

Table 1 Carbohydrate compositions, and theoretical and calculated masses of peaks in Fig. 2A

Peak No.	Carbohydrate composition	Deduced carbohydrate structure ^a	Theoretical	Calculated	Charge state	Observed <i>m/z</i>
			mass ^b	mass		
1	[dHex] ₀ [Hex] ₄ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₀	SO ₃ -Hybrid(2)	1560.51	1560.53	1+	1561.53
2	[dHex] ₀ [Hex] ₃ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₀	SO ₃ -Bi(4)	1398.46	1398.47	1+	1399.48
3	[dHex] ₀ [Hex] ₃ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₀	SO ₃ -Bi(5)	1601.57	1601.57	1+	1602.58
	[dHex] ₀ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₀	SO ₃ -Hybrid(3)	1722.58	1722.58	2+	862.30
	[dHex] ₁ [Hex] ₆ [HexNAc] ₆ [NeuAc] ₀	SO ₃ -FBI(3)	1950.70	1950.70	2+	976.36
4	[dHex] ₀ [Hex] ₄ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₀	SO ₃ -Bi(2)	1763.62	1763.62	2+	882.82
	[dHex] ₁ [Hex] ₃ [HexNAc] ₂ [NeuAc] ₀	FCore	1058.41	1058.41	1+	1059.42
5	[dHex] ₀ [Hex] ₄ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₁	SO ₃ -Bi(2)NA ₁	2054.69	2054.74	2+	1028.38
	[dHex] ₁ [Hex] ₄ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₀	SO ₃ -FBI(2)	1909.69	1909.66	2+	955.84
	[dHex] ₁ [Hex] ₄ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₁	FBI(2)NA ₁	2120.79	2120.82	2+	1061.42
	[dHex] ₀ [Hex] ₄ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₀	(SO ₃) ₂ -Bi(2)	1843.55	1843.56	2+	922.79
6	[dHex] ₀ [Hex] ₃ [HexNAc] ₆ [NeuAc] ₀	(SO ₃) ₂ -Bi(3)	1884.57	1884.60	2+	943.31
7	[dHex] ₀ [Hex] ₄ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₁	SO ₃ -Bi(2)NA ₁	2054.69	2054.68	2+	1028.34
	[dHex] ₁ [Hex] ₃ [HexNAc] ₆ [NeuAc] ₀	(SO ₃) ₂ -FBI(3)	2030.68	2030.66	2+	1016.34
8	[dHex] ₁ [Hex] ₄ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₁	SO ₃ -FBI(2)NA ₁	2200.74	2200.78	2+	1101.40

^aDeduced carbohydrate structures are presented in Table 9 ; ^b monoisotopic mass value.

Table 2 Carbohydrate compositions, and theoretical and calculated masses of peaks in Fig. 2B

Peak No.	Carbohydrate composition	Deduced carbohydrate structure ^a	Theoretical mass ^b		Charge state	Observed <i>m/z</i>
			mass	mass		
1	[dHex] ₀ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	BiNA ₁	1933.70	1933.68	1+	1934.69
2	[dHex] ₀ [Hex] ₆ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	Hybrid(4)NA ₁	2095.76	2095.74	2+	1048.88
3	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	FBiNA ₁	2079.76	2079.78	2+	1040.90
4	[dHex] ₀ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	BiNA ₂	2224.80	2224.80	2+	1113.41
5	[dHex] ₀ [Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	FTriNA ₂ , FBilacNA ₂	2735.99	2735.98	2+	1369.00
6	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	FBiNA ₂	2370.86	2370.86	2+	1186.44
7	[dHex] ₀ [Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₃	TriNA ₃	2881.03	2881.02	2+	1441.52
8	[dHex] ₁ [Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₃	FTriNA ₃	3027.08	3027.08	2+	1514.55
9	[dHex] ₁ [Hex] ₇ [HexNAc] ₆ [NeuAc] ₃	FTetraNA ₃ , FTriIacNA ₃	3393.22	3393.26	2+	1697.64
10	[dHex] ₁ [Hex] ₇ [HexNAc] ₆ [NeuAc] ₄	FTetraNA ₄	3683.31	3683.42	2+	1842.72
11	[dHex] ₁ [Hex] ₈ [HexNAc] ₇ [NeuAc] ₄	FTetraIac ₁ NA ₄	4048.44	4048.45	3+	1350.49

^aDeduced carbohydrate structures are presented in Table 9; ^bmonoisotopic mass value.

Table 3 Structural assignments of peaks in Fig 5A

Peak No.	Amino acid residues	Theoretical mass ^a	Observed m/z		
			M ¹⁺	M ²⁺	M ³⁺
1	α 7	538.6	539.3		
	β 4	545.6	546.4		
2	β 11	1140.2	1140.7	571.0	
3 ^b	α 6(Asn52)	-			
	α 9 (Asn78) and α 9- α 10 (Asn78)	-			
4	α 5	718.9	719.5		
5	α 2	817.0	817.6	409.3	
6	β 7	712.8	713.4		
7	β 6	1376.5	1377.4	689.0	
	β 10	1727.8	1728.4	864.6	576.9
8 ^b	α 8	838.0	838.6	419.8	
	α 8- α 9 (Asn78) and α 8- α 10 (Asn78)	-			
9	β 5	616.8	617.5		
10	β 8-2 ^c	1172.4	1172.5	587.1	
11	β 1	1697.9	1698.4	849.7	566.9
12 ^b	β 3 (Asn23)	-			
	β 8-1 ^c	1553.8	1554.3	777.6	
13	β 12	871.0	871.6		
14	β 8	2708.1		1354.8	903.5
15	α 1	4123.4		2062.8	1375.2

^a average mass value, ^b glycopeptides,

^c β 8 was partly hydrolyzed to β 8-1 and β 8-2, α 3, α 4, β 2 and β 9 were not detected.

Table 4 Peptides and carbohydrate compositions of peaks 3, 8, and 12 in Fig. 5A

Peak No. ^a	Glyco-peptides	Carbohydrate composition ^b	Deduced carbohydrate structure ^c	Theoretical mass ^d	Observed <i>m/z</i>				
					<i>M</i> ²⁺	<i>M</i> ³⁺	<i>M</i> ⁴⁺		
3	α6 (Asn52)	[Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₃	TriNA ₃	4,220.0		1,407.6			
		[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	BiNA ₂	3,563.4	1,782.8	1,189.1			
		[Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	TriNA ₂ , BiLac ₁ NA ₂	3,928.8		1,310.4			
		[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	BiNA ₁	3,272.2	1,636.7	1,091.5 ^e			
		α9 (Asn78)	[Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₃	TriNA ₃	4,932.7		1,644.4		
		[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	BiNA ₂	4,276.1	2,139.2	1,426.2	1,070.0		
		[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	BiNA ₁	3,984.9	1,992.6	1,329.2			
		α9-α10 (Asn78)	[Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₃	TriNA ₃	5,019.8		1,674.6		
		[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	BiNA ₂	4,363.2	2,182.9	1,455.4	1,091.5 ^e		
		[Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	TriNA ₂ , BiLac ₁ NA ₂	4,728.5		1,576.7			
[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	BiNA ₁	4,071.9	2,036.3	1,358.4					
8	α8-α9 (Asn78)	[Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₃	TriNA ₃	5,752.7		1,918.7	1,439.4		
		[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	BiNA ₂	5,096.1		1,699.0	1,275.1		
		[Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	TriNA ₂ , BiLac ₁ NA ₂	5,461.5		1,821.4	1,366.7		
		[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	BiNA ₁	4,804.9		1,602.7			
		α8-α10 (Asn78)	[Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₃	TriNA ₃	5,839.8		1,948.4	1,461.0	
		[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	BiNA ₂	5,183.2		1,728.5	1,296.6		
		[Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	TriNA ₂ , BiLac ₁ NA ₂	5,548.6		1,850.4	1,388.2		
		[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	BiNA ₁	4,892.0		1,631.3			
		12	β3 (Asn23)	[Fuc][Hex] ₇ [HexNAc] ₆ [NeuAc] ₄	FTetra NA ₄	6,128.0		2,043.6	
				[Fuc][Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₃	FTriNA ₃	5,471.5		1,823.8	
[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	FBiNA ₂			4,814.9		1,605.4			
[Fuc][Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	FTriNA ₂ , FBiLac ₁ NA ₂			5,180.2		1,728.4			
[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	FBiNA ₁			4,523.6	2,262.2	1,509.0			

^a Mass spectra are shown in Fig. 6. ^b Hex, hexose; Fuc, fucose; HexNAc, *N*-acetylhexosamine; NeuAc, *N*-acetylneuramic acid. ^c See Table 9,

^d average mass value.

