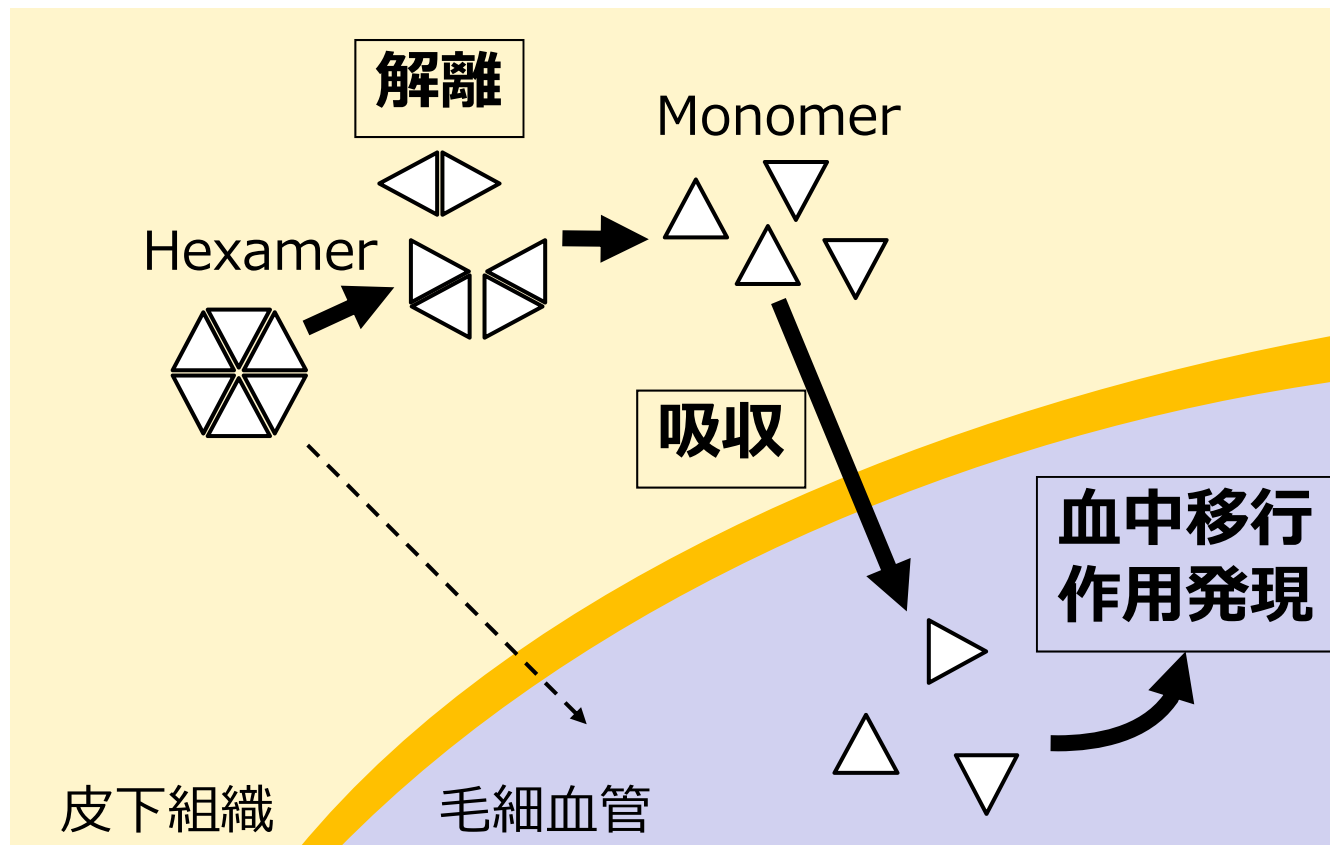




# 水素/重水素交換質量分析法を 用いたバイオ医薬品の 高次構造解析

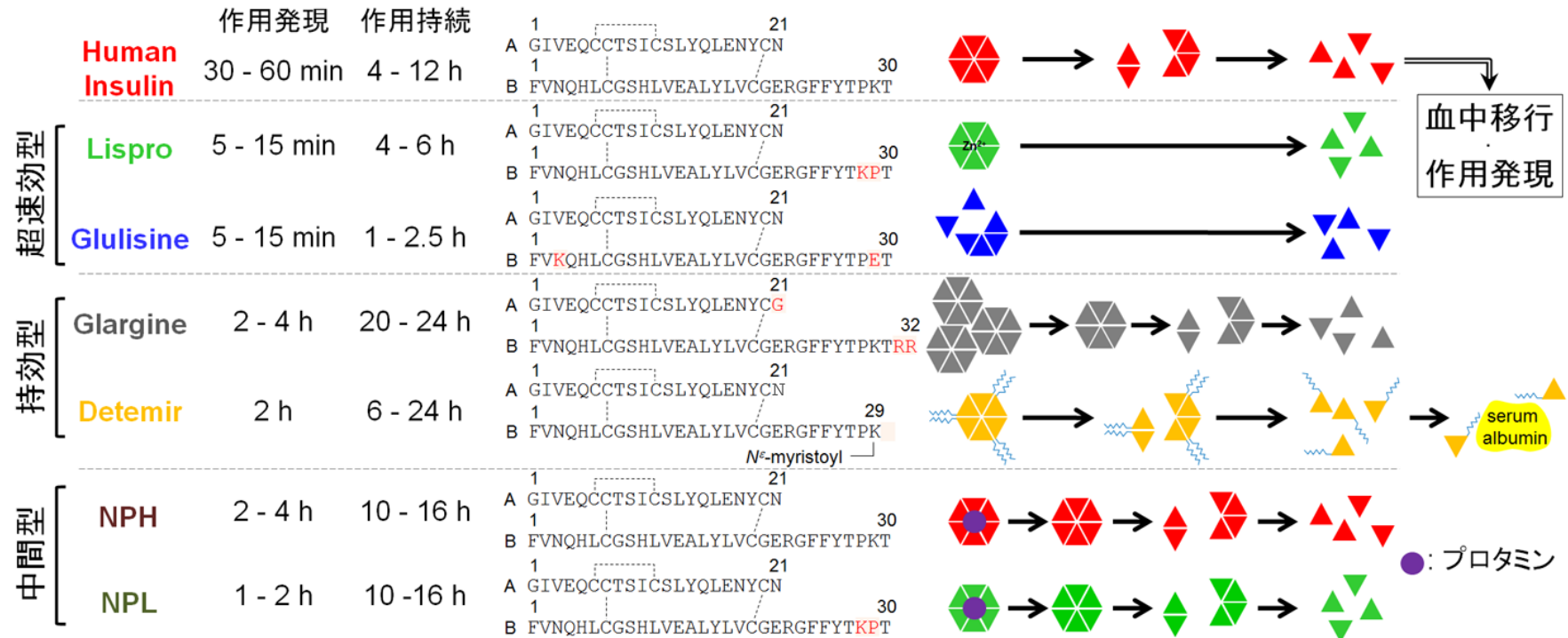
中澤志織 橋井則貴 川崎ナナ  
国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部  
(連携) 北海道大学大学院生命科学院

