

VI. APPENDIX II: MOUSE ANTIBODY PRODUCTION TEST

The following tests for murine viruses (mouse antibody production test (27) should be performed on any MCB and EPC derived from murine cell lines and on all lots of mAb derived from mouse ascites fluid:

1. Ectromelia
2. EDIM
3. GD VII virus
4. Hantaan virus
5. LCM virus, including challenge for non-lethal strains
6. LDH-elevating virus
7. Minute virus of mice
8. Mouse adenovirus
9. Mouse encephalomyelitis
10. Mouse hepatitis
11. Mouse salivary gland (murine CMV)
12. Pneumonia virus of mice
13. Polyoma
14. Reovirus type 3
15. Sendai
16. Thymic virus

VII. APPENDIX III: ORGANS TO BE CONSIDERED IN DOSIMETRY ESTIMATES

1. all target organs/tissues
2. bone
3. bone marrow
4. liver
5. spleen
6. adrenal
7. kidney
8. lung
9. heart
10. urinary bladder
11. gall bladder
12. thyroid
13. brain
14. gonads
15. gastrointestinal tract
16. adjacent organs of interest

VIII REFERENCES

1. Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals, CBER, FDA, 1993.
2. Points to Consider in the Production and Testing of New Drugs and Biologicals Produced by Recombinant DNA Technology, FDA, CBER, April 10, 1985 and Supplement to the Points to Consider in the Production and Testing of New Drugs and Biologicals Produced by Recombinant DNA Technology: Nucleic Acid Characterization and Genetic Stability, CBER, FDA, April 6, 1992.
3. Elimination of Establishment License Application for Specified Biotechnology Products and Specified Synthetic Biologics. Final rule. (May 14, 1996; 61 Federal Register 24227).
4. Guidance for Industry for the Submission of Chemistry, Manufacturing and Controls Information for a Therapeutic Recombinant DNA-derived Product or a Monoclonal Antibody Product for In Vivo Use, CBER/CDER, FDA, August, 1996.
5. Points to Consider in the Production and Testing of Therapeutic Products for Human Use Derived from Transgenic Animals, CBER, FDA, 1995.
6. International Conference on Harmonisation; Final Guideline on Quality of Biotechnological Products: Analysis of the Expression Construct in Cells Used for Production of r-DNA Derived Protein Products, (February 23, 1996; 61 Federal Register 7006).
7. International Conference on Harmonisation; Final Guideline on Stability Testing of Biotechnological/Biological Products, (July 10, 1996; 61 Federal Register 36466).
8. Marcus-Sekura, CJ. Validation of removal of human retroviruses. In *Developments in Biological Standardization*, volume 75, "International Symposium on Virological Aspects of the Safety of Biological Products", edited by the International Association of Biological Standardization, pp. 133-143, Karger, New York, New York, USA, 1991.
9. Rubinstein, LJ and Stein, KE. Murine immune response to the Neisseria meningitidis Group C capsular polysaccharide. *J Immunology* 1988; 141:4352-56.
10. Lindmo, T, Boven, E, Cuttitta, F, et al. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J Immunol Meth* 1984; 72:77-89.
11. Nisonoff, A, Lamoyi, E. Implications of the presence of an internal image of the antigen in anti-idiotypic antibodies: possible application to vaccine production. *Clin Immunol Immunopathol* 1981;21:397-406.
12. Stein, KE and Epstein, S. [letter] *Mol Immunol* 1991;28:193.
13. Burtonboy, G, Delferriere, N, Bodeus, M, and Mousset, B. Absence of Viral Particles in Rat Hybridomas. An Ultrastructural Study In Rat Hybridomas and Rat Monoclonal Antibodies (Ed. H. Bazin), pp. 465-473, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
14. Dinowitz, M, Lie, YS, Low, MA, et al. Recent studies on retrovirus-like particles in Chinese hamster

ovary cells. In *Developments in Biological Standardization*, volume 76, "Continuous Cell lines, An International Workshop on Current Issues", edited by the International Association of Biological Standardization, pp. 201-207, Karger, New York, New York, USA, 1992.

15. Miller, DG and Miller, AD. Tunicamycin treatment of CHO cells abrogates multiple blocks to retrovirus infection, one of which is due to a secreted inhibitor. *J Virol* 1992;66:78-84.

16. Eglitis, MA, Kadan, MJ, Wonilowicz, E, Gould, L. Introduction of human genomic sequences renders CHO-K1 cells susceptible to infection by amphotropic retroviruses. *J Virol* 1993;67:1100-1104.

17. Lander, M R and Chattopadhyay, S K, A *Mus dunni* cell line that lacks sequences closely related to endogenous murine leukemia viruses and can be infected by ecotropic, amphotropic, xenotropic and mink cell focus-forming viruses. *J Virol*. 1984;52:695-698.

18. Report of a WHO Study group (1987). Acceptability of cell substrates for production of biologicals. World Health Organization Technical Report Series 747.

19. Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices, CDER/CBER/CDRH/CVR, FDA, December, 1987.

20. Guidelines on Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing, Center for Drugs and Biologics, FDA, June, 1987.

21. Guidance for Industry for the Submission Documentation for Sterilization Process Validation in Applications for Human and Veterinary Drug Products, CDER/CVM, FDA, November, 1994.

22. Guideline for Submitting Documentation for the Stability of Human Drugs and Biologics, Center for Drugs and Biologics, FDA, February, 1987.

23. FDA Guidance Concerning Demonstration of Comparability of Human Biological Products, Including Therapeutic Biotechnology-derived Products, CBER, FDA, April, 1996.

24. Goldsmith, MA, Slavik, M, Carter, SK. Quantitative prediction of drug toxicity in humans from toxicology in small and large animals. *Cancer Res* 1975;35:1354-64.

25. Collins, JM, Zaharko, DS, Dedrick, RL et al. Potential roles for preclinical pharmacology in phase I trials. *Cancer Treat Rep* 1986; 70:73-80.

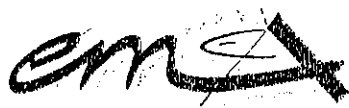
26. EORTC Pharmacokinetics and metabolism group: pharmacokinetically-guided dose escalation in phase I clinical trials. *Eur J Clin Oncol* 1987; 23:1083-87.

27. Nicklas, W, Kraft, V, and B Meyer. Contamination of transplantable tumors, cell lines, and monoclonal antibodies with rodent viruses. *Lab Anim Sci* 1993;43: 296-300.

20010962

以降 P.209 - P.219は下記「資料」をご参照ください。

「資料」



The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
Evaluation of Medicines for Human Use

London, 20 September 2001
CPMP/BWP/3207/00

**COMMITTEE FOR PROPRIETARY MEDICINAL PRODUCTS
(CPMP)**

**NOTE FOR GUIDANCE ON COMPARABILITY OF MEDICINAL
PRODUCTS CONTAINING BIOTECHNOLOGY-DERIVED PROTEINS
AS DRUG SUBSTANCE**

20010962

以降 P.220 - P.229は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、「資料」をご参照ください。

「資料」

One product, One Process, One Set of Specifications. A Proven Quality Paradigm for the Safety and Efficacy of Biologic Drugs. *BioPharm*, March, 14-24 (2001)

Politics and Policies. Changes in Congress may affect Medicare coverage of biotech therapies, FDA regulations, and interest in generic biologics. *BioPharm*, July, 46-50 (2001)

特性・品質解析，品質評価法の検討

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第1室長）
協力研究者： 太田美矢子 （国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部主任研究官）

