

Fig. 5 Sugar mapping of asialo-EPO-A, -B, and -C

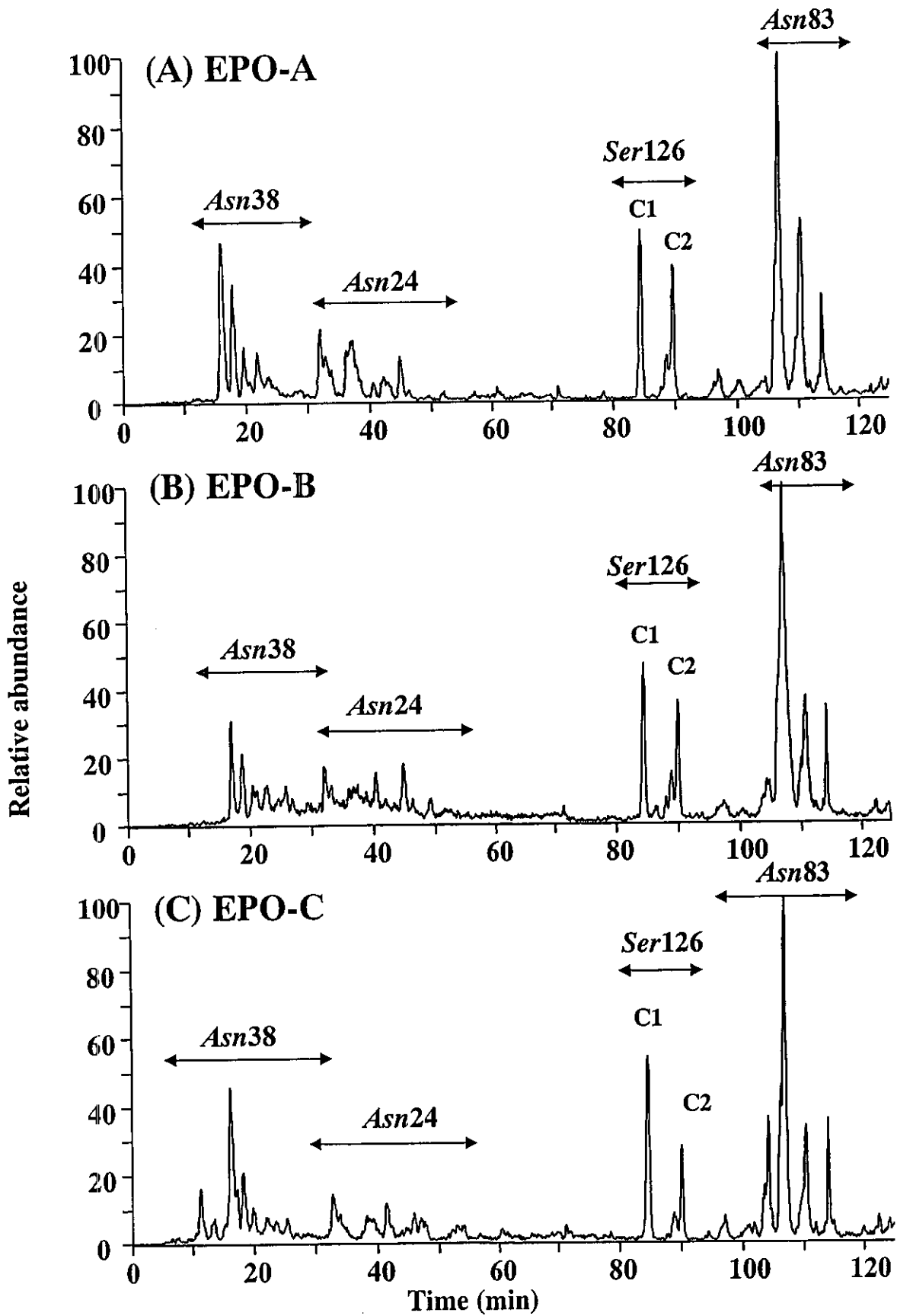


Fig. 6 glycopeptide mapping of EPO-A, -B, and -C

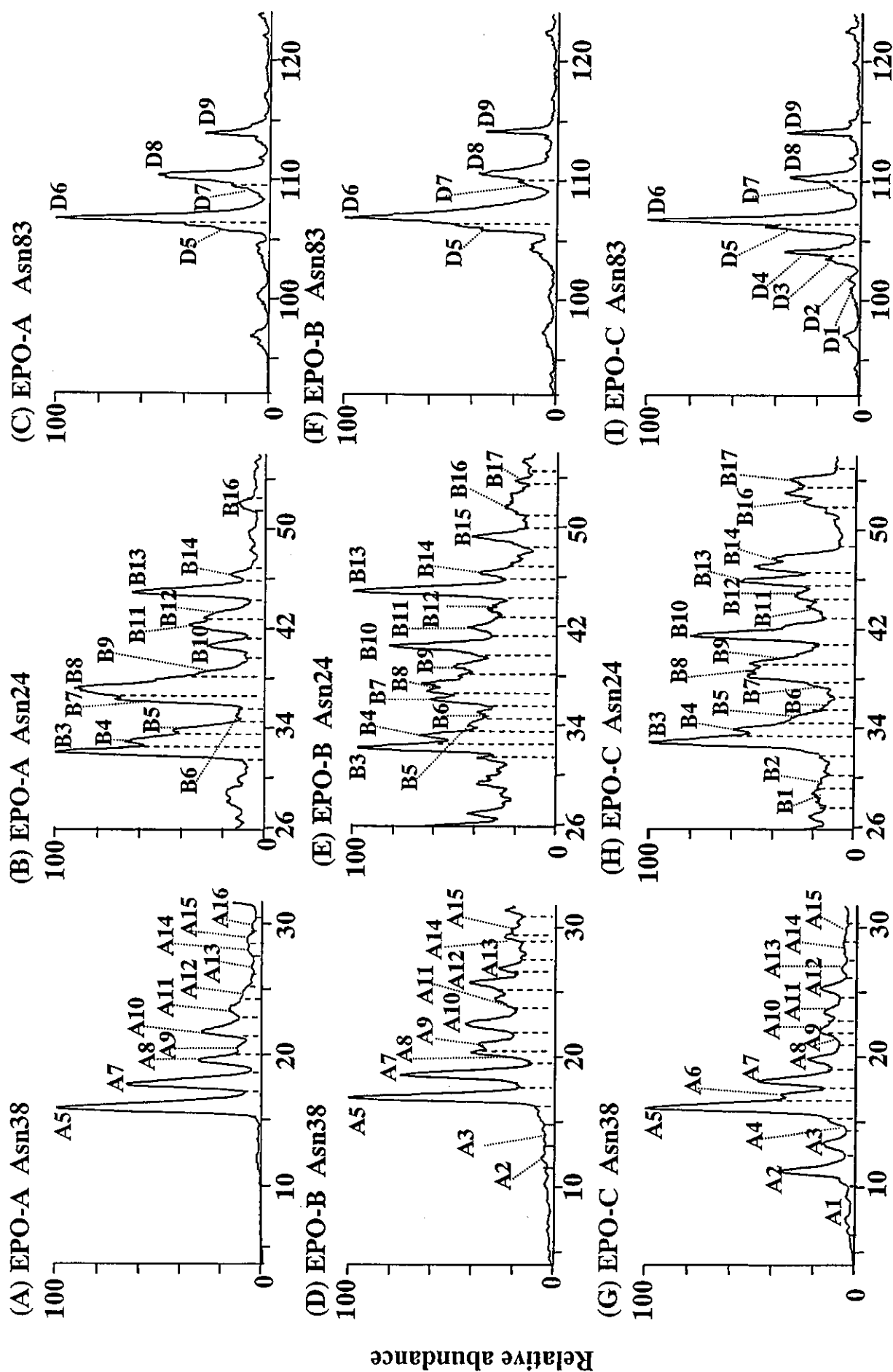


Fig. 7 Expanded views of glycopeptide maps of N38, N24, and N83 glycopeptides in EPO-A, -B, and -C Time (min)

