部長
協力研究者	原園 景	国立医薬品食品衛生研究所	生物薬品部主任研究官
協力研究員	高久明美	国立医薬品食品衛生研究所	生物薬品部研究員
協力研究員	中川ゆかり	医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団	
協力研究員	高橋知子	医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団	

**研究要旨** 日局各条バソプレシン注射液の純度試験，及び定量試験として，それぞれモルモットを用いた子宮収縮成分が含まれないことの確認，及びシロネズミを用いた血圧測定が設定されている。前者は脳下垂体由来バソプレシンが用いられていた当時，オキシトシンの混入を調べる目的で設定されたものと思われるが，現在，バソプレシン原薬はペプチド合成により製造されることからオキシトシンは含まれておらず，ペプチド合成により生じる可能性のある目的物質由来不純物を対象とした試験を設定すべきである。定量試験に関しても，USP では HPLC を用いた試験を設定しており，日局も理化学的試験法の導入を検討する時期にきている，そこで，本研究では，適切な純度試験及び定量試験を策定することを目的とし，日局バソプレシン標準品の HPLC プロファイル，並びに合成バソプレシンに混入し得る目的物質由来不純物を明らかにした。

### A. 研究目的

局方試験策定並びに見直しにおいては，最近の高度な分析技術に対応すること，また，国際的動向に配慮することが目標とされている。生物薬品についても，分析技術の進展，及び動物愛護の精神を考慮して，高度な分析技術を取り入れた試験法を策定すること，バイオアッセイから理化学的試験法への切り替えを検討することが奨励されている。現在，日局各条バソプレシン注射液では，純度試験として子宮収縮成分を対象としたモルモットを用いたバイオアッセイが，また，定量法として，血圧上昇作用を指標とした雄のシロネズミを用いたバイオアッセイが設定されている（表 1）。前者は，脳下垂体由来バソプレシンが用いられていた当時，製造工程由来不純物であるオキシトシンの混入を調べる目的で設定されたものと推察されるが，現在のバソプレシン原薬はペプチド合成により製造されているので，オキシトシンの混入ではなく，ペプチド合成により生じる可能性のある目的物質由来不純物を対象とした純度試験を設定すべきである。また，定量法として設定されている動物を用いたバイオアッセイは，精度が低いこと，実施には高い技術が必要であることから，より精度が高く簡便な試験法の設定が望まれる。実際，USP では，HPLC を用いた純度試験及び定量法が採用されている。バイオアッセイを理化学

的分析に切り替えることができれば，精度を高めること，試験に必要な試料，労力及び費用を減らすこと，並びに動物の使用を中止できることが期待される。

そこで本研究では，純度試験及びバイオアッセイを HPLC に置き換えることを目的に，USP 法を参考に，日局バソプレシン標準品及びバソプレシン原薬の不純物プロファイルを求めた。つぎに，純度試験を HPLC に置き換えることの妥当性を検証するため，HPLC 並びに LC/MS を用いて市販の合成バソプレシン製剤の不純物プロファイリングを行い，合成バソプレシンに含まれる不純物の同定，並びに USP 法の検証を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 試料

バソプレシンとして，日局バソプレシン標準品（Lot VAS01），バソプレシン原薬 A 並びにピトレン注射液 20（第一三共株式会社）を用いた。

#### 2. LC/UV

日局バソプレシン標準品の純度の試験では，USP 法に準じて行った。すなわち，ODS C18（Beckman，4.6 x 250 mm，5 $\mu$ m）カラムにて，溶離液にリン酸二水素アンモニウム（6.6 g/l）：アセトニトリル = 87 : 13（pH 3.0）を用いて，カラム温度 40 $^{\circ}$ C，流速 1.0 ml/min のイソクラティック条



件にて分離し、220 nm の吸光度を測定した。また、不純物の分析では、液体クロマトグラフには、H-class (Waters), カラムには、BEH130 C18 (Waters, 2.1 x 150 mm, 1.7 $\mu$ m), 溶離液には、A : 57 mM リン酸アンモニウム (pH 3.0), B : 50% アセトニトリルを用いた。試料は、カラム温度 40 $^{\circ}$ C, 流速 0.20 ml/min, 26%B のイソクラティック条件で溶出し、220 nm の吸光度を測定した。