# 質量分析 (MS) によるインスリン作用 発現時間・持続時間予測



多量体安定性は、インスリンの作用の発現と持続を左右する重要なファクター

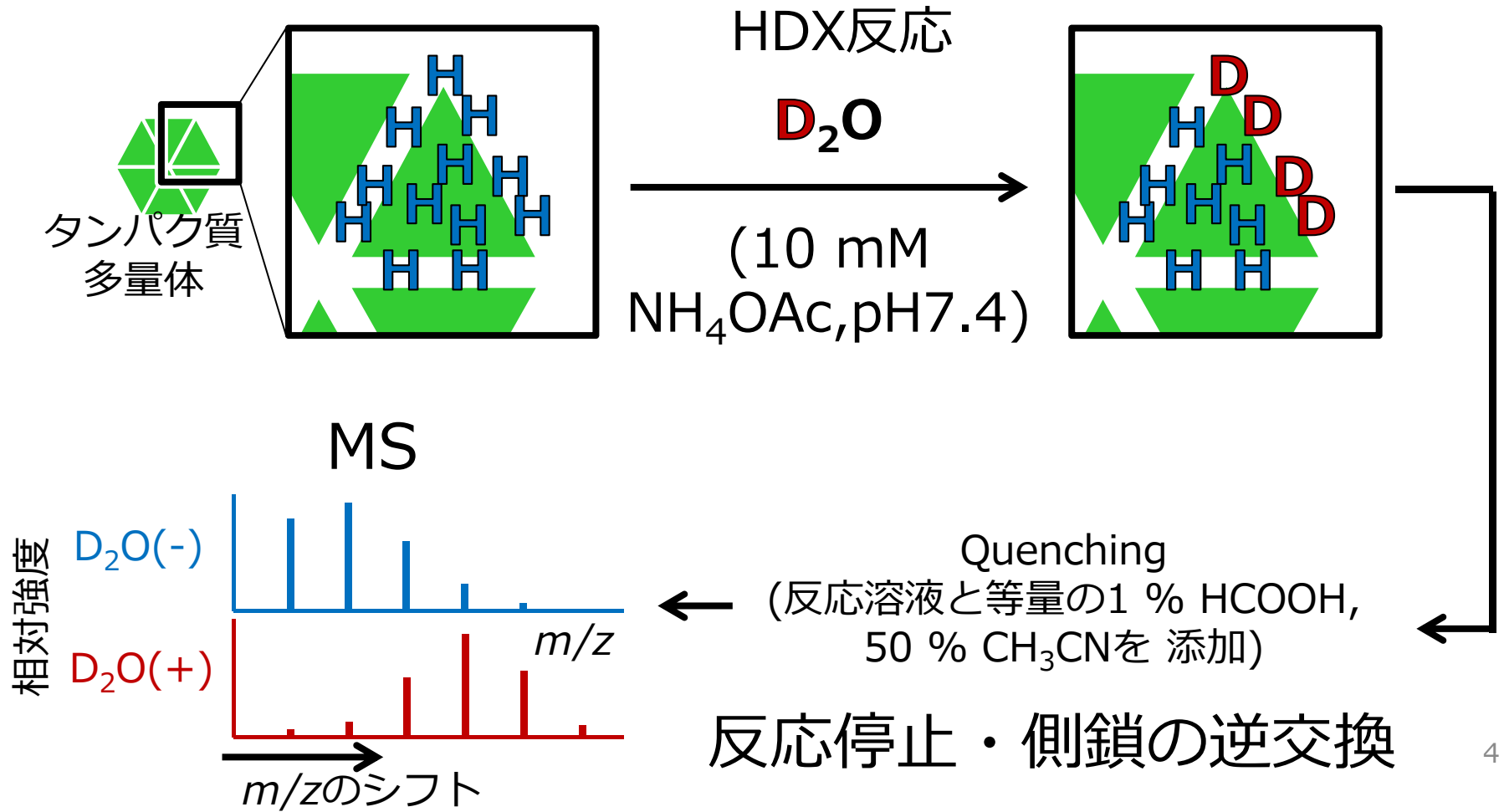
# インスリンアナログ製剤と多量体安定性



- 分子の多量体安定性が作用の発現と持続性を左右
- 作用時間の発現と持続性は動物モデルを用いて評価
- 分子の多量体安定性を評価できれば、作用発現・持続時間を予測できる