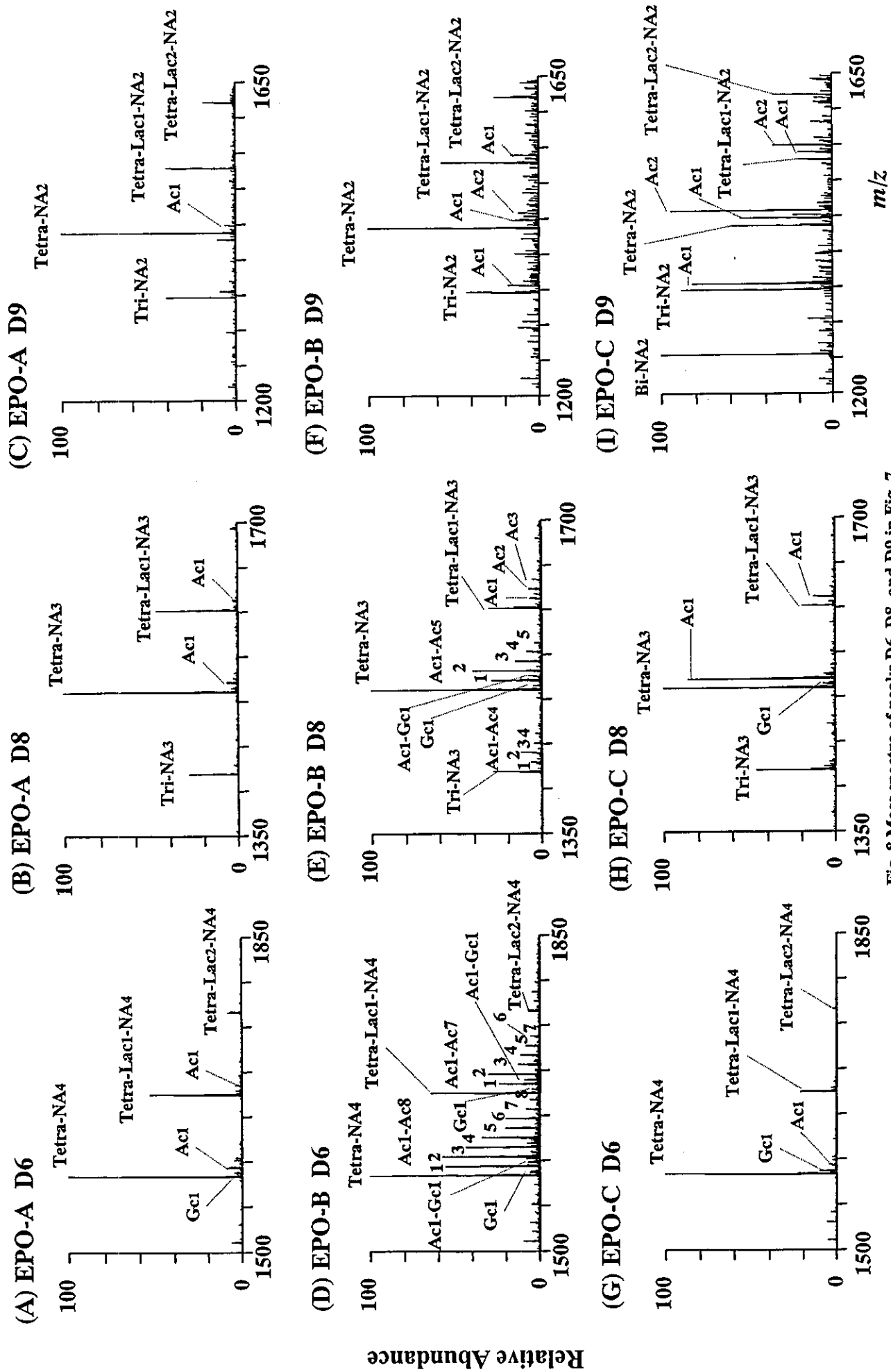


Fig. 8 Mass spectra of peaks D6, D8, and D9 in Fig. 7

Table 2 Peak number, glycoforms, and theoretical and observed m/z of N38 glycopeptides in EPO-A, B and C digests

Peak	Glycoform	Charge state	Theoretical m/z		Observed m/z		
			Mono	Average	EPO-A	EPO-B	EPO-C
A1	Tetra-NA ₄ -SO ₂	4-	1,119.1	1,119.8			1,119.3*
	Tetra-Lac1-NA ₄ -SO ₂	4-	1,210.4	1,211.1			1,210.3
A2	Tetra-NA ₄ -SO ₁	4-	1,099.1	1,099.8		1,099.5	1,099.8*
A3	Tetra-Lac1-NA ₄ -SO ₁	4-	1,190.4	1,191.1		1,190.6	1,190.9*
A4	Tetra-Lac2-NA ₄ -SO ₁	4-	1,281.7	1,282.4			1,281.5*
A5	Tetra-NA ₄ ¹⁾	4-	1,079.2	1,079.8	1,079.1*	1,079.4*	1,079.3*
A6	Tetra-NA ₄ ²⁾	4-	1,079.2	1,079.8			1,079.2*
A7	Tetra-Lac1-NA ₄	4-	1,170.4	1,171.1	1,170.3*	1,170.3*	1,170.2*
A8	Tetra-Lac2-NA ₄	4-	1,261.7	1,262.4	1,261.6*	1,261.8*	1,262.1*
A9	Tri-NA ₃ ³⁾	3-	1,220.5	1,221.2	1,220.8*	1,221.0	
	Tetra-Lac2-NA ₄	4-	1,261.7	1,262.4	1,261.9	1,261.7	1,262.1
	Tetra-Lac3-NA ₄	4-	1,353.0	1,353.8	1,352.8	1,352.9	1,353.4*
	Tetra-NA ₄ -Ac1	4-	1,089.7	1,090.3	1,089.8	1,089.7*	
A10	Tetra-NA ₃ (or Tri-Lac1-NA ₃) ⁴⁾	3-	1,342.2	1,342.9	1,341.5*	1,342.5*	1,342.6*
	Tetra-Lac1-NA ₄ -Ac1 ⁵⁾	4-	1,180.9	1,181.6		1,181.0	
A11	Tetra-Lac1-NA ₃ (or Tri-Lac2-NA ₃)	3-	1,463.9	1,464.7	1,464.1	1,463.9*	1,463.7
		4-	1,097.7	1,098.3	1,097.4*	1,097.6	1,097.6
	Tetra-Lac1-NA ₃ -Ac1 (or Tri-Lac2-NA ₃ -Ac1)	3-	1,477.9	1,478.7			1,478.1
	Tetra-NA ₃ -Ac1	3-	1,356.2	1,356.9			1,356.3*
A12	Tetra-Lac2-NA ₃	4-	1,188.9	1,189.6	1,189.1*	1,189.3	
	Tri-NA ₃ ⁶⁾	3-	1,220.5	1,221.2		1,220.5	1,220.7*
	Tetra-NA ₄ -Ac2 ⁷⁾	3-	1,467.2	1,468.0		1,467.6*	
A13	Tetra-NA ₃ (or Tri-Lac1-NA ₃) ⁸⁾	3-	1,342.2	1,342.9			1,342.9*
	Tetra-NA ₃ -Ac1 (or Tri-Lac1-NA ₃ -Ac1)	3-	1,356.2	1,356.9	1,356.3*	1,356.8*	
	Tetra-Lac3-NA ₃	4-	1,280.2	1,281.0	1,280.1		
	Tri-NA ₃	3-	1,220.5	1,221.2			1,220.7*
	Tri-NA ₂	3-	1,123.4	1,124.1	1,123.4		
	Tetra-Lac1-NA ₄ -Ac1 ⁹⁾	4-	1,180.9	1,181.6	1,181.0	1,180.9	
	Tetra-Lac1-NA ₄ -Ac2 ¹⁰⁾	4-	1,191.4	1,192.1		1,191.4*	
A14	Tetra-NA ₂ (or Tri-Lac1-NA ₂)	3-	1,245.1	1,245.8	1,245.4*	1,245.6*	1,245.3*
A15	Tetra-NA ₂ (or Tri-Lac1-NA ₂)	3-	1,245.1	1,245.8	1,245.4*	1,245.5	1,245.0*
	Tetra-NA ₂ -Ac1 (or Tri-Lac1-NA ₂ -Ac1)	3-	1,259.1	1,259.9			1,258.9
	Tetra-NA ₂ -Ac2 (or Tri-Lac1-NA ₂ -Ac2)	3-	1,273.1	1,273.9			1,273.2
	Tetra-Lac1-NA ₂ (or Tri-Lac2-NA ₂)	3-	1,366.9	1,367.6	1,366.5	1,367.5	1,367.4
	Tetra-NA ₄ -Ac2 ¹¹⁾	4-	1,100.2	1,100.8		1,100.1*	
	Tetra-NA ₄ -Ac3	4-	1,110.7	1,111.3		1,110.4	
	Tetra-Lac1-NA ₄ -Ac2 ¹²⁾	4-	1,191.4	1,192.1		1,191.6	
A16	Tetra-Lac2-NA ₂	3-	1,488.6	1,489.4	1,489.4*		
	Tetra-Lac1-NA ₂ (or Tri-Lac2-NA ₂)	3-	1,366.9	1,367.6	1,367.6		

All carbohydrates contain a fucosylated core. *, base peak in the mass spectra of each HPLC peak in Fig.2A; Mono, monoisotopic; Bi, biantennary; Tri, triantennary; Tetra, tetraantennary; NA, N-acetylneuramic acid, Lac, N-acetylglucosamine; Ac, acetyl; SO, sulphate; ¹⁾ and ²⁾, ³⁾ and ⁶⁾, ⁴⁾ and ⁸⁾, ⁵⁾ and ⁹⁾, ⁷⁾ and ¹¹⁾, ¹⁰⁾ and ¹²⁾, isomer.