要 旨

我々はこれまで、液体クロマトグラフィー質量分析法（LC/MS）を用いた糖鎖マッピング，及び糖ペプチドマッピングを開発し，糖タンパク質性医薬品の特性・品質解析に応用できることを示してきた。本研究では，国際的な重要課題となっているバイオテクノロジー応用医薬品の同等性／同質性評価法としての，糖鎖マッピング，及び糖ペプチドマッピングの有用性を評価した。類似糖タンパク質のモデルとして，起源の異なる3種類の遺伝子組換え型ヒトエリスロポエチン(EPO)を用い，糖鎖マッピング，及び糖ペプチドマッピングが，類似糖タンパク質の構造の違いをどれだけ識別できるかを調べた。その結果，糖鎖マッピングは，糖鎖の構造と分布の違いに基づく糖タンパク質の差異を明確にできること，また，エキソグリコシダーゼ消化法を併用することによって，差異の原因となっている糖鎖の構造を解析できること，さらに，糖ペプチドマッピングを行うことによって，その糖鎖が結合している部位を明らかにできることを確認した。以上のことから，LC/MSによる糖鎖マッピング，及び糖ペプチドマッピングは，製造方法変更等によって生じる新旧糖タンパク質の同等性／同質性評価法として有用であることが確認された。

A. 研究目的

バイオテクノロジー応用医薬品の製造方法は，製造技術の進展に併せて，科学的，実用的，または経済的な理由により，研究開発段階や承認後等の様々な段階において，しばしば変更・改良が試みられている。糖タンパク質性医薬品における製造方法の変更は，糖鎖部分の構造や分布に影響を及ぼすことが知られており，この糖鎖構造と分布の変化は，生物活性，体内動態，溶解性，及び安定性に変化をもたらすことが予想される。従って，製造法変更等によって生じる新旧糖タンパク質性医薬品の糖鎖部分の同等性／同質性(comparability)を評価することは非常に重要である。しかし，糖鎖部分には，単糖組成，分岐構造，結合様式，及び硫酸基やアセチル基などによる修飾等の違いによって生じる不均一性が存在

し，糖鎖構造の類似した新旧糖タンパク質間の糖鎖部分の特性を迅速かつ簡便に比較することは容易ではない。製法変更時の同等性／同質性評価において，糖鎖の複雑な構造と不均一性をいかに迅速かつ簡便に解析するかが国際的な大きな課題となっている。

これまでに我々は，液体クロマトグラフィー質量分析法(LC/MS)を用いた糖鎖マッピングによる糖タンパク質の糖鎖の構造，及び不均一性解析法，並びに，LC/MSを用いた糖ペプチドマッピングによる部位特異的糖鎖不均一性解析法を開発し，遺伝子組換え型ヒトエリスロポエチン(EPO)等の糖タンパク質糖鎖の解析に有用であることを示してきた。これらの分析法は，糖鎖の誘導体化，及び精製過程を必要

とせず、簡便かつ迅速に糖鎖構造と不均一性を詳細に解析できることから、製法変更に伴う糖鎖の構造や不均一性の変化の解析にも応用できるものと期待される。

本研究は、国際的な重要課題となっているバイオテクノロジー応用医薬品、特に糖タンパク質性医薬品の同等性/同質性評価における、LC/MSを用いた糖鎖マッピング、及び糖ペプチドマッピングの有用性評価を目的としている。本年度は、起源の異なる3種類の組換え型ヒトエリスロポエチン(EPO)を類似糖タンパク質のモデルとして用いて糖鎖マッピング及び糖ペプチドマッピングを行い、両分析法が3種のEPO間の糖鎖の構造と不均一性の差異をどれだけ識別できるかを試験することによって、同等性/同質性評価としての有用性を評価した。

B. 研究方法

1) EPO

EPOはCHO細胞、及びBHK細胞で産生し、精製したものをを用いた。便宜上、EPO-A、-B、及び-Cとした。

2) 糖鎖の調製

EPO(400 µg)を500 µlのリン酸緩衝液(pH 6.4)に溶解し、2単位のNグリコシダーゼFと37℃で20時間反応させて糖鎖を切り出した。70%冷エタノールを加えてタンパク質を除去し、糖鎖を回収後、NaBH₄で還元して糖アルコールとした。

3) エキソグリコシダーゼ消化

糖アルコールを酢酸アンモニウム(pH 4.5)に溶解し、シアリダーゼ、またはシアリダーゼ、及びβ-ガラクトシダーゼと37℃で20時間反応させた。

4) 糖ペプチドの調製

EPO(1 mg)を100 mM酢酸アンモニウム(pH 8.0) 1 mlに溶かし、エンドプロテアーゼ Glu-C(0.25 mg)を62 µlの酢酸アンモニウム(pH 8.0)に溶解させたものを加えて、37℃で20時間消化した。

5) 糖鎖マッピング

① HPLC

HPLC装置：Finnigan spectrasystem (p4000 pump, UV2000, finnigan 社)

分離カラム：Hypercarb (2.1 x 100 mm, Hypersil 社)

流速：0.2 ml/min

検出波長：206 nm

移動相 A：5 mM 酢酸アンモニウム

移動相 B：5 mM 酢酸アンモニウムを含む 80% アセトニトリル

グラジエント：90分間で移動相 B を 30-58% に上昇させた

② 質量分析法

エレクトロスプレーイオン化トリプルステージ四重極型 MS/MS システム：TSQ-7000

(Finnigan 社)

測定モード：ネガティブイオンモード
(シアロ糖鎖)

ポジティブイオンモード (エキソ
グリコシダーゼ消化糖鎖)

シースガス：70 psi

オグジュラリーガス：10 unit

キャピラリー温度：225℃

マルチプライヤー：1000-1200 V

ESI 電圧：4500 V

スキャン範囲：1000-1600 (シアロ糖鎖)

800-2000 (エキソグリコシダー
ゼ消化糖鎖)

スキャン回数：2 秒 (シアロ糖鎖)

3 秒 (エキソグリコシダーゼ消
化糖鎖)

6) 糖ペプチドマッピング

① HPLC

HPLC装置：Finnigan spectrasystem (p4000 pump, UV2000, Finnigan 社)

分離カラム：Vydac C18 (2.1 x 250 mm, Vydac 社)

流速：0.2 ml/min

検出波長：206 nm

移動相 A：1 mM 酢酸アンモニウム

移動相 B：1 mM 酢酸アンモニウムを含む 80 %
アセトニトリル

グラジエント：移動相 B を 60 分間で 1-6 % に上
昇させた後、60-140 分で 6-36 %
に上昇させた

② 質量分析法

エレクトロスプレーイオン化トリプルステー
ジ四重極型 MS/MS システム：TSQ-7000

(Finnigan 社)

測定モード：ネガティブイオンモード

シースガス：70 psi

オグジュラリーガス：10 unit

キャピラリー温度：225 °C

マルチプライヤー：1200 V

ESI 電圧：4500V

スキャン範囲：1000-2400

スキャン回数：3 秒

C. 研究結果

(1) 糖鎖マッピング

1) シアロ糖鎖の糖鎖マッピング

発現細胞の異なる 3 種類の EPO から N グリカナーゼ F を用いて糖鎖を切り出し、NaBH₄ で還元して糖アルコールとした後、グラファイトカーボンカラムを用いた LC/MS によって糖鎖マッピングを行った。Fig. 1 は、3 種の EPO の糖鎖マップである。

まず、EPO-A で検出された主なピークについて、マススペクトルを基に糖鎖構造をアサインした結果、フコースが結合したジシアロ 2 本鎖 (BiNA₂)、トリシアロ 3 本鎖 (TriNA₃)、トリシアロ 4 本鎖 (TetraNA₃)、テトラシアロ 4 本鎖糖鎖 (TetraNA₄)、並びにラクトサミン 1 分子結合フコシルテトラシアロ 4 本鎖 (TetraLac₁NA₄)、及びラクトサミン 2 分子結合フコシルテトラシアロ 4 本鎖 (TetraLac₂NA₄) 糖鎖が結合していることが確認された。