### 3. LC/MS

液体クロマトグラフには Paradigm MS4 (Michrome BioResources), 質量分析計には、Q-TOF 型の Qstar Elite (AB Sciex), イオン源にはナノエレクトロスプレーを使用した。カラムには、L-Column L2-C18 (CERI, 0.1 x 150 mm, 3  $\mu$ m), 溶離液には、A : 0.1% ギ酸 (A) 及び B : 0.1% ギ酸を含む 90% アセトニトリルを用いた。5 mU 相当量の試料を、同カートリッジ式トラップカラムに吸着させ、0.1% TFA で脱塩した後、流路を反転させ、室温、流速 0.5  $\mu$ l/min で、0-2 min, 5% B, 2-22 min, 5-80% B のグラジエント条件にて溶出した。質量分析の  $m/z$  範囲は、400-2,100 とした。

## C. 研究結果及び考察

### 1. USP 法による日局バソプレシン標準品 (Lot VAS01) 及びバソプレシン原薬 A の純度試験

バソプレシンは、視床下部で合成されて下垂体後葉に貯蔵され、種々の刺激により血中に分泌される 9 アミノ酸残基からなるペプチドホルモンで、1 番目と 6 番目のシステイン間で S-S 結合を形成している (図 1)。同じく下垂体後葉から分泌されるオキシトシンとは、2 番目及び 8 番目の 2 カ所のアミノ酸が異なっている。バソプレシンは、抗利尿作用、血管収縮などの作用を示し、下垂体性尿崩症、下垂体性または腎性尿崩症の鑑別診断、腸内ガスの除去、食道静脈瘤出血の緊急処置に用いられる。バソプレシンの純度試験は、脳下垂体由来バソプレシンを用いた場合に混入が想定されるオキシトシンを想定して設定されている。しかしながら、現在バソプレシン原薬はペプチド合成により製造されているので、オキシトシンの混入はないことから、より適切な純度試験を設定すべきである。そこで、日局バソプレシン標準品とバソプレシン原薬 A について、USP 法に準じて HPLC を行い、不純物のプロファイルを求めた。図 2A 及び B に、日局バソプレシン標準品及びバソプレシン原薬 A のクロマトグラムを示す。含まれる不純物は微量であった。いくつかのピークは共通して存在したが、そうでないものもあり、そのプロファイルは異なっていた。最も多い不純物も異なっており、それぞれ、1.6%及び1.5%含まれ

ていた。

### 2. バソプレシン (ピトレシン) の LC/UV

次に、合成バソプレシンに含まれる不純物のプロファイルの詳細に明らかにすることを目的に、市販バソプレシン注射剤を用いて HPLC/UV 分析条件の検討を行った。ペプチドの HPLC において、溶離液の添加物として、一般にトリフルオロ酢酸、ギ酸及びリン酸などが用いられている。しかしながら、トリフルオロ酢酸やギ酸などのカルボン酸を含む化合物は紫外部に吸収を持つことから、これらを添加物として用いた場合、微量の不純物を検出することができず不適切であった (データ非表示)。そこで、UPS 法と同様にリン酸緩衝液を用いることとし、より分離を向上させるため、担体の粒子径が 2 $\mu$ m 以下のカラムを用いて分析を行った (図 3)。不純物は非常に少なく、バソプレシンのピーク高さの 0.3 %以下であるが、多数の不純物のピークが認められ、いくつかのピークはバソプレシンのピークに非常に近接していた (図 3B)。グラジエント条件を用いることにより、より分離を向上できる可能性はある。しかしながら、HPLC にてこれらのピークを十分に分離可能な純度試験条件を構築するのは難しいと思われた。

### 3. バソプレシン (ピトレシン) の HPLC/MS

混入する不純物の特性を明らかにする目的で、LC/MS 分析を行った (図 4)。LC/MS においては、不揮発性のリン酸緩衝液は使用できないことから、ギ酸を用いたグラジエント条件を用いて分析を行った。図 4A に、ベースピーククロマトグラムを示す。11~18 分を積算したマススペクトルを 0 価の質量に変換した質量スペクトルを図 4B に示す。バソプレシン (1083.4 Da) のピーク以外に、質量 1066.4 (-17 Da), 1099.4 (+16 Da) 及び 2165.7 (+1082 Da) Da のピークが観測された。それぞれ、アミノ基の脱離、酸化ならびにペプチド分子間の S-S 結合の形成が推測された。酸化体については、図 4A に示すように、複数の溶出時間で溶出しており、酸化部位の違いにより溶出時間が異なることが推測される。以上のことから、現在市販されている合成バソプレシンには、不純物は非常に少なく、主要な不純物は酸化体及び分子間 S-S 結合形成物であることが分かった。そこで、ペプチド合成で製造されたバソプレシンの純度試験においては、これらの物質の含量を評価できる方法であることの必要性が示唆された。