Table 3 Peak number, glycoforms, and theoretical and observed m/z of N24 glycopeptides in EPO-A, B and C digest

Peak	Glycoform	Charge state	Theoretical m/z		Observed m/z		
			Mono	Average	EPO-A	EPO-B	EPO-C
B1	Tetra-NA4-SO1	4-	1,357.0	1,357.8			1,357.4*
B2	Tetra-Lac1-NA4-SO1	4-	1,448.3	1,449.1			1,448.4
	Tetra-Lac2-NA4-SO1	4-	1,539.5	1,540.5			1,540.2
B3	Tetra-NA4	4-	1,337.0	1,337.8	1,337.4*	1,337.2*	1,337.4*
B4	Tetra-Lac1-NA4	4-	1,428.3	1,429.1	1,428.5*	1,428.7*	1,428.3*
B5	Tetra-Lac2-NA4	4-	1,519.6	1,520.5	1,519.8*	1,520.1*	1,519.9*
B6	Tetra-Lac3-NA4	4-	1,610.8	1,611.8	1,611.6	1,611.1	1,610.8*
	Tetra-NA4-Ac1	4-	1,347.5	1,348.3	1,347.9*	1,347.8*	1,347.6
	Tri-NA3-SO1	4-	1,192.9	1,193.7			1,193.4*
	Tetra-Lac2-NA4-Ac1	4-	1,530.1	1,531.0			1,530.0
B7	Tri-NA3 ¹⁾	4-	1,172.9	1,173.6	1,173.1*	1,173.3*	1,173.2*
B8	Tetra-NA3 (or Tri-Lac1-NA3) ²⁾	4-	1,264.2	1,265.0	1,264.6*	1,264.1*	1,264.0
	Tetra-NA3-Ac1 (or Tri-Lac1-NA3-Ac1) ³⁾	4-	1,274.7	1,275.5			1,274.8*
	Tetra-Lac1-NA3 (or Tri-Lac2-NA3)	4-	1,355.5	1,356.3	1,356.0	1,355.5	1,355.4
	Tetra-Lac1-NA3-Ac1 (or Tri-Lac2-NA3-Ac1)	4-	1,366.0	1,366.8			1,366.0
B9	Tetra-Lac2-NA3	4-	1,446.8	1,447.6	1,446.7*	1,447.0	1,446.9
	Tetra-Lac2-NA3-Ac1	4-	1,457.3	1,458.1			1,457.0
	Tetra-Lac3-NA3	4-	1,538.1	1,539.0	1,538.2	1,538.3	1,538.4
	Tetra-NA3-Ac1 (or Tri-Lac1-NA3-Ac1)	4-	1,274.7	1,275.5			1,275.1*
	Tetra-NA3-Ac2 (or Tri-Lac1-NA3-Ac2)	4-	1,285.2	1,286.0			1,285.5
	Tetra-Lac1-NA3-Ac1 (or Tri-Lac2-NA3-Ac1)	4-	1,366.0	1,366.8			1,365.7
	Tetra-Lac1-NA3-Ac2 (or Tri-Lac2-NA3-Ac2)	4-	1,376.5	1,377.3			1,376.4
	Tetra-NA4-Ac2 ⁴⁾	4-	1,358.0	1,358.8		1,358.2*	
B10	Tri-NA3 ⁵⁾	4-	1,172.9	1,173.6	1,173.0*	1,173.4*	1,172.8*
	Tri-NA3-Ac1	4-	1,183.4	1,184.1			1,183.3
	Tetra-NA3 (or Tri-Lac1-NA3) ⁶⁾	4-	1,264.2	1,265.0			1,264.3
	Tetra-NA3-Ac1 (or Tri-Lac1-NA3-Ac1) ⁷⁾	4-	1,274.7	1,275.5	1,274.8		1,275.3
	Tetra-Lac1-NA3-Ac1 (or Tri-Lac2-NA3-Ac1)	4-	1,366.0	1,366.8	1,365.9		
B11	Tri-NA2 ⁸⁾	3-	1,467.2	1,468.1	1,467.3*	1,467.4	1,467.1
	Tri-NA2-Ac1	4-	1,110.7	1,111.3			1,110.6
	Tri-SA2-Ac2	4-	1,121.2	1,121.8		1,121.7	
	Tri-NA3-Ac1	4-	1,183.4	1,184.1		1,183.8	
	Tetra-NA2 (or Tri-Lac1-NA2)	4-	1,191.4	1,192.2	1,191.2	1,191.8	1,191.7
	Tetra-NA2-Ac1 (or Tri-Lac1-NA2-Ac1)	4-	1,201.9	1,202.7			1,201.6*
	Tetra-NA2-Ac2 (or Tri-Lac1-NA2-Ac2)	4-	1,212.4	1,213.2			1,213.0
	Tetra-NA4-Ac2 ⁹⁾	4-	1,358.0	1,358.8		1,358.0*	
B12	Tetra-NA2 (or Tri-Lac1-NA2)	4-	1,191.4	1,192.2	1,191.3*	1,192.1	
	Tetra-NA2-Ac1 (or Tri-Lac1-NA2-Ac1)	4-	1,201.9	1,202.7			1,202.0
	Tetra-NA2-Ac2 (or Tri-Lac1-NA2-Ac2)	4-	1,212.4	1,213.2			1,212.3*
	Tri-NA3-Ac1	4-	1,183.4	1,184.1		1,183.7*	
	Tetra-Lac1-NA2 (or Tri-Lac2-NA2)	4-	1,282.7	1,283.5	1,282.8		
	Tetra-Lac1-NA2-Ac2 (or Tri-Lac2-NA2-Ac2)	4-	1,303.7	1,304.5			1,303.5
	Tetra-Lac2-NA2	4-	1,374.0	1,374.8	1,374.2		
B13	Bi-NA2	3-	1,345.5	1,346.3	1,345.8*	1,345.4*	1,345.9*
	Bi-NA2-Ac1	3-	1,359.5	1,360.3			1,359.8
B14	Tri-NA2 ¹⁰⁾	4-	1,100.2	1,100.8	1,100.0*	1,100.8*	1,099.9
	Tri-NA2-Ac1	4-	1,110.7	1,111.3			1,110.7*
	Tri-NA3-Ac2	4-	1,193.9	1,194.7		1,194.5	
B15	Bi-NA2-Ac1	3-	1,359.5	1,360.3		1,359.3*	
	Tri-NA3-Ac2	4-	1,193.9	1,194.7		1,194.5	
B16	Bi-NA1	3-	1,248.5	1,249.2	1,248.3*	1,248.2*	1,248.3
	Bi-NA1-Ac1	3-	1,262.5	1,263.2			1,262.8*
	Tri-NA3-Ac2	4-	1,193.9	1,194.7		1,193.8	
B17	Bi-NA2-Ac2	3-	1,373.5	1,374.3		1,374.0*	
	Tri-NA1-Ac2	3-	1,398.2	1,399.0			1,398.1*

All carbohydrates contain a fucosylated core. *, base peak in the mass spectra of each HPLC peak in Fig. 2B; Mono, monoisotopic; Bi, biantennary; Tri, triantennary; Tetra, tetraantennary; NA, N-acetylneuramic acid; Lac, N-acetyllactosamine; Ac, acetyl; SO, sulphate; ¹⁾ and ³⁾, ²⁾ and ⁶⁾, ³⁾ and ⁷⁾, ⁴⁾ and ⁹⁾, ⁵⁾ and ¹⁰⁾, isomer.

Table 4 Peak number, glycoforms and theoretical and observed m/z of N83 glycopeptides in EPO-A, B and C digests.