つぎに、EPO-B の糖鎖マップを EPO-A の糖鎖マップと比較したところ、EPO-B からは、EPO-A で認められた主なピーク以外に、複数のピークが溶出されていることが確認された。例えば、EPO-A と共通で、最も結合量の多い TetraNA₄ (ピーク 1) に続いて、ピーク 2-4 が溶出されている。Fig. 2 は、TetraNA₄ (ピーク 1) 及びピーク 2-4 のマススペクトルである。ピーク 1 で検出されたイオン (*m/z* 1227) は TetraNA₄ の 3 価イオンであり、このイオンとピーク 2-4 で観測された *m/z* 1241, 1255, 1269, 1283, 及び 1297 のイオンとの *m/z* 値の差は 14 の倍数である。*m/z* 値 14 は、アセチル基の 3 価イオンの *m/z* に一致することから、ピーク 2-4 は、TetraNA₄ が複数のアセチル基によって修飾されたものであることが示唆された。

また、EPO-C では、TetraNA₄ のピーク 1 が溶出される以前に、EPO-A、及び B では確認されないピーク 5、及び 6 が溶出されることが確認された。Fig. 3 はピーク 5、及び 6 のマススペクトルである。ピーク 5、及び 6 の分子量は、TetraNA₄ よりもそれぞれ 80Da、及び 160Da 大きいことから、TetraNA₄ に硫酸基またはリン酸基が 1 または 2 分子結合したものであることが示唆された。そこで、リン酸基の有無をアルカリホスファターゼ処理、及び ³¹P-NMR で確認した。しかし、ピーク 5、及び 6 は、アルカリホスファターゼ処理によっても消失しないこと、また、³¹P-NMR においてリン酸のシグナルが観測されないことから、リン酸基ではなく硫酸基が付加したものであることが示唆された。さらに、ピーク 5 をシアリダーゼ、及び β-ガラクトシダーゼで処理した後、分取し、¹H-NMR を測定したところ、GlcNAc の 6 位炭素に結合している水素が約 0.5 ppm 低磁場シフトしていることから、硫酸基が結合していることが確認された。

以上のように、糖鎖マップの主なピークの帰属を行うことによって、EPO-B にはアセチル化糖鎖が、また、EPO-C には硫酸化糖鎖が結合していることが明らかになった。

2) シアロ糖鎖の 2 次元 (2D) マップ

糖鎖マップ上の全ピークを帰属することによって、

3つのEPO間の糖鎖の構造と分布の違いをさらに詳細に明らかにすることができると思われた。そこで、糖鎖マッピングの結果を2次元で表し (Fig. 4), マップ上のすべてのピークの糖鎖構造をマススペクトルから決定した (Table 1)。その結果, 3つのEPO間には, シアロ糖鎖の分布, 並びにアセチル化, 及び硫酸化の違いによる明確な差が存在することが明らかになった。

まず, シアロ糖鎖の分布を比較すると, EPO-AにはD1-10 (m/z 1033), F1-5 (m/z 1155), I1-3 (m/z 1276)のように, 複数のジシアロ3及び4本鎖糖鎖が結合しているのに対して, EPO-Cではジシアロ3または4本鎖糖鎖の結合は確認されなかった。また, EPO-BにはわずかにD1がマイナーピークとして検出されるのみであった。

つぎに, アセチル化糖鎖の分布を比べると, EPO-Bでは複数のアセチル化テトラシアロ4本鎖糖鎖, すなわち, Ga-e, Ja-c, 及びLa,bが確認されたが, EPO-Aでは, Ga1が検出されるのみであった。EPO-Cにもアセチル化糖鎖の存在が確認されたが, テトラシアロ4本鎖グループではなく, トリシアロ4本鎖糖鎖にアセチル化が起きていることが明らかになった。

さらに, 硫酸化について, EPO-Cでは, TetraNA₄だけでなく, 主な3及び4本鎖糖鎖に硫酸化が起きていることが明らかになった。また, わずかであるが硫酸化糖鎖はEPO-A及び-Bにも存在しており, EPO-Bでは, アセチル化糖鎖にも硫酸化が起きていることが確認された。

3) アシアロ糖鎖マッピング

すでに我々は, エキソグリコシダーゼ消化法と糖鎖マッピングを組み合わせることによって, 糖鎖構造をより詳細に解析できることを示している。そこで, アセチル化及び硫酸化されている単糖の決定, 及びアシアロ糖鎖部分の構造を比較することを目的に, シアリダーゼ消化糖鎖の糖鎖マッピングを行った。

Fig. 5は, 3種のEPOのアシアロ糖鎖の糖鎖マッピングの結果である。シアリダーゼ処理によってEPO-A及び-Bの糖鎖パターンはほぼ同じになるこ

とが確認された。この結果から, EPO-Bのアセチル化はシアル酸部分で起きていること, また, EPO-Aと-Bの違いは, シアル酸の種類と結合数の違いによるものであることが明らかになった。

これに対して, EPO-Cでは, EPO-A及び-Bとは異なり, シアリダーゼ処理後もアセチル化及び硫酸化糖鎖が存在することが確認された。EPO-Cのアセチル化と硫酸化はシアル酸ではなく, アシアロ部分に起きていることが考えられた。そこで, さらにβ-ガラクトシダーゼ, 及びNアセチルヘキソサミニダーゼで消化後, 再度糖鎖マッピングを行うことによって, EPO-Cのアセチル基はガラクトースに, また, 硫酸基は非還元末端側のNアセチルグルコサミンに結合していることが明らかになった。

また, 3本鎖糖鎖には2, 4-branched及び2, 6-branchedの2つの異性体が存在するが, EPO-Aと-Cでは, 2つの3本鎖糖鎖のピーク高さが逆転しており, 分布が異なることが明らかになった。

(2) 糖ペプチドマッピング

1) 糖ペプチドマッピング

EPOには3本のN結合糖鎖がAsn24, Asn38, 及びAsn83に, また, 1本のO結合糖鎖がSer126に結合している。EPO-A, -B, 及び-CをエンドプロテアーゼGlu-Cで消化して4本の糖ペプチドを含むペプチド断片とし, LC/MSを用いて糖ペプチドマッピングを行った。Fig. 6A, B, 及びCはそれぞれEPO-A, -B, 及び-Cの糖ペプチドマップである。また, Table 2-5には, 各ピークの糖鎖構造をまとめた。Fig. 6, 及びTable 2-5から, Glu-C消化物中の4本の糖ペプチドが, Asn38, Asn24, Ser126及びAsn83を含むペプチドの順に溶出され, 各糖ペプチドは, ペプチドに結合している糖鎖の構造の違いに基づいて, さらに細かく分離されていることが確認された。また, Fig. 6A, B, 及びCの溶出パターンから, 3種のEPOの各糖鎖結合部位に付加している糖鎖の構造は異なっていることが明らかになった。例えば, EPO-CのAsn38及びAsn83には, 3つのEPOに共通なピークが溶出されるよりも早く, 複数のピークが溶出され

ることが確認された。さらに、EPO-A の Asn24 のピークの形が、他の EPO とは異なっていること、また、EPO-B の Asn83 のピークが、他の EPO よりブロードであることが確認された。そこで、これらの違いは、それぞれ何に起因するのかをマススペクトルから解析した。

2) 硫酸化糖鎖

Fig. 7A, D, 及び G は、それぞれ EPO-A, -B, 及び -C の Asn38 糖ペプチドの拡大図である。共通ピーク A5-A16 のマススペクトルから、3つの EPO には共通して、ジ、トリ、及びテトラシアロフコシル複合型糖鎖が結合していることが確認された。それ以外に、EPO-C では、ピーク A1-A4 が検出されているが、これらのピークは、 m/z 値から、モノ、及びジ硫酸化糖鎖であることが明らかになった。硫酸化糖鎖は、Asn83 糖ペプチドにおいてもピーク D1-D4 として検出された。先にも述べたように我々は、糖鎖マッピングを用いて、EPO-C の N 結合糖鎖が一部硫酸化されていることを見出しているが、糖ペプチドマッピングによって、硫酸化糖鎖の結合部位が Asn38 及び Asn83 であることが明らかになった。