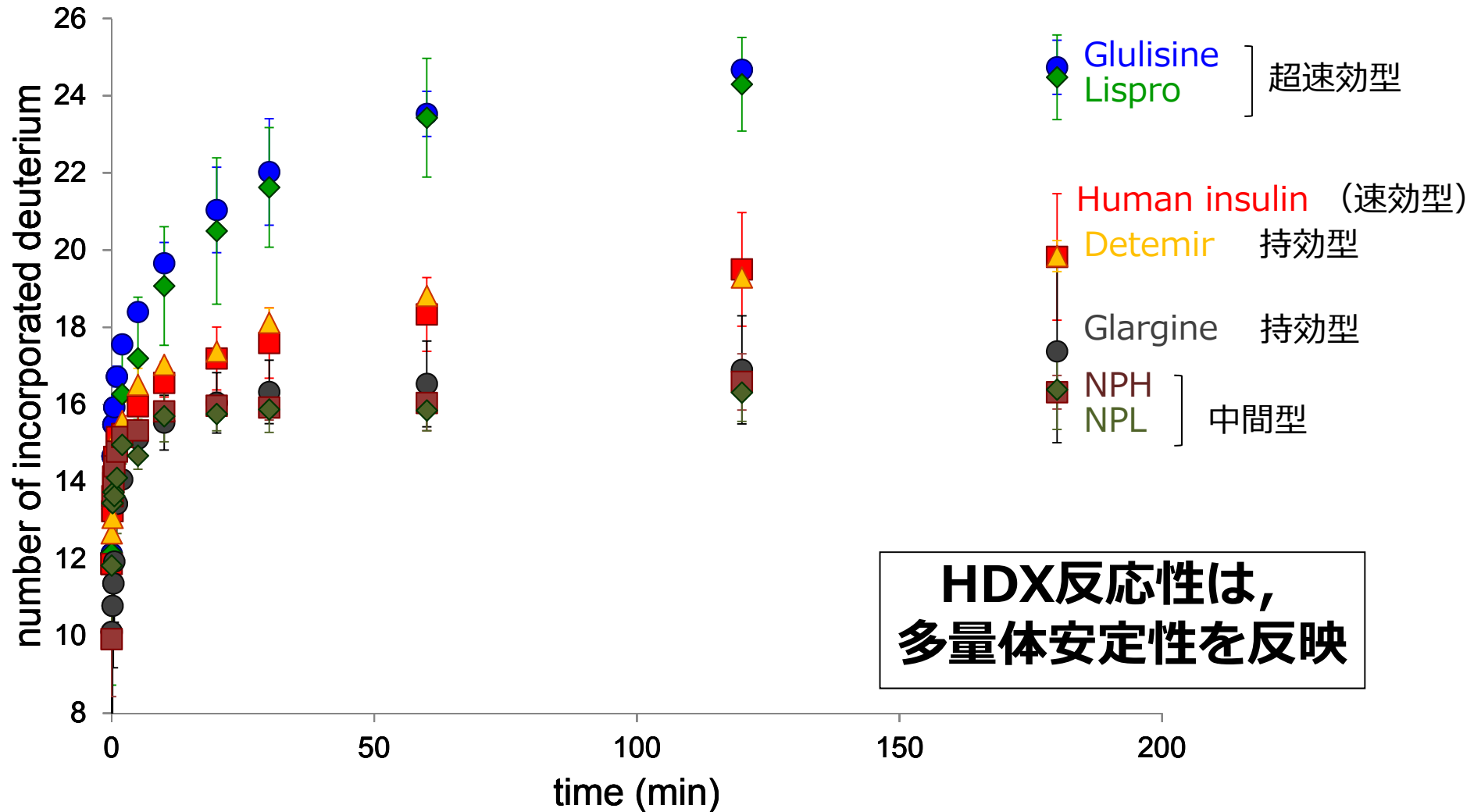
# 水素重水素交換/MS(HDX/MS)による多量体安定性解析

HDX: hydrogen/deuterium exchange



# インスリンアナログ製剤のHDX/MS

S. Nakazawa *et al.* Anal. Biochem., 420, 61-67, 2012



**HDX反応性は、  
多量体安定性を反映**

# インスリンアナログ製剤の多量体安定性解析

## HDXパラメータ

### 水素交換数

|               | $D_{\infty}$ | $D_s$ | $D_m$ | $D_f$ |
|---------------|--------------|-------|-------|-------|
| Human insulin | 20.3         | 3.9   | 1.5   | 3.0   |
| Lispro        | 24.5         | 7.3   | 2.6   | 2.5   |
| Glulisine     | 24.7         | 7.2   | 2.6   | 2.8   |
| Glargine      | 18.0         | 2.0   | 1.8   | 4.2   |
| Detemir       | 19.9         | 3.3   | 1.6   | 2.5   |
| NPH           | 16.4         | 1.0   | 1.8   | 3.6   |
| NPL           | 16.9         | 1.3   | 2.0   | 1.8   |

$$D_t = D_{\infty} - D_f \cdot \exp(-k_f t) - D_m \cdot \exp(-k_m t) - D_s \cdot \exp(-k_s t)$$

$D_t$ : 反応開始からt min後の交換数

$D_{\infty}$ : 最大交換数

$D_f/D_m/D_s$ , 交換速度が速い/中間/遅い水素数 ( $k > 1.0$ ,  $0.1 < k \leq 1$ ,  $k \leq 0.1$ )

