

表3-4 バイオロジクスを適用対象としたICHガイドライン<sup>1</sup>

- 組換えDNA技術を応用したタンパク質生産に用いる細胞中の遺伝子発現構成体の分析 (1998年1月)<sup>2</sup>
- 生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) 製造用細胞基材の由来, 調製及び特性解析 (2000年7月)<sup>3</sup>
- ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価 (2000年2月)<sup>4</sup>
- 生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) の規格及び試験方法の設定 (2001年5月)<sup>5</sup>
- 生物薬品 (バイオテクノロジー応用製品/生物起源由来製品) の安定性試験 (1998年1月)<sup>6</sup>
- バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価 (2000年2月)<sup>7</sup>

- 1 <http://www.nihs.go.jp/dig/ich/ichindex.htm>
- 2 <http://www.nihs.go.jp/dig/ich/quality/q5d/iyakusin-873.pdf>
- 3 <http://www.nihs.go.jp/dig/ich/quality/q5b/q5bstep4j.html>
- 4 <http://www.nihs.go.jp/dig/ich/quality/q5a/iyakusin329.pdf>
- 5 <http://www.nihs.go.jp/dig/ich/quality/q5c/q5cstep4j.html>
- 6 [http://www.hourei.mhlw.go.jp/~hourei/cgi-bin/t\\_docframe.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=3572](http://www.hourei.mhlw.go.jp/~hourei/cgi-bin/t_docframe.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=3572)
- 7 <http://www.nihs.go.jp/dig/ich/safety/s6/iyakusin-326.pdf> (註末参考文献3)

スやタンパク質としての抗原性が問題となるケースが多いという特徴も持っている。安全性確保上、次項で述べるような点に留意しておく必要がある。

バイオロジクスの品質・安全性などを確保するための一般的留意事項について、日米EU医薬品規制調和国際会議 (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use ; ICH) の場で三極の規制当局関係者および製薬業界の専門家を集めて議論が続けられており、合意に至った事項についてはガイドラインとして厚生労働省から各種公表されている (ICHガイドライン)。細胞基材由来のタンパク質性医薬品 (および一部の生物起源由来タンパク質性医薬品) に関してこれまでに公表されているICHガイドラインを表3-4に示す。また、医薬品開発途上や承認後に製造方法の変更を行う場合に、変更前後の製品の医薬品としてのcomparability (同等性/同質性) をいかに評価するかに関する議論が現在進行している。

## B 細胞基材より生産されるペプチド・タンパク質性医薬品の非臨床安全性評価

### 1. 概 論

不純物や感染性物質に起因する安全性の問題とは別に、有効成分そのものに関連した安全性上の問題がある。多くのホルモンやサイトカインに代表されるようにペプチド・タンパク質性医薬品中の目的タンパク質は多種多様な生物学的作用を微量で示し、生体内で必要なときに必要な場所で必要な濃度存在し、他の生体内機能分子と協同作業あるいは相互調節制御的作業を営みながら生体

のホメオスタシスの維持に関与している。そのため、これらの機能分子が医薬品として人為的に投与された場合、目的タンパク質自体が生体内で本来の生理的濃度をはるかに超えた状態または本来存在しない組織にまで存在する状態が生じることにより目的外の作用が発現したり、生体のホメオスタシスの乱れを招いて生体に望ましくない作用を発揮する可能性がある。したがって、期待する薬効やその効果発現のための作用機序はもとより、目的外の作用についても医薬品開発段階（非臨床試験段階）で十分に理解を深めておく必要がある。

さらに、特にタンパク質性医薬品では抗原性についても注意が必要である。これらの抗原性は、アレルギーやアナフィラキシー（即時型 I 型アレルギー反応、具体的な症状としてはショックなど）、アナフィラキシー様症状（臨床所見からはアナフィラキシーと区別できないが、発現機序において IgE が関与しないもの）あるいは中和抗体（インヒビター）の産生など、临床上重篤もしくは致命的な問題につながるケースもある。種差の問題から、製品のヒトに対する抗原性は最終的には臨床試験でしか確実な評価はできないが、

- ①目的タンパク質自体およびそれと同等な生物学的作用を示す目的タンパク質関連物質の抗原性
- ②精製工程により除去できなかった、あるいは製品の保存中に凝集、変性などの構造変化を起こして生成する目的タンパク質由来不純物の抗原性
- ③製品中の（目的タンパク質由来ではない）夾雑タンパク質や夾雑リポ多糖類などの不純物の抗原性
- ④製品中のタンパク質と添加剤（ヒト血清アルブミンや糖類など）との相互作用により形成される反応付加体の抗原性

の4点については、臨床試験の実施前に、

- ①製品の製造工程（細胞基材、培養工程に用いる培地成分、精製スキーム等々）の選択の妥当性に関する十分な検討
- ②品質面に関する徹底的な試験、解析（問題となる不純物混在量の上限值を規定するなど、保存中の変化も考慮した適切な品質規格の設定）

を行った上で、

- ③適切な非臨床安全性試験の実施、およびそこでの抗原性に関する注意深い観察と十分な考察

を行っておくことが望ましい。なお、添加剤や不純物がアジュバント（免疫増強物質）として作用するケースもあるので、この点にも注意が必要である。

## 2. 非臨床安全性試験—ICHガイドライン—

動物などを用いた非臨床安全性試験の主な目的は、まず、特に臨床試験開始前の段階において、

- ①当該医薬品をヒトに適用する際の投与量および投与スケジュールを設定するための安全性情報を可能な限り得ること
- ②医薬品として期待される薬効以外の毒性が発現するおそれのある臓器・組織を可能な限り特定し、かつその毒性の種類、程度、可逆性や発現機序を検討しておくこと

である。また、

- ③臨床試験を含めた臨床使用時においてモニタリングすべき具体的な安全性評価項目を見出すこと
- ④承認・上市前にヒトでの知見を十分に得ることが事実上困難なケースが多い安全性（例えば、がん原性、生殖・発生毒性、遺伝毒性）に関する情報を得ること