Table 5 Structural assignments of peaks in Fig. 5B

Peak No.	Amino acid residues	Theoretical mass ^a	observed m/z		
			M ¹⁺	M ²⁺	M ³⁺
1	β4	545.6	546.2		
2	α7	538.6	539.2		
3 ^b	α6(Asn52)	-			
4 ^b	α6(Asn52)	-			
5 ^b	α6(Asn52)	-			
6 ^b	α9(Asn78) and α9-α10(Asn78)	-			
7 ^b	α9(Asn78) and α9-α10(Asn78)	-			
8 ^b	α9(Asn78) and α9-α10(Asn78)	-			
9	β11	1140.2	1140.6	570.9	
10	β10	1727.8	1728.0	864.5	
11 ^b	β3(Asn23)	-			
12 ^c	β6	1376.5	1377.2	689.0	
	β3(Asn23)	-			
13 ^c	β7	712.8	713.4		
	β3(Asn23)	-			
14 ^c	α5	718.9	719.4		
	β3(Asn23)	-			
15 ^b	β3(Asn23)	-			
16 ^b	α8-α9 (Asn78) and α8-α10 (Asn78)	-			
17 ^b	α8-α9 (Asn78) and α8-α10 (Asn78)	-			
18	α1	4123.4		2061.5	1375.6
19	α2	817.0	817.5	409.2	
20	β8-1 ^d	1553.8	1554.1	777.5	
21	β1	1697.9	1698.0	849.6	
	β8-2 ^d	1172.4	1172.5	586.9	
22	α8	838.0	838.5		
23	β12	871.0	871.5		
24	β5	616.8	617.4		
25	β8	2708.1		1355.4	903.5

^a average mass value, ^b glycopeptide, ^c glycopeptide and peptide,

^d β8 was partly hydrolyzed to β8-1 and β8-2, α3, α4, β2 and β9 were not detected.

Table 6 Peptides and carbohydrate compositions of peaks in Fig. 5C

Peak No. ^a	Glyco-peptides	Carbohydrate composition ^b	Deduced carbohydrate structure ^c	Theoretical mass ^d	Observed <i>m/z</i>		
					<i>M</i> ²⁺	<i>M</i> ³⁺	<i>M</i> ⁴⁺
c1	α6(Asn52)	[Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₃	TrNA ₃	4,220.0		1407.0	
		[Hex] ₃ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	BiNA ₂	3,563.4	1781.7	1188.4	1234.1
c2	α6(Asn52)	[Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	TrNA ₃ , BiIac ₁ NA ₂	3,928.8	1964.5	1310.6	1256.1
		[Fuc][Hex] ₃ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	FBiNA ₂	3,709.6	1854.8	1237.5	1105.9
c3	α6(Asn52)	[Hex] ₃ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	BiNA ₁	3,272.2	1637.3	1091.9	1070.0
		[Hex] ₆ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	Hybrid (4)NA ₁ , Hybrid (2)Iac ₁ NA ₁	3,434.3	1718.6	1145.8	1183.3
c4	α9(Asn78)	[Hex] ₄ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₂	Bi(1)GN ₂ NA ₂	3,604.5		1203.3	
		[Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₃	TrNA ₃	4,932.7		1644.5	1234.1
c5	α9(Asn78)	[Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₃	TrNA ₃	5,019.8		1674.3	1256.1
		[Fuc][Hex] ₃ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₁	FBiGN ₁ NA ₁	4,334.2	1445.1	1445.1	1256.1
c6	α9(Asn78)	[Fuc][Hex] ₃ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₁	FBiGN ₁ NA ₁	4,421.3	1474.1	1474.1	1105.9
		[Hex] ₃ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	BiNA ₂	4,276.1	1426.5	1426.5	1070.0
c7	β3(Asn23)	[Hex] ₃ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	TrNA ₃ , BiIac ₁ NA ₂	4,343.2	1455.7	1455.7	1092.2
		[Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	TrNA ₃ , BiIac ₁ NA ₂	4,641.5	1547.7	1547.7	1183.3
c8	β3(Asn23)	[Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	TrNA ₃ , BiIac ₁ NA ₂	4,728.5	1576.6	1576.6	1183.3
		[Hex] ₃ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	BiNA ₁	3,984.9	1329.0	1329.0	
c9	β3(Asn23)	[Hex] ₃ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	BiNA ₁	4,071.9	1358.3	1358.3	1019.4
		[Fuc][Hex] ₁ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₄	FTetra NA ₄	6,128.0	2043.7	2043.7	1533.1
c10	β3(Asn23)	[Fuc][Hex] ₃ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₄	FBiGN ₁ NA ₄	5,600.6	1868.2	1868.2	1533.1
		[Fuc][Hex] ₃ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₄	FTetraIac ₁ NA ₄	6,493.4	2165.5	2165.5	1624.1
c11	β3(Asn23)	[Fuc][Hex] ₃ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₃	FTriNA ₃	5,471.5	1824.4	1824.4	1368.7
		[Fuc][Hex] ₄ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₃	FTetraNA ₃ , FTriIac ₁ NA ₃	5,836.8	1946.0	1946.0	
c12	α8-α9(Asn78)	[Fuc][Hex] ₄ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₃	FBi(1)GN ₁ NA ₃	4,944.0	1649.8	1649.8	
		[Fuc][Hex] ₂ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₂	FBiNA ₂	4,814.9	1605.7	1605.7	
c13	α8-α9(Asn78)	[Fuc][Hex] ₂ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₂	FTriNA ₃ , FBiIac ₁ NA ₂	5,180.2	1727.1	1727.1	
		[Fuc][Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	FCore GN ₁ NA ₂	4,287.4	1430.8	1430.8	
c14	α8-α10(Asn78)	[Fuc][Hex] ₄ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	FBi(1)GN ₁ NA ₂	4,652.7	2145.1	2145.1	
		[Fuc][Hex] ₃ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	FBiNA ₁	4,523.6	1508.1	1508.1	
c15	α8-α10(Asn78)	[Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₃	TrNA ₃	5,752.7	1918.4	1918.4	1439.0
		[Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₃	TrNA ₃	5,839.8	1946.8	1946.8	1460.6
c16	α8-α9(Asn78)	[Hex] ₃ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	BiNA ₂	5,096.1	1699.8	1699.8	1274.7
		[Hex] ₃ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	BiNA ₂	5,183.2	1728.2	1728.2	1296.3
c17	α8-α9(Asn78)	[Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	TrNA ₃ , BiIac ₁ NA ₂	5,461.5	1821.0	1821.0	1366.3
		[Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	TrNA ₃ , BiIac ₁ NA ₂	5,548.6	1849.6	1849.6	1388.1
c18	α8-α10(Asn78)	[Hex] ₃ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	BiNA ₁	4,804.9	1601.8	1601.8	1202.3
		[Hex] ₃ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	BiNA ₁	4,892.0	1631.4	1631.4	1223.5

^a Mass spectra are shown in Fig. 7. ^b See Table 4. ^c See Table 9. ^d average mass value.