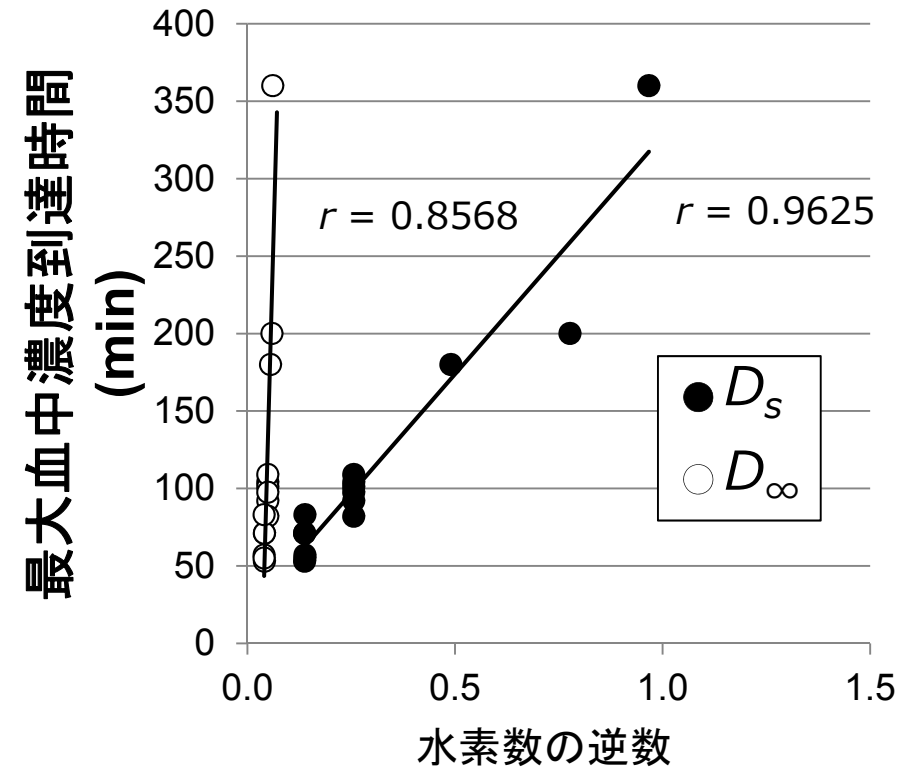
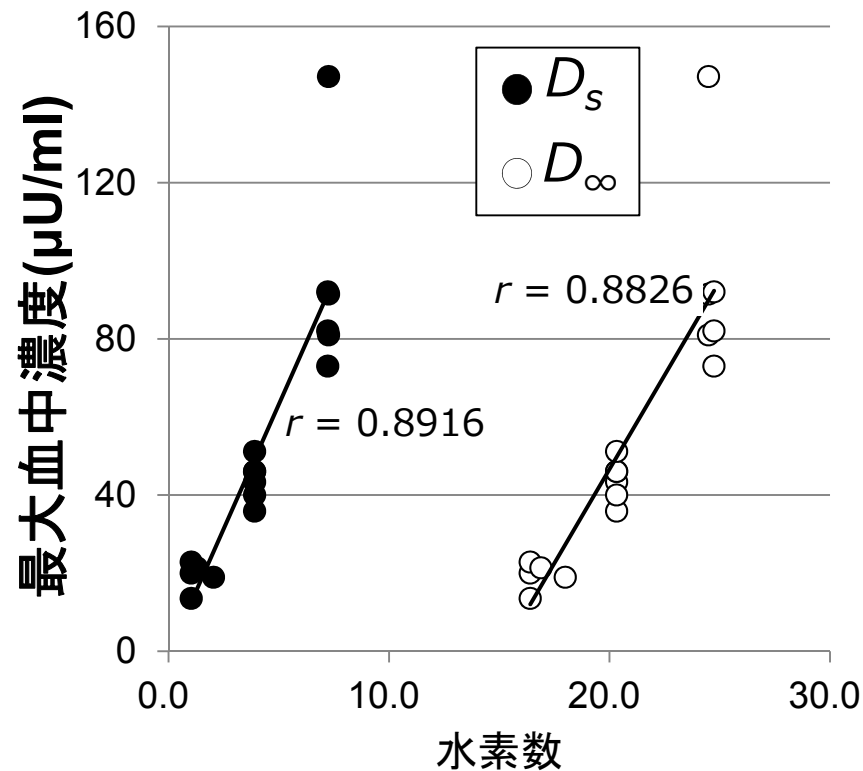
$k_f/k_m/k_s$ : 各群の水素の反応速度定数( $\text{min}^{-1}$ )