3) シアロ糖鎖

Asn24 を含む糖ペプチドの拡大図を Fig. 7B, E, 及び H に示す。EPO-A のピークの形状は他の EPO の形状と異なっていることから、構成糖鎖の分布が異なっていることがわかる。EPO-A では、ピーク B8 として溶出されているトリシアロ 4 本鎖糖鎖と、ピーク B11, 及び B12 のジシアロ 4 本鎖糖鎖が他の EPO に比べて多く結合していることが明らかになった。先に糖鎖マッピングを用いて、EPO-A には、非還元末端のガラクトースがシアル酸によって飽和されていない糖鎖が多く存在することを見出しているが、糖ペプチドマッピングの結果、これらの糖鎖は Asn24 に結合していることが明らかになった。また、ジシアロ、及びトリシアロ 4 本鎖糖鎖は EPO-B, 及び -C には僅かにしか結合していないことが確認された。

4) アセチル化糖鎖

Fig. 8 は、Fig. 7 に示されている EPO-A, -B 及び -C の Asn83 を含む糖ペプチドから分離されたピーク D6, D8 及び D9 のマススペクトルである。各ピークの m/z 値から、D6, D8, 及び D9 はそれぞれテトラシアロ、トリシアロ、及びジシアログループであることが確認された。Asn83 に結合している主なテトラシアロ糖鎖は、Fig. 8A, D, 及び G から、TetraLac_{0,2}NA₄ であることが確認されたが、EPO-B には、それら以外にも多数の糖鎖が結合していることが分かった。これらの糖鎖のイオンの m/z 値は 10.5(4 価)ずつ増加していることから、EPO-B の Asn83 には複数のアセチル化糖鎖が結合していることが明らかになった。EPO-B におけるピーク形状のブロード化は、糖鎖のアセチル化によるものと考えられる。アセチル化は Asn24 や Asn38 でも確認されたが、Asn83 が顕著であった。

Fig. 8B, 3E, 及び 3H は、トリシアログループのマススペクトルである。EPO-B のアセチル化糖鎖はテトラシアログループに比べて減少しているが、逆に、EPO-C では増加していることが分かった。EPO-C のアセチル化糖鎖は D9 のジシアログループでさらに増加し、3 本鎖ではモノアセチル糖鎖が、また、4 本鎖糖鎖ではモノ、及びジアセチル糖鎖が検出された。ジシアロ 2 本鎖糖鎖にアセチル化は見られなかった。尚、ジシアロ 2 本鎖糖鎖は、主に Asn24 に見られたが、EPO-C のみ、Asn83 にも結合していることが確認された。我々は、糖鎖マッピング、及びエキソグリコシダーゼ消化法を用いて、EPO-B ではシアル酸がアセチル化されているが、EPO-C のアセチル基はシアル酸ではなくガラクトースに結合していることを明らかにしている。糖ペプチドマッピングの結果は、それらをよく支持しているといえる。また、糖ペプチドマッピングの結果、EPO-B のアセチル化は主に Asn83 に起きているのに対して、EPO-C では、Asn24 によく見られることが明らかになった。

5) O 結合糖鎖

Fig 6 及び Table 5 から、O 結合糖鎖は 3 つの EPO

ともに共通であることが確認された。一般に、O 結合糖鎖の切り出しは難しく、糖鎖マッピングを応用できる機会が少ないが、糖ペプチドマッピングでは糖鎖を切り出すことなく、O 結合糖鎖の構造を解析できるので便利であることが確認された。

D. 考察

平成12年度本「医薬品等の品質規格に係る国際的動向を踏まえた研究」報告書でも考察されているように、培養方法や精製方法等の製造方法の変更によって生じる構造の非常に類似したバイオテクノロジー応用医薬品の同等性/同質性の評価が国際的な問題となっている。とりわけ、糖タンパク質性医薬品は、同一ポリペプチド鎖に様々な糖鎖が結合した構造の類似した不均一な集団であり、この不均一性は、培養方法や分離方法の変更によって変動することが想定されること、また、糖鎖部分は、生物活性や体内動態に影響することが多くの研究によって明らかにされていることから、製法変更後、糖鎖の不均一性をいかに評価するかが重要な課題となっている。

これまで我々は、グラファイトカーボンカラムを用いた LC/MS による糖鎖マッピングを開発し (Kawasaki, N., et al., 1999, *Anal. Biochem.*), 単糖組成, 分岐構造, 及び結合様式の違いによる糖鎖の不均一性を分析できることを示してきた (Kawasaki, N., et al., 2000, *Anal. Biochem.*). 本糖鎖マッピングは、エキソグリコシダーゼ消化法や NMR と組み合わせることによって、新規糖鎖の構造解析に応用することも可能であった (Kawasaki, N., et al., 2002, *Glycobiology*). また、我々は、ODS カラムを用いた LC/MS によるペプチドマッピングにおいて、移動相として酢酸アンモニウムを用いることによって、糖ペプチドのみが選択的に溶出され、さらにグリコフォームが分離される糖ペプチドマッピングを開発し、EPO の部位特異的糖鎖の不均一性解析に有用であることを示してきた (Ohta, M., et al., 2001, *J. Chromatogr. A*).

本年度より本研究課題に参加した我々は、バイオテクノロジー応用医薬品、特に、糖タンパク質性医薬品の同等性/同質性評価における糖鎖マッピング、

及び糖ペプチドマッピングの有用性を探るため、起源の異なる3種類のEPO(EPO-A, -B, 及び-C)を構造の非常に類似した糖タンパク質のモデルとして選び、両分析法が、これらの糖タンパク質の糖鎖構造の違いをどこまで詳細に識別できるかを評価した。

まず、糖鎖マッピングでは、一度の分析で糖鎖構造とその分布の違いを明確にできること、すなわち、3つのEPOのシアル化、アセチル化、及び硫酸化の違いを識別できることを確認した。また、エキソグリコシダーゼ消化法を併用することによって、差異の原因となっている糖鎖の詳細な構造を解析できることを実証した。これらの結果は、製法変更に伴う新旧糖タンパク質の識別が可能であること、また、製法変更によって糖鎖構造が変化したとき、どのような変化が生じているのかを簡単に解析できることを示唆している。

これまで、糖鎖の構造には、構成単糖の種類、分岐構造、結合位置、結合様式、及び修飾の違いによる多様性が存在することから、糖鎖の不均一性を詳細に解析するには多大な労力と時間が必要とされてきた。そこで、品質評価・管理には、全糖鎖の構造を解析することよりも、活性に関与することが明らかかな構造の違いに基づく分析方法の利用、例えば、シアロ糖鎖の分布が活性に関与している場合は、等電点電気泳動法、キャピラリー電気泳動法などの電荷の相違に基づく分析法の利用が提唱されてきた。今回、モデルとして用いたEPOも、シアル酸結合数が生物活性に影響することが知られている糖タンパク質であり、等電点電気泳動法やキャピラリー電気泳動法の他、FACE, HPAEC-PAD, 及びシアル酸定量法などの利用が検討されてきた。しかし、今回の分析の結果、EPOの糖鎖には、硫酸基、及びアセチル基が結合していること、また、結合の程度はEPOによって異なることが明らかになった。硫酸基、及びアセチル基そのものの活性等に及ぼす影響はまだ明らかにされていないが、硫酸基の結合は、電荷に基づくシアロ糖鎖の分析に影響を与え、アセチル基の付加はサイズや疎水性の違いに基づく分析に影響を及ぼすことが考えられる。さらに、アセチル NeuAc は、シアル酸定量に影響を与えることが知られてい