も重要な目的である。したがって新医薬品の開発研究上、非臨床安全性試験の実施は、安全性薬理試験も含めて一般的に必要なものであり、それはバイオロジクスにおいても例外ではない。

また、開発途中や承認・上市後に製造方法を変更した場合や最終製品に重大な変更（例えば添加物に関する大きな変更）を加えた際にも、最終製品のcomparability（同等性/同質性）を確認するため、品質面での評価のみならず、場合によっては追加の安全性試験、薬物動態試験、薬力学試験や臨床試験が必要となることもある。

目的タンパク質の構造の多様性や不均一性、作用発現の動物種特異性、免疫原性、予期しない部位での作用発現の可能性など、バイオロジクスの物性面や作用面での特徴・特殊性からみて、従来の医薬品（特に化学合成医薬品）における非臨床安全性試験の種類・項目および試験方法をバイオロジクスにそのまま機械的に適用することは必ずしも妥当ではなく、従来とは異なる観点や方法で試験を実施すべき場合が多い。このため、細菌、酵母、昆虫、植物および哺乳動物細胞を含む種々の発現系を用い、特性解析がなされた細胞から製造される医薬品（動物工場/植物工場由来医薬品も含む。遺伝子治療用医薬品および細胞・組織利用医薬品は除く）について、別途検討すべき非臨床安全性試験の内容や考え方がICHガイドライン「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」として厚生労働省から公表されている（章末参考文献3、表3-4脚注7）。これは、化学合成医薬品を主な適用対象とした他の非臨床安全性ICHガイドラインを補完する位置付けにある。

上記ガイドラインの基本的考え方によれば、あらゆる遺伝子組換え技術応用医薬品や細胞培養技術応用医薬品に対して適切とされる画一的な非臨床安全性試験のプロトコールなるものは存在し得ず、対象とする医薬品の特性や臨床上

の適用法などを考慮して医薬品毎にケース・バイ・ケースで合理的かつ柔軟に対応することが適切であるとされている。「ケース・バイ・ケース」といっても、あくまで当該医薬品の臨床上の安全性や有効性の適正な評価に役立つ知見を得ることを最終的な目標として、その時点で最も科学的に適切な試験を実施すべきであることは当然である。その上で、実施すべき試験の種類・項目および具体的な試験方法に関しては個々の医薬品毎に合理的な選択を行えばよい。逆に実施しないとした試験については、実施しなくてよいと判断した合理的な理由が必要である。

化学合成医薬品と同様、バイオロジクスの非臨床安全性試験においても、

- ①適切な動物種の選択
- ②用いる動物の例数、性別および週齢
- ③用いる動物の生理的状态
- ④投与量、投与経路、投与方法など動物への投与計画
- ⑤試験使用条件下での試料の安定性

などについて十分考慮しなければならない。

ガイドラインで適用対象としているバイオロジクスの多くには動物種特異性があるため、非臨床安全性試験において適切な動物種を選択することが特に重要である。*in vivo*での活性についてある特定の性質を予測したり、ヒトを含む複数の動物種の相対的な感受性を評価するためには、種々の動物由来の培養細胞系を利用することが適切なケースもある。①における「適切な動物種」とは、その動物種に目的産物の受容体が発現しており、用いる試料が薬理的活性を示すような動物種のことである。例えば、モノクローナル抗体医薬品の場合における「適切な動物種」は、意図するエピトープ（抗原決定基）を発現し、かつヒトと類似した組織交差反応性を示すような動物種に相当する。ヒト疾患と類似していると考えられる実験動物モデル、例えば誘発性および自然発症性病態モデル動物、遺伝子ノックアウトモデル動物、トランスジェニック動物などを非臨床安全性試験に用いることにより有益な知見を得られる場合もあるが、その際にはこのような動物モデルを用いて安全性評価を行う科学的妥当性を事前に明確にしておく必要がある。それぞれの安全性評価では通常2種類の「適切な動物種」を使用した試験を計画すべきであるが、十分な周辺データおよび考察に基づいた正当かつ合理的な理由があれば1種類の「適切な動物種」を用いた試験のみでも許容され得る。

上記の動物種の選択とも関係するが、②の例数について、使用される動物の例数が少ない場合（ヒト以外の霊長類を用いた試験においてしばしばみられる）、背景データなどの当該試験以外のデータの収集や総合的な考察をより綿

密に行う必要がある。観察の頻度を増やしたり観察期間を延長することによっても、例数が少ないことに起因する限界を部分的には補うことが可能である。

④の投与量、投与経路および投与回数は、臨床適用で予定される投与方法に可能な限り近い形とすべきである。投与量についてガイドラインでは「使用される動物種における医薬品の体内動態及び生物学的利用率並びに実験動物に安全かつ人道的に投与しうる投与量について考慮すべき」かつ「毒性用量及び無毒性用量（NOAEL）を含み、用量－反応関係に関する情報が得られるよう設定しなければならない」とされている。

ヒトに適用されるバイオロジクスの多くは動物で免疫原性を示すことから、動物における抗体産生がヒトでの抗体産生を直接意味するものではないものの、反復投与試験において当該医薬品の投与により産生する抗体を測定して（目的タンパク質に対する抗体の測定のみではなく、必要に応じて不純物などに対する抗体産生や添加剤共存による影響も含めた検討も行う）、観察された抗体反応の特性（例えば、抗体力価、応答した動物数、中和抗体であるか否か）を明らかにし、その上で抗体発現が本薬の薬理作用および毒性所見に及ぼす影響について検討する必要がある。このため、用いた動物のほとんどで、新たに産生した抗体により当該医薬品の薬理作用または毒性作用が中和されるケースを除いては、抗体が検出されたことだけを理由として安易に本来必要である他の非臨床安全性試験を省略したり試験期間を短縮したりすることは不適切である。なお、反復投与毒性試験における投与期間について、ガイドラインでは一般的に1～3ヵ月、臨床で短期使用（例えば7日以内）および急性の致死性疾患に対する適応が検討されている薬剤では2週間、慢性疾患に対する適応が検討されている薬剤では6ヵ月前後が推奨されている。