6



# インスリンアナログ製剤の多量体安定性解析

HDXパラメータと最大血中濃度 ( $C_{max}$ )  
及び最大血中濃度到達時間( $t_{max}$ ) の相関性



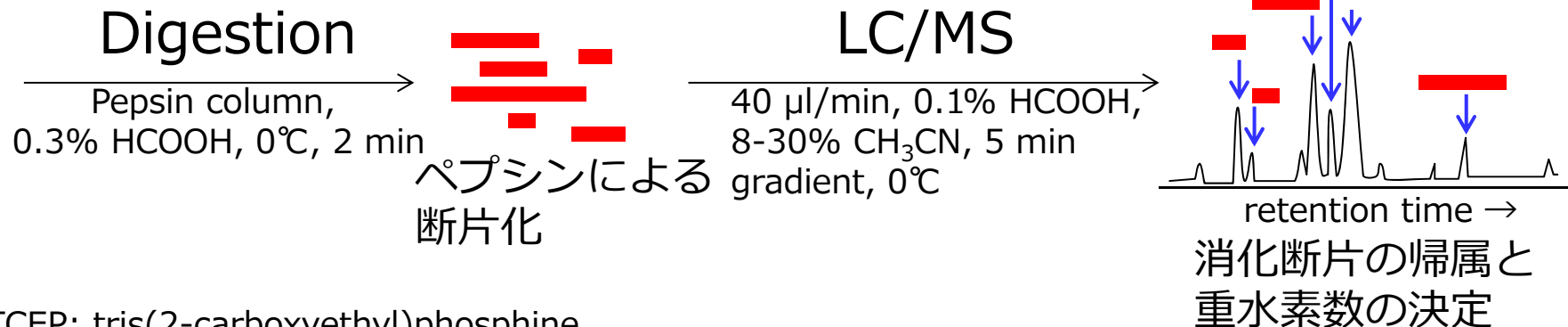
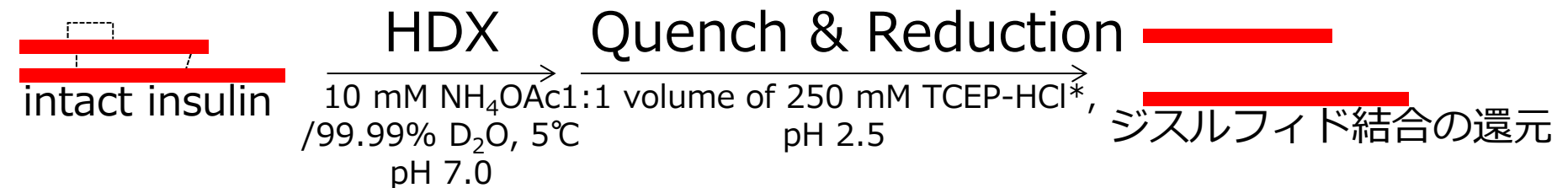
# 重水素化したタンパク質のペプチドマッピング