### 3. バソプレシンの試験法に関する考察

#### 1) USP 法による日局バソプレシン標準品 (Lot

## VAS01) の純度試験

日局バソプレシン標準品の不純物プロファイルでは、微量ではあるが多数のピークが観測された。バソプレシン原薬Aのプロファイルと比較したところ、最も多い不純物は異なっていた。含まれる不純物がどの程度生物活性を示すのかにより、バイオアッセイにより求めた生物活性と理化学的試験により求めた生物活性に乖離が生じる可能性がある。従って、定量法をバイオアッセイから理化学的試験に置き換えるには、合成バソプレシンに含まれる不純物のパターンの範囲を明らかにすること、また、純度の高いバソプレシンを用いて代替を検討することが重要であろうと思われた。

## 2) バソプレシン (ピトレシン) の HPLC/UV 及び LC/MS

担体の粒子径が 2 $\mu$ m 以下のカラムを用いた HPLC/UV においてバソプレシンのピークの直前に溶出するピークは、粒子径 3 $\mu$ m 以上の通常のカラムを用いた場合には分離できていないと推察される。この近接したピークは LC/MS による不純物の検討結果から、恐らくバソプレシンの酸化体の一つであると思われる。バソプレシンの純度試験として、その含量を評価できる方法が期待される。また、USP においては、バソプレシンの確認試験に質量分析が用いられている。そこで、バイオアッセイを理化学的試験に置き換える場合には、特異性の高い同一性の確認法として質量分析の設定を検討すべきと思われた。

## D. 結論

- 1) 日局バソプレシン標準品 (Lot VAS01) の不純物プロファイルは、別に測定したバソプレシン原薬のものとは異なっていた。このことは、定量法をバイオアッセイから理化学的試験法に置き換える際に乖離が生じる可能性があることを示唆している。
- 2) HPLC/UV によるバソプレシン不純物試験に用いる溶離液の添加物として、リン酸塩が適していることを確認した。また、合成バソプレシンに含まれる不純物のプロファイルを明らかにし、バソプレシンの純度試験においては、アミノ酸配列の異なるペプチドだけでなく、酸化体及び分子間 S-S 結合形成物の評価が可能な分析法を採用すべきであることが示唆された。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表 原著論文

- 1) Ryosuke Kuribayashi, Noritaka Hashii, Akira

Harazono, Nana Kawasaki: Rapid evaluation for heterogeneities in monoclonal antibodies by liquid chromatography/ mass spectrometry with a column-switching system. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, in press

- 2) S. Nakazawa, N. Hashii, A. Harazono, N. Kawasaki: Analysis of oligomeric stability of insulin analogs using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, 420, 61-67(2012)

### 総説など

- 1) R. Kuribayashi, S. Nakazawa, N. Kawasaki: N-glycan profiling by LC/MS. Glycoscience Protocol Online Database (GlycoPOD). <http://jcgdb.jp/GlycoPOD/protocolListShow.action>
- 2) 川崎ナナ: 抗体医薬品における品質評価の視点. 新機能抗体開発ハンドブック ~次世代抗体創製から産業への展開まで~ 監修 濱窪隆雄. 双文社 東京 2012 印刷中
- 3) 石井明子, 多田 稔, 川崎ナナ: バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ(第5回) バイオ医薬品の生産用基材, *ファームテックジャパン*, 28(6), (2012)
- 4) 新見伸吾, 石井明子, 川崎ナナ: バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ(第4回) バイオ医薬品の不純物の評価(2), *ファームテックジャパン*, 28(4), 113-119 (2012)
- 5) 新見伸吾, 石井明子, 川崎ナナ: バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ(第3回) バイオ医薬品の不純物の評価(1), *ファームテックジャパン*, 28(3), 43-48 (2012)
- 6) 橋井則貴, 原園 景, 川崎ナナ: バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ (第1回) バイオ医薬品の物理的・化学的性質解析の現状, *ファームテックジャパン*, 27(13),99(2633)-104(2638) (2011)
- 7) 橋井則貴, 中澤志織, 川崎ナナ: 再生医療製品の品質評価におけるグライコミクス, *薬学雑誌* 132(4), 395-530 (2012)
- 8) 中澤志織, 橋井則貴, 鈴木琢雄, 多田 稔, 石井明子, 川崎ナナ: バイオ医薬品の品質・安全性に関する最近の話題—特性解析の新しい位置づけと重要性, *レギュラトリーサイエンス学会誌*, 2(1), 21-30 (2012)
- 9) 遊佐敬介, 山口照英, 川崎ナナ: ヒトに感染が疑われているレトロウイルスとウイルス安全性, *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, 42(5), 444-447 (2011)