Table 7 Peptides and carbohydrate compositions of peaks in Fig. 8B

Peak No.	Glyco-peptides	Carbohydrate composition ^a	Deduced carbohydrate structure ^b	Theoretical mass ^c	Observed <i>m/z</i>		
					<i>M</i> ²⁺	<i>M</i> ³⁺	<i>M</i> ⁴⁺
r1	α6(Asn52)	[Hex] ₆ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₃	Hybrid (7)NA ₃ , Hybrid (1)Lac ₁ NA ₃	4,503.2	1,925.1	1,501.6	
		[Hex] ₈ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₂	Hybrid (1)NA ₃	3,846.6		1,283.4	
r2	α6(Asn52)	[Hex] ₆ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₃	TriNA ₃	4,220.0		1,407.8	
		[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	BiNA ₂	3,563.4	1,782.0	1,188.6	
r3	α6(Asn52)	[Hex] ₆ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₂	TriNA ₂ , BiLac ₁ NA ₂	3,928.8	1,965.2	1,310.9	
		[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	FBiNA ₂	3,709.6	1,855.2	1,237.5	
r4	α6(Asn52)	[Hex] ₁ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	Hybrid (8)NA ₂ , Hybrid (4)Lac ₁ NA ₂ , Hybrid (2)Lac ₂ NA ₂	4,090.9		1,365.1	
		[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	BiNA ₁	3,272.2	1,636.6	1,091.4	
		[Hex] ₆ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	Hybrid (4)NA ₁ , Hybrid (2)Lac ₁ NA ₁	3,434.3	1,717.4	1,145.4	
r5	α9(Asn78)	[Hex] ₄ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₂	Bi(1)GN ₂ NA ₂	3,604.5	1,803.1	1,202.9	
		[Hex] ₆ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₃	TriNA ₃	4,932.7		1,644.7	1,233.9
r6	α9(Asn78)	[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₁	FBiGN ₁ NA ₁	4,334.2		1,445.1	
		[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	BiNA ₂	4,276.1	2,139.3	1,426.0	1,069.8
r7	α9(Asn78)	[Hex] ₆ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₂	TriNA ₂ , BiLac ₁ NA ₂	4,641.5		1,547.9	1,160.9
		[Hex] ₄ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₂	Bi(1)GN ₂ NA ₂	4,317.2		1,440.1	1,080.1
r8	α9(Asn78)	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	BiNA ₁	3,984.9	1,992.8	1,329.4	
		[Hex] ₆ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₁	TriNA ₁ , BiLac ₁ NA ₁	4,350.2		1,450.6	
r9	β3(Asn23)	[Fuc] ₁ [Hex] ₇ [HexNAc] ₆ [NeuAc] ₄	FTetra NA ₄	6,128.0		2,043.1	1,532.7
		[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₄	FBiGN ₁ NA ₄	5,600.6		1,868.0	
r10	β3(Asn23)	[Fuc] ₁ [Hex] ₈ [HexNAc] ₇ [NeuAc] ₄	FTetraLac ₁ NA ₄	6,493.4		2,164.6	1,624.2
		[Fuc] ₁ [Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₃	FTriNA ₃	5,471.5		1,824.8	1,368.5
		[Fuc] ₁ [Hex] ₇ [HexNAc] ₆ [NeuAc] ₃	FTetraNA ₃ , FTriLac ₁ NA ₃	5,836.8		1,946.1	
		[Fuc] ₁ [Hex] ₄ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₃	FBI (1)GN ₁ NA ₃	4,944.0		1,649.1	
r11	β3(Asn23)	[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₃	FBiGN ₁ NA ₃	5,309.3		1,771.5	
		[Fuc] ₁ [Hex] ₃ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	FBiNA ₂	4,814.9		1,606.0	1,205.1
		[Fuc] ₁ [Hex] ₆ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₂	FTriNA ₂ , FBiLac ₁ NA ₂	5,180.2		1,727.7	
r12	β3(Asn23)	[Fuc] ₁ [Hex] ₃ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₂	FCore GN ₁ NA ₂	4,287.4	2,145.2	1,430.3	
		[Fuc] ₁ [Hex] ₄ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	FBI(1) GN ₁ NA ₂	4,652.7		1,552.7	
r13	β3(Asn23)	[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	FBiNA ₁	4,523.6	2,263.5	1,508.7	
		[Fuc] ₁ [Hex] ₃ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	FBiNA ₂	4,814.9		1,606.0	

^a See Table 4. ^b See Table 9. ^c average mass value.

Table 8 Peptides and carbohydrate compositions of peaks in Fig. 8D

Peak No.	Glyco-peptides	Carbohydrate composition ^a	Deduced carbohydrate composition ^b	Theoretical mass ^c	Observed <i>m/z</i>	
					<i>M</i> ²⁺	<i>M</i> ³⁺
p1	α6(Asn52)	[Hex] ₃ [HexNAc] ₆ [SO ₃] ₂	Bi(3)(SO ₃) ₂	3,223.1	1,612.4	1,075.6
		[Hex] ₄ [HexNAc] ₅ [SO ₃] ₁ [NeuAc] ₁	Bi(2)(SO ₃) ₁ NA ₁	3,393.3	1,696.9	1,132.1
		[Hex] ₃ [HexNAc] ₅ [SO ₃] ₂	Bi(4)GN ₁ (SO ₃) ₂	3,019.9	1,510.8	
p2	α6(Asn52)	[Hex] ₄ [HexNAc] ₄ [SO ₃] ₁	Hybrid(2)(SO ₃) ₁	2,898.8	1,450.1	
		[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [SO ₃] ₁	Hybrid(3)(SO ₃) ₁	3,061.0	1,531.1	
		[Hex] ₃ [HexNAc] ₄ [SO ₃] ₁	Bi(4)(SO ₃) ₁	2,736.7	1,368.7	
p3	α6(Asn52)	[Hex] ₃ [HexNAc] ₅ [SO ₃] ₁	Bi(4)GN ₁ (SO ₃) ₁	2,939.9	1,470.6	
		[Hex] ₄ [HexNAc] ₅ [SO ₃] ₁	Bi(2)(SO ₃) ₁ , Hybrid(2)GN ₁ (SO ₃) ₁	3,102.0	1,552.1	
p4	α9(Asn78)	[Hex] ₄ [HexNAc] ₅ [SO ₃] ₁ [NeuAc] ₁	Bi(2)(SO ₃) ₁ NA ₁	4,106.0	2,053.8	1,369.7
		[Hex] ₅ [HexNAc] ₆ [SO ₃] ₁ [NeuAc] ₁	Tri(1)(SO ₃) ₁ NA ₁ , Bi(2)Iac ₁ (SO ₃) ₁ NA ₁	4,471.3		1,491.3
		[Hex] ₄ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	Bi(2)NA ₂	4,317.2		1,440.6
		[Hex] ₄ [HexNAc] ₅ [SO ₃] ₂	Bi(2)(SO ₃) ₂	3,894.8		1,298.9
		[Hex] ₄ [HexNAc] ₅ [SO ₃] ₁	Bi(2)(SO ₃) ₁	3,814.7		1,271.8
		[Hex] ₃ [HexNAc] ₆ [SO ₃] ₂	Bi(3)(SO ₃) ₂	3,935.8		1,313.6
p5	α9(Asn78)	[Hex] ₆ [HexNAc] ₇ [SO ₃] ₁ [NeuAc] ₁	Tri(1)Iac ₁ (SO ₃) ₁ NA ₁ , Tetra(1)(SO ₃) ₁ NA ₁	4,836.6		1,613.0
		[Hex] ₃ [HexNAc] ₄ [SO ₃] ₁	Bi(4)(SO ₃) ₁	3,449.4	1,726.0	1,150.9
		[Hex] ₂ [HexNAc] ₅ [SO ₃] ₁	Bi(5)(SO ₃) ₁	3,652.6	1,827.0	1,219.1
		[Fuc] ₁ [Hex] ₄ [HexNAc] ₅ [SO ₃] ₁	FBi(2)(SO ₃) ₁ , FHybrid(2)GN ₁ (SO ₃) ₁	3,960.9		1,321.4
p6	β3(N23)	[Hex] ₄ [HexNAc] ₅ [SO ₃] ₁	Bi(2)(SO ₃) ₁ , Hybrid(2)GN ₁ (SO ₃) ₁	3,814.7		1,273.0
		[Hex] ₄ [HexNAc] ₆ [SO ₃] ₂	Hybrid(5)(SO ₃) ₂	4,490.6		1,497.3
p7	β3(N23)	[Hex] ₅ [HexNAc] ₅ [SO ₃] ₁ [NeuAc] ₁	Hybrid(6)(SO ₃) ₁ NA ₁	4,660.7		1,554.2
		[Fuc] ₁ [Hex] ₃ [HexNAc] ₆ [SO ₃] ₂	FBi(3)(SO ₃) ₂	4,474.6		1,492.3
		[Fuc] ₁ [Hex] ₃ [HexNAc] ₆ [SO ₃] ₁	FBi(3)(SO ₃) ₁	4,394.5		1,465.6
		[Fuc] ₁ [Hex] ₄ [HexNAc] ₅ [SO ₃] ₁ [NeuAc] ₁	FBi(2)(SO ₃) ₁ NA ₁	4,644.7		1,548.8
		[Fuc] ₁ [Hex] ₄ [HexNAc] ₅ [SO ₃] ₁ [NeuAc] ₂	FBi(2)(SO ₃) ₁ NA ₂	4,936.0		1,645.6
		[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	FBI ₁ NA ₂	4,814.9		1,606.5
		[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₆ [SO ₃] ₁ [NeuAc] ₁	FTri(1)(SO ₃) ₁ NA ₁	5,010.1		1,671.4
p8	β3(N23)	[Fuc] ₁ [Hex] ₃ [HexNAc] ₄ [SO ₃] ₁	FBI(4)(SO ₃) ₁	3,988.1	1,994.8	1,330.5
		[Fuc] ₁ [Hex] ₃ [HexNAc] ₃ [NeuAc] ₂	FCoreGN ₁ NA ₂	4,287.4		1,430.1

^a See Table 4, ^b See Table 9, ^c average mass value.