さらに、最終製品（科学的妥当性があればそれと類似の剤型でも可）を用いての局所刺激性試験を実施する必要がある。ただし、単回または反復投与毒性試験に局所刺激性の評価を組み込むことにより、局所刺激性試験を独立して実施しなくてよい場合もある。同様に、安全性薬理試験のうち、摘出臓器を用いる試験や*in vitro*での試験以外の一部は、毒性試験に組み込んで実施することも可能である。また、反復投与毒性試験には可能な限りトキシコキネティクスを組み込むことが望ましい。

特に免疫毒性試験、生殖・発生毒性試験、遺伝毒性試験およびがん原性試験では、従前の化学合成医薬品で確立された試験方法をそのままバイオロジクスに適用して試験を実施しても無意味な結果しか得られない場合が多い。これらの試験の実施にあたっては、そもそもの試験目的を十分に考えた上で、品質面や薬理学的作用の面あるいは予定される適応症や投与期間等の臨床的側面など

個々の医薬品の特性に合わせた試験計画を個別に立案して試験を実施する必要がある。なお、科学的にみて合理的な理由があれば試験内容を簡略化したり、場合によっては試験を実施しなくても問題はない。

### C 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保

遺伝子治療用医薬品においては、

- ①ウイルスベクターの場合の複製（増殖）性ウイルスの検出方法、存在許容量と管理方法
  - ②抗原性、特にウイルスベクターの場合に、目的遺伝子以外で発現するウイルスタンパク質による抗原性に対する留意と軽減方策
  - ③標的細胞指向性の付与などによる目的外の細胞・組織への遺伝子導入の回避と投与量の軽減のための方策
  - ④レトロウイルスベクターなどの染色体への遺伝子組み込みに伴う遺伝毒性、がん原性発現への慎重な対処
- などが重要課題である（表3-5）。

### D 細胞・組織利用医薬品の品質・安全性確保

細胞・組織利用医薬品・医療機器においては、

表3-5 バイロロジクスの品質・安全性確保の方策に関するガイドライン類（ICHガイドライン以外）

- 生物学的製剤基準（1993年10月）<sup>1</sup>
- 遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針（1995年7月、一部改正2002年3月）<sup>2,3</sup>
- 血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドライン（1999年8月）<sup>4</sup>
- 細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方（2000年12月）<sup>5</sup>
- ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針（2000年12月）<sup>6</sup>
- 異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針（2002年7月）<sup>7</sup>
- 日局生物薬品のウイルス安全性確保の基本要件（第14改正日本薬局方第1追補・参考情報）（2002年12月）<sup>8</sup>
- 医療用具の製造（輸入）承認申請に必要な生物学的安全性試験の基本的考え方（2003年2月）<sup>9</sup>
- 生物由来原料基準（輸血用血液製剤総則、血漿分画製剤総則、人細胞組織製品原料基準、人尿由来原料基準、人由来原料基準、反芻動物由来原料基準、動物細胞組織製品原料基準、動物由来原料基準）（2003年5月）<sup>10</sup>
- BSEリスク評価の基本的な考え方（2003年8月）<sup>11</sup>

- 1 1993年10月1日付け厚生省告示第217号（その後、適宜一部改正）
- 2 [http://www.ourei.mhlw.go.jp/~ourei/cgi-bin/t\\_docframe.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=3109](http://www.ourei.mhlw.go.jp/~ourei/cgi-bin/t_docframe.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=3109)
- 3 [http://www.ourei.mhlw.go.jp/~ourei/cgi-bin/t\\_docframe.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=3638](http://www.ourei.mhlw.go.jp/~ourei/cgi-bin/t_docframe.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=3638)
- 4 <http://www.ourei.mhlw.go.jp/ourei/doc/tsuchi/150702-a.pdf>
- 5 <http://www.nihs.go.jp/mhlw/jouhou/cell/cell-a.pdf>
- 6 <http://www.nihs.go.jp/mhlw/jouhou/cell/cell-b.pdf>
- 7 <http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/index.html#isyoku>
- 8 <http://jpd.nihs.go.jp/jp14supp1/da1tuiho.pdf>
- 9 [http://www.ourei.mhlw.go.jp/~ourei/cgi-bin/t\\_docframe.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=3732](http://www.ourei.mhlw.go.jp/~ourei/cgi-bin/t_docframe.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=3732)
- 10 2003年5月20日付け厚生労働省告示第210号
- 11 <http://www.ourei.mhlw.go.jp/ourei/doc/tsuchi/150806-c.pdf>

- ①原材料となる細胞・組織から由来する感染症発生のリスク防止
- ②非自己細胞・組織の移植による望ましくない免疫反応や細胞分泌タンパク質による免疫原性
- ③移植細胞・組織のがん化の可能性
- ④移植細胞・組織が産生する目的外の生理活性物質が生体に及ぼす影響
- ⑤細胞の遺伝子改変、分化、増殖などに用いる試薬や培地成分による有害作用の回避

などに対する検討と対処が、製品特異的な安全性確保の方策として必要である(表3-5)。

### E 動物工場/植物工場由来医薬品の品質・安全性確保

動物工場/植物工場由来医薬品においては、

- ①動物由来の異種間感染性物質の混入の可能性の排除
- ②製品(タンパク質や細胞・組織)による望ましくない免疫反応の回避に関する対策

が特に重要である(表3-5)。

### F 感染性物質

バイオロジクスの安全性問題を物質面から考える際、大別して3つの観点がある。1つめは有効成分そのものに関わる安全性の問題、2つめは不純物などに関わる安全性の問題であり、これらについてはすでに論述した。3つめは汚染物質、特に感染性物質に関わる安全性の問題である。3者いずれも製品の安全性確保を図る上でゆるがせにできないポイントであるが、前2者が製品毎の個別対応の色彩が濃いのに対し、感染性物質に関わる問題はバイオロジクス全体に共通するものが多く、また、重篤な感染症の発生などの深刻な健康被害を招く可能性もあるのできわめて慎重な対応が必要である。