- 10) 川崎ナナ：『臨床試験に向けたバイオ医薬品の品質管理』，技術情報協会，PHARMSTAGE(東京)，11(10)，4-8 (2012)
  - 11) 中澤志織，橋井則貴，川崎ナナ：『遊離糖鎖のLC/MS 試料分析講座』，印刷中
  - 12) 橋井則貴，石井明子，新見伸吾，川崎ナナ共著：「第1章申請に必要な品質評価試験項目設定でのポイント 第1節申請をふまえた構造・特性解析での押さえ所」「第1章 第2節申請で求められる不純物分析のポイント」，『バイオ医薬品 CMC 申請のための品質評価と申請書作成 実学集』，技術情報協会(東京)，3-18，19-35 (2011)
  - 13) 川崎ナナ：参考情報 ペプチド及びたん白質の質量分析，『日本薬局方技術情報 2011 (JPTI 2011)』(財)日本公定書協会編，じほう(東京)，307-311 (2011)
  - 14) 石井明子，川崎ナナ：バイオシミラー医薬品の各国ガイドラインについて -日本におけるバイオ後続品の位置付け及び海外との比較，『透析療法ネクスト XI 新しい腎性貧血治療薬-EPO バイオシミラー』，秋葉隆，秋澤忠男編集，医学図書出版，22-36 (2011)
2. 学会発表
- 1) R. Kuribayashi, N. Hashii, A. Harazono, N. Kawasaki: Assessment of the glycan heterogeneity of monoclonal antibodies by LC/MS with a column-switching system: Application for process analytical technology., 8<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceuticals, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, (Mar. 19-22, 2012), Istanbul, Turkey
  - 2) A. Harazono, N. Hashii, N. Kawasaki: Comparison of mass spectrometric glycoform profiles of innovator and biosimilar erythropoietin product, USP Science & Standards Symposium on Biologics & Biotechnology, (Oct. 3-6, 2011), Seattle, USA
  - 3) 川崎ナナ：バイオ医薬品開発動向と課題. 日本薬学会第 132 年会シンポジウム(2012, 3,28-31) 札幌
  - 4) 橋井則貴，原園 景，栗林亮佑，中澤志織，川崎ナナ：液体クロマトグラフィー/質量分析及び主成分分析によるエリスロポエチン製剤先行品及び後続品の糖鎖プロファイル類似性評価. 日本薬学会第 132 年会 (2012, 3,28-31) 札幌
  - 5) 栗林亮佑，橋井則貴，原園 景，川崎ナナ：カラムスイッチング法を用いた液体クロマトグラフィー/質量分析法による抗体医薬品の糖鎖不均一性解析技術の開発，プロセス解析工学の開発. 日本薬学会第 132 年会 (2012, 3,28-31) 札幌
  - 6) 原園 景，橋井則貴，栗林亮佑，川崎ナナ：質量分析によるエポエチン先行品と後続品のグリコフォームプロファイルの比較. 第1回レギュラトリーサイエンス学会学術集会(2011, 9, 2-3) 東京
  - 7) 栗林亮佑，橋井則貴，原園 景，川崎ナナ：カラムスイッチング法を用いた LC/MS によるバイオ医薬品の糖鎖不均一性解析技術の開発. 第1回レギュラトリーサイエンス学会学術集会(2011, 9, 2-3) 東京
- F. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

