

FDAは異常行動とタミフルとの関連を実質的に認め警告

浜 六郎*

FDAの11月13日の警告

FDAは2006年11月16日の小児薬剤諮問委員会¹⁾の開催前の2006年11月13日、タミフルに関して、以下のような警告を発した²⁾。

ロシュ社とFDAは小児科医・初期治療にあたる医師・薬剤師、患者に対し、タミフルの処方情報の「警告/神経精神系イベント」と「患者への情報」欄に改訂があったことを通知した。

タミフルはインフルエンザ発症後2日間以内の1歳以上の合併症のない急性インフルエンザ感染治療と、1歳以上のインフルエンザ予防に適応とされている。タミフルを服用したインフルエンザ患者の自傷行為やせん妄の市販後報告が寄せられている(大半の報告は日本から)。インフルエンザ患者、とくに子どもはタミフル服用のすぐ後に自傷行為や精神錯乱の危険性が高まる可能性があり(may be at an increased risk of---), 異常行動の兆候がないか注意して監視するべきである(should be closely monitored for sign of unusual behavior)。タミフル服用後に異常行動の兆候があった場合、直ちに専門家に連絡をすべきである(should be contacted immediately)。

FDAのこの添付文書の変更は、日本の添付文書の記載とはほぼ同じにしたということであるが、今回の措置をとった理由を9月20日付けFDAのDDRE (Division of Drug Risk Evaluation 医薬品のリスク評価部門)による報告書(抗ウイルス製剤部門に対して評価結果を報告したTamiflu AE review 2006 Memorandum)³⁾でみると、事態を相当深刻に受け止めての措置であることがわかる。

因果関係を実質的に認めたDDREの報告書

Memorandum³⁾では、2005年12月16日にレビューをしてから10か月の間に神経精神症状系有害事象の報告が増加したことをまず指摘。そこで、05年8月から06年7月6日までに報告されたタミフル使用後の神経精神症状系の有害事象129例と、それまで(1999年~2005年

8月29日まで)に報告されていた126例とを比較した。今期の129例については、種々の理由(他の原因の可能性が高いなど)で26例を除いた103人を解析の対象とした(表1)。

103例中、日本からが95例、米国5例、ドイツ2例であった。成人も加えた処方件数あたりでは日本からの報告が多いように見えるが、小児に対する処方件数は、日本が米国の10倍以上であるため、小児の処方件数で比較すると多少多い目であるが、有意の差とは言えない。

年齢では5歳以下が7例、6歳から11

歳が40例、12歳から16歳が21例(16歳以下68例)、20歳までが8例、21歳以上の成人は27例であった。性別では男性が69人、女性32人であった。

FDAでは、分析を容易にするために、症状別に8つに分類している(表1)。最も多いのが、異常行動を伴う「せん妄」60例、自殺関連事象6例、パニック発作3例、delusion 3例、痙攣12例、意識レベル低下6例、意識消失4例、その他9例であった。

重症度と転帰については、死亡例が3例(日本からが2例、シンガポール1例)、致死例11例、入院38例、障害あり1例、その他50例である(表1)。昨年自殺と報告された14歳の少年につ

表1: タミフル使用後の神経精神症状の臨床的特徴のまとめ

年齢 (n=101)	1.5歳~90歳, 中央値12歳	16歳以下 68人, 17~20歳 8人, 21歳以上 25人
性 (n=101)	女性32人, 男性69人	
適応	インフルエンザ治療 100例(A型75, B型3) インフルエンザの予防3	
報告国	日本95(92%), 米国5(5%), ドイツ2人, シンガポール1人	
症状の分類 (n=103)	1. 異常行動を伴うせん妄	60(死亡2)
	2. 自殺関連有害事象	6(死亡1)
	3. パニック発作	3
	4. 妄想 (delusion)	3
	5. 痙攣	12
	6. 意識レベル低下	6
	7. 意識消失	4
	8. その他(めまいなど)	9
転帰 (n=103)	死亡3人(日本2, シンガポール1), すべて日本人 致死例11, 入院38, 障害が残った1, その他内科的に重要例50例	
症状出現までの服用回数 (n=103)	1回が54例, 1~2回が75例(73%), 最大10回	
最終服用から症状発現までの時間と累積発症率 (n=58)	30分以内12(21%), 1時間以内24(41%), 2時間以内32(55%), 4時間以内46(79%), 6時間以内53(91%), 最長24時間	
使用中止・継続で症状の消長	中止で消失 65, 中止でも持続 10, 2回目で再発 13, 2回目から消失 9	