一般にヒトや動物を起源とする医薬品や添加剤を製造しようとする場合、あるいはその他製造過程において使用される細胞や組織、培地成分、クロマトグラフ用カラムの担体の成分、試薬などがヒトや動物などに由来する場合において留意すべき安全性上のきわめて重要な課題に、ウイルス、その他の微生物(細菌・真菌、マイコプラズマ)あるいはプリオンによる汚染の可能性がある。

このうち、細菌・真菌およびマイコプラズマによる汚染については、起源動物や原材料、あるいは医薬品製造基材(原薬の品質・安全性を確保する上で決定的に重要な位置付けにあると定めた原薬製造のための出発素材、表3-5にあげた生物由来原料基準で「原料又は材料」とされるもの)の段階をはじめ、製造工程の

適切な段階における適切な微生物学的検査や管理あるいは製品段階での無菌試験やマイコプラズマ否定試験などで対処することが一般的方策となっている。

反芻動物由来原料で問題となるプリオンについては、表3-5にあげた「BSEリスク評価の基本的な考え方」など、1996年の「牛海綿状脳症（BSE）に関する医薬品等の当面の安全性確保策について」（<http://www1.mhlw.go.jp/houdou/0804/98.html>）以降の一連のBSE対策により原産国、使用部位、製造工程および製品の使用方法に基づく規制が行われており、これに従って対応することで安全性確保を図ることになる。

ウイルス安全性の確保については、バイオロジクス全般で基本的考え方は共通しているが、細部における問題とその対策や具体的アプローチは各製品の種類や製造方法毎に異なるところも多い。代表的バイオロジクスについては、すでにウイルス安全性に関するガイドライン類が各種整備されている（表3-4、表3-5）。これらのガイドラインをとおして、医薬品等のウイルスに対する総合的な安全性確保を図るために必要な基本的方策の共通認識とされることを要約すると、表3-6に示したとおりになる。これら表3-6 ①～⑨の方策を、段階的にかつ複数以上、相互補完的に活用していくことによって、医薬品等のウイルス面での安全性を確保、向上させることが重要である。

さらに、事前に予測あるいは検知できないウイルスなどによる健康被害の発生とその対応に備えて、原材料記録の保管管理、医薬品製造基材（血液、細胞・組織）の一部の貯留保管、ドナー記録・販売記録の保管管理、当該製品投

■表3-6 ウイルスに対するバイオロジクスの総合的な安全性確保を図るために必要な基本的方策

- |   |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>①ウイルス汚染の可能性（汚染源）について熟知しておくこと</li> <li>②原材料およびその起源たるヒトや動物の適格性に関して慎重に検討し、評価すること</li> <li>③医薬品の製造基材と定めた段階のもの、すなわち原料または材料（例えば、原血漿、加工した細胞、セルバンク、プールした尿、細胞培養液、構造遺伝子、発現ベクターなど）において徹底的なウイルス試験とその結果の解析、評価を行い、ウイルス存在の有無および存在するウイルスの種類や性質について検討すること（なお、③は原材料やその起源たるヒトや動物における検討、評価と相互補完的に実施することが合理的な場合もある）</li> <li>④ウイルスやウイルス様粒子が存在した場合、ヒトへの有害性がどの程度あるかを検討、確認すること</li> <li>⑤ヒトに感染性や病原性を示すウイルスが存在しないような製造関連物質（培地成分、試薬、抗体を使用したアフィニティークロマトグラフ用担体など）を選択すること</li> <li>⑥必要に応じて、製造工程の適当な段階において製品（例えば、細胞培養液を集めた未加工/未精製バルク、最終製品）の（外来性）ウイルス否定試験を実施するための適切な試験計画を策定すること</li> <li>⑦製造工程による十分なウイルスクリアランスを達成するために、ウイルスの除去/不活化に効果的な方法を各種組み合わせることで工程中に採用すること</li> <li>⑧周到なウイルスクリアランス試験計画を立てること</li> <li>⑨製造工程のもつウイルス不活化/除去能を評価する試験を⑥に基づいて実施し、評価すること</li> </ul> |
|---|



与に起因する可能性のある感染症発生の有無などの追跡調査，感染症の定期報告，当該製品が投与された患者の臨床記録・製品記録・製品およびドナーや患者由来の検査試料をしかるべき期間保存する措置，その他関連情報の積極的収集と情報提供なども，製品の種類や特殊性に応じて実施する必要がある。ただしこれらの多くは，血液製剤や細胞・組織利用医薬品など感染性物質混入のリスクが比較的高く保健衛生上の危害の発生または拡大を防止するための措置を講ずることが必要な製品（後述の厚生労働大臣により指定される「特定生物由来製品」）に対して求められるもので，細胞基材由来ペプチド・タンパク質性医薬品の多くにはあてはまらない。

ところで，製品のウイルス汚染ひいては健康被害発生を最も効果的に回避できるか否かの大きなポイントは，表3-6の②および③の段階，すなわち医薬品製造の上流の段階でウイルス汚染に関するチェックをいかに適切かつ厳密に行うかにかかっている。その具体的方策は，製品が (i) 血液製剤，(ii) ヒト細胞・組織利用製品，(iii) ヒト尿由来製品，(iv) その他のヒト原料由来製品，(v) 動物細胞・組織利用製品，(vi) その他の動物原料由来製品，(vii) 反芻動物原料由来製品のいずれのカテゴリーに該当するかなどによってそれぞれ異なる。

生物由来原料基準で定められているとおり，例えばヒト細胞・組織利用製品については，細胞・組織採取から製品に至るまでの過程においてウイルス不活化/除去などの処理が一般的には困難なことから，ドナースクリーニングの段階で，製品の利用の目的に応じた適切な問診などの診断および検査を行い，ドナーとしての適格性を慎重に判断することとされている（表3-7）。