Table 9. Deduced carbohydrate structures presented in Table 1,2,4, and 6-8

Abbreviation ^a	Structure ^b
Hybrid(1)	
Hybrid(2) [FHybrid(2)]	
Hybrid(3)	
Hybrid(4)	
Hybrid(5)	
Hybrid(6)	
Hybrid(7)	
Hybrid(8)	
FCore	
Bi [FBi]	
Bi(1) [FBi(1)]	
Bi(2) [FBi(2)]	
Bi(3) [FBi(3)]	
Bi(4) [FBi(4)]	
Bi(5) [FBi(5)]	
Tri [FTri]	
Tri(1) [FTri(1)]	
FTetra	
Tetra (1)	

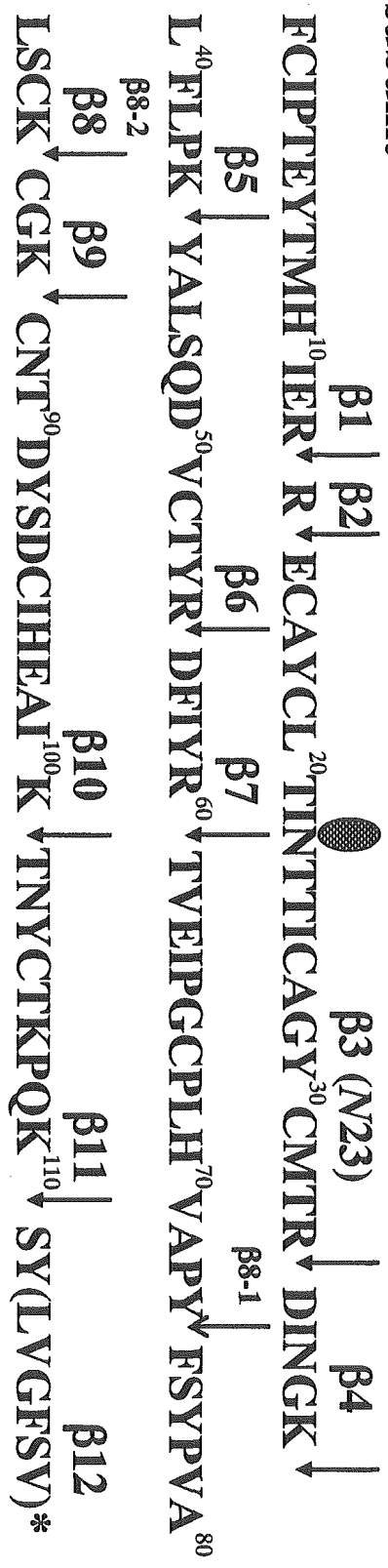
^a F, fucose; Bi, biantennary; Tri, triantennary; Tetra, tetraantennary.

^b Man, mannose; Fuc, fucose; Gal, galactose; GalNAc, *N*-acetylgalactosamine; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine.

α subunit



β subunit



● : Carbohydrate, ()*: only in r-TSH.

Fig. 1 Amino acid sequence and glycosylation sites of TSH

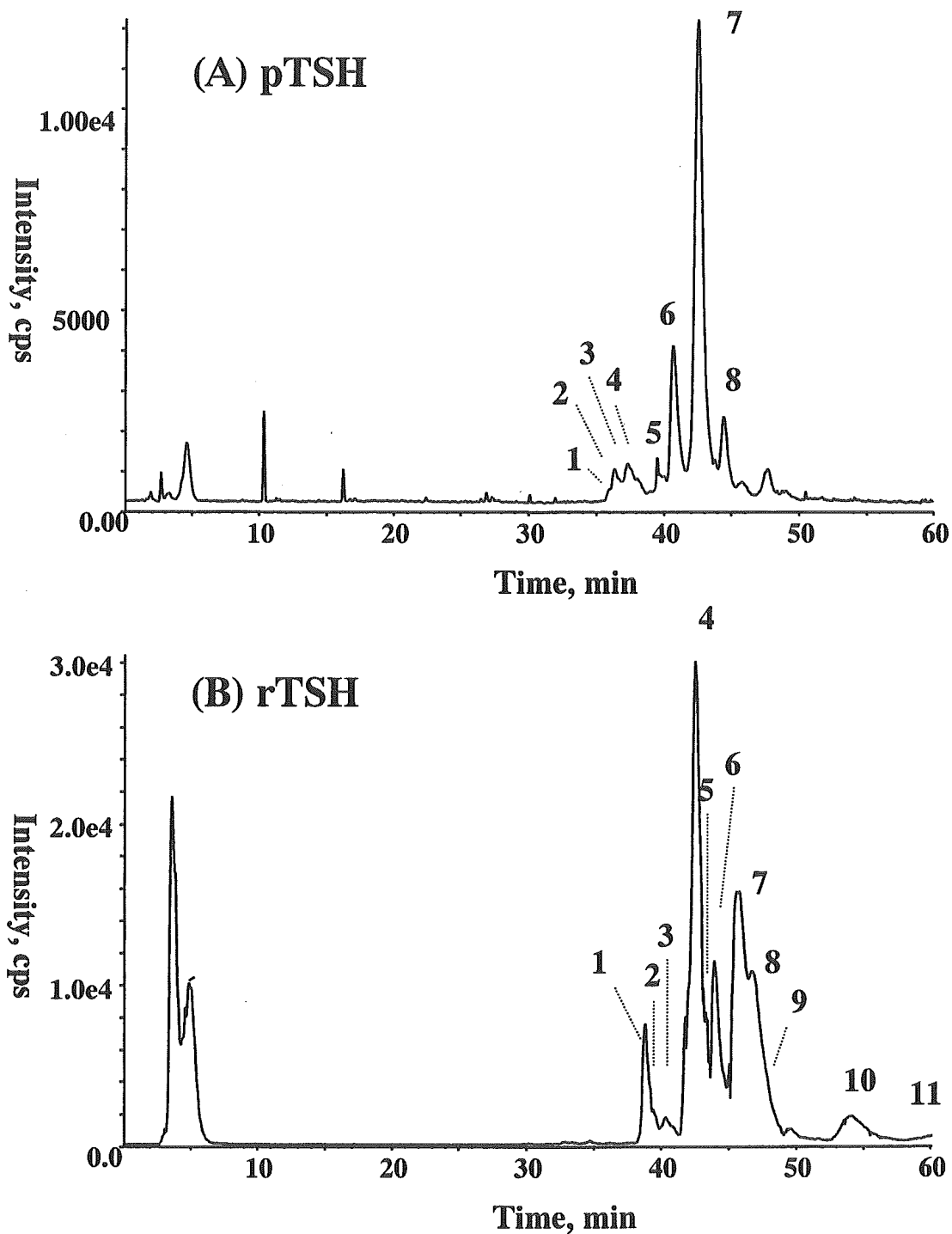
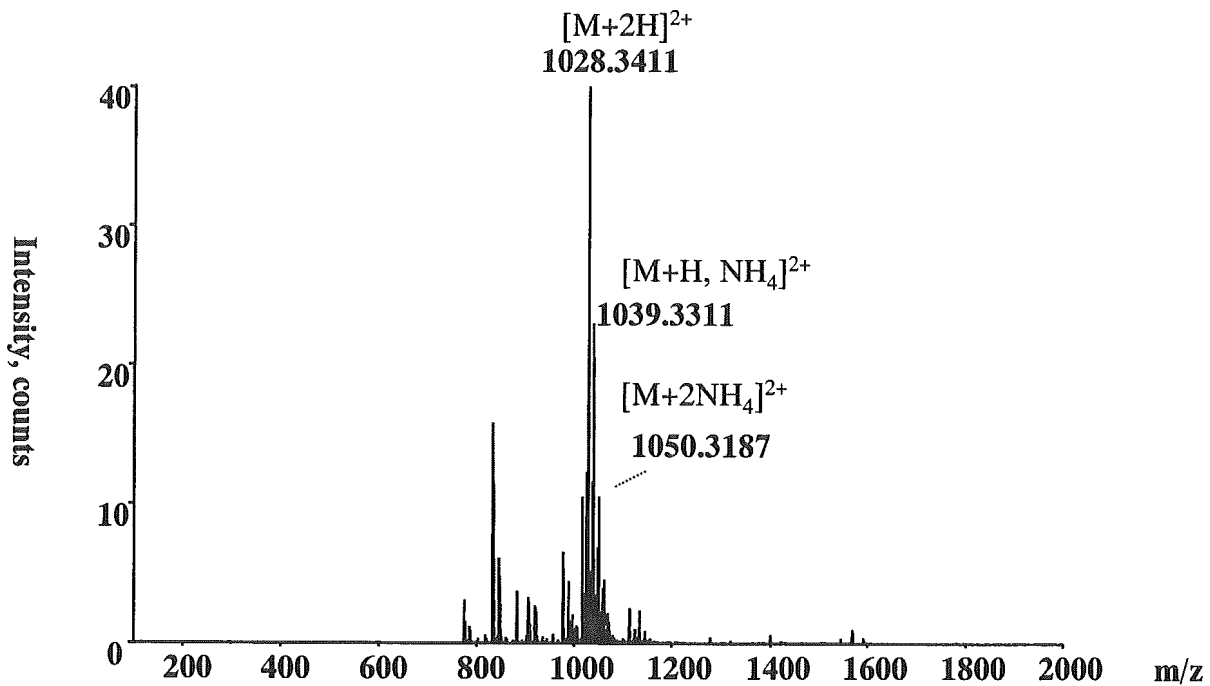