る。従って、等電点電気泳動法、キャピラリー電気泳動法、FACE、HPAEC-PAD、及びシアル酸定量法だけでは、製造法変更に伴う糖鎖構造の変化を正確に把握することはできないと予想される。それに対して、我々が開発した糖鎖マッピングは、一度の分析で、糖鎖構造の僅かな違いを捉え、迅速かつ簡単にその構造を明らかにすることができることから、製造方法等変更後の同等性/同質性評価において、優れた能力を発揮できるものと思われる。例えば、Nグリコシルノイラミン酸や、Gal α 1-3Galのような糖鎖抗原などの出現にも迅速に対応できることが期待される。

糖タンパク質性医薬品には、組織プラスミノゲンアクチベータのように、分子内に複数の糖鎖が結合しており、それぞれの糖鎖が異なった役割を担っているものも少なくない。また、各糖鎖が高次構造や安定性に寄与しているという研究結果も報告されており、部位ごとの糖鎖の不均一性を明らかにすることはより重要であると思われる。従来から糖鎖結合部位ごとの糖鎖構造解析に、オンライン、またはオフラインによるMSとペプチド/糖ペプチドマッピングの組み合わせが用いられてきた。従来法では、トリフルオロ酢酸などの酸溶媒により、ペプチド及び糖ペプチドを溶出させてペプチド・糖ペプチドマップを作成し、結合している主な糖鎖の構造は、糖ペプチドのマスマスペクトルから解析された。しかし、この方法では主成分のイオン強度が大きいため、マイナー成分や修飾糖鎖などのイオンピークが検出され難く、詳細な糖鎖構造に関する情報を得ることは難しかった。これに対して、我々が見出した糖ペプチドマッピングは、ペプチドと糖ペプチド混合物から、糖ペプチドが優先的に溶出され、さらに各糖ペプチドは、結合している糖鎖の違いによって細かく分離されるため、糖鎖結合部位ごとの糖鎖の不均一性をより詳細に解析することが可能である。

実際、糖ペプチドマッピングでは、EPOの4つの糖鎖結合部位ごとの糖鎖の不均一性の違いを明らかにできることを確認した。すなわち、1)糖鎖マッピングで見出されたEPO-Aのジシアロ及びトリシア

ロ4本鎖糖鎖はAsn24に結合していること、2)EPO-B及びCのアセチル化はすべての部位で起きているが、EPO-BはAsn83で、また、EPO-CはAsn24で顕著であること、3)EPO-Cの硫酸化はAsn38及びAsn83で起きていること、が明らかになった。

以上のように、本研究では、我々が開発した糖鎖マッピングと糖ペプチドマッピングの、製造法変更等によって得られる新旧糖タンパク質性医薬品の同等性/同質性評価法としての有用性を評価し、糖鎖マッピングは、糖鎖の構造と分布の違いに基づく糖タンパク質の差異を識別できること、さらに、エキソグリコシダーゼ消化法を併用することによって、差異の原因となっている糖鎖の構造を解析できること、また、糖ペプチドマッピングを行うことによって、その糖鎖が結合している部位を明らかにできることを確認した。従って、糖鎖マッピング、及び糖ペプチドマッピングは、糖タンパク質性医薬品の同等性/同質性評価法として有用であると思われる。

E. 結論

糖鎖マッピング、及び糖ペプチドマッピングは、糖鎖の構造とその分布の違いに基づく糖タンパク質の差異の識別、差異の原因となる糖鎖構造の解析、及びその糖鎖の結合部位を明らかにできることから、糖タンパク質性医薬品の同等性/同質性評価法として有用であることが確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawasaki, N., Ohta, M., Itoh, S., Hyuga, M., Hyuga, S., and Hayakawa, T.: The usefulness of sugar-mapping by liquid chromatography /mass spectrometry in comparability assessments of glycoprotein products. submitted.
- 2) Kawasaki, N., Haishima, Y., Ohta, M., Itoh, S., Hyuga, M., Hyuga, S., and Hayakawa, T.: Structural analysis of sulfated N-linked oligosaccharides in erythropoietin. *Glycobiology*, in press.

- 3) Kawasaki, N., Ohta, M., Itoh, S., and Hayakawa, T.: Analyses of glycoproteins and glycopeptides by liquid chromatography/mass spectrometry, and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Methods Molecular Biology*, in press
- 4) Kawasaki, N.: Analysis of interactions between carbohydrates and proteins. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 13, supplement GT-C04E (2001)
- 5) Ohta, M., Kawasaki, N., Hyuga, S., Hyuga, S., and Hayakawa, T.: Selective glycopeptide mapping of erythropoietin by on-line high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 910, 1-11 (2001).
- 6) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 太田美矢子, 日向昌司, 日向須美子, 早川堯夫: 糖鎖含有タンパク質製剤の品質評価試験法に関する研究(III). *衛研報告* (印刷中)
- 6) 太田美矢子, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 日向昌司, 日向須美子, 早川堯夫: LC/MS を用いた糖ペプチドマッピング法による甲状腺刺激ホルモンの部位特異的な糖鎖の不均一性の解析. 日本薬学会第 122 年会 (2002, 3)
- 7) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 太田美矢子, 日向昌司, 日向須美子, 早川堯夫: LC/MS を用いたタイプの異なる N-結合型糖鎖の一斉分析. 日本薬学会第 122 年会 (2002, 3)

2. 学会発表

- 1) 沢井 勇, 斎藤芳郎, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 早川堯夫, 高橋和彦: ヒト selenoprotein P の糖鎖構造解析. 第 38 回日本生化学会北海道支部例会 (2001, 7)
- 2) 川崎ナナ, 配島由二, 太田美矢子, 伊藤さつき, 日向昌司, 日向須美子, 早川堯夫: LC/MS 及び NMR を用いたエリスロポエチンの硫酸化糖鎖の構造解析. 第 74 回日本生化学会大会 (2001, 10)
- 3) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 日向昌司, 太田美矢子, 日向須美子, 早川堯夫: LC/MS 及び LC/MS/MS を用いた組換え型ヒトフォリスタチンの糖鎖構造解析. 第 74 回日本生化学会大会 (2001, 10)
- 4) 沢井 勇, 斎藤芳郎, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 早川堯夫, 高橋和彦: ヒト selenoprotein P の糖鎖構造解析. 第 74 回日本生化学会大会 (2001, 10)
- 5) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 太田美矢子, 日向昌司, 日向須美子, 早川堯夫: キャピラリー LC/MS による微量糖タンパク質糖鎖の構造解析. 日本薬学会第 122 年会 (2002, 3)

