

## 【原著・基礎】

## Doripenem のヒト dehydropeptidase-I に対する安定性

山野 佳則・川井 悠唯・湯通堂 隆

塩野義製薬株式会社創薬研究所\*

(平成 17 年 1 月 24 日受付・平成 17 年 3 月 18 日受理)

新規注射用カルバペネム系抗菌薬 doripenem のヒト腎 dehydropeptidase-I (DHP-I) に対する安定性を検討した。既存カルバペネム系抗菌薬である imipenem は DHP-I に不安定であるため、DHP-I 阻害薬であるシラスタチンとの合剤として臨床で用いられており、カルバペネム系抗菌薬のヒトにおける体内動態を評価するうえでは、DHP-I 安定性は重要な位置づけとされている。

本研究においては、COS-1 細胞で高発現後、シラスタチンをカップリングしたアフィニティークロマトグラフィーによって精製したヒト腎由来 DHP-I 組換え蛋白を用いて、doripenem の分解活性を評価した。精製蛋白は、SDS ポリアクリルアミド電気泳動によりほぼ単一のブロードなバンドを示したことから、糖蛋白として産生されていることが示唆された。

組換えヒト腎 DHP-I を用いた安定性試験において、imipenem は濃度に依存した速やかな分解が観察された。DHP-I 存在下で imipenem を 90 分培養した時の残存活性が 20% となるような条件下で、ヒト DHP-I に対する安定性が高いことが報告され臨床では単剤で使用されているカルバペネム系抗菌薬 meropenem は 80% 程度の高い残存活性を示した。新規カルバペネム系抗菌薬 doripenem も meropenem と同程度の高い DHP-I 安定性を有することが示されたことから、ヒト体内において単剤で高い安定性を有することが示唆された。

**Key words:** doripenem, dehydropeptidase-I

Doripenem (DRPM) は新規カルバペネム系抗菌薬であり、きわめて強い抗緑膿菌活性とともに、広い抗菌スペクトルを有する。一般的に、カルバペネム系抗菌薬のヒトにおける体内動態を予測するうえで、ヒト腎臓に存在する dehydropeptidase-I (DHP-I) に対する安定性は重要と考えられている<sup>1)</sup>。例えば、カルバペネム系薬剤の一つである imipenem (IPM) は、ヒトを含む各種動物の腎に多く存在する DHP-I に対する安定性が低いため、生体内において速やかに分解することが報告されている。したがって、生体内での DHP-I による分解を防いで薬効をより強く示すために、臨床においては DHP-I 阻害薬であるシラスタチンとの合剤という形で用いられている<sup>1)</sup>。一方、meropenem (MEPM) は、ヒト腎由来 DHP-I に対する安定性が高いため、単剤として臨床でも有効性を発揮できることが報告されている<sup>2)</sup>。本研究においては、DRPM のヒト DHP-I に対する安定性を評価することによって、DRPM が臨床において単剤で使用できる程度の安定性を有していることを明らかとした。

## I. 材料と方法

### 1. 使用薬剤

DRPM は、塩野義製薬において合成されたものを使用した。MEPM は住友製薬、IPM は U.S. Pharmacopeia 社よ

り入手した。いずれも力価が明らかなものを使用した。

### 2. ヒト DHP-I 高発現用ベクターの構築

ヒト DHP-I 遺伝子 (GenBank 登録 No. J05257, NM004413)<sup>3)</sup> の翻訳領域に相当する 1233 bp を含む遺伝子断片を、PCR により増幅した。PCR を行う際の鋳型 DNA は Human MTC™ Panel I (Clontech 社) に含まれているヒト腎由来 cDNA、酵素は KOD dash (TOYOBO) を用いた。増幅した遺伝子断片を発現ベクター pcDNA 3.1+ (Invitrogen 社) の CMV promoter 下流に挿入して、ヒト DHP-I 高発現用ベクターを構築した。