Fig. 2 Oligosaccharide profiles of pTSH (A) and rTSH (B)

N-linked oligosaccharides from pTSH and rTSH were analyzed by CapLC-ESI-Q/TOFMS

(A) Mass spectrum of peak 7 in Fig. 2A



(B) Product ion spectrum of peak 7 in Fig. 2A

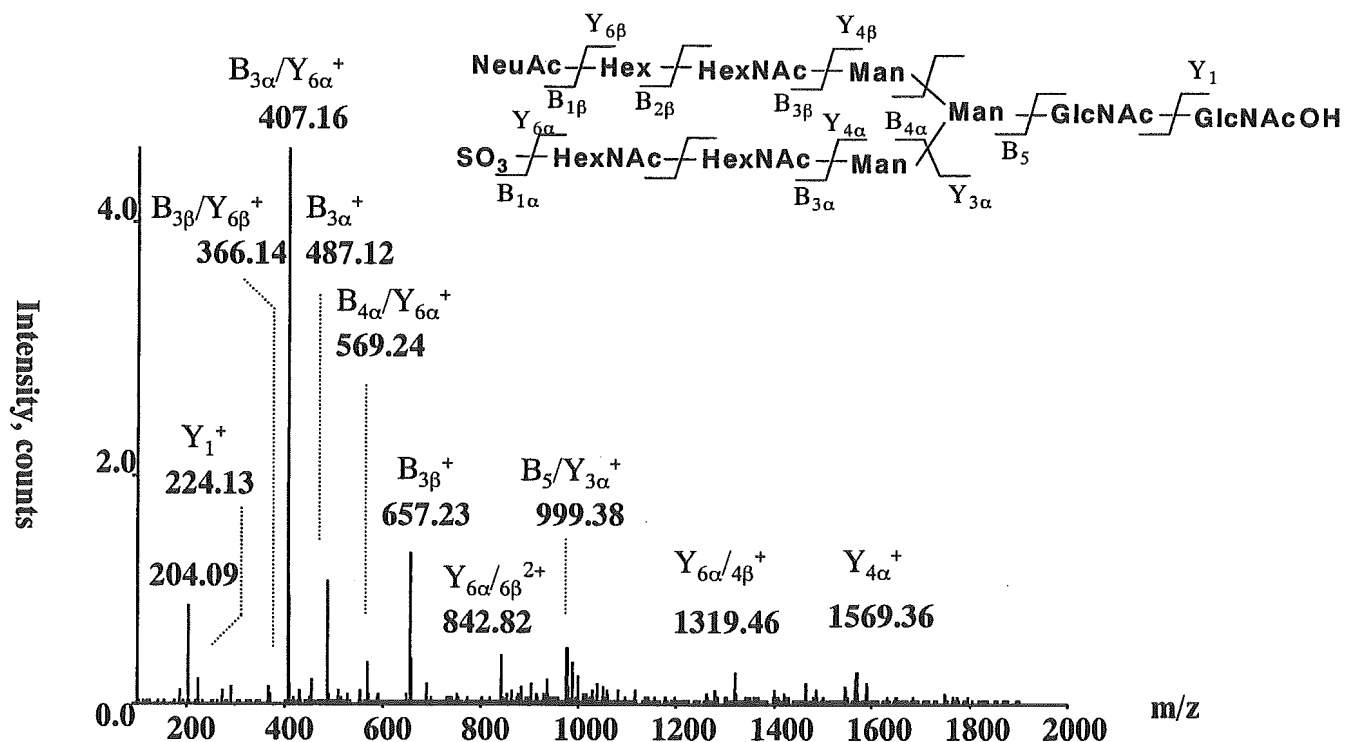
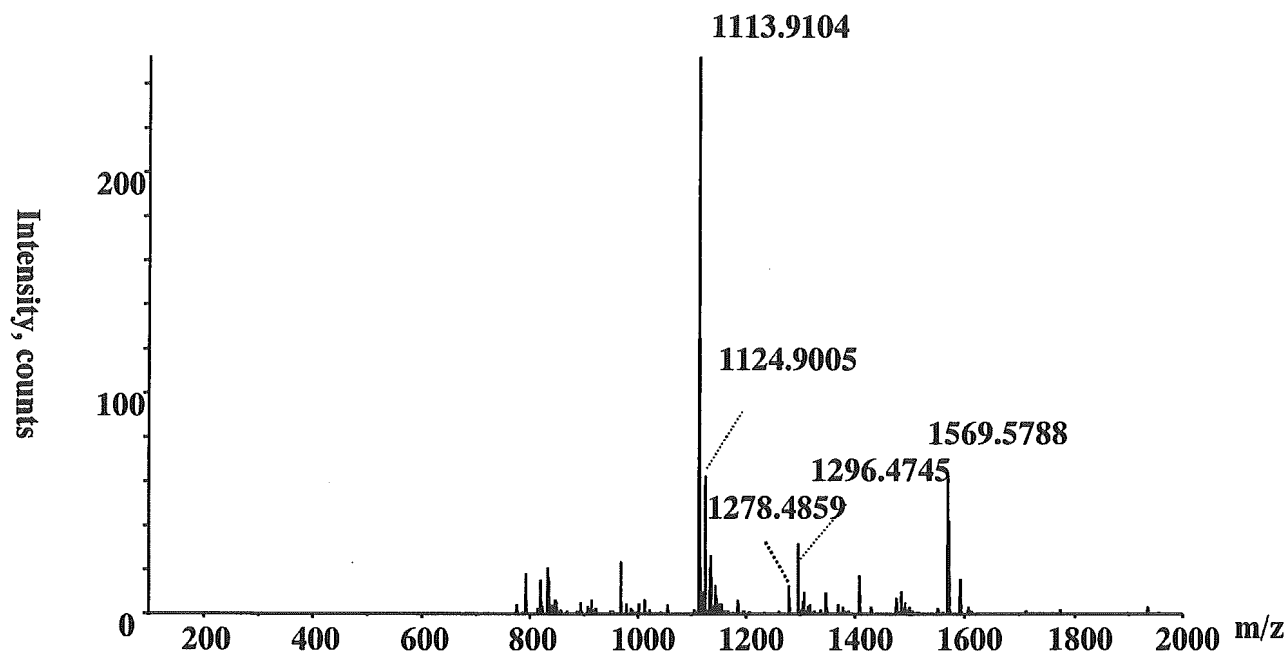