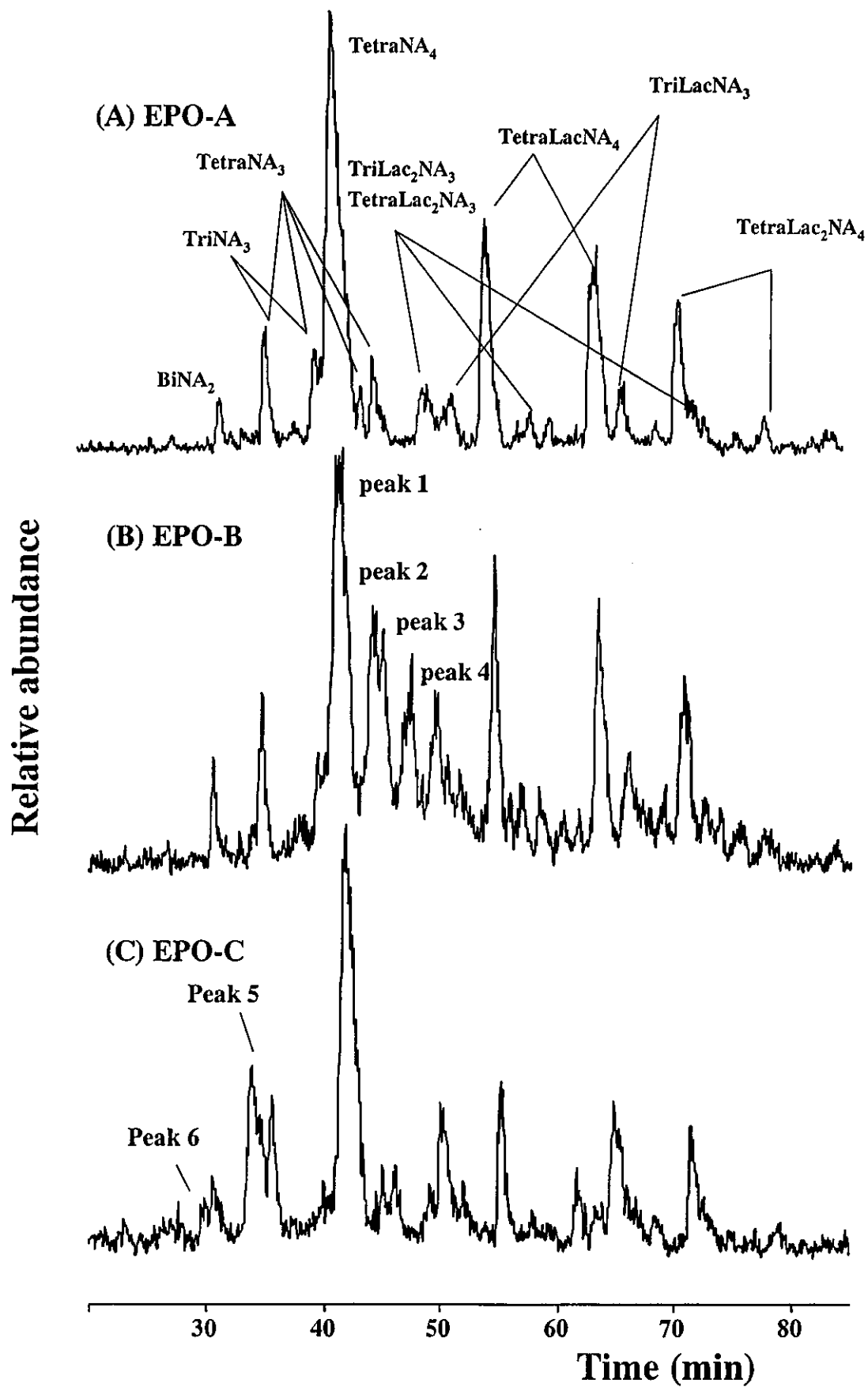


Fig. 1 Sugar mapping of EPO-A, B and C by LC/MS

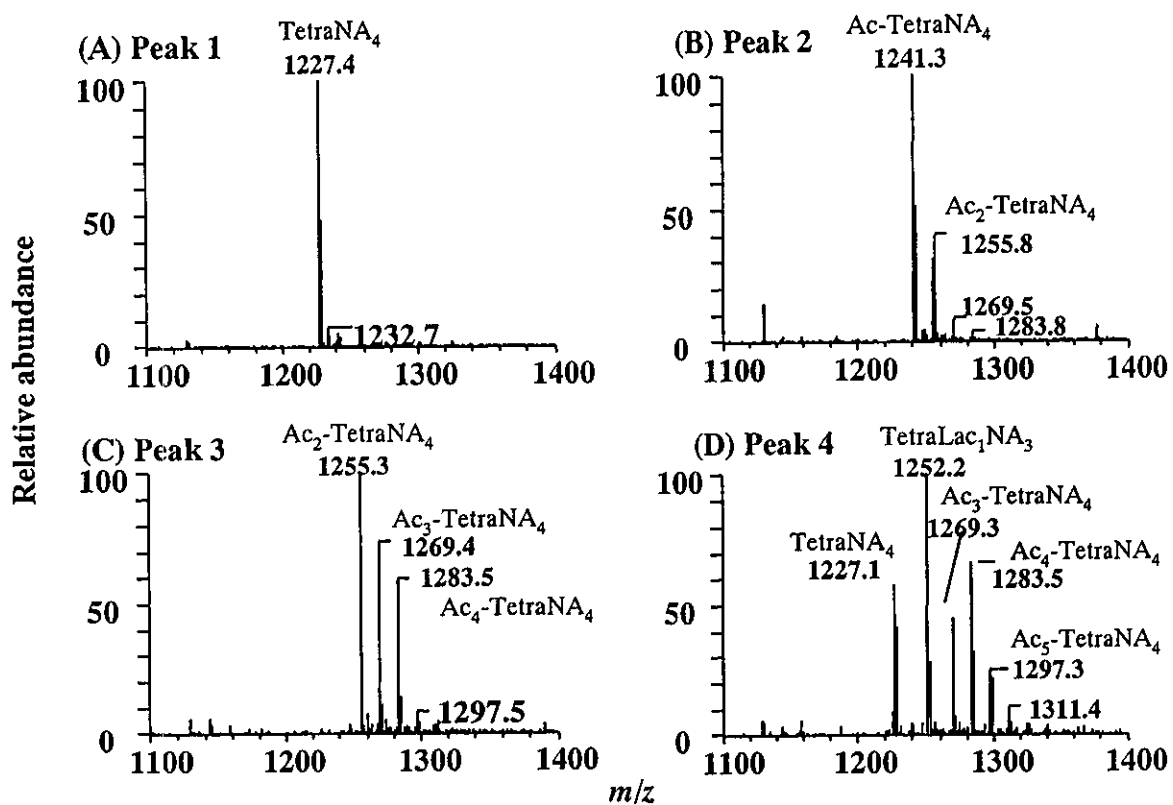


Fig. 2 Mass spectra of peaks 1-4 in Fig. 1B

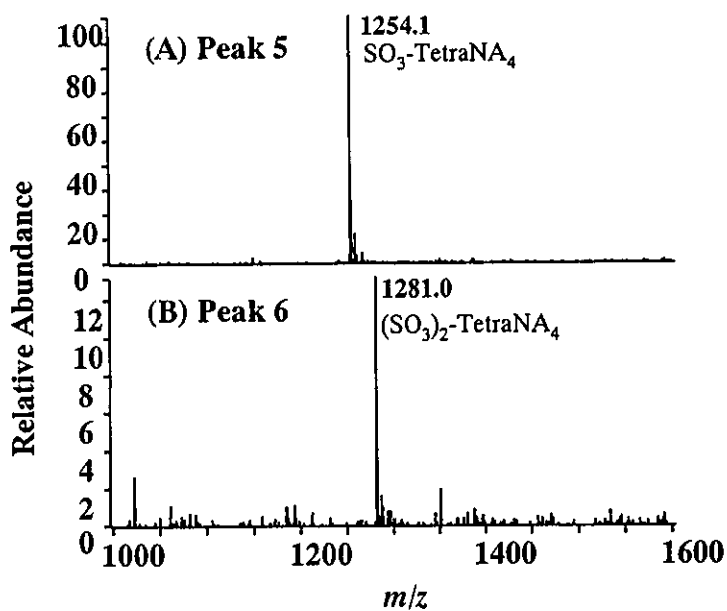


Fig. 3 Mass spectra of peaks 5, 6 in Fig. 1C

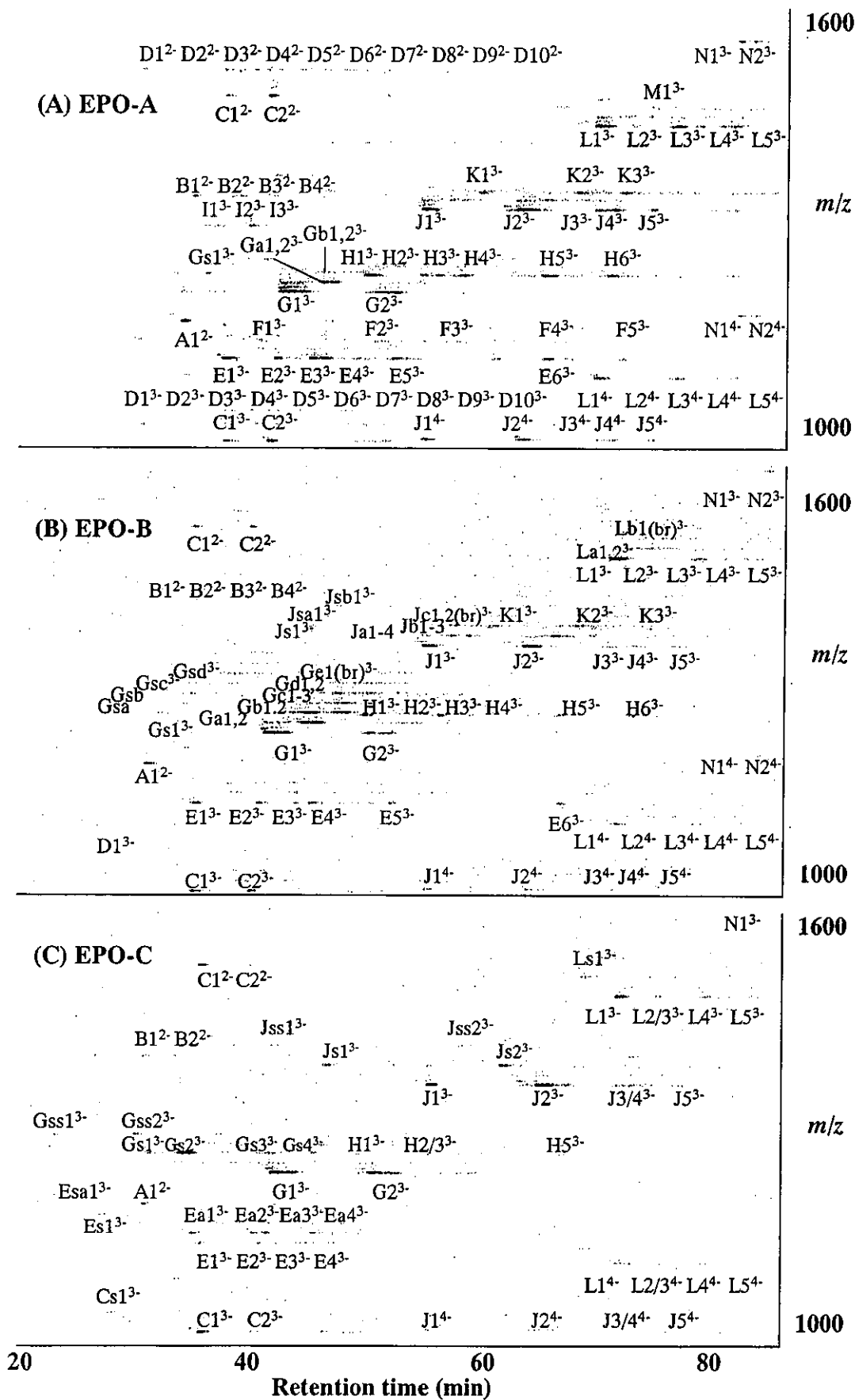


Fig. 4 2-D sugar maps of EPO-A, -B, and -C

Table 1

Carbohydrate structures of A1-N2 in Fig. 4, and their theoretical masses and observed m/z values

No	Carbohydrate structure ^a	Theoretical mass ^b	Observed m/z											
			EPO-A			EPO-B			EPO-C					
			M ²⁻	M ³⁻	M ⁴⁻	M ²⁻	M ³⁻	M ⁴⁻	M ²⁻	M ³⁻	M ⁴⁻			
A1	BiNA ₂	2372.2	1185.0			1184.9			1185.3					
B1	Bi Lac ₁ NA ₂ , TriNA ₂ ^c	2737.5	1367.9			1367.5			1367.9					
B2	Bi Lac ₁ NA ₂ , TriNA ₂	2737.5	1367.3			1367.5			1367.8					
B3	Bi Lac ₁ NA ₂ , TriNA ₂	2737.5	1367.9			1367.5			1367.4					
B4	Bi Lac ₁ NA ₂ , TriNA ₂	2737.5	1367.5			1367.5			1367.4					
C1	TriNA ₃	3028.8	1513.3	1008.7		1513.4		1008.5	1513.1			1008.5		
C2	TriNA ₃	3028.8	1513.1	1008.5		1513.5		1008.5	1513.4			1009.1		
Cs1	Ac-TriNA ₃	3070.8							nd					
D1	BiLac ₂ NA ₂ , TriLac ₁ NA ₂ , TetraNA ₂ ^d	3102.9	1551.0	1033.4		1550.8		1033.5						
D2	BiLac ₂ NA ₂ , TriLac ₁ NA ₂ , TetraNA ₂	3102.9	1549.8	1033.9										
D3	BiLac ₂ NA ₂ , TriLac ₁ NA ₂ , TetraNA ₂	3102.9	1550.4	1033.0										
D4	BiLac ₂ NA ₂ , TriLac ₁ NA ₂ , TetraNA ₂	3102.9	1550.8	1033.8										