### 3. ヒト DHP-I の精製

Campbell らの報告<sup>4)</sup> に準じて、以下のようにシラスタチンをカップリングさせたアフィニティークロマトグラフィー用のゲル単体を調製した。1 mM HCl 中で膨潤・洗浄した CH-Sepharose 4B ゲル (Amersham Bioscience) を、カップリング用の緩衝液である 0.5 M NaCl を含有する 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.0) 中に溶解した 15 mg/mL シラスタチン溶液と混合後、2 時間室温で反応させて、シラスタチンをカップリングさせた CH-Sepharose 4B ゲルを調製した。

組換えヒト DHP-I の調製は、Adachi ら<sup>5)</sup> の報告に準じ

\*大阪府豊中市二葉町 3 1 1

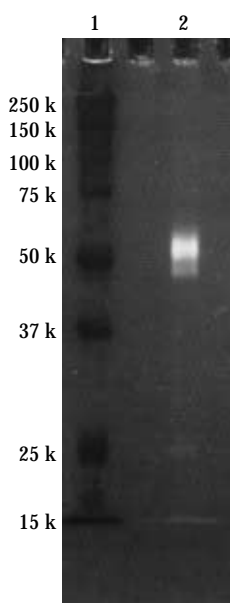


Fig. 1. SDS-PAGE profile of purified recombinant human DHP-I. Lane 1: Molecular weight marker ( Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad ) lane 2: purified recombinant human DHP-I.

て、以下のように実施した。2. で構築したヒト DHP-I 高発現用ベクターをトランスフェクションした COS-1 細胞(大日本製薬)を 5% Triton X-100 中で 4 一晩処理することによって可溶化した後、 $31,000 \times g$ , 20 分間遠心し、上清を DHP-I 含有粗酵素液として回収した。

シラスタチンをカップリングさせた CH-Sepharose 4B ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、粗酵素液からヒト DHP-I を精製した。シラスタチンに結合した DHP-I は 0.5 mg/mL のシラスタチンにより溶出し、透析によって溶出液からシラスタチンを除去した。

#### 4. DHP-I 活性の測定

DHP-I の基質である glycyl dehydrophenylalanine (GDPA) の分解速度を測定することによって、DHP-I の活性を算出した<sup>4)</sup>。50  $\mu$ M の GDPA (pH 7.5) に酵素を添加後、37 で 10 分間反応させ、終濃度 10% となるように酢酸を添加して反応を停止させた。Ab275 を測定することによって、反応前後の GDPA 量を算出し、GDPA 分解速度を求めた。1 分間に 1  $\mu$ mol の GDPA を分解する活性を 1 unit と定義して、DHP-I 活性を求めた。

#### 5. カルバペネム系薬の DHP-I に対する安定性試験

DRPM, MEPM, IPM を 200  $\mu$ g/mL 含有する溶液に、10 mM Tris-HCl (pH 7.5) で希釈調製した酵素溶液を等量加え、37 で反応させた。30, 60, 90 分間経過時に分取した反応液と等量の氷冷エタノールを加えて反応を停止させた。反応停止液中に含まれる各カルバペネム系薬の含量を、band-culture 法によって測定した。

#### 6. band-culture 法による化合物濃度の測定

寒天以外の構成成分を規定されている 1/2 濃度で調製した Mueller Hinton Agar (Becton Dickinson) に、感受性変異株である *E. coli* 7437 株を約  $1 \times 10^6$  cfu/mL 加えた培地を用いて、band-culture 法による濃度測定を実施した。数段階に希釈した試験溶液により生ずる試験菌の生育阻止帯長を測定し、試験溶液中の濃度を測定した。

#### 7. DHP-I 標品の純度の測定

精製した DHP-I 標品の純度は、sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide ゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって確認した。Laemmli らの報告<sup>6)</sup>に従って SDS-PAGE を実施後、以下に示すように Sypro Ruby (Bio-Rad) を用いて蛋白質を染色した。電気泳動の終了したゲルを 10% 酢酸 40% メタノール中で固定、Sypro Ruby 溶液中で 2 時間染色した後、6% 酢酸 10% メタノール中で洗浄し、UV トランスイルミネーター (TOYOBO) によりゲル上の蛋白を検出した。