Fig. 3 Mass spectrum (A) and product ion spectrum (B) of peak 7 in Fig. 2A

(A) Mass spectrum of peak 4 in Fig. 2B $[M+H]^{2+}$



(B) Product ion spectrum of peak 4 in Fig. 2B

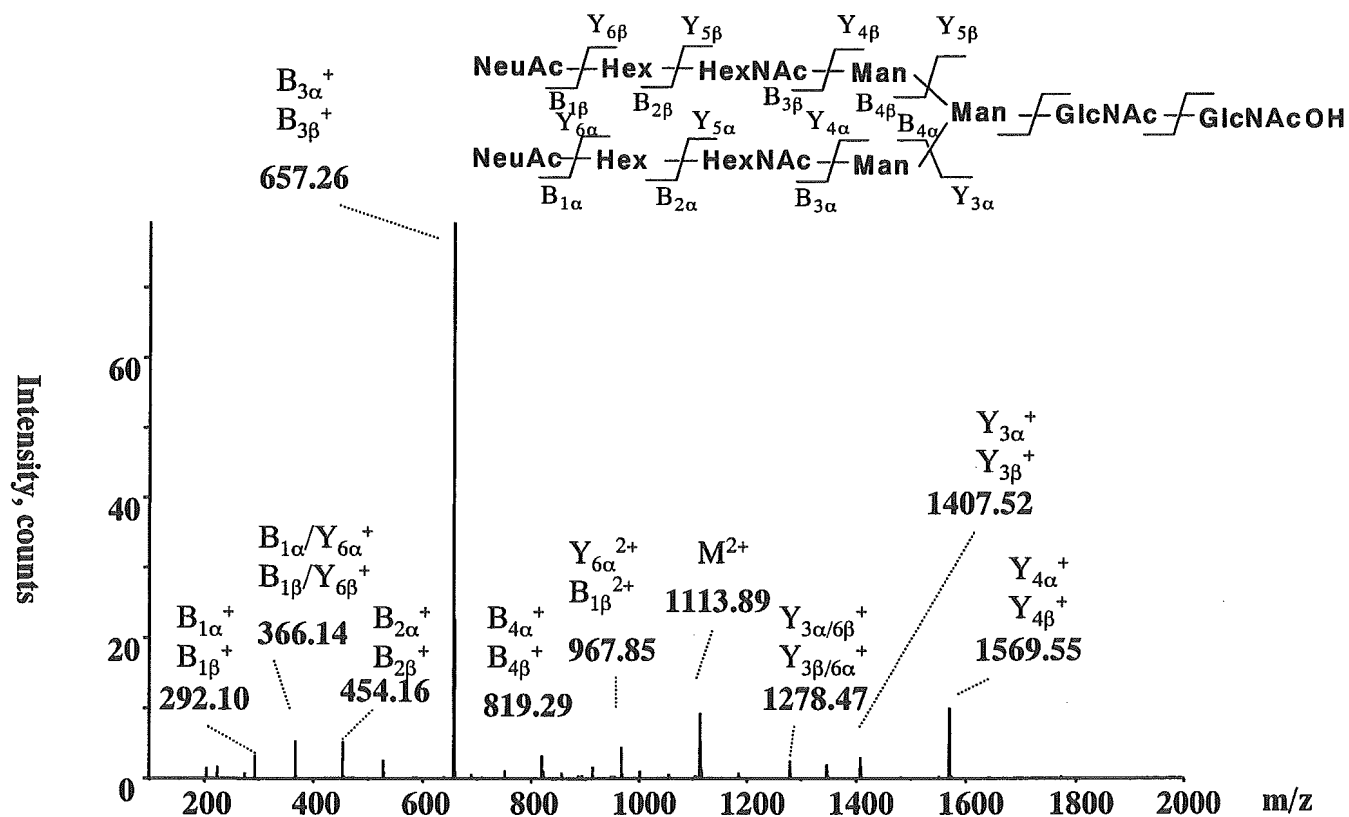


Fig. 4 Mass spectrum (A) and product ion spectrum (B) of peak 4 in Fig. 2B

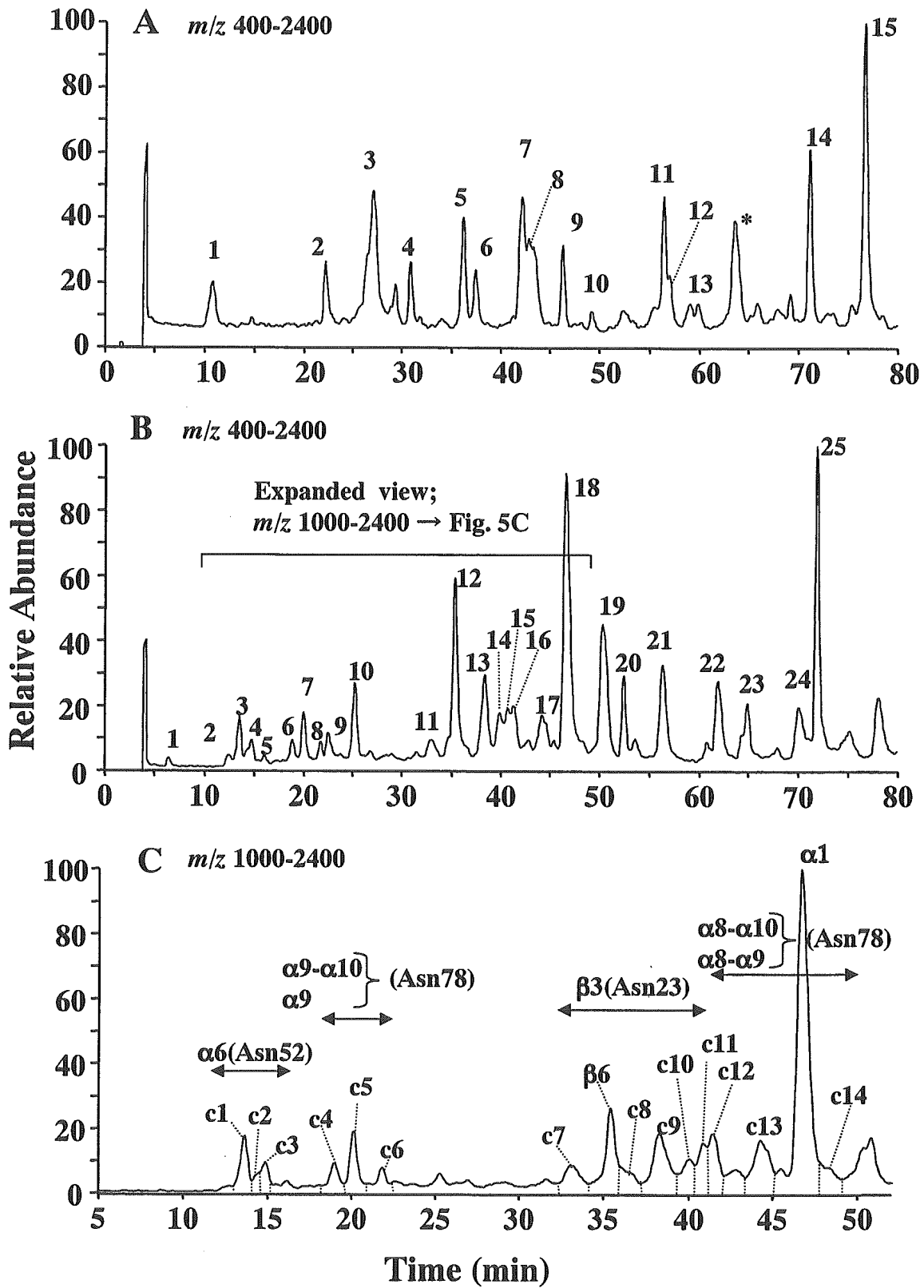


Fig. 5 (A) Peptide/glycopeptide map of trypsin digested-rTSH obtained by elution with TFA
(B) Peptide/glycopeptide map of trypsin digested-rTSH obtained by elution with ammonium acetate
(C) Glycopeptide map of trypsin digested-rTSH obtained by elution with ammonium acetate