症状の分類	年齢(歳)					合計
	2-5	6-11	12-16	17-20	21~	
1 異常行動を伴うせん妄	7	31	14	4	4	60
2 自殺関連有害事象	0	0	1	0	5	6
3 パニック発作	0	0	0	0	3	3
4 妄想 (delusion)	0	0	1	1	1	3
5 痙攣	0	1	4	1	6	12
6 意識レベルの低下	0	3	0	2	1	6
7 意識消失	0	1	0	0	3	4
8 その他(めまいなど)	0	4	1	0	4	9
合計	7	40	21	8	27	103

*a 死亡例1例, *b 死亡例2例, 生存例の2例が紹介されている。普段不安など覚えたことのない40歳男性は、タミフルを3日目服用後から不安が生じ、7日目を服用してから自殺未遂で救急搬送され、中止後回復した。56歳男性は、1日目を服用2時間後に精神症状があり、急にうつ状態になり自殺したくなり、マンションの9階から飛び出し自殺しようになったが、子どもらのことを思い自殺をとどまった。翌日には症状は消失し、タミフルを飲むのは止めた。

*NPO 法人医薬ビジランスセンター

いては、警察の指紋の情報などから、階段の手すりにぶら下がった後で落下した、と解釈されたことが記されている。

FDAは、これらの症例の特徴について以下のようにまとめている。

- 1. オセルタミビルの使用と、時間的に関連がある。
- 2. 報告した医師の多くはこれが薬剤による副作用であると感している。
- 3. 異常行動や自殺関連事象は極めて特異であり、インフルエンザ脳炎や熱せん妄の典型的症状と異なる。

1. 時間的関連については、

たとえば、103人中、54人(52%)が1回目の服用で生じていること、5日目に(10回目の服用で)生じたという報告は1例しかないこと、発症までの時間の記載がある58例についてみると、12例(21%)はわずか30分以内に症状が出現したことをFDAは指摘している。

さらにデータをみると、75人(73%)が1,2回目服用までで発症している。1時間以内の発症は合計24例(41%)、4時間以内が46例(79%)、6時間以内で53例(91%)を占めた。

せん妄例では、60人中、1回だけの服用で生じたのが、38人(63%)、2回目が14人(23%)、1回と2回で合計52人(87%)であった。したがって、60人中大部分が服用初日に生じていることが明らかである。

2. 報告した医師の多くがタミフルとの関連を感じている理由

報告した医師の多くがタミフルとの関連を感じている理由としてFDAは、使用中で速やかに症状が消失していることや、画像診断で脳炎、脳症の所見を欠くこと、上記のように服用後急速に症状が出現していることなどを指摘している。

症例全体をみると、中止や再投与後の症状の記載のあった97例中65例(67%)で中止後に症状が消失していること、せん妄の60例中、脳のCT/脳波/脳MRIなどで異常がないことが25例で確認されていること、せん妄時の体温が38度以下であった例が11例あったことなどについてもFDAは指摘し、医師の判断の理由としてあげている。

さらにデータをみると、13例(13%)は2回目使用後も症状が出現した(通常の再投与試験ではなく、2回目使用で症状

が出現した場合を、「再使用で陽性」と解釈している)。合計すると、78例(80%)で中止や再投与後の症状の出方が、タミフルとの関連を示唆している。

たとえば、顕著な異常行動を伴う「せん妄状態」の7歳の男性例を報告した医師は、MRIやCTスキャン、脳波検査で、脳炎や脳症の可能性を示す所見は何もないため、もしもタミフルが関係していなければ、他の原因の可能性は何もないことになる、としている。