## II. 結 果

### 1. ヒト DHP-I の精製

ヒト DHP-I 高発現用ベクターを COS-1 細胞にトランスフェクション後、10% の fetal bovine serum を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (SIGMA) 中で培養した同細胞の 100 mL 培養液より回収した細胞を 5% Triton X-100 中で処理することによって、DHP-I 活性を有する粗酵素液を調製した。粗酵素液を用いてアフィニティークロマトグラフィーによりヒト DHP-I を精製した結果、1.2 unit/mL の DHP-I 活性を有する精製酵素液 3 mL を獲得した。

精製酵素を SDS-PAGE で分離し Sypro Ruby で染色した結果、90% 以上の高い純度で、分子量が約 62 kDa に相当するややブロードなほぼ単一のバンドを示した (Fig. 1)。

### 2. DRPM の DHP-I に対する安定性

0.17 unit/mL と 0.5 unit/mL の 2 段階の濃度を有する組換えヒト DHP-I 酵素溶液を用いて、DRPM, MEPM, IPM の安定性を調べた。

IPM については、酵素添加量に依存した濃度低下が観察され、いずれの酵素濃度においても時間依存的に反応液中の IPM 濃度が減少した。90 分反応時においては、0.17 unit/mL のヒト DHP-I 存在下で反応前に比べて 50.4% の残存濃度、0.5 unit/mL のヒト DHP-I 存在下では 23.2% の残存濃度にまで減少した。

一方、DRPM については、0.17 unit/mL のヒト DHP-I 存在下で 90 分反応時に 87.5%、0.5 unit/mL のヒト DHP-I 存在下では 82.4% の高い残存濃度を維持していた。MEPM については、0.17 unit/mL および 0.5 unit/mL のヒト DHP-I 存在下での残存率はそれぞれ 79.1%、78.1% であり、DRPM のヒト DHP-I に対する安定性は MEPM と同程度以上に高いことが示された (Fig. 2)。

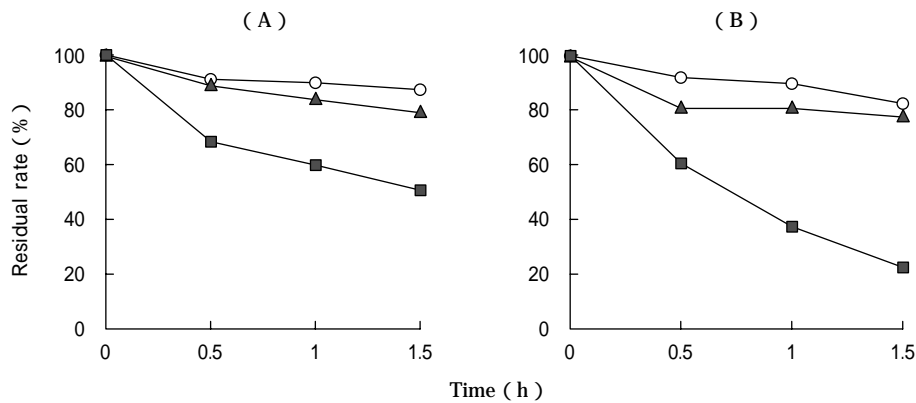


Fig. 2. Stability of doripenem against human DHP-I. Residual doripenem (■), meropenem (○) and imipenem (▲) are shown as the percentage after incubation at 37 °C in the presence of 0.17 unit/mL (A) or 0.5 unit/mL (B) of human dehydropeptidase-I.