Peak	Glycoform	Charge state	Calculated m/z		Observed m/z			
			Mono	Average	EPO-A	EPO-B	EPO-C	
D1	Tetra-Lac2-NA4-SO2	5-	1,443.6	1,444.4			1443.9*	
	Tetra-Lac2-NA3-SO2	5-	1,385.4	1,386.2			1,386.3	
D2	Tetra-NA4-SO2	4-	1,622.2	1,623.1			1622.6*	
	Tetra-Lac1-NA4-SO2	4-	1,713.4	1,714.4			1,714.5	
	Tetra-NA3-SO2	4-	1,549.4	1,550.3			1,549.7	
D3	Tetra-Lac1-NA4-SO1	4-	1,693.4	1,694.4			1694.1*	
	Tetra-Lac1-NA4-SO1-Gc1	4-	1,697.4	1,698.4			1,698.6	
	Tetra-Lac2-NA4-SO1	4-	1,784.7	1,785.8			1,784.7	
	Tetra-Lac2-NA4-SO1-Ac1	4-	1,795.2	1,796.3			1,795.1	
	Tetra-Lac2-NA4-SO1-Gc1	4-	1,788.7	1,789.8			1,788.8	
	Tetra-Lac3-NA4-SO1	5-	1,500.6	1,501.5			1,501.0	
	Tetra-Lac1-NA3-SO1	4-	1,620.7	1,621.6			1,620.8	
	Tetra-Lac2-NA3-SO1	4-	1,712.0	1,713.0			1,712.6	
D4	Tetra-NA4-SO1	4-	1,602.2	1,603.1			1602.7*	
	Tetra-NA4-SO1-Ac1	4-	1,612.7	1,613.6			1,612.9	
	Tetra-NA4-SO1-Gc1	4-	1,606.2	1,607.1			1,607.1	
	Tetra-Lac1-NA4-SO1	4-	1,693.4	1,694.4			1,694.1	
	Tetra-NA3-SO1	4-	1,529.4	1,530.3			1,530.3	
D5	Tetra-Lac2-NA4	4-	1,764.7	1,765.8	1764.8*	1764.9*	1765.4*	
	Tetra-Lac2-NA4-Ac1	4-	1,775.2	1,776.3	1,775.3	1,775.3		
	Tetra-Lac2-NA4-Ac2	4-	1,785.7	1,786.8		1,785.9		
	Tetra-Lac2-NA4-Ac3	4-	1,796.2	1,797.3		1,797.2		
	Tetra-Lac2-NA4-Ac4	4-	1,806.8	1,807.8		1,807.3		
	Tetra-Lac2-NA4-Gc1	4-	1,768.7	1,769.8	1,769.7	1,768.7	1,769.1	
	Tetra-Lac1-NA4	4-	1,673.5	1,674.4	1,673.6	1,674.1	1673.6*	
	Tetra-Lac1-NA4-Ac1	4-	1,684.0	1,684.9			1,684.3	
	Tetra-Lac1-NA4-Gc1	4-	1,677.5	1,678.4			1,677.9	
	Tetra-Lac3-NA4	4-	1,856.0	1,857.1	1,856.5	1,856.2	1,856.7	
	Tetra-Lac3-NA4-Ac1	4-	1,866.5	1,867.6		1,866.7		
	Tetra-Lac4-NA4	4-	1,947.3	1,948.4	1,947.7		1,947.8	
	D6	Tetra-NA4	4-	1,582.2	1,583.1	1582.6*	1582.9*	1582.8*
		Tetra-NA4-Ac1	4-	1,592.7	1,593.6	1,593.5	1,593.7	1,592.8
Tetra-NA4-Ac2		4-	1,603.2	1,604.1		1,603.9		
Tetra-NA4-Ac3		4-	1,613.7	1,614.6		1,613.9		
Tetra-NA4-Ac4		4-	1,624.2	1,625.1		1,624.4		
Tetra-NA4-Ac5		4-	1,634.7	1,635.6		1,635.4		
Tetra-NA4-Ac6		4-	1,645.2	1,646.2		1,645.6		
Tetra-NA4-Ac7		4-	1,655.7	1,656.7		1,656.3		
Tetra-NA4-Ac8		4-	1,666.2	1,667.2		1,667.1		
Tetra-NA4-Gc1		4-	1,586.2	1,587.1	1,586.9	1,587.2	1,586.7	
Tetra-NA4-Ac1-Gc1		4-	1,596.7	1,597.6		1,598.0		
Tetra-Lac1-NA4		4-	1,673.5	1,674.4	1,674.1	1,673.4	1,673.7	
Tetra-Lac1-NA4-Ac1		4-	1,684.0	1,684.9	1,684.6	1,684.0		
Tetra-Lac1-NA4-Ac2		4-	1,694.5	1,695.4		1,694.4		
Tetra-Lac1-NA4-Ac3		4-	1,705.0	1,706.0		1,705.2		
Tetra-Lac1-NA4-Ac4		4-	1,715.5	1,716.5		1,715.8		
Tetra-Lac1-NA4-Ac5		4-	1,726.0	1,727.0		1,726.8		
Tetra-Lac1-NA4-Ac6		4-	1,736.5	1,737.5		1,737.0		
Tetra-Lac1-NA4-Ac7		4-	1,747.0	1,748.0		1,747.7		
Tetra-Lac1-NA4-Gc1		4-	1,677.5	1,678.4		1,677.7		
Tetra-Lac1-NA4-Ac1-Gc1		4-	1,688.0	1,688.9		1,687.6		
Tetra-Lac2-NA4		4-	1,764.7	1,765.8	1,764.7	1,765.4	1,764.9	
D7		Tetra-Lac1-NA3 (or Tri-Lac2-NA3)	4-	1,600.7	1,601.6	1601.2*	1601.0*	1600.9*
	Tetra-Lac1-NA3-Ac1 (or Tri-Lac2-NA3-Ac1)	4-	1,611.2	1,612.1	1,612.1	1,611.7	1,611.3	
	Tetra-Lac1-NA3-Ac2 (or Tri-Lac2-NA3-Ac2)	4-	1,621.7	1,622.6		1,622.2	1,621.7	
	Tetra-Lac1-NA3-Ac3 (or Tri-Lac2-NA3-Ac3)	4-	1,632.2	1,633.1		1,632.4	1,632.4	
	Tetra-Lac1-NA3-Gc1	4-	1,604.7	1,605.6		1,604.9	1,604.8	
	Tetra-Lac2-NA3	4-	1,692.0	1,692.9	1692.0*	1,692.4	1,691.8	
	Tetra-Lac2-NA3-Ac1	4-	1,702.5	1,703.5	1,703.0	1,702.9	1,702.4	
	Tetra-Lac2-NA3-Ac2	4-	1,713.0	1,714.0		1,713.5	1,713.1	
	Tetra-Lac2-NA3-Ac3	4-	1,723.5	1,724.5		1,723.7	1,723.7	
	Tetra-Lac2-NA3-Gc1	4-	1,696.0	1,696.9			1,696.0	
	Tetra-Lac3-NA3	4-	1,783.2	1,784.3	1,784.4	1,784.0	1,784.1	
	Tetra-Lac3-NA3-Ac1	4-	1,793.8	1,794.8		1,794.5	1,794.7	
	Tetra-Lac3-NA3-Ac2	4-	1,804.3	1,805.3		1,805.1		