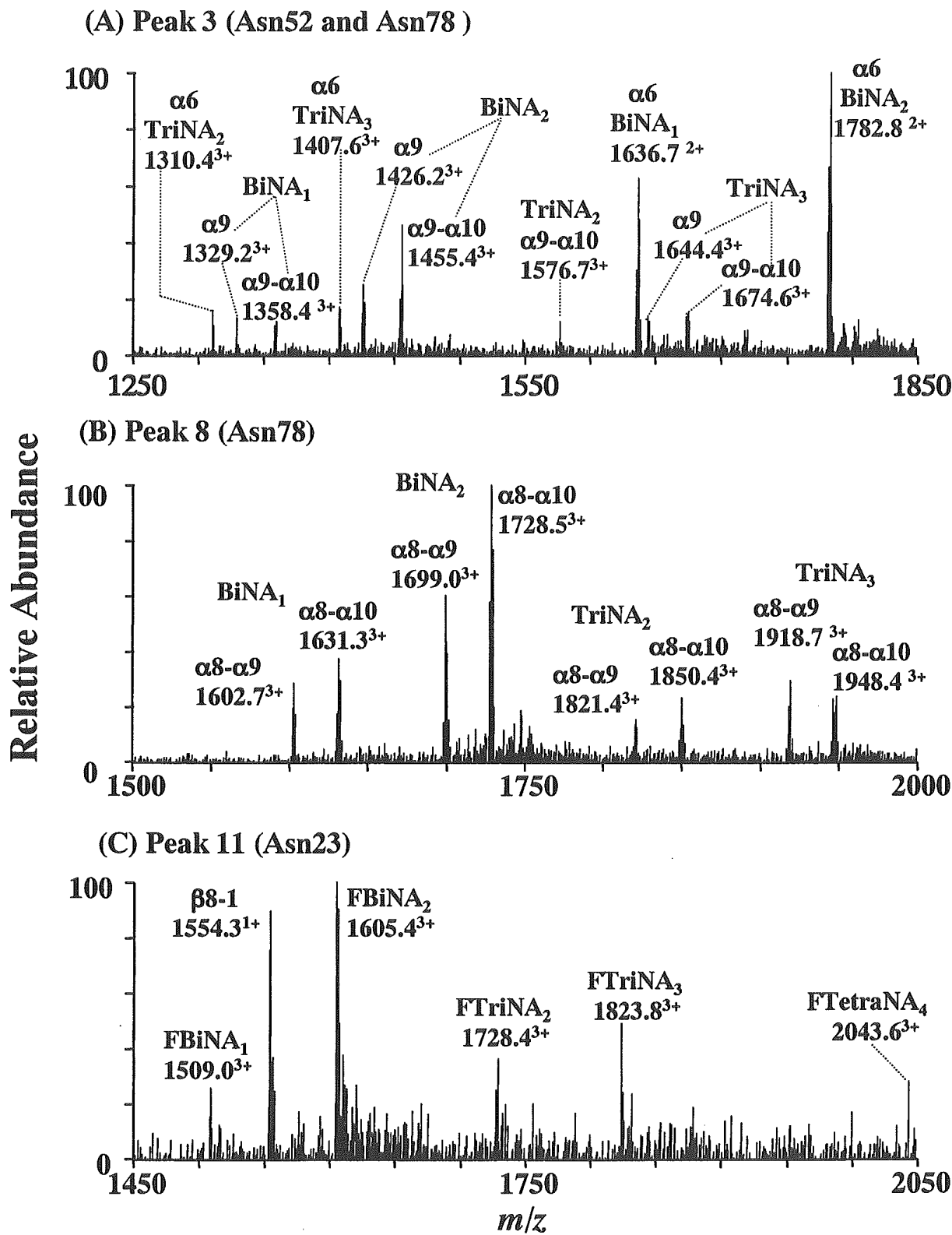


Fig. 6 Mass spectra of peaks 3, 8 and 12 in Fig. 5A

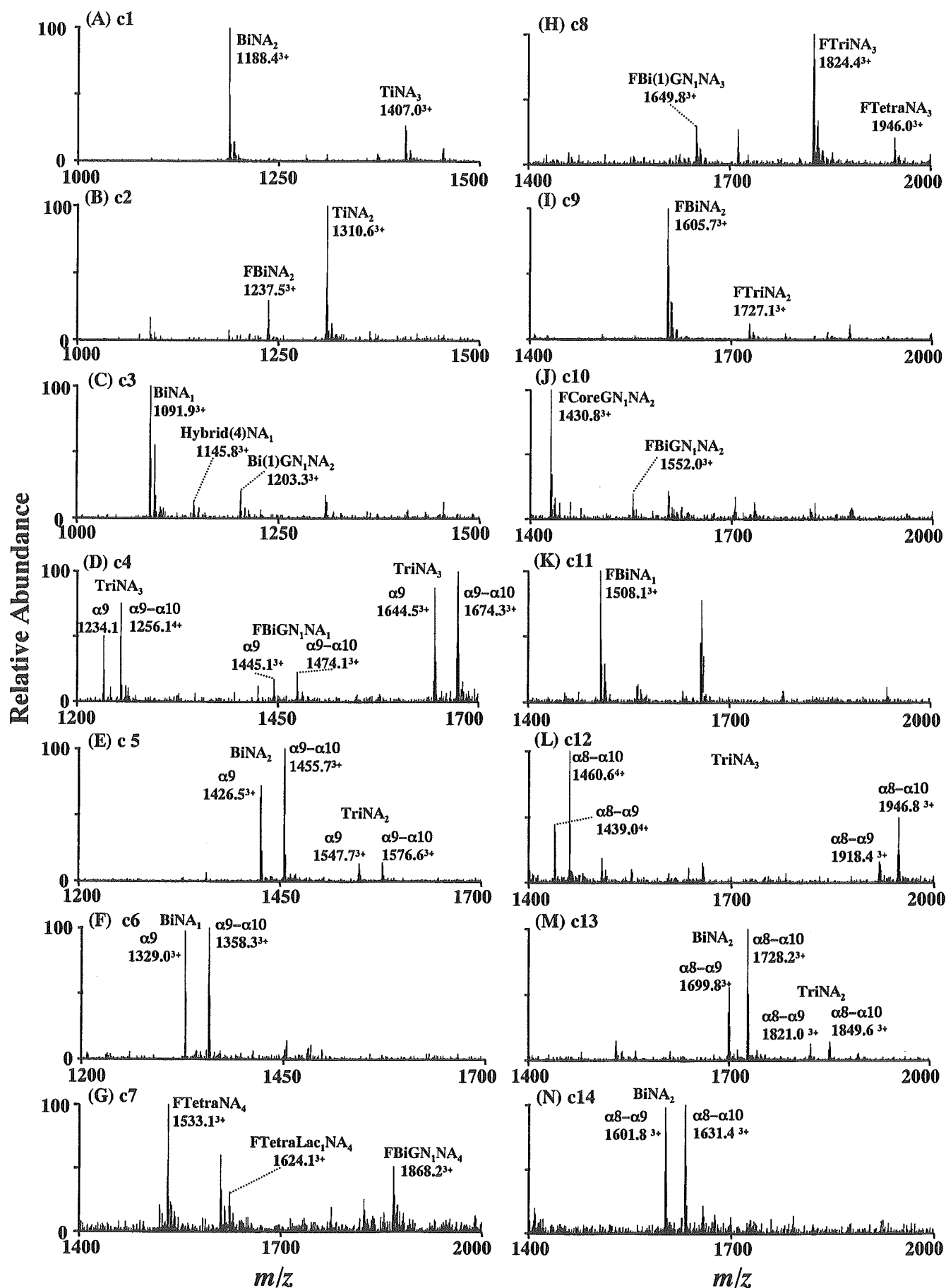


Fig. 7 Mass spectra of peaks c1-c14 in Fig. 5C

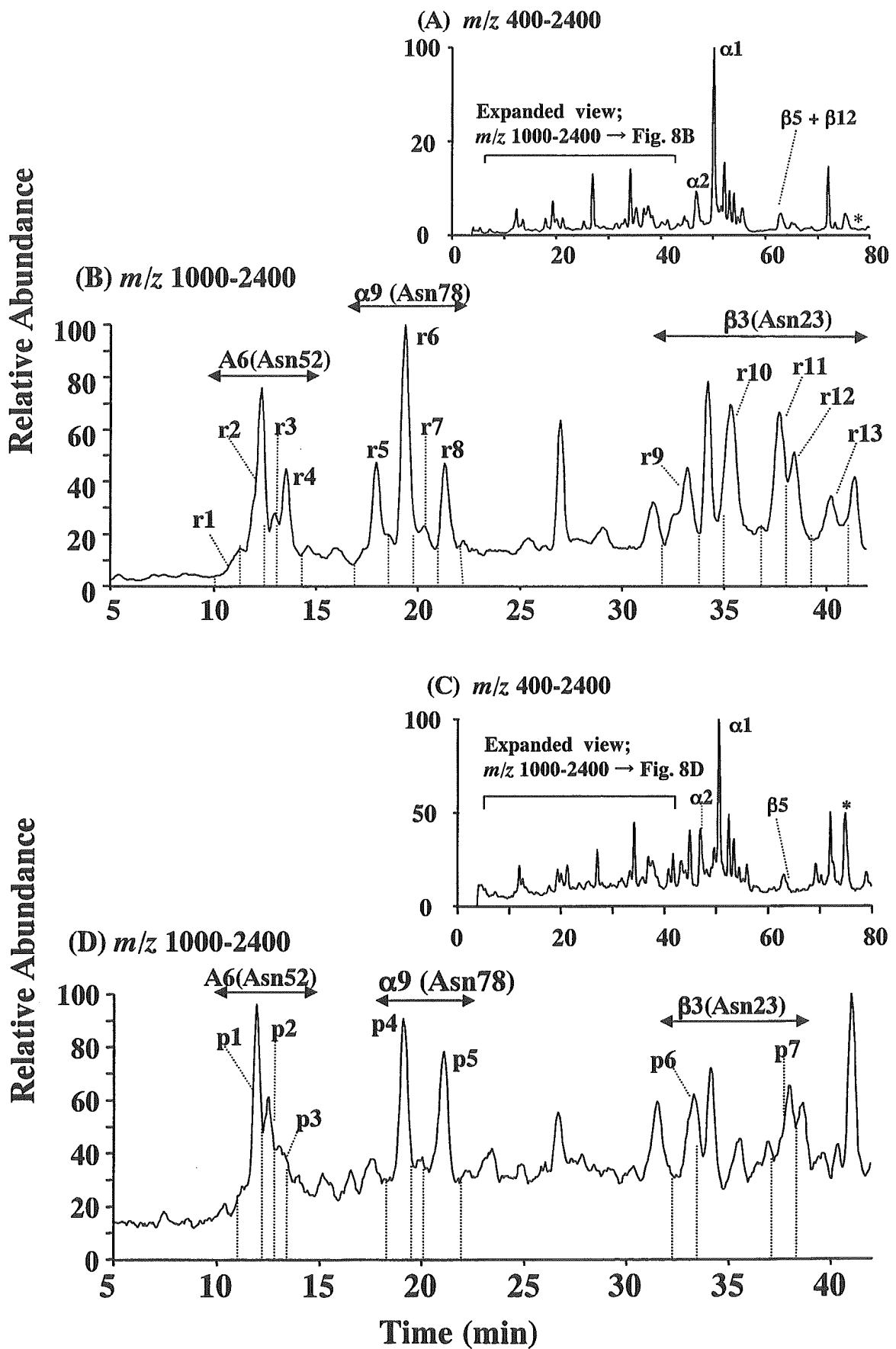


Fig. 8 Peptide/glycopeptide maps of rTSH (A) and pTSH (C), and Glycopeptide maps of rTSH (B) and pTSH (D)

厚生科学研究費補助金 (医薬総合研究事業)