### III. 考 察

本研究で用いたヒト DHP-I 組換え蛋白を SDS-PAGE にて解析した結果、既報告<sup>3)</sup>と同様に GDPA の分解活性を有するとともに、約 62 kDa の分子量に相当する位置に検出できたこと、ブロードなバンドを示したことが観察された。以上の結果より、既報告と同様に、本研究で精製した組換えヒト DHP-I は糖蛋白として産生されていることが示唆された。

ヒト組換え DHP-I を用いた安定性試験の結果、IPM は容易に分解されるものの DRPM は MEPM と同程度の高い安定性を有していることが本研究より示された。IPM は DHP-I に安定性が低いため DHP-I 阻害薬であるシラスタチンと併用して用いられているのに対して、MEPM はヒト DHP-I に対する安定性が IPM に比べて高いため臨床においては単剤として用いられている<sup>2)</sup>。したがって、MEPM と同程度以上の高い安定性を有する DRPM は、単剤として利用できる有用性の高いカルバペネム系薬剤であることが示された。

### 謝 辞

本研究を実施するにあたり協力いただいた塩野義製薬株式会社創薬研究所・石崎順博士、菊池典久博士、中村悦男氏に、シラスタチンアフィニティーカラムの作製および DHP-I 高産生細胞の構築において、多大な協力をいただいたことを深謝いたします。

### 文 献

- 1) Mouton J W, Touw D J, Horrevorts A M, et al: Comparative pharmacokinetics of the carbapenems. *Clinical implications*. *Clin Pharmacokinetic* 39: 185 ~ 201, 2000
- 2) Mouton J W, van den Anker J N: Meropenem clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinetic* 28: 275 ~ 286, 1995
- 3) Adachi H, Tawaragi Y, Inuzuka C, et al: Primary structure of human microsomal dipeptidase deduced from molecular cloning. *J Biol Chem* 265: 3992 ~ 3995, 1990
- 4) Campbell B J, Forrester L C, Zahler W, et al:  $\beta$ -Lactamase activity of purified and partially characterized human renal dipeptidase. *J Biol Chem* 259: 14586 ~ 14590, 1984
- 5) Adachi H, Katayama T, Inuzuka C, et al: Identification of membrane anchoring site of human renal dipeptidase and construction and expression of a cDNA for its secretory form. *J Biol Chem* 265: 15341 ~ 15345, 1990
- 6) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 259: 680 ~ 685, 1970
- 7) Fukasawa M, Sumita Y, Harabe E T, et al: Stability of meropenem and effect of 1 $\beta$ -methyl substitution on its stability in the presence of renal dehydropeptidase I. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 1577 ~ 1579, 1992

## Stability of doripenem against human renal dehydropeptidase-I

Yoshinori Yamano, Yui Kawai and Takashi Yutsudo

Discovery Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.,  
3 1 1 Futaba-cho, Toyonaka, Osaka, Japan

We evaluated the stability of doripenem, a novel carbapenem antibiotic, against human renal dehydropeptidase-I ( DHP-I ). Because imipenem, a carbapenem antibiotic, was reported to be easily hydrolyzed by human DHP-I, it is used in the clinic combined with DHP-I inhibitor cilastatin, so stability against human DHP-I plays an important roles in the human pharmacokinetics of carbapenem antibiotics.

We evaluated stability against DHP-I using recombinant human renal DHP-I, purified by cilastatin-coupled affinity chromatography from COS-1 cells producing DHP-I. Purified DHP-I was shown to form a broad single band in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, suggesting that it was produced as a glycosylated protein in COS-1 cells.

Stability was observed by determining the residual activity of the carbapenem antibiotics after incubation for 90 min in the presence of purified DHP-I. The residual activity of imipenem decreased with increasing activity of purified DHP-I. The residual activity of imipenem and meropenem after incubation with purified DHP-I was 20% and 80%, suggesting that meropenem, which is used without a DHP-I inhibitor in the clinic, is highly stable against DHP-I. Doripenem was as stable as meropenem under the same conditions, suggesting that doripenem and meropenem could be used without a DHP-I inhibitor in the clinic.