一方，ヒト尿由来製品では，原材料/医薬品製造基材にあたる一定処理後のプール尿においてB型肝炎ウイルス（HBV）抗原検査および核酸増幅検査

表3-7 ヒト細胞・組織利用医薬品におけるドナーの適格性

- B型肝炎ウイルス（HBV），C型肝炎ウイルス（HCV），ヒト免疫不全ウイルス（HIV），ヒトTリンパ球向性ウイルス（HTLV）およびヒトパルボウイルスB19感染症については，問診および検査（血清学的試験や核酸増幅検査（NAT）—例えばPCR法による—など）により否定する必要がある
- ヒトサイトメガロウイルス（CMV）およびEpstein Barrウイルス（EBV）感染については必要に応じて検査により否定することが求められる
- (i) 梅毒トレポネーマ，クラミジア，淋菌・結核菌の細菌による感染症，(ii) 敗血症およびその疑い，(iii) 悪性腫瘍，(iv) 重篤な代謝・内分泌疾患，(v) 膠原病，血液疾患，(vi) 肝疾患，(vii) 痴呆症（伝達性海綿状脳症およびその疑いのある者）については既往歴，問診などによる診断を行うとともに，輸血や移植医療を受けた経験の有無などから適格性を判断する
- 免疫適合性を考慮する
- ウインドウピリオド（病原体またはそれに対する抗体が検出できない感染初期の時期）の存在を考慮して可能な限り再検査を実施する
- なお，患者自己由来の細胞・組織を用いる場合は必ずしもドナースクリーニングを必要としない

(NAT) によるHBV, C型肝炎ウイルス (HCV), ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 検査が必要であるとされている。

細胞基材由来のペプチド・タンパク質性医薬品の場合は、細胞基材の由来となるヒト・動物レベルでの安全性にはあまり拘泥しない代わりに、セルバンクを医薬品製造基材と位置付け、この段階で徹底的なウイルス試験を行うことにより安全性を担保する。さらに、大量培養後の細胞でもしかるべきウイルス試験を念のため行うことにより、安全性の確保を徹底するという方策をとっている。

動物細胞・組織利用製品の場合は、

- ①細胞・組織採取の過程での病原微生物汚染の防止
- ②動物種毎の微生物学的特性を考慮したドナー動物の選択
- ③動物種に応じた適切な感染症に関する試験項目の設定
- ④適切な封じ込め設備などが整った施設におけるドナー動物の飼育管理
- ⑤生きた細胞または組織を用いる場合にあってはウイルス感染リスクの検証を行うこと