D8	Tetra-Lac4-NA3	4-	1,874.5	1,875.6	1,875.1		1,874.8
	Tetra-NA3 (or Tri-Lac1-NA3)	4-	1,509.4	1,510.3	1509.9*	1509.5*	1509.5*
	Tetra-NA3-Ac1 (or Tri-Lac1-NA3-Ac1)	4-	1,519.9	1,520.8	1,520.1	1,520.0	1,519.7
	Tetra-NA3-Ac2 (or Tri-Lac1-NA3-Ac2)	4-	1,530.4	1,531.3		1,530.7	
	Tetra-NA3-Ac3 (or Tri-Lac1-NA3-Ac3)	4-	1,540.9	1,541.8		1,541.5	
	Tetra-NA3-Ac4 (or Tri-Lac1-NA3-Ac4)	4-	1,551.4	1,552.3		1,552.4	
	Tetra-NA3-Ac5 (or Tri-Lac1-NA3-Ac5)	4-	1,561.9	1,562.8		1,561.9	
	Tetra-NA3-Gc1 (or Tri-Lac1-NA3-Gc1)	4-	1,513.4	1,514.3		1,513.1	1,514.1
	Tetra-NA3-Ac1-Gc1 (or Tri-Lac1-NA3-Ac1-Gc1)	4-	1,523.9	1,524.8		1,524.2	
	Tetra-Lac1-NA3 (or Tri-Lac2-NA3)	4-	1,600.7	1,601.6	1,601.7	1,600.8	1,601.1
	Tetra-Lac1-NA3-Ac1 (or Tri-Lac2-NA3-Ac1)	4-	1,611.2	1,612.1	1,611.7	1,611.7	1,611.9
	Tetra-Lac1-NA3-Ac2 (or Tri-Lac2-NA3-Ac2)	4-	1,621.7	1,622.6		1,622.2	
	Tetra-Lac1-NA3-Ac3 (or Tri-Lac2-NA3-Ac3)	4-	1,632.2	1,633.1		1,632.4	
	Tri-NA3	4-	1,418.1	1,418.9	1,418.8	1,418.7	1,418.6
	Tri-NA3-Ac1	4-	1,428.6	1,429.5		1,429.4	
	Tri-NA3-Ac2	4-	1,439.1	1,440.0		1,439.5	
	Tri-NA3-Ac3	4-	1,449.6	1,450.5		1,450.0	
Tri-NA3-Ac4	4-	1,460.1	1,461.0		1,461.0		
D9	Tetra-NA2 (or Tri-Lac1-NA2)	4-	1,436.6	1,437.5	1437.0*	1437.4*	1,436.7
	Tetra-NA2-Ac1 (or Tri-Lac1-NA2-Ac1)	4-	1,447.1	1,448.0	1,447.5	1,448.0	1,447.4
	Tetra-NA2-Ac2 (or Tri-Lac1-NA2-Ac2)	4-	1,457.6	1,458.5		1,458.8	1,457.6
	Tri-NA2	4-	1,345.3	1,346.1	1,345.4	1,345.4	1,345.2
	Tri-NA2-Ac1	4-	1,355.8	1,356.6		1,355.8	1,356.0
	Tetra-Lac1-NA2 (or Tri-Lac2-NA2)	4-	1,527.9	1,528.8	1,527.8	1,528.9	1,527.5
	Tetra-Lac1-NA2-Ac1 (or Tri-Lac2-NA2-Ac1)	4-	1,538.4	1,539.3		1,539.3	1,538.5
	Tetra-Lac1-NA2-Ac2 (or Tri-Lac2-NA2-Ac2)	4-	1,548.9	1,549.8			1,549.6
	Tetra-Lac2-NA2	4-	1,619.2	1,620.1	1,620.5	1,619.9	1,620.4
	Bi-NA2	4-	1,254.1	1,254.8			1,254.8*

All carbohydrates contain fucosylated core. *, base peak in the mass spectra of each peak in Fig. 2D; Mono, monoisotopic; Bi, biantennary; Tri, triantennary; Tetra, tetraantennary; NA, N-acetylneuramic acid, Lac, N-acetylglucosamine; Ac, acetyl; Gc, glycolyl; SO, sulphate.

Table 5 Peak number, glycoforms, and theoretical and observed m/z of O126 glycopeptides in EPO-A, B and C digests

Peak	Glycoform	Charge state	Theoretical m/z		Observed m/z		
			Mono	Average	A	B	C
C1	NA2-Gal-GalNAc	2-	1,391.1	1,391.9	1,391.1	1,392.0	1,391.5
C2	NA-Gal-GalNAc	2-	1,245.6	1,246.3	1,246.0	1,245.6	1,245.7

Peak C1 and C2 was shown in Fig. 1. NA, N-acetylneuramic acid; Mono, monoisotopic.

分担研究報告書

医薬品等の品質規格に係る国際的動向を踏まえた評価に関する研究

分担研究者：新見伸吾（国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部診断用医薬品室長）

研究要旨

医薬品審査の国際調和を目指した研究の一環として、現在抗凝固薬としての申請が予定されているヒトトロンボモジュリン(h-TM)について共通力価測定法の確立、共通力価測定法を用いた単位の定義及び h-TM 日本初回標準品の設定を行った。h-TM 共通力価測定法における反応は主に h-TM と h-トロンビンの複合体形成、複合体による h-プロテイン C の活性化、h-プロテイン C による基質の切断から成り立っている。標準力価測定法を用いて尿由来 h-TM (uh-TM) の活性を測定した結果、12 分まで基質切断時間と基質である S-2366 から形成されたパラニトロアニリンの間に良好な直線関係が得られた。そこで、共通力価測定法における基質切断時間を 10 分と設定した。また、この共通力価測定法において反応 1 分当たり 0.1 μmol のパラニトロアニリンを形成する h-TM の活性を 1JRS 単位と定めた。共通力価測定法を用いて組換え h-TM(rh-TM)と uh-TM 社内標準物質を測定した結果、それぞれ個々の会社で定めた活性のある一定範囲において直線的な濃度依存曲線が得られた。さらに、共通力価測定法を用いて h-TM の活性を測定し、得られた分散係数 (CV) に基づきその妥当性について評価した。その結果、uh-TM 活性の測定において h-トロンビンと h-プロテイン C のロット間 CV はそれぞれ 2.90%と 6.57%であった。さらに、TJRS 1 と名付けた h-TM 1 次国内標準品を用いて同時、日間、施設間再現性を調べた結果、分散係数はそれぞれ 1.30%、1.63%、5.02%であった。また、本測定において h-TM 1 次国内標準品の力価は 1 アンプル当たり 205JRS 単位であることも明らかになった。次に、設定した h-TM 1 次国内標準品の安定性について様々な温度条件で保存した同標準品を測定することにより評価した。その結果、アレニウスプロットから予想される力価の低下は 103 年間-20°C で保存した場合 3.0%以下であった。以上の結果から、今回設定した共通力価測定法は h-TM の力価を測定するのに適しており、さらに今回力価が測定された h-TM 1 次国内標準品は -20°C の条件で長期間安定に保存できることが示された。

A. 研究目的

トロンボモジュリン (TM) は血管内皮細胞表面に存在するトロンビン受容体であり、トロンビンがプロテイン C を活性化する際の補助因子として発見された。その後の研

究から、TM は、ユニークかつ強力な抗凝固作用を有することが明らかになり、抗血栓薬として現在国内で 2 社が臨床応用を目指した開発を行っている。両社の h-TM とも *in vitro* の試験においてトロンビン依存

的なプロテインC活性化能を始めとする各種抗凝固作用を有していること、また各種血栓モデル動物においても著明な血栓形成抑制作用を有することが報告されている。このような検討においてTMの有用性が認められたことから、現在、臨床試験が行われており、それらの新薬としての承認申請は間近に迫っている。

しかし現状では、TMの臨床適用の基礎となる医薬品の品質や特性を評価するうえで次の様な問題点が残されている。1つはTMの活性測定法及び力価(単位)の定義が両社で異なっていることである。また、両社ともそれぞれ独自に開発を進めた経緯から、A社は組換えヒト型(rh-TM)B社はヒト尿由来h-TM(uh-TM)と由来が異なっているだけでなく精製方法やプロセッシングによるC末端側の欠失状況に違いがあり、必ずしもその特性が同一ではない可能性もある。このような現状で力価の決定をそれぞれ任意の個別の測定法に委ねたままにしておくことは、これら医薬品の特性、品質の相互比較はもとより臨床上の相対評価を困難にし、ひいては臨床適用にあたって無用の混乱を招くことになる。さらに、今後、国内外においてh-TMを医薬品として開発する会社があらわれたり、現在開発中の2社が国外の会社と提携してh-TMを様々な国で販売するような事態になればこのような危惧は、ますます深刻かつ複雑になることが予想される。このような問題は、昨今医薬品審査の国際的な調和が提唱されている状況において、その流れに逆向するものでぜひとも回避しなければならない。

そこで、我々はh-TMに関し今後臨床適用に当たって予想される危惧を回避するた

め、h-TMの共通力価測定法の確立、確立された共通法における力価の定義及び適切なh-TM国内標準品の設定を行った。さらに、共通力価測定法の妥当性並びにh-TM国内標準品の安定性についても検討を行った。先ほど述べたように、両社で活性測定法は異なっており、A社は測定法A、B社は測定法Bを用いて活性測定を行っている。従って、共通力価測定法はこれらの測定法を至適化し統一することにより設定することが望ましい。両社の方法はいくつかの点で異なっているが、その主な違いは活性化プロテインCの合成基質である。その違いにより、合成基質からの生成物の測定においてA法では蛍光法、B法では吸光度法が用いられている。そのうち吸光度法のほうがデータの相互比較の点で容易であることから共通法としては適切と考えられ、B法を以下のように改変し共通力価測定法の確立を試みた。まず、基質のインキュベーション時間に関してB法は比較的短いことから、多数のサンプルの測定に相当ではない。そこで共通法においては基質のインキュベーション時間を延長した。さらに、B法においてプロテインCはヒト由来のものを用いているが、トロンビンについてはウシ由来のものを用いているため、ヒトにおける薬効を評価するには必ずしも適当ではないという問題点もあった。そこで共通法においてはヒト由来のトロンビン及びプロテインCを用いることとした。このようにして設定した測定法の共通力価測定法としての妥当性は各種測定で得られた分散係数を基に評価した。