いずれの領域の、  
どのような高次構造上の差異に由来するか？



重水素分布を調べるためペプチドマッピングを行った。

ペプチドマッピングの概要



\*TCEP: tris(2-carboxyethyl)phosphine

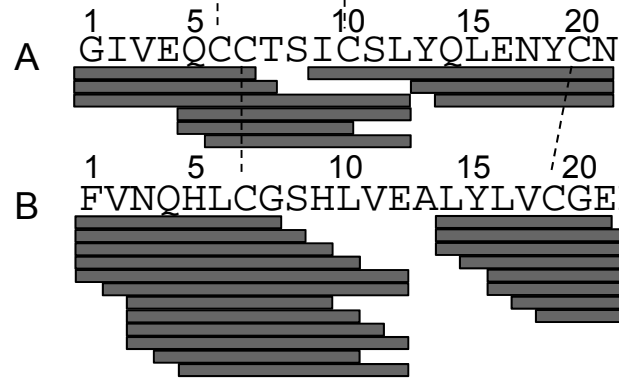




# インスリンアナログ製剤のペプチドマッピング

S. Nakazawa *et al.* Biochim. Biophys. Acta, 1834, 1210-1214, 2013

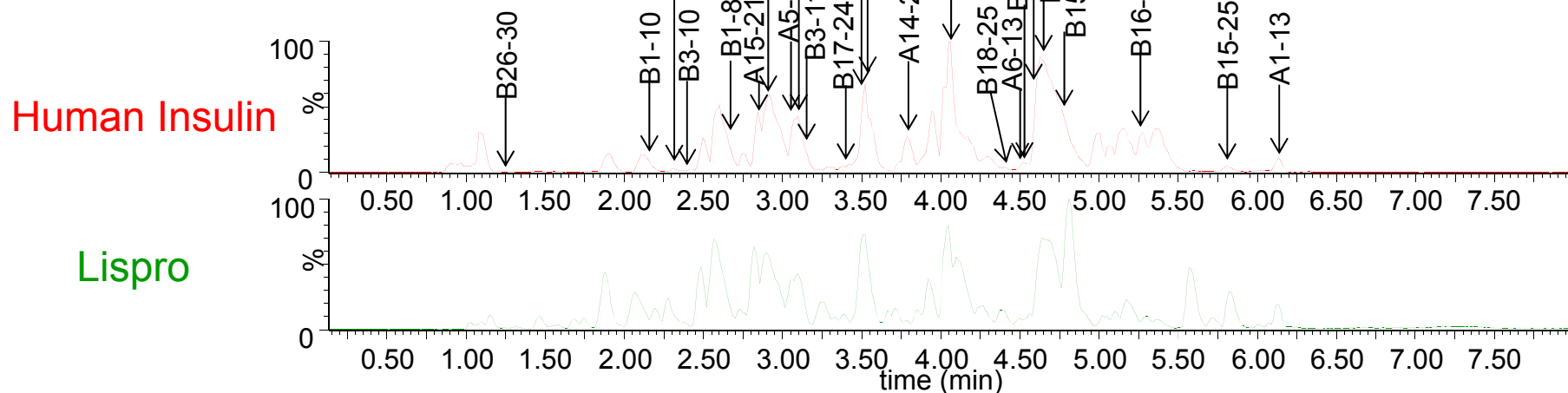