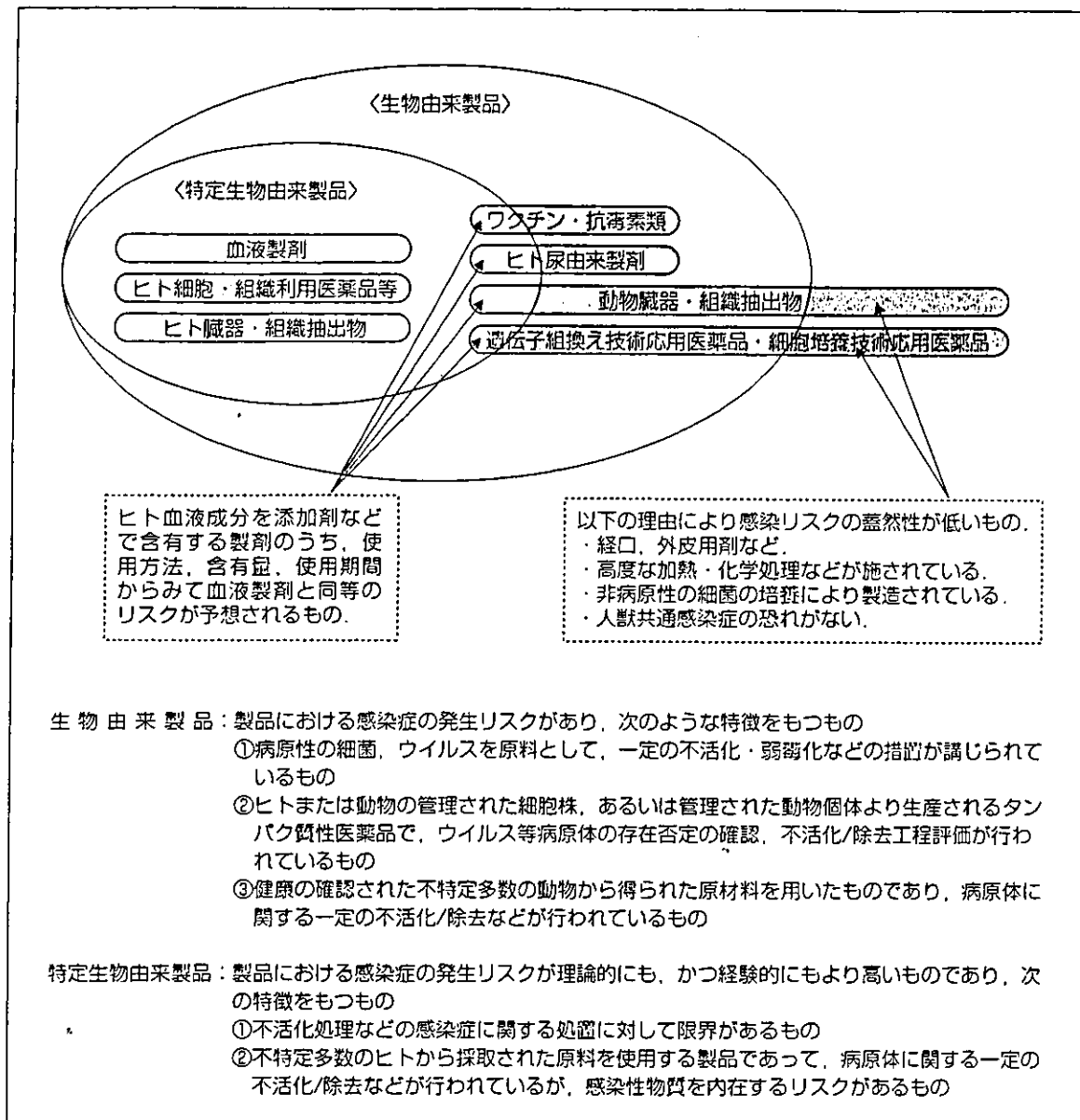
などが必要とされている。

動物原料由来製品の場合は、動物個体レベルで健康な動物あるいは食肉基準に適合した動物またはSpecific Pathogen-Free (SPF) 動物を選択すること、さらに、動物レベルまたは原材料・医薬品製造基材レベルで動物種毎のウイルス学的特性（特にヒトへの感染性をもつウイルスの存在の可能性）に留意した検討を行うことが必要とされている。このウイルス試験の種類や程度は、製品の種類や以降の製造工程（不活化/除去工程など）での検討を勘案してケース・バイ・ケースで考えるのが合理的である。

医薬品・医療機器における感染リスクの評価に際して最も重要なことは、製造に用いられるヒト・動物由来原材料に感染性物質が混入するリスクの程度について合理的・客観的かつ可能な限り定量的な評価を行った上で、製品の臨床的有用性も勘案しながら、個々の製品の製造工程がもつ感染性物質のクリアランス能および投与経路に応じた患者の感染リスク（さらには発病リスク）を踏まえての現実的な議論を行うことである。

2002年の薬事法改正に伴い、新たに「生物由来製品」および「特定生物由来製品」という規制区分が設けられ、2003年7月から施行された ([http://www.ourei.mhlw.go.jp/ourei/cgi-bin/t\\_docframe.cgi?MODE=ourei&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=427](http://www.ourei.mhlw.go.jp/ourei/cgi-bin/t_docframe.cgi?MODE=ourei&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=427)) (図3-2)。「生物由来製品」とは、ヒト・その他の生物（植物以外）に由来する原材料を用いて製造される医薬品等のうち、製品による感染症伝播に関するリスク評価などの科学的見地に基づき「保健衛生上特別の注

図3-2 生物由来製品と特定生物由来製品



意を要するもの」として厚生労働大臣により個別に指定されるものであり、その中にはワクチン・抗毒素類、ヒトや動物の培養細胞由来の遺伝子組換え技術応用医薬品、動物成分抽出製剤などが含まれる。生物由来製品の中でも科学的見地もしくは行政的にみて感染症伝播に関するリスクについてさらに厳重な注意が必要、すなわち「保健衛生上の危害の発生又は拡大を防止するための措置を講ずることが必要なもの」は「特定生物由来製品」として指定される。2003年5月現在、既承認の医薬品等の中から、血液製剤、ヒト胎盤（プラセンタ）抽出物を含有する製剤、およびヒト血清アルブミンを添加剤として含み一個人（患者）に長期間適用されることが想定される製剤が特定生物由来製品として指定されている。この薬事法改正に伴って、特定生物由来製品を用いる際には

表3-8 バイオロジクス全体に共通する安全性確保上の要点（まとめ）

- 原材料の採取段階も含めた製造工程の厳密な管理
- 各バイオロジクスに特徴的な有効成分および目的物質由来不純物や製造工程由来不純物・汚染物質などの特性・品質解析や品質管理
- 有効成分および不純物などに関わる安全性の確認
  - ・予期せぬ作用、抗原性・免疫原性・局所刺激性、新たに産生する抗体の影響などの確認
- 感染性物質に関わる安全性の確保
  - ・細菌・真菌、マイコプラズマ、プリオン、ウイルス

医療機関において患者に十分な情報提供を行い患者の理解を得ることも義務付けられた。

本章で述べてきたバイオロジクス全体に共通する安全性確保上の要点を、表3-8にまとめる。

#### ■ 参考文献 ■

- 1) 早川堯夫：平成10年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告 日局生物薬品の品質・安全性確保に関する研究—ウイルス安全性確保の基本要件（中間報告）—, 医薬品研究, 30, pp.602-617, 1999.
- 2) 早川堯夫：バイオテクノロジーを応用した医薬品の特性解析, 品質及び安全性確保の評価科学—組換え医薬品, 細胞培養医薬品, 遺伝子治療用医薬品, トランスジェニック動物由来タンパク質性医薬品, トランスジェニック動物由来細胞治療用医薬品—, 国立医薬品食品衛生研究所報告, 117, pp.1-38, 1999.
- 3) 厚生省医薬安全局審査管理課長通知：「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」について, 医薬審第326号, 2000.
- 4) 早川堯夫, 内田恵理子ら：トランスジェニック動物由来の品質・安全性確保に関する基礎的研究, 医薬品研究, 31, pp.791-817, 2000.
- 5) 早川堯夫, 山崎修道, 延原正弘編：バイオ医薬品の品質・安全性評価, エル・アイ・シー, 2001.
- 6) 早川堯夫, 豊島聡ら：トランスジェニック動物/クローン動物を利用して製造した医薬品の品質・安全性評価, 国立医薬品食品衛生研究所報告, 119, pp.1-26, 2001.
- 7) 早川堯夫, 石井明子：先端的バイオロジクス開発の現状と新たなバイオ創薬に向けての課題, 医薬品研究, 33, pp.693-729, 2002.
- 8) 早川堯夫：バイオテクノロジー応用医薬品, 内藤周幸編, 臨床試験2003, pp.157-179, 薬事日報社, 2003.
- 9) 早川堯夫, 永田龍二：細胞・組織加工医薬品・医療機器の品質管理, Clinical Neuroscience, 21, pp.1195-1197, 2003.