B. 研究方法

緩衝液 (I=3.0)

3.03g のトリス (ヒドキシメチル) アミノメタンと 1.7g のイミダゾールを 50ml の 1M 塩酸に溶かし、蒸留水で全量を 100ml にした。この液に 11.7g の塩化ナトリウムを加えて溶かし、溶液 A とした。4.04g のトリス (ヒドキシメチル) アミノメタン、2.27g のイミダゾール、0.6g のアジ化ナトリウム、1.95g の塩化ナトリウムを蒸留水に溶かし、全量を 100ml とした。この液に 11.7g の塩化ナトリウムを加えて溶かし、溶液 B とした。100ml の溶液 B に対して溶液 A を適宜混合し pH8.4 に調整した。この混合液を緩衝液 (I=3.0) とした。

h-TM サンプル

rh-TM 標準品(TS6)は適当量の rh-TM 溶液をアンプルに加え、凍結乾燥することにより調製した。rh-TM 標準品を含む 1 アンプルに 1.0ml の蒸留水を加えて溶かし、そのうちの 0.25ml を 0.05%(v/v) ツイーン 20 を含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) 4.75ml と混合した。

uh-TM 標準品(TM003)は適当量の uh-TM 溶液をバイアルに加え、凍結乾燥することにより調製した。uh-TM 標準品をふくむ 1 バイアルに 0.05%(v/v) ツイーン 20 を含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) 2.625ml を加えて溶かし、そのうちの 1ml を 0.05%(v/v) ツイーン 20 を含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) 3ml と混合した。

これら h-TM 溶液は 0.05%(v/v) ツイーン 20 を含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) 3ml で 2 倍、2.5 倍、3.33 倍、5 倍、10 倍に希釈し、そのうちの溶液 1ml を 0.05%(v/v)

ツイーン 20 を含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) 3ml と混合した。

AT III 1 次保存溶液 (25 単位/ml)

ヒト AT III を含むバイアルに 20ml の蒸留水を加え、バイアルをゆるやかに振盪させながら溶かした。得られたヒト AT III 1 次保存溶液 (25 単位/ml) は液体窒素で凍結し -40°C で保存した。

AT III 2 次保存溶液 (2 単位/ml)

AT III 1 次保存溶液 (25 単位/ml) を 37°C の水浴で溶かし、0.154M 塩化ナトリウム、3.78mM クエン酸ナトリウム、54.9mM マンニトールを含む緩衝液で 2 単位/ml に希釈した。得られた AT III 2 次保存溶液 (2 単位/ml) は液体窒素で凍結し -40°C で保存した。

ヘパリン及びヒト AT III (HP-ATIII) 溶液

HP-ATIII 溶液は 1 反応当たり AT III 2 次保存溶液 (2 単位/ml)、0.0425ml の 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0)、10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) で希釈して調製したヘパリン (30 単位/ml) 0.05ml を混ぜることにより調製した。

プロタック⁷ 溶液 (0.75 単位/ml)

凍結乾燥したプロタック⁷ を含むバイアルに 0.18%(w/v) アジ化ナトリウム 4ml を加えて溶かした。

h-トロンビン溶液 (40 単位/ml)

h-トロンビンは 0.15M 塩化ナトリウム、0.5%(w/v) ポリエチレングリコール 6000 を

含むバッファーで溶解し 40 単位/ml に調整した。得られた h-トロンピン溶液 (40 単位/ml) は液体窒素で凍結し -80°C で保存した。

S-2366 保存溶液

凍結乾燥した S-2366 を含むバイアルに蒸留水 2.9ml を加えて溶かした。

TM 活性測定用の S-2366 溶液

S-2366 保存溶液 3ml は 60mM 塩化カルシウムを含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) 2.5ml、0.5%(v/v) ツイーン 20 を含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) 1.5ml、緩衝液 (I=3.0) 1.1ml、蒸留水 6.9ml で混和した。

プロテイン C 活性測定用 S-2366 溶液

S-2366 保存溶液 7.5ml は 60mM 塩化カルシウムを含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) 2.5ml、0.5%(v/v) ツイーン 20 を含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) 1.5ml、緩衝液 (I=3.0) 1.1ml、蒸留水 2.4ml で混和した。

プロテイン C 溶液 (12 単位/ml)

h-プロテイン C 溶液 (0.5~2.0mg/ml) の一部を 0.5%(v/v) ツイーン 20 を含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) で 15 μg/ml に希釈した。プロテイン C 溶液の活性は以下のように測定し定義した。結果に基づきプロテイン C 溶液 (0.5~2.0mg/ml) は 0.5%(v/v) ツイーン 20 を含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) で 12 単位/ml に希釈した。プロテイン C 溶液 (12 単位/ml) は液体窒素で凍結し、-80°C で保存した。

プロテイン C 活性の測定と活性の定義

プロテイン C 溶液 (0.5~2.0mg/ml) は 0.5%(v/v) ツイーン 20 を含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) で 15 μg/ml に希釈した。なお以下の反応は 37°C で行った。プロテイン C 溶液 (15 μg/ml) 100 μl は 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) 500 μl、Protac¹ 溶液 (0.75 単位/ml) 400 μl と混和した。4 時間後、反応混液を氷水中に置き反応を停止した。反応混液は 0.05%(v/v) ツイーン 20 を含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) で 2 倍に希釈し、この希釈反応混液のうち 25 μl を予め 37°C に温めた S-2366 溶液 475 μl と混和した。30 分後 50%(v/v) 酢酸 1.5ml を加えて反応を止めた。ブランク溶液は上記希釈反応混液 25 μl に 50%(v/v) 酢酸 1.5ml と混合した S-2366 溶液 475 μl を加えて調製した。これらのサンプルにおけるパラニトロアニリンの吸光度は分光光度計を用い 405nm の波長で測定した。

この測定において 1 単位は反応 1 分間当たり 1 μmol のパラニトロアニリンを生成するプロテイン C の活性と定義した。この定義に基づき活性は次の式により計算した。

$$\text{活性 (単位/ml)} = \frac{(A1 - A2) \times K1 \times V4}{M \times T} \times \frac{V2}{V3} \times \frac{1}{V1} \times K2$$

A1: サンプルにおける吸光度

A2: ブランクにおける吸光度

K1: 2 [最初の反応 (プロテイン C 活性化) 後の反応混液の希釈係数]

M: 9.6×10^3 ($E_{1\text{cm}}^{\mu\text{mol}}$) (パラニトロアニリン)

ンのマイクロモル吸光係数)

T:30 分[基質とのインキュベーション時間
(2 番目の反応)]

V1:0.1ml[反応混液 (最初の反応)の最初の
容量]

V2:1ml[反応混液 (最初の反応) の最終容量]

V3:0.025ml[反応混液 (2 番目の反応) の最
初の容量]

V4: 2×10^{-3} [反応混液 (2 番目の反応) 最終
容量]

K2:プロテイン C 溶液(15 μ g/ml)調製時の
希釈係数

TM 活性の測定と活性の定義

共通力価測定法の基本的な操作は図 1 に示している。なお、以下に示す全ての反応は 37°Cで行った。h-TM サンプル 25 μ l を トロンピン溶液 (40 単位/ml) 25 μ l、及び 20mM 塩化カルシウムを含む 10%(v/v)緩衝液(I=3.0) 75 μ l と混和し、10 分インキュベーションした。次にプロテイン C 溶液 (12 単位/ml) 25 μ l を反応液に加えた。10 分後 HP-ATIII 溶液 100 μ l を添加することにより反応を停止した。形成された活性化プロテイン C の量は S-2366 溶液 250 μ l を加えることにより測定した。種々の時間インキュベーション後 50%(v/v)酢酸 1.5ml を加えて反応を停止した。パラニトロアニリンの吸光度は分光光度計を用い 405nm の波長で測定した。ブランクの溶液は h-TM 溶液の代わりに 0.05%(v/v)ツイーン 20 を含む 10%(v/v)の緩衝液 (I=3.0) を用いた以外上記のように調製した。