分担研究報告書

医薬品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第2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、現在肝疾患、腎不全、血管機能障害に対する治療薬としての応用が期待されている肝細胞増殖因子 (HGF) を例にとり多機能性バイオテクノロジー応用医薬品の生物学的及び免疫学的国際標準品の設定、さらには各種疾患の治療薬として用いる場合、各治療効果に関連した品質を保證するうえにおいて適切な細胞を用いた生物学的活性測定法について調査研究した。

国際標準品に関しては WHO により提供された不活性型の 1 本鎖及び活性型の 2 本鎖組換え HGF 標準品候補合計 3 種類について共同検定に参画した施設により各種細胞を用いた生物学的アッセイ及び ELISA を用いた免疫化学的アッセイにより測定がなされた。各自家標準品を基にして得られた生物学的アッセイの値は、特に 1 本鎖において実際の充填量に比べ低く算出され、すべての標準品候補において測定におけるばらつきは高かった。一方、免疫学的アッセイにおいてもその値は特に 1 本鎖において実際の充填量に比べ低く算出され、すべての標準品候補にける測定のばらつきは生物学的アッセイに比べると低かった。各標準品候補の免疫化学的アッセイの値を 2 本鎖標準品候補に関しては 2 本鎖自家標準品で、また 1 本鎖標準品候補に関しては 1 本鎖自家標準品で計算しなおすと充填量とよく一致し、測定のばらつきは小さかった。最終的に 1 本鎖及び 2 本鎖それぞれ 1 種類が標準品として設定され、生物学的活性についてはすべての測定結果、免疫化学的活性については同じ型の自家標準品を用いた検討結果から値が定められた。

組換え HGF を肝疾患の治療薬として用いる場合その生物学的試験法として初代培養肝細胞に対する DNA 合成促進作用等が有用であることが示された。同様に腎不全の治療薬として用いる場合、その生物学的試験法として腎臓近位細管細胞に対する増殖促進作用、ウシ尿管上皮細胞の幹腔形成促進作用などが有用であることが示された。また、血管機能障害の治療薬として用いる場合、各種血管内皮細胞に対する DNA 合成促進作用、アポトーシス及びネクローシス抑制作用などが有用であることが示された。

A. 目的

肝細胞増殖因子(HGF)は成熟ラット初代培養肝細胞の増殖を促進する因子として発見された。その後、遺伝子クローニングが

なされ、分子量約 69kDa の α 鎖と約 34kDa 鎖からなるヘテロダイマーであり 1 本鎖の不活性型の前駆体として産生され、その後 2 本鎖にプロセッシングされることにより

活性型の成熟分子となる。その後、受容体である c-MET が発見され、c-MET に結合することにより細胞内シグナル伝達系が活性化され、様々な細胞において多彩な生理活性を示すことが次々と明らかになってきている。このような細胞レベルの知見を基に肝疾患を始めとする各種疾患への治療薬としての有効性について疾患モデル動物を用いた検討が精力的になされている。その結果、HGF によるヒトの各種疾患への治療薬への応用は現実のものとなり、京都大学探索医療センターにおいて劇症肝炎などの患者を再生する研究が始められ、5年以内には臨床試験を目指す予定が立てられている。これまでのタンパク性医薬品はある特定の疾患あるいはそれに関連した疾患の治療薬として用いられていた。しかしながら、HGF の場合その幅広い生物活性を有することから、全く異なる疾患の治療に用いられることが予想される。今後複数の異なる製薬会社から医薬品としての承認申請がなされた場合、その活性の相互比較はどのように行えばよいか。また、さらに複数の異なる疾患の治療薬として申請された場合、その生物活性はどのような試験に基づいて評価すべきか等現状では問題点が山積みされている。このような観点から HGF のような多機能性タンパク質に関しては従来のタンパク質性医薬品とは異なった対応が要求されることは明らかである。

そこで本研究においては最近 WHO から HGF の国際標準品の設定がなされたことから、その経緯と問題点について紹介する。次に各種モデル疾患動物を用いた HGF の治療薬としての有用性に関する現状並びに各疾患の治療効果に関連した細胞レベルの

生物学的活性について紹介し、今後医薬品申請がなされた場合の適切な生物学的活性試験法を設定するうえでの端緒としたい。

B. 研究方法

組換え HGF 国際標準品が設定されるに至った経緯についてその詳細を調査した。また、組換え HGF の各種疾患治療効果に関する知見並びに治療効果に関連する細胞レベルにおける生物学的な作用について調査した。

C. 研究結果及び考察

1. 組換え HGF 国際標準品の設定

WHO の NIBSC(National Institute for Biological Standard and Control)による HGF 国際標準品の設定は先に述べたように HGF の様々な生理作用が明らかになり、各種疾患の治療薬に用いられる可能性が高くなったことに加え、HGF が各種疾患の診断マーカー及び予後因子としての有用性を示す知見が集積されたことによりその必要性が高まったことによる。NIBSC による HGF 国際標準品はアンプルに充填された二種類の組換え HGF 標準品候補を共同検定に加わる各研究室所有の自家標準組換え HGF とバイオアッセイあるいは免疫化学的アッセイにより比較し、その値を決めることに設定することとされた。その際用いる標準品候補の熱安定性も評価の対象となった。現在1本鎖及び2本鎖の組換え HGF が広く研究に用いられていることから、両者が標準品候補として用いられた。2本鎖組換え HGF としては CHO 細胞及びマウスミエローマ細胞の一つである NSO 細胞で産生されたもの、1本鎖組換え HGF とし

てはバキュロウイルス発現系を用いて sf 21 細胞で発現させたものが用いられた。これら組換え HGF はその凍結乾燥品を賦形剤含有の緩衝液で溶解後アンプルに充填し、凍結乾燥品として供給された。1アンプル当たりの充填量は1本鎖 HGF で4 μ g、2本鎖 HGF で5 μ g であった。まず、共同検定を行う前に NIBSC により標準品候補 HGF の生物活性に及ぼす賦形剤及び凍結融解、熱による強制分解の影響が HGF の細胞増殖促進作用に基づく二種類のバイオアッセイを用いて調べられた。また、最初に述べたように、1本鎖は不活性型前駆体であり、バイオアッセイ系に含まれる血清により2本鎖の活性型に転換され作用を示すようになる。そこで、1本鎖 HGF のウシ胎児血清 (FCS) 前処理が2本鎖 HGF の転換に及ぼす作用についても検討が行われた。

まず予備的検討として標準品候補組換え HGF の 4MBr5 及び MvILu 細胞に対する増殖促進作用について調べられた。1本鎖組換え HGF を \pm 20%FCS で前処理し、4MBr5 細胞増殖に及ぼす作用について 3 H チミジンの取り込みにより調べられた結果、1~64ng/ml の範囲で濃度依存的に促進作用がみられ、最大で4倍の促進がみられた。なお、50%有効濃度は20%FCS 前処理1本鎖組換え HGF で約6ng/ml、未処理で16ng/ml であった。この結果から1本鎖組換え HGF においては20%FCS の前処理により2本鎖への転換が促進され、より低濃度で作用を示すことが明らかになった。次に凍結融解に及ぼす作用について、使用直前に溶解した2本鎖組換え HGF 及び溶解後-20℃に保存し2週間後に融解した2本

鎖組換え HGF の MvILu 細胞増殖に及ぼす作用について、TGF- β を添加し増殖を抑制した状態で調べられた。なお、本検討には2本鎖組換え HGF として CHO 細胞由来のものが用いられた。その結果、両2本鎖組換え HGF により1~128ng/ml の範囲で濃度依存的に促進作用がみられ、最大で約3倍の促進がみられた。また、その濃度依存性および促進の程度は両者で変わらなかった。この結果から少なくとも1回の凍結融解で HGF は失活しないことは示された。本測定ではクリスタルバイオレットによる核染色が細胞増殖の指標として用いられたが、 3 H チミジンの取り込みと同様に良好な HGF 濃度依存性が示されたことから、その後共同検定では細胞増殖の測定にはクリスタルバイオレット法が用いられた。同様な細胞増殖アッセイ法により標準品候補組換え HGF の全てにおいて熱安定性が調べられた。その結果、室温から37℃の範囲で4~5ヶ月保存した標準品候補組換え HGF の細胞増殖促進活性は-20℃で同様な期間保存したものと変わらなかった。従って、凍結乾燥品において標準品候補組換え HGF は用いた条件においては安定であることが示された。また、賦形剤の影響についても調べられたが影響はみられなかった。

以上基礎的検討結果から標準品候補組換え HGF が共同検定を行う標品として妥当であることが示されたことから、次に標準品候補組換え HGF の生物学的活性及び免疫学的活性について11の施設で共同検定が行われた。生物学的活性については細胞を用いたバイオアッセイを用いて評価され、用いる方法の選択については各施設に委ねられた。結果的に用いられたバイオアッセ