自殺関係症状として紹介された生存例2例もこの点を強く示唆している。1例目は、普段不安など覚えたことのない40歳男性。タミフルを3個目服用後から不安が生じ15分以上寝られなくなり強い不安状態のなかで7個目を服用してから自殺未遂をして救急搬送された。中止後1週間かかったが、回復した。2例目は56歳男性。1個目のタミフルを服用2時間後に「精神症状」があり、急にうつ状態になった。自殺したくなりマンションの9階から飛び出し自殺しようになったが、子どもらのことを思い自殺をとどまった。翌日には症状が消失し、タミフルを飲むのは止めた。報告医は、「精神症状」はたぶんタミフルと関係があると考えた(probably related)。

3. インフルエンザ脳炎や熱せん妄と異なる特異な異常行動や自殺関連事象

FDAは、異常行動や自殺関連事象は極めて特異であり、インフルエンザ脳炎や熱せん妄の典型的症状と異なる点として、「われわれは、文献検索の結果、インフルエンザの患者が、窓から飛び出し、落ちて死亡したというよう例を見出すことはできなかった。自殺企図や自殺既遂についても、インフルエンザによるせん妄では極めて非典型的である。」と述べている。

DDREは関連を事実上認めている

「関連を完全には説明できていない」が「否定はできない」

FDAは、「報告例の「異常行動」とオセルタミビル(タミフル)との関連を完全には説明できていない(still cannot fully explain the association)」と言い、「薬剤単独か、病気だけによるのか、その両者が関係してか、なお不明である。」と、結論を保留している。

しかし、この種の害反応で「関連を完全に説明」できるまで「関連なし」とすることは許されることではない、さすが

に、FDAはそこまではしていない。報告書では、

1)1年間でさらに神経精神系有害事象、害反応(AERSD)が多数報告されたこと、2)症例を報告した多数の医師(numerous physicians)が患者の「異常行動」はタミフルによって生じた有害事象(つまり副作用)と考えているという事実、3)通常のインフルエンザによる中枢神経症状とは異なる、これら有害事象の症状の特徴の特異性などがある点から、通常のインフルエンザの自然経過に加えて、有害な状態の出現にタミフルが関与して上乗せした可能性について、われわれは否定することはできない(we cannot rule out the possible contribution of oseltamivir to the adverse consequence over and above the adverse symptoms which may result from the natural history of influenza illness)」

したがって、現時点では、これはインフルエンザ単独の経過であると断定的に言えるような確実な証拠はないし、また、適切な市販後データがタミフル使用と神経性神経症状との関連を示唆しているといえる。日本の現状のようにもし米国でもこの薬剤の使用が増加したなら、米国でも有害反応例が増加するかもしれない点が問題とわれわれは考える。

そこで、米国における添付文書の神経精神系有害事象に関する注意事項を、日本の添付文書の記載と同様に変更するのが賢明であろう。

特に臨床医/患者/患者家族に対して、危険な行動(たとえば自殺行動など)を未然に防ぐよう、患者をよく観察することように注意を喚起したい。

と述べている。

上記理由には記載していないが、先にあげた、時間的関連(使用後短時間で発症し、半数以上が中止で消失)や、インフルエンザの自然経過として文献上全く記載がない特異な症状であること、MRIやCT、脳波で異常を認めず、38℃以下が多数例あるなど、インフルエンザのせん妄やインフルエンザ脳炎・脳症では説明がつかないことも、医師がタミフルとの関連を考えた理由となっている。