本測定で、反応 1 分当たり 0.1 μ mol のパラニトロアニリンを生成する TM の活性を 1JRS 単位と定義した。この定義に基づき活

性は以下の式により計算した。なお、サンプル当たりの h-TM 活性は個々の測定において希釈係数を掛けて計算した。

$$\text{活性 (JRS 単位 /ml)} = \frac{(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) \times V1 \times \text{希釈係数}}{M \times V2 \times T \times K}$$

M: 9.6×10^{-3} ($E_{1\text{cm}}^{\mu\text{mol}}$) (パラニトロアニリン

のマイクロモル吸光係数)

V1: 2.0×10^{-3} ml (反応混液の最終容量)

V2:0.025ml (TM サンプルの容量)

T:基質とのインキュベーション時間 (分)

k : 0.1 μ mol/分/JRS 単位 (力価の定義に基づく係数)

共通力価測定法による h-TM 国内標準品の活性測定

rh-TM (TJRS1) 3 アンプルを 1 回の測定に用い、測定は異なった日に 3 回繰り返した。

C. 研究結果

S-2366 からパラニトロアニリン形成のタイムコース

図 2 は共通力価測定法を用いた uh-TM による S-2366 からパラニトロアニリン形成のタイムコースを示している。12 分まで基質の切断時間と吸光度の間の良好な直線関係が得られた。そこで、共通力価測定法における基質の切断時間を 10 分と設定した。

uh-TM と rh-TM 社内標準物質の濃度依存性

図 3 と 4 は共通力価測定法における uh-TM 及び rh-TM の濃度依存性を示して

いる。両 h-TM は個々の会社で定めた活性のある一定範囲において直線的な濃度依存性を示した。

h-トロンビン及びh-プロテインCのロット間再現性

表1と2はそれぞれ異なったロットのh-トロンビン及びh-プロテインCを用いuh-TM 社内標準物質を共通力価測定法で測定した結果を示している。これらの測定におけるh-トロンビン及びh-プロテインCのロット間の分散係数(CV)はそれぞれ2.90%及び6.57%であった。

h-TM 国内初回標準品の測定における同時、測定日間、施設間再現性とアンプル当たりの活性の決定

表3は共通力価測定法によりh-TM 国内初回標準品を測定した結果を示している。これらの測定においてh-TM 国内初回標準品の活性の平均値を計算した結果、アンプル当たり205JRSと定めた。同時、日間、施設間の分散係数(CV)は表4に示した分散値からそれぞれ1.30%、1.63%、5.02%と計算された。

h-TM 国内初回標準品の安定性

図5は40℃、60℃、70℃、80℃で種々の期間保存したh-TM 国内初回標準品を共通力価測定法で測定した結果を相対活性として示している。40℃で10週保存したサンプルの相対活性は試験開始時と変わらなかったが、他のサンプルでは温度及び保存期間に依存的な相対活性の低下がみられた。図6に示すように、アレニウスプロットから予想される活性の低下は-20℃、103年で

3.0%以下であった。

D. 考察

本研究において我々はh-TMの活性を測定するための共通力価測定法を確立した。確立した共通力価測定法は図2に示すように、良好な基質切断反応時間依存性を示した。また、図3及び4に示すように、両h-TMにおいて良好な濃度依存性を示した。表1及び2に示すように、異なったロットのh-トロンビンとh-プロテインCを用いてuh-TMの活性を共通力価測定法により測定した結果、ロット間分散係数はそれぞれ2.90%、6.57%と低かった。この結果から共通力価測定法により測定されたh-TMの活性はh-トロンビン及びh-プロテインCのロット間の違いによりほとんど影響を受けないことが示された。表4に示すように、共通力価測定法により同時、日間、施設間再現性を検討した結果、それらの分散係数5.02%以下と低かった。この結果から共通力価測定法が再現性のある方法であることが示された。以上の結果から本研究で確立された共通力価測定法はh-TMの活性測定法として妥当であることが示された。

我々はまたTJRS1と名付けたh-TM初回国内標準品の力価を測定し、1アンプル当たり205JRS単位と定めた。図6に示したアレニウス式から予想されるように、h-TM初回国内標準品は-20℃で100年間力価を低下させることなく保存可能であることが示された。

以上、共通力価測定法の確立とh-TM初回国内標準品を対照に用いた各h-TMの活性測定によりrh-TMとuh-TMの品質と臨床の有効性を比較することが可能になっ

た。さらに、このような共通力価測定法と h-TM 初回国内標準品を用いた力価の比較はこれら h-TM が近い将来臨床的に治療薬として用いられた際、臨床適用にあたって無用の混乱を避けるうえで非常に有用と考えられる。

E. 研究成果

1. Niimi, S., Oshizawa, T., Naotsuka, M., Ohba, S., Yokozawa, A., Murata, T., Hayakawa, T.: Establishment of a standard assay for human thrombomodulin and determination of the activity of the Japanese reference standard. *Biologicals* 30, 69-76 (2002)
2. Nagano, M., Nakamura, T., Niimi, S., Fujino, S., Nishimura, T., Murayama, N., Ishida, S., Ozawa, S., Saitou, Y., Sawada, J.: Substitution of arginine for cystein 643 of the glucocorticoid receptor reduces its steroid-binding affinity and transcriptional activity. *Cancer Lett.* in press (2002)
3. Niimi, S., Horikawa, M., Seki, T., Ariga, T., Kobayashi, T., Hayakawa, T.: Effect of activins AB and B on DNA synthesis stimulated by epidermal growth factor in primary cultured rat hepatocytes Effect of activins AB and B on DNA synthesis stimulated by epidermal growth factor in primary cultured rat hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull.*, in press 25 (2002)
4. Kobayashi, T., Niimi, S., Hyuga, M., Hayakawa, T., Left lobe-specific increase of HGF and follistatin mRNA in relation to the rat liver regeneration
14th International Congress of Developmental Biology (2001.7)
5. 新見伸吾、堀川麻衣、関泰一郎、有賀豊彦、小林 哲、早川堯夫 初代培養ラット肝細胞における EGF による DNA 合成促進に対するアクチビン AB,B の作用 第 8 回肝細胞研究会 (平成 13 年 6 月)
6. 新見伸吾、風間宏美、稲川雅美、関泰一郎、有賀豊彦、日向昌司、早川堯夫 MRC-5 細胞における TPA 依存的な HGF 産生促進に対するアクチビンの作用 第 74 回日本生化学会大会 (平成 13 年 10 月)
7. 後藤洋子、新見伸吾、早川堯夫、宮下徳治 ラクトース修飾フィブロインの機能評価—レクチン及び肝細胞との相互作用 第 10 回ポリマー材料フォーラム (平成 13 年 11 月)

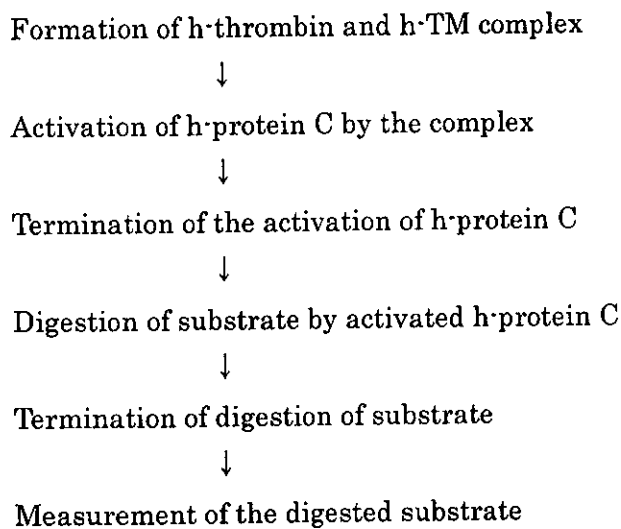


Figure 1. Fundamental protocol of the standard assay method for h-TM

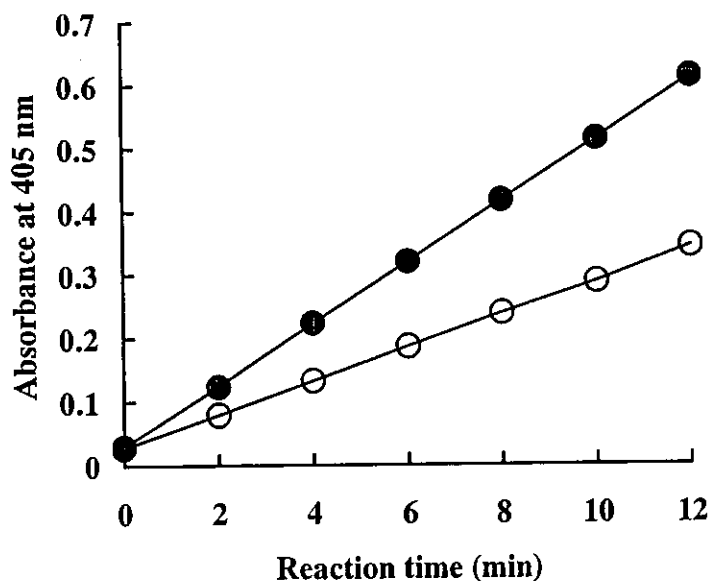


Figure 2. Time course of formation of *p*-nitroaniline from S-2366 by uh-TM in the standard method. The uh-TM reference material was used in the experiment at concentrations of 2 uh-TM units/ml (○) and 4 uh-TM units/ml (●).