## Isotope tag method for quantitative analysis of carbohydrates by liquid chromatography–mass spectrometry

Jin Yuan<sup>1</sup>, Noritaka Hashii, Nana Kawasaki\*, Satsuki Itoh, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa

*Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan*

Available online 15 December 2004

### Abstract

We have previously demonstrated that liquid chromatography/mass spectrometry equipped with a graphitized carbon column (GCC-LC/MS) is useful for the structural analysis of carbohydrates in a glycoprotein. Here, we studied the monosaccharide composition analysis and quantitative oligosaccharide profiling by GCC-LC/MS. Monosaccharides were labeled with 2-aminopyridine and then separated and monitored by GCC-LC/MS in the selective ion mode. The use of tetradeuterium-labeled pyridylamino ( $d_4$ -PA) monosaccharides as internal standards, which were prepared by the tagging of standard monosaccharides with hexadeuterium-labeled 2-aminopyridine ( $d_6$ -AP), afforded a good linearity and reproducibility in ESIMS analysis. This method was successfully applied to the monosaccharide composition analysis of model glycoproteins, fetuin, and erythropoietin. For quantitative oligosaccharide profiling, oligosaccharides released from an analyte and a standard glycoprotein were tagged with  $d_0$ - and  $d_6$ -AP, respectively, and an equal amount of  $d_0$ - and  $d_4$ -PA oligosaccharides were coinjected into GCC-LC/MS. In this procedure, the oligosaccharides that existed in either analyte or a standard glycoprotein appeared as single ions, and the oligosaccharides that existed in both analyte and a standard glycoprotein were detected as paired ions. The relative amount of analyte oligosaccharides could be determined on the basis of the analyte/internal standard ion-pair intensity ratio. The quantitative oligosaccharide profiling enabled us to make a quantitative and qualitative comparison of glycosylation between the analyte and standard glycoproteins. The isotope tag method can be applicable for quality control and comparability assessment of glycoprotein products as well as the analysis of glycan alteration in some diseases.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Monosaccharides; Oligosaccharides; Pyridylation; Isotope tag

### 1. Introduction

A variety of recombinant glycoproteins and modified glycoproteins are developed as medical agents, and most of them exist in heterogeneous forms because of the various combinations of oligosaccharides. Alteration of glycosylation is

known to affect the biological activity, mobilization, and biophysical properties of glycoproteins [1], so assessments of their carbohydrate structure and heterogeneity are essential in many stages of development and quality control of glycoprotein products. Since glycosylation varies in response to changes in the manufacturing condition, monosaccharide composition analysis and/or oligosaccharide profiling are needed for the characterization and as a test for constancy and comparability assessments of glycosylation [2]. Several analytical procedures using HPLC have been reported for oligosaccharide profiling and structural analysis of carbohydrates [3–5]. The oligosaccharide profiling using liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) is especially known to provide structural information from their chromatographic behavior and molecular mass [6–8]. We have developed mass spectrometric oligosaccharide profiling using a graphitized carbon column (GCC), which can separate

**Abbreviations:** AP, 2-aminopyridine;  $d_0$ , non-deuterium-labeled;  $d_4$ , tetradeuterium-labeled;  $d_6$ , hexadeuterium-labeled; Fuc, fucose; Gal, galactose; GalN, galactosamine; GalNAc, *N*-acetylgalactosamine; GCC, graphitized carbon column; Glc, glucose; GlcN, glucosamine; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; Man, mannose; PA, pyridylamino; R.S.D., relative standard deviation; SIM, selected ion mode; TFA, trifluoroacetic acid; TIC, total ion chromatogram

\* Corresponding author. Tel.: +81 3 3700 1141; fax: +81 3 3707 6950.

*E-mail address:* [nana@nihs.go.jp](mailto:nana@nihs.go.jp) (N. Kawasaki).

<sup>1</sup> Present address: Chendu Institute of Biological Products, 610063, Chengdu Wai Dong Bao Jiang Qiao, Sichuan Province, China.

oligosaccharides based on subtle differences in branch, position, and linkage with volatile solution [9,10]. This method enables us to distinguish the glycosylation among some glycoprotein products produced in different cells [11].

A use of internal standards is known to improve the precision and linearity in quantitative analyses. Isotopic analogs of the analytes are currently the preferred internal standards for quantification by mass spectrometry (MS) procedures. For instance, Gygi et al. [12] demonstrated the approach for the accurate quantification of the proteins within complex mixture using isotope-coded affinity tags (ICATs). The use of the isotope-labeled carbohydrates as internal standards can make it possible to quantify the carbohydrates by LC/MS. Reductive pyridylation is frequently used for the tagging of carbohydrates in HPLC analysis [13,14]. This derivatization is known to afford higher sensitivity in MS analysis [15], and PA oligosaccharides were reported to be separated by GCC [16]. Here, we study quantitative analysis of carbohydrates using tetradeuterium-labeled pyridylamino ( $d_4$ -PA) carbohydrates as internal standards. First, we study the monosaccharide composition analysis by using  $d_4$ -PA monosaccharides as internal standards. Next, the isotope tag method is used for the quantitative oligosaccharide profiling using recombinant human chorionic gonadotropin (rhCG) and human chorionic gonadotropin (hCG) as an analyte and standard glycoproteins, respectively.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

All monosaccharide standards were purchased from Seikagaku-kogyo (Tokyo, Japan). The pyridylation apparatus (PALSTATION), reagents for the pyridylation reaction, and PA monosaccharide standards were available from TaKaRa Biomedicals (Otsu, Japan). The hexadeuterium-labeled 2-aminopyridine ( $d_6$ -AP) was purchased from Wako (Osaka, Japan). Human chorionic gonadotropin (hCG) and recombinant hCG (rhCG) were bought from Sigma (St. Louis, MO, USA). *N*-glycosidase F was purchased from Roche Diagnostics. All other chemicals and reagents were of analytical grade and were commercially available.