「関連を完全には説明できていない」けれども、「関連は否定できない」し、したがって、もし日本と同じように大量使用したなら同様に多発することを懸念し

て警告を発し、もし使用したら、危険を回避するために監視を怠らないことを呼びかけたのである。

このような、注意喚起のしかたは、「関連は否定できない」という域をはるかに超えている。ほとんど実質的に関連を認めた措置である。

2004年に同じ警告をすでにした厚生労働省は関連を認めている？

そもそもこれら、多くの医師が「たぶん関連がある」とした異常行動に関する多数の報告を厚生労働省は受けているはずである。しかし厚生労働省ホームページ上で知りうる異常行動の症例数は、35件(2004年1月1日～3月31日まで)であった²⁾。また、それも件数がわかるだけで、その内容、医師の判断、服用から発症までの時間など、なにも分からない。

それに、2004年6月に異常行動を「重大な副作用」として警告しているため、厚生労働省は今回もあらたな措置をとっていない。逆にみれば、2004年当時から、今日もなお、厚生労働省は、少なく

とも今回の米国の認識と変わらない認識をすでに持っていたということになる。

ただ、FRAと厚生労働省との違いは、FDAは、重要な情報のほとんど全てを公表し、第三者の検討を可能にしたが、日本の厚生労働省はほとんど症例を公表せず、第三者の検討は不可能であるという点である。

なお、14歳の少年(筆者が2005年11月学会報告した1例と同一例)について、FDAは、「異常行動の結果が、事故死につながった可能性がある」「この事象はオセルタミビルに関連したものと評価された」と厚生労働省が言った、と記載している。真偽のほどは不明であるが、これが本当なら、やはり、厚生労働省は、2004年6月の時点から、すでに、現在のFDAと同様の認識を持っていたということの意味をいよう。

しかし、そう認識しながら、被害救済で「否定」したのはなぜか、これは一体何であったのか、問い直さなければならぬ。

参考文献

- 1) Pediatric Advisory Committee November 16, 2006 <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/oc06.htm#pac> Briefing Information: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/06/briefing/2006-4254b1-index.htm>
- 2) 2006 Safety Alerts for Drugs, Biologics, Medical Devices, and Dietary Supplements Tamiflu (oseltamivir phosphate) <http://www.fda.gov/medwatch/safety/2006/safety06.htm#tamiflu>
- 2) http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/06/briefing/2006-4254b_09_01_Tamiflu%20AE%20Review%202006%20Redacted_D060309_092.pdf
- 3) Edwards ET, Et al (Post-Marketing Safety Evaluator: Division of Drug Risk Evaluation: DDRE) Tamiflu AE Review 2006 Memorandum (Department of Health and Human Services, Public Health Services, Food and Drug Administration: Center for Drug Evaluation and Research=FDA CDER) Sept. 20 2006 http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/06/briefing/2006-4254b_09_01_Tamiflu%20AE%20Review%202006%20Redacted_D060309_092.pdf
- 4) 平成18年7月6日平成18年度第1回薬事・食品衛生審議会、医薬品等安全対策部会、配布資料No2-2 <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2006/07/dl/s0706-2e.pdf>

タミフルは初日昼(初回服用後)に異常言動を起こす(その1)

厚生労働省研究班報告書とFDA報告を正しく読めば因果関係は明瞭

NPO 法人医薬ビジランスセンター (薬のチェック) 浜 六郎

はじめに

「インフルエンザに伴う随伴症状の発現状況に関する調査研究」(主任研究者: 横田俊平横浜市立大学教授)の報告書(以下、「報告書」と略)¹⁾が2006年10月26日に公表された。この報告書では、インフルエンザに罹患した約2800人の小児を対象にして調査し、異常言動の発現について、タミフル未使用群とタミフル使用群を比較したところ、統計学的に有意な差は見られなかった。タミフルは肺炎を抑制した、と述べられている。報告書では、タミフルと異常言動などの関連は、「明確な結論を導くためには今後の検討が必要である」としているが、厚生労働省のQ&A²⁾ではそのことにはふれず、「関連には明らかな有意性はなかった」ことのみを強調し「安全性に重大な懸念はない」「有用」と結論づけている。多くのマスメディアもそう受け取り、国民に誤った情報が流されているため、事態は重大であると考え、批判的に吟味した。