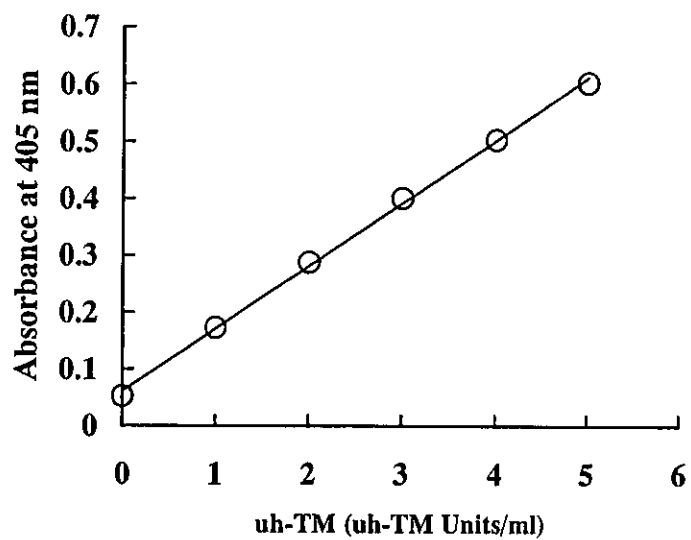


Figure 3. Dose-response curve of uh-TM in the standard method. The activity of uh-TM is expressed in the specific units (uh-TM units) of the original method of measurement.

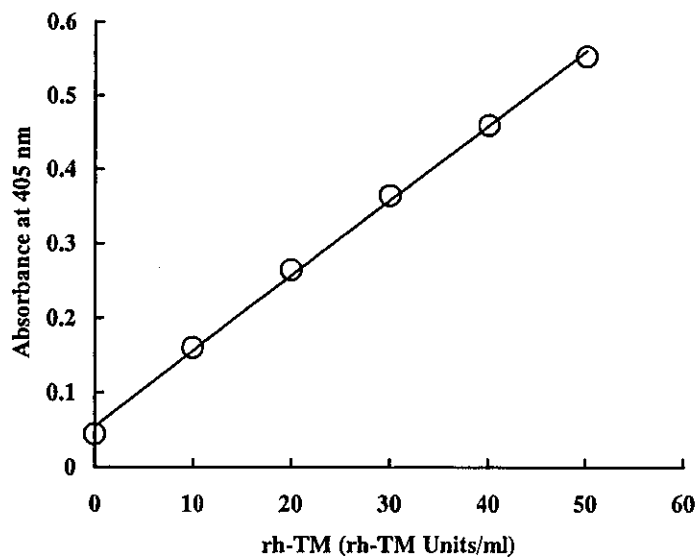


Figure 4. Dose-response curve of rh-TM in the standard method. The activity of rh-TM is expressed in the specific units (rh-TM units) of the original method of measurements.

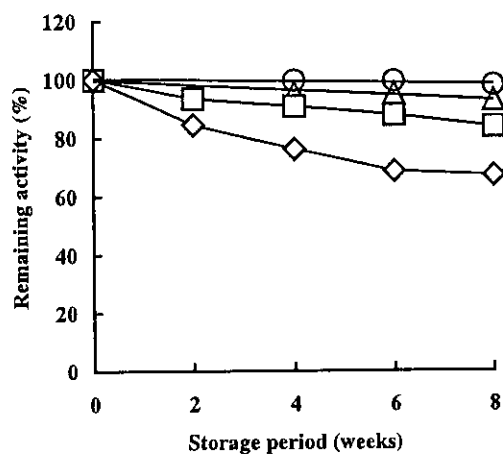


Figure 5. Effect of heat treatment on the stability of the Japanese reference standard for h-TM. The Japanese reference standard was stored at 40°C (○), 60°C (△), 70°C (□), and 80°C (◇) for various periods.

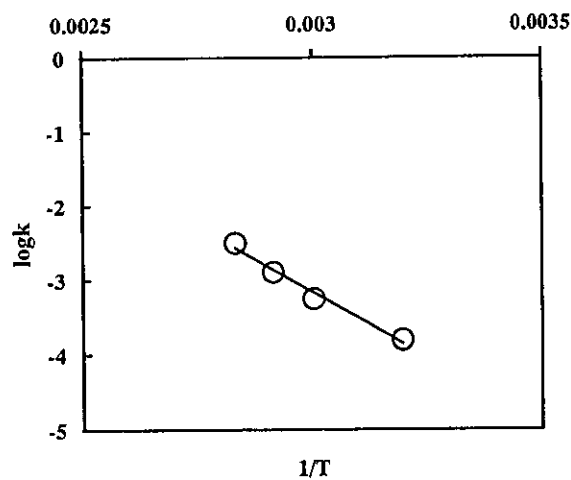


Figure 6. Arrhenius plot analysis of temperature-dependent loss of the h-TM activity of the Japanese reference standard. The reaction rate constant (k) at each temperature was calculated from the results shown in Figure 5 by using the equation below. $Y = -kx + \log 100$, where x is the stored period (days) and Y is the logarithm of remaining potency (%).

Table 1. Intra-batch precision of h-thrombin in measurements of the activity of the uh-TM reference material by the standard method

h-thrombin (Lot no.)	uh-TM activity (uh-TM Units/vial)	
A	98.6	Average=99.0
B	102	S.D.=2.87
C	96.3	CV (%)=2.90

h-Protein C (Lot F) was used in the experiment.

Table 2. Intra-batch precision of h-protein C in measurements of the activity of the uh-TM reference material by the standard method

h-protein C (Lot no.)	uh-TM activity (uh-TM Units/vial)	
D	112	Average=107
E	109	S.D.=7.03
F	98.6	CV (%)=6.57

h-Thrombin (Lot A) was in the experiment.

Table 3. Measurement of the activity of the Japanese reference standard for h-TM by the standard method

Dilution factor	Laboratory	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Dilution factor	Laboratory	Exp.1	Exp.2	Exp.3		
x 200	A	223.3	231.7	218.3	x 50.0	A	215.0	211.3	213.8		
		218.3	235.0	226.7			215.0	211.3	213.8		
		226.7	235.0	218.3			212.9	218.8	210.0		
		203.3	211.7	208.3			214.6	210.8	215.8		
	B	201.7	216.7	210.0		B	195.0	201.7	202.5		
		198.3	213.3	205.0			195.0	202.5	196.7		
		210.0	206.7	203.3			190.8	201.3	200.0		
		203.3	206.7	203.3			195.0	197.5	191.7		
	C	203.3	206.7	203.3		C	193.8	197.1	195.4		
		205.0	208.3	200.0			193.3	197.9	191.7		
		219.2	220.8	211.7			213.0	209.3	204.0		
		216.7	219.2	220.8			210.3	214.0	208.0		
x 100	A	225.0	222.5	225.8	x 40.0	A	213.3	211.7	210.3		
		195.8	205.8	201.7			189.3	195.7	196.0		
		195.8	207.5	207.5			189.7	195.7	194.0		
		198.3	208.3	196.7			190.3	195.3	196.7		
	B	202.5	202.5	197.5		B	195.0	192.7	190.3		
		197.5	205.8	200.8			191.3	195.0	192.0		
		200.8	210.0	198.3			192.3	195.0	190.0		
		218.4	212.9	215.1			Average			205.4	
	x 66.7	A	217.3	216.2		216.2	Average	A	217.3	216.2	216.2
			221.8	218.4		220.1			221.8	218.4	220.1
			196.8	204.0		202.9			196.8	204.0	202.9
		B	197.9	205.1		197.9		B	197.9	205.1	197.9
196.8			203.4	199.5	196.8	203.4			199.5		
199.5			200.7	194.0	199.5	200.7			194.0		
C		197.3	200.1	196.8	C	197.3		200.1	196.8		
		196.2	199.5	197.3		196.2		199.5	197.3		