### 2.2. Pyridylation of monosaccharides

For the pyridylation of amino sugars, free amino groups of monosaccharides (GlcN, GalN, 1–1000 pmol) were acetylated by incubation in 50  $\mu$ l of methanol/pyridine/distilled water (30/15/10, v/v/v) with 2  $\mu$ l of acetic anhydride for 30 min at room temperature. The mixture was dried using a vacuum centrifuge evaporator without heating. Acetic acid (50  $\mu$ l), methanol (60  $\mu$ l), and 10  $\mu$ l of coupling reagent prepared by mixing 100 mg of AP was added to monosaccharides (Fuc, Gal, Glc, Man, GlcNAc, GalNAc, 1–1000 pmol). The mixture was heated at 90 °C for 20 min by PALSTATION, and the excess reagents were removed by evaporation under a stream of nitrogen gas at 60 °C for 20 min. Then 10  $\mu$ l of a reducing reagent, prepared just before use by mixing 6 mg of borane–dimethylamine complex and 100  $\mu$ l of acetic acid, was added, and the mixture was heated at 90 °C for 35 min. The reaction mixture was dried three times under a stream of nitrogen gas at 50 °C for 10 min. The residue was dissolved in water for LC/MS analysis. For the preparation of isotope analogs, the tetradeuterium-labeled PA ( $d_4$ -PA) monosaccharide,  $d_0$ -AP was just replaced by  $d_6$ -AP (Fig. 1).

### 2.3. Monosaccharide composition analysis of a glycoprotein

A glycoprotein (25 pmol) was placed in a hydrolysis tube fitted with a Teflon-lined screw cap. Fifty microliters of 2 M HCl–2 M trifluoroacetic acid (TFA) was added to the sample, which was then heated at 100 °C for 6 h. Simultaneously, a set of monosaccharide standards, 100 pmol of Gal, Man, Glc, Fuc, GlcN, and GalN, was treated identically as the analytes. The solution obtained was freeze-dried. The monosaccharides obtained from the analyte glycoproteins and standard monosaccharides were tagged with non-deuterium-labeled 2-aminopyridine ( $d_0$ -AP) and  $d_6$ -AP, respectively. Each tagged oligosaccharide mixture was dissolved into purified water, and a mixture of  $d_0$ - and  $d_4$ -PA monosaccharides was injected into the GCC-LC/MS.

### 2.4. Preparation of *N*-linked oligosaccharides

*N*-linked oligosaccharides were released from hCG as described previously [17]. Briefly, hCG and rhCG (100  $\mu$ g)

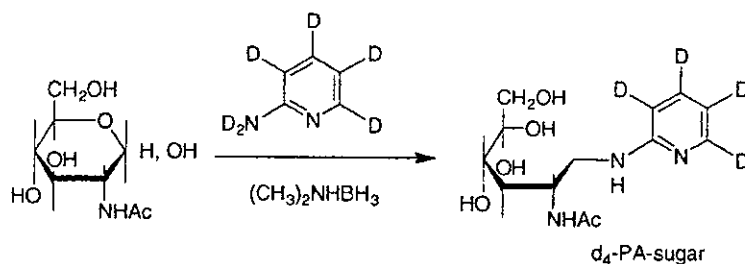


Fig. 1. Synthesis of  $d_4$ -PA monosaccharide internal standard.

were dissolved in 360  $\mu$ l of 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 8.6), containing 8 M guanidine hydrochloride and 5 mM ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA). After an addition of 2.6  $\mu$ l of 2-mercaptethanol, the mixture was allowed to stand at room temperature for 2 h. To this solution, 7.56 mg of monoiodoacetic acid was added, and the resulting mixture was incubated at room temperature for 2 h in the dark. The reaction mixture was applied to a PD-10 column (Amershambioscience, Uppsala, Sweden) to remove the reagents, and the eluate was lyophilized.

Carboxymethylated hCG and rhCG were dissolved in 100  $\mu$ l of 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2, and incubated with 5 units of PNGase F at 37 °C for 2 days. Protein was precipitated with 340  $\mu$ l of cold ethanol, and the supernatant was dried.

### 2.5. Pyridylation of oligosaccharides from hCG

To the lyophilized oligosaccharides released from rhCG we added 10  $\mu$ l of coupling reagent prepared by mixing 300 mg of  $d_0$ -AP, and 100  $\mu$ l of acetic acid, and the reaction mixture was heated at 90 °C for 60 min. Then, 10  $\mu$ l of a reducing reagent, prepared just before use by mixing 20 mg of borane-dimethylamine complex and 100  $\mu$ l of acetic acid, was added, and the mixture was heated at 80 °C for 60 min. The reaction mixture was dried three times under a stream of nitrogen gas at 60 °C for 10 min. The residue was dissolved in water for LC/MS analysis. For the preparation of the tetradeuterium-labeled ( $d_4$ )-PA oligosac-

charide isotope analogs,  $d_0$ -AP was just replaced by  $d_6$ -2-aminopyridine.

### 2.6. LC/MS analysis

LC was carried out using a Magic 2002 HPLC system (Michrom BioResources Inc., Auburn, CA, USA) using a Hypercarb column (0.2 mm  $\times$  150 mm, Thermoelectron, San Jose, CA, USA). The flow rate was set at 2–3  $\mu$ l/min through a splitter system. The mobile phases were 5 mM ammonium acetate (pH 8.5) with 2% of acetonitrile (pump A) and 80% of acetonitrile (pump B). A gradient of 10–35% of B in 60 min was used for the monosaccharide analysis. For oligosaccharide profiling, we used a gradient of 5–20% of B in 20 min, 20–70% of B in 15 min, and 70–95% of B in 5 min. The mass spectrometer used was a TSQ 7000 (Thermoelectron) equipped with a nanoelectrospray ion source (AMR Inc., Tokyo, Japan). The ESI voltage was set to 2000 V (positive ion mode) or 1500 V (negative ion mode), and the capillary temperature was 175 °C.

## 3. Results

### 3.1. Monosaccharide composition analysis using the isotope tag method

First, we examined the possibility of the isotope-tag method for the monosaccharide composition analysis of gly-