表1 各条バソプレシン注射液の問題点

項目	第十六改正	問題点	方策
基原	本品は健康なウシ又はブタなどの脳下垂体後葉から大部分の子宮収縮成分のオキシトシンを除いて得た血圧上昇成分のバソプレシン又は合成によって得たバソプレシンを含む。	現在は合成のみ。	市場調査後、脳下垂体部分を削除し、合成のみとする。
製法	本品は脳下垂体後葉から得たバソプレシン部分又は合成によって得たバソプレシンをとり、注射剤の製法により製する。	同上	同上
純度試験	<p>次の方法により試験を行うとき、子宮収縮成分の量は、定量された10バソプレシン単位につき0.6オキシトシン単位以下である。</p> <p>標準溶液は、オキシトシン標準品に薄めた酢酸を加えた標準原液に生食液を加え0.020オキシトシン単位/mL含むように調製し、試料溶液は、本品の定量されたバソプレシン単位の6/100の単位を求めオキシトシン単位と仮定し、注射液に生食液を加え仮定した0.020オキシトシン単位/mLを含むよう調整する。摘出子宮収縮実験装置を用い、マグナス容器を用いて子宮を懸垂する。幼時から雄を見ないように、更に雄の体臭をも感じさせないように分けて飼育した175～350gの発情期でない健康な処女モルモットの頭を打って殺し、直ちに子宮を摘出・懸垂し、子宮が十分伸びきったとき、子宮収縮試験を始める。</p> <p>標準溶液による子宮収縮の高さの平均は、試料溶液による子宮収縮の高さの平均に等しいか、又はそれより大きい。また、25%増量した標準溶液による子宮の収縮の高さは定量の標準溶液による子宮収縮の高さより明らかに高い。</p>	<p>オキシトシンは、下垂体由来バソプレシンの場合に想定される製造工程由来不純物であるが、合成バソプレシンの場合は不要である。</p> <p>合成過程で生じる目的物質関連物質、目的物質由来不純物に対応していない。</p> <p>動物愛護の観点から無用な試験は実施すべきではない。</p>	<p>全文削除。</p> <p>合成バソプレシンに混在している不純物等を同定し、理化学的試験法を策定する。</p>
定量法	<p>標準溶液は、バソプレシン標準品に薄めた酢酸を加えた標準原液に生食液を加え薄め、薄めた液0.2mLを試験動物に注射したとき血圧が35～60mmHg上昇するように調節し、これを高用量標準溶液SHとする。更にこの液を生食液で1.5～2.0倍容量に薄めたものを低用量標準溶液SLとする。試料溶液は、SHと等しい単位数を等容量中に含むように本品に生食液を加えて薄め、これを高用量試料溶液THとする。更にこの液を生食液で1.5～2.0倍容量に薄め、低用量標準溶液TLとする。ただし、SHとSLとの濃度比はTHとTLとの濃度比に等しくする。</p> <p>体重200～300gの健康な雄のシロネズミに麻酔をし、気管にカニューレを挿入して人工呼吸を行い、第二頸椎骨の一部を除き、脊髄を切断し、大後頭孔を経て脳髄を破壊する。股静脈には生食液を満たしたカニューレを挿入し、ヘパリンナトリウムに生食液を加えて溶かした液をこのカニューレを経て注射し、直ちに生食液で流し込む。次に頸動脈にカニューレを挿入し、ビニール管を用いて血圧マンメーターに連結する。あらかじめ、カニューレとビニール管には生食液を満たしておく。一定の時間を置いて標準溶液及び試料溶液をカニューレを経て静脈に注射し、キモグラムの血圧の上昇値を1mmHgまで測定する。注射順位はSH, SL, THおよびTLを用いて4対(第1対SH, TL, 第2対SL, TH, 第3対TH, SL, 第4対TL, SH)を作り、各対中では示された順序とし、各対の順位は無作為とする。この試験は同じ試験動物を用いて4対をもって1組の試験とし、通例、2組で行う。ただし、各組については異なった試験動物を使用してもよい。</p> <p>各組の各対における高用量及び低用量の起こした血圧上昇の差をもとに計算し、本品1mL中の単位数を求める。</p>	<p>オキシトシンはHPLCに変更されている。</p> <p>USPもHPLCである。</p> <p>動物愛護の観点から理化学的手法に変更すべきである。</p>	<p>HPLCに変更する。そのためには、強制劣化サンプル等を用いた、現行のバイオアッセイ法とHPLC法の相関性の確認が必要である。</p>