その結果、報告書のデータそのものが、インフルエンザ発症初日の昼には高

度に有意にタミフルは異常言動を起しやすことを示していた。そのうえ、報告書には、調査方法や解析方法に、タミフルの害を過小評価に導く重大なバイアスの危険性があるため適切な調査方法を用いなければさらに明瞭な関連が認められることになることが判明した。その後公表されたFDAの情報でも、せん妄例の約3分の2が初回服用後で、服用後数時間以内に発症していることと合致している。批判的吟味の結果を詳しく述べる。

なお、本稿は、第38回日本小児感染症学会³⁾、第12回日本薬剤疫学会⁴⁾において発表した内容をまとめたタミフルと異常言動に関する厚生労働省研究班報告書の批判的吟味⁵⁾、および厚生労働省に対する意見書⁶⁾に、さらに検討を加え改訂したものである。

【1】厚生労働省研究班「報告書」の概要

(1) 報告書の調査目的と基本的方法

報告書は、2005/06年のシーズンに、インフルエンザに伴う随伴症状の調査、処方の実態調査を目的として、全国12都県の小児科医師により、迅速診断など

の方法でインフルエンザの診断がつけられた小児を対象に、該当診療所で連続10人を調査する方法で情報を収集した観察研究である。

(2) データ収集方法

データ収集方法は、医師: 医師用調査票を初診時に作成し、1週間後患者・家族が再診時に、患者・家族用調査票を受け取り、記入し完成、再診できない患者については電話等で情報を聴取し記載。診察時に、患者・家族用調査票が、患者・家族に手渡され、1週間後の再診時にそれを医師に手渡した。

収集データ項目は、基本的項目のほか、患者・家族用調査票では、1. おびえ・恐怖の症状、2. 映像的な幻視幻覚の表現、3. うわごと、突然大声を出す、4. 理由なく怒り出す、泣き出す、ニヤリと笑うなどを収集。医師からの情報としては、上記症状を一括して「異常言動」として情報収集した。参考のため、調査用紙裏面に具体的例文が記載された。

薬剤に関しては、解熱剤、抗生物質、シンメトレル、タミフル、リレンザが調査されたが、医師情報では、解熱剤としてアセトアミノフェンがあげられていたが、非ステロイド抗炎症剤の記入欄は設けられていなかった。



A nonsynonymous SNP in human cytosolic sialidase in a small Asian population results in reduced enzyme activity: potential link with severe adverse reactions to oseltamivir

Chuan-Yun Li^{1,*}, Quan Yu^{2,*}, Zhi-Qiang Ye^{1,*}, Ying Sun¹, Quanyuan He^{1,2}, Xiao-Mo Li¹, Wuxue Zhang¹, Jingchu Luo¹, Xiaocheng Gu¹, Xiaofeng Zheng², Liping Wei¹

¹Center for Bioinformatics, ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China; ³Laboratory of Biochemistry, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China

The use of oseltamivir, widely stockpiled as one of the drugs for use in a possible avian influenza pandemic, has been reported to be associated with neuropsychiatric disorders and severe skin reactions, primarily in Japan. Here we identified a nonsynonymous SNP (single nucleotide polymorphism) in dbSNP database, R41Q, near the enzymatic active site of human cytosolic sialidase, a homologue of virus neuraminidase that is the target of oseltamivir. This SNP occurred in 9.29% of Asian population and none of European and African American population. Our structural analyses and *K_i* measurements using *in vitro* sialidase assays indicated that this SNP could increase the unintended binding affinity of human sialidase to oseltamivir carboxylate, the active form of oseltamivir, thus reducing sialidase activity. In addition, this SNP itself results in an enzyme with an intrinsically lower sialidase activity, as shown by its increased *K_m* and decreased *V_{max}* values. Theoretically administration of oseltamivir to people with this SNP might further reduce their sialidase activity. We note the similarity between the reported neuropsychiatric side effects of oseltamivir and the known symptoms of human sialidase-related disorders. We propose that this Asian-enriched sialidase variation caused by the SNP, likely in homozygous form, may be associated with certain severe adverse reactions to oseltamivir.