D5	BiLac ₂ NA ₂ , TriLac ₁ NA ₂ , TetraNA ₂	3102.9	1549.7	1033.2										
D6	BiLac ₂ NA ₂ , TriLac ₁ NA ₂ , TetraNA ₂	3102.9	1550.6	1033.8										
D7	BiLac ₂ NA ₂ , TriLac ₁ NA ₂ , TetraNA ₂	3102.9	1550.4	1033.3										
D8	BiLac ₂ NA ₂ , TriLac ₁ NA ₂ , TetraNA ₂	3102.9	1550.2	1033.6										
D9	BiLac ₂ NA ₂ , TriLac ₁ NA ₂ , TetraNA ₂	3102.9	1551.0	1033.4										
D10	BiLac ₂ NA ₂ , TriLac ₁ NA ₂ , TetraNA ₂	3102.9	1550.3	1032.9										
E1	TriLac ₁ NA ₃ , TetraNA ₃ ^e	3394.1							1130.4					1130.5
E2	TriLac ₁ NA ₃ , TetraNA ₃	3394.1							1130.2					1130.2
E3	TriLac ₁ NA ₃ , TetraNA ₃	3394.1							1130.3					1130.6
E4	TriLac ₁ NA ₃ , TetraNA ₃	3394.1							1130.3					1130.4
E5	TriLac ₁ NA ₃ , TetraNA ₃	3394.1							1130.4					1130.4
E6	TriLac ₁ NA ₃ , TetraNA ₃	3394.1							1130.6					1130.3
Ea1	Ac-TriLac ₁ NA ₃ , Ac-TetraNA ₃	3436.1							1130.6					1130.4
Ea2	Ac-TriLac ₁ NA ₃ , Ac-TetraNA ₃	3436.1							1130.3					1144.0
Ea3	Ac-TriLac ₁ NA ₃ , Ac-TetraNA ₃	3436.1							1130.3					1144.0
Ea4	Ac-TriLac ₁ NA ₃ , Ac-TetraNA ₃	3436.1							1130.3					1144.1
Es1	SO ₃ -TriLac ₁ NA ₃ , SO ₃ -TetraNA ₃	3474.2							1130.4					1144.2
F1	TriLac ₂ NA ₂ , TetraLac ₁ NA ₂ ^f	3468.2							1130.3					1157.2
F2	TriLac ₂ NA ₂ , TetraLac ₁ NA ₂	3468.2							1154.9					
F3	TriLac ₂ NA ₂ , TetraLac ₁ NA ₂	3468.2							1155.3					
F4	TriLac ₂ NA ₂ , TetraLac ₁ NA ₂	3468.2							1155.5					
F4	TriLac ₂ NA ₂ , TetraLac ₁ NA ₂	3468.2							1155.4					