作用発現時間



PK Human insulin (速効型) 0.5~1 h

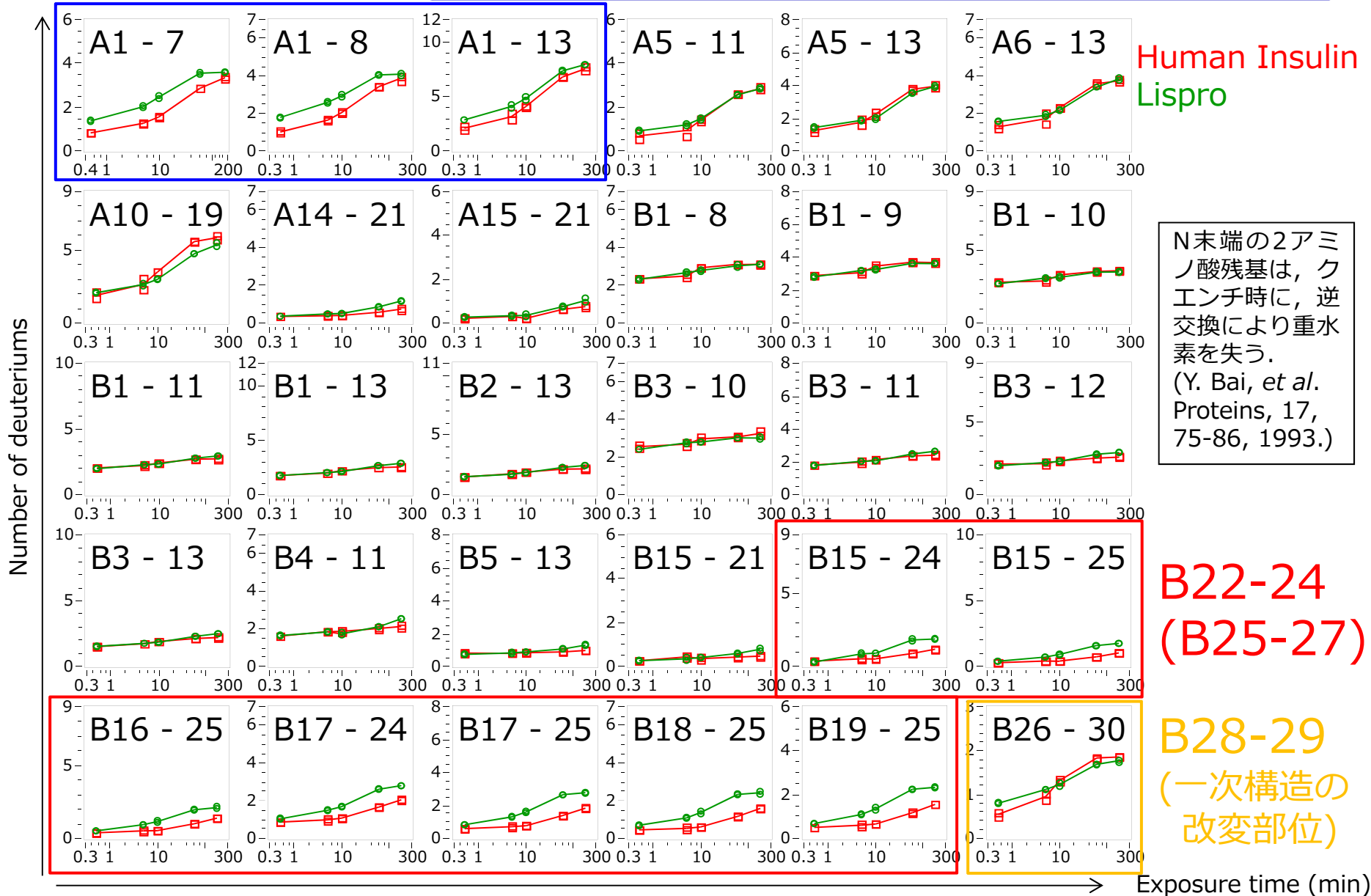
KP Lispro (超速効型) 5~15 min

Total ion current chromatograms

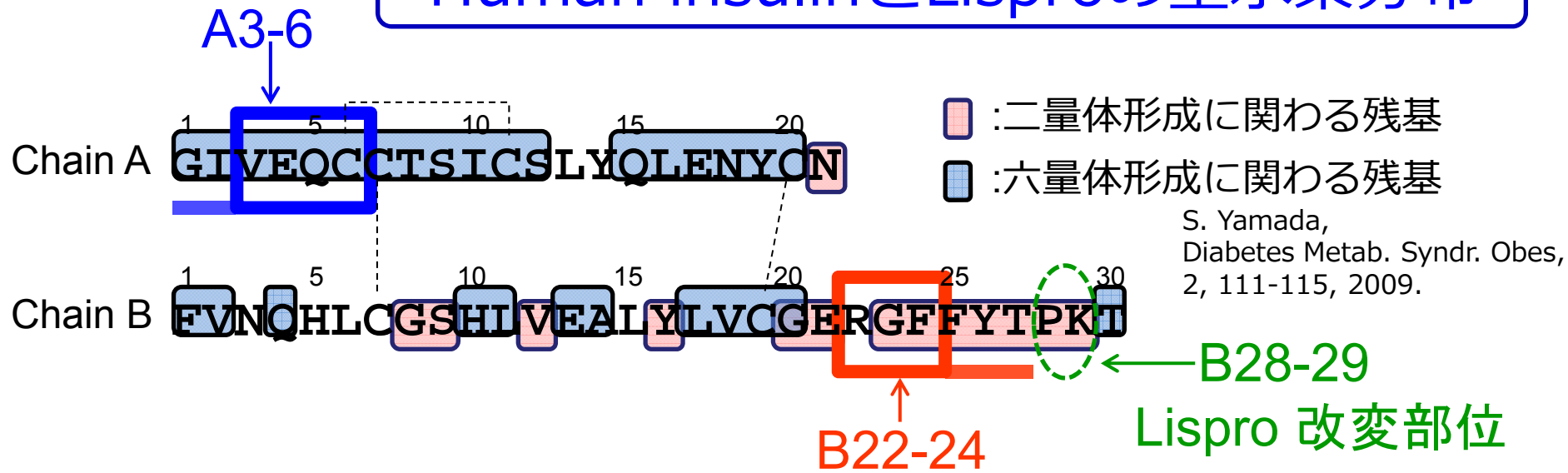


A3-6(A1-2)

# Human insulinとLisproの重水素分布



# Human insulinとLisproの重水素分布



A3-6, B22-24は、改変部位に近い