Keywords: Asia, SNP, neuraminidase inhibitor, oseltamivir, sialidase, bioinformatics

Cell Research advance online publication 10 April 2007; doi: 10.1038/cr.2007.27

Introduction

Influenza neuraminidase (NA) has been one of the most attractive drug targets against influenza [1-4] and numerous efforts have been made on the design of NA inhibitors [5-6]. Two effective neuraminidase inhibitors, oseltamivir

phosphate (Tamiflu, Roche) and zanamivir (Relenza, Glaxo), have been marketed; and peramivir (BioCryst) has progressed to advanced clinical development. Among them Tamiflu is the only orally applicable drug so far and is currently considered to be the appropriate drug against the human influenza virus H5N1 infections [7]. Many countries have stockpiled the drug in preparation for a possible pandemic [8]. However, over a thousand adverse events have been reported to occur with its use during seasonal influenza, including a small number of rare but severe adverse events [9]. Seventy-five pediatric cases have been studied in detail, including eight fatalities, 32 neuropsychiatric events, and 12 skin/hypersensitivity events [9]. Interestingly, 69 of the 75 cases were identified in Japan, the country that

*These three authors contributed equally to this work.

Correspondences: Liping Wei¹, Xiaofeng Zheng²

¹Tel: +86 10 6275 5206; Fax: +86 10 6275 2438

E-mail: weilp@mail.cbi.pku.edu.cn

²E-mail: xiaofengz@pku.edu.cn

Received 12 March 2007; revised 15 March 2007; accepted 16 March 2007

has the highest use of oseltamivir in the world. Although whether Tamiflu directly caused these cases is still being debated, the possible severe side effects of Tamiflu should not be ignored.

Oseltamivir is processed in the liver by esterases into the active form oseltamivir carboxylate, which can inhibit the neuraminidase of influenza virus with high affinity [10-13]. Oseltamivir carboxylate resulted from two successful principles in the history of NA inhibitor design. The first is to substitute the C6 group with a more hydrophobic group that would pack well in the hydrophobic pocket created by the rotation of Glu276's carboxylate group which forms a salt bridge with Arg224. The second is to replace the C4 group of Neu5Ac2en, a transition state analogue, with a basic group that would interact with Glu119 and Glu227 of the virus neuraminidase [10-13].

Human has four sialidases that are homologues of virus neuraminidases. The structure of human cytosolic sialidase (HsNEU2) was published recently [14] and shown to be similar to that of viral neuraminidases, containing exactly the same active site residues. It seemed reasonable to investigate whether human sialidases could also bind oseltamivir carboxylate, thus potentially causing adverse reactions.

Searching the dbSNP database at NCBI [15], we found that a nonsynonymous SNP from G to A (refSNP ID rs2233385) causes Arg41 in HsNEU2 to be substituted by Gln in a small portion of Asian populations. Here we present results from structural bioinformatic analyses and *in vitro* enzymatic activity assays showing that the R41Q SNP could increase human sialidase's binding affinity to oseltamivir carboxylate, thus rendering it more sensitive to inhibition by the drug. In addition, the SNP itself results in an enzyme with an intrinsically lower sialidase activity. We suggest that this sialidase variation caused by the SNP, likely in homozygous form, may be associated with certain severe adverse reactions to Tamiflu.

Materials and Methods

Searching for the neuraminidase active site in all known human protein structures

We used the active site residues in influenza virus neuraminidase N9, Arg118, Arg371, Arg292, and Tyr406, and their sequential and spatial spacing to generate a template of the active site. We used this template to search all known human protein structures in Protein Data Bank (PDB). Eleven of the structures contain the same four residues in the correct order in sequence and less than 2.0 angstroms of Root Mean Standard Deviation (RMSD) from the template in space. Manual inspection of docking analyses using these structures with sialic acid and oseltamivir carboxylate showed that only HsNEU2 had the correct binding pocket.

Molecular simulation

We retrieved and analyzed the following structures from PDB:

human sialidase HsNEU2 (PDB ID:1VCU), influenza virus neuraminidase N2 (PDB ID:2BAT), and influenza virus neuraminidase N9 complexed with oseltamivir carboxylate (PDB ID:2QWK). The structure of HsNEU2 R41Q variant was built by substituting the side chain of Arg41 to Gln. The complex structures of wild-type HsNEU2 and HsNEU2 R41Q with oseltamivir carboxylate were built by superimposing HsNEU2's active site residues Arg21, Arg304, Arg237 and Tyr334 to N9's active site residues Arg118, Arg371, Arg292 and Tyr406, respectively. The complex structures of N2 with oseltamivir carboxylate were built by the same procedure. All of these complexes were optimised in Insight II (Accelrys, San Diego, USA): after adding a two-Angstrom water layer and fixing the protein backbone atoms, we performed 500 steps of steepest descent with derivative value of 0.01 kcal·mol⁻¹·Å⁻¹ and 1 000 steps of conjugate gradient under Consistent Valence Force Field (CVFF) with derivative value of 0.001 kcal·mol⁻¹·Å⁻¹. We evaluated different aspects of the binding affinity between oseltamivir carboxylate and HsNEU2 in these complexes, including intermolecular energy under CVFF (van der Waals term and electrostatic term) and inhibition constant derived by Insight II. The cutoff for intermolecular energy calculation under CVFF was 100 Angstroms. The scoring function in Insight II was an empirical function taking into account the contribution of hydrogen bonds, ionic interactions, hydrophobic contacts, freezing of internal degrees of freedom and aromatic-aromatic interactions.

Expression of HsNEU2 wild-type and its R41Q variant proteins in E. coli

We expressed and purified both wild-type HsNEU2 and its R41Q variant by following the standard protocol [16-17]. The full-length coding region of *HsNEU2* was obtained by PCR amplification using an isolated human genomic library as the template. Exon1 was amplified using HsNEU2-N11 (5'-CGG AAT TCA TGG CGT CCC TTC CTG TCC TG-3') with a 5'-*Eco*R I restriction site and HsNEU2-C11 (5'-CTG AAC CTG GTG GGT GGG TGC-3'). Exon2 from Trp68 to the stop codon was amplified using HsNEU2-N12 (5'-TGG CAA GCT CAG GAG GTG GTG-3') and HsNEU2-C12 (5'-ACG CGT CGA CTC ACT GAG GCA GGT ACT-3') with a 5'-*Sal*I restriction site. The two PCR products were ligated by T4 DNA ligase and the resulting full-length fragment was subcloned into the *Eco*R I – *Sal*I sites of pET-28a expression vector. The HsNEU2 variant, R41Q, was generated by mutagenesis through PCR amplification using the overlap extension technique [18], with two PCR primers R41Q-M1 (5'-CGG AAC AGC GAG CAA GCA AGA-3') and R41Q-M2 (5'-TCT TGC TTG CTC GCT GTT CCG-3'). The resulting recombinant plasmids were verified by DNA sequencing, followed by transformation into the *E. coli* expression strain Rosetta (DE3). Both HsNEU2 wild-type and its R41Q variant proteins were purified by a two-step purification procedure using a Ni-affinity column and a gel filtration Hiload Superdex-75 column (Amersham, USA) [19]. They showed apparent molecular mass of about 45 kDa in SDS-PAGE, which was consistent with the predicted molecular weight. For both the wild-type and R41Q variant, about 3 mg of proteins in high purity were obtained from 1 L of culture for further experiments.

Sialidase assay

Sialidase activities of both recombinant wild-type HsNEU2 and its R41Q variant against the substrate 2'-(4-methylumbelliferyl)α-D-N-acetylneuraminic acid (MU-NANA) (Sigma) were determined by fluorimetric assays to measure the amount of 4-methylumbelliferone