F5	TriLac ₂ NA ₂ , TetraLac ₁ NA ₂	3468.2	1155.4						
G1	TetraNA ₄	3685.4	1227.4	1227.4					1227.5
G2	TetraNA ₄	3685.4	1227.4	1227.1					1227.3
Ga1	Ac-TetraNA ₄	3727.4	1241.5	1241.3					
Ga2	Ac-TetraNA ₄	3727.4	1241.5	1241.3					
Gb1	Ac ₂ -TetraNA ₄	3769.5	1256.2	1255.8					
Gb2	Ac ₂ -TetraNA ₄	3769.5	1255.5	1255.3					
Gc1	Ac ₃ -TetraNA ₄	3811.5		1269.5					
Gc2	Ac ₃ -TetraNA ₄	3811.5		1269.3					
Gc3	Ac ₃ -TetraNA ₄	3811.5		1269.3					
Gd1	Ac ₄ -TetraNA ₄	3853.5		1283.5					
Gd2	Ac ₄ -TetraNA ₄	3853.5		1283.8					
Gd3	Ac ₄ -TetraNA ₄	3853.5		1283.5					
Ge1br	Ac ₅ -TetraNA ₄	3895.6		1297.7					
Gs1	SO ₃ -TetraNA ₄	3765.5	1254.5	1254.4					1253.9
Gs2	SO ₃ -TetraNA ₄	3765.5							1254.1
Gs3	SO ₃ -TetraNA ₄	3765.5							1253.9
Gs4	SO ₃ -TetraNA ₄	3765.5							1254.0
Gss1	(SO ₃) ₂ -TetraNA ₄	3845.5							1280.7
Gss2	(SO ₃) ₂ -TetraNA ₄	3845.5							1281.0
Gsa1	SO ₃ -Ac-TetraNA ₄	3807.5							
Gsb1	SO ₃ -Ac ₂ -TetraNA ₄	3849.5							
Gsc1br	SO ₃ -Ac ₃ -TetraNA ₄	3891.6							
Gsd1br	SO ₃ -Ac ₄ -TetraNA ₄	3933.6							
H1	TriLac ₂ NA ₃ , TetraLac ₁ NA ₃ ⁸	3759.5	1252.2	1252.2					1252.8
H2	TriLac ₂ NA ₃ , TetraLac ₁ NA ₃	3759.5	1252.2	1252.2					1252.5
H3	TriLac ₂ NA ₃ , TetraLac ₁ NA ₃	3759.5	1252.1	1252.4					
H4	TriLac ₂ NA ₃ , TetraLac ₁ NA ₃	3759.5	1252.2	1252.2					
H5	TriLac ₂ NA ₃ , TetraLac ₁ NA ₃	3759.5	1252.2	1252.6					1252.0
H6	TriLac ₂ NA ₃ , TetraLac ₁ NA ₃	3759.5	1252.1	1252.5					
I1	TetraLac ₂ NA ₂	3833.5	1276.8	1252.1					
I2	TetraLac ₂ NA ₂	3833.5	1276.9	1276.8					
I3	TetraLac ₂ NA ₂	3833.5	1276.3	1276.9					
J1	TetraLac ₁ NA ₄	4050.7	1349.1	1349.2	1011.8	1011.7	1011.7	1349.1	1011.8
J2	TetraLac ₁ NA ₄	4050.7	1349.0	1349.0	1011.9	1011.7	1011.7	1349.1	1011.7
J3	TetraLac ₁ NA ₄	4050.7	1348.7	1348.9	1011.1	1011.1	1011.1	1349.2	1011.2
J4	TetraLac ₁ NA ₄	4050.7	1349.3	1349.6	1011.3	1011.8	1011.8		
J5	TetraLac ₁ NA ₄	4050.7	1349.2	1349.4	1011.4	1011.5	1011.5	1349.3	1011.0
Ja1	Ac-TetraLac ₁ NA ₄	4092.7	1363.2	1363.2	1021.9	1021.9	1021.9		
Ja2	Ac-TetraLac ₁ NA ₄	4092.7	1363.3	1363.3	1022.0	1022.1	1022.1		
Ja3	Ac-TetraLac ₁ NA ₄	4092.7	1363.8	1363.0	rd	1022.9	1022.9		

Ja4	Ac-TetraLac ₁ NA ₄	4092.7	1363.0	1022.9	1363.5	1022.1
Jb1	Ac ₂ -TetraLac ₁ NA ₄	4134.8			1377.5	1032.9
Jb2	Ac ₂ -TetraLac ₁ NA ₄	4134.8			1377.2	1031.7
Jb3	Ac ₂ -TetraLac ₁ NA ₄	4134.8			1377.6	1032.8
Jc1br	Ac ₃ -TetraLac ₁ NA ₄	4176.8			1391.2	nd
Jc2br	Ac ₃ -TetraLac ₁ NA ₄	4176.8			1391.9	nd
Js1	SO ₃ -TetraLac ₁ NA ₄	4130.8			1375.8	1032.1
Js2	SO ₃ -TetraLac ₁ NA ₄	4130.8				
Jss1	(SO ₃) ₂ -TetraLac ₁ NA ₄	4210.8				
Jss2	(SO ₃) ₂ -TetraLac ₁ NA ₄	4210.8				
Jsa1	SO ₃ -Ac-TetraLac ₁ NA ₄	4172.8				
Jsb1	SO ₃ -Ac ₂ -TetraLac ₁ NA ₄	4172.8				
K1	TetraLac ₂ NA ₃	4124.8	1373.9		1390.6	nd
K2	TetraLac ₂ NA ₃	4124.8	1374.1		1404.1	1052.3
K3	TetraLac ₂ NA ₃	4124.8	1374.4		1374.1	
L1	TetraLac ₂ NA ₄	4416.1	1470.9	1103.1	1470.9	1103.1
L2	TetraLac ₂ NA ₄	4416.1	1470.4	1102.5	1471.0	1103.1
L3	TetraLac ₂ NA ₄	4416.1	1470.9	1103.2	1471.3	1102.9
L4	TetraLac ₂ NA ₄	4416.1	1471.5	1102.9	1471.6	1103.4
L5	TetraLac ₂ NA ₄	4416.1	1470.7	1103.3	1471.2	1103.2
La1	Ac-TetraLac ₂ NA ₄	4458.1			1485.2	1113.2
La2	Ac-TetraLac ₂ NA ₄	4458.1			1485.6	1113.7
Lb1br	Ac ₂ -TetraLac ₂ NA ₄	4500.2			1499.1	nd
Ls1	SO ₃ -TetraLac ₂ NA ₄	4496.2				
M1	TetraLac ₃ NA ₃	4490.1	1495.6			
N1	TetraLac ₃ NA ₄	4781.4	1592.8	1194.4	1592.9	1194.1
N2	TetraLac ₃ NA ₄	4781.4	1593.5	1194.1	1592.5	1194.7
					1498.3	1123.4
					1593.0	1195.2
					1593.3	1195.6

^a All carbohydrates contain fucosylated trimannosylcore. Bi, biantennary; Tri, triantennary; Tetra, tetraantennary; NA, NeuAc; Lac, N-acetylglucosamine. ^b average mass value. ^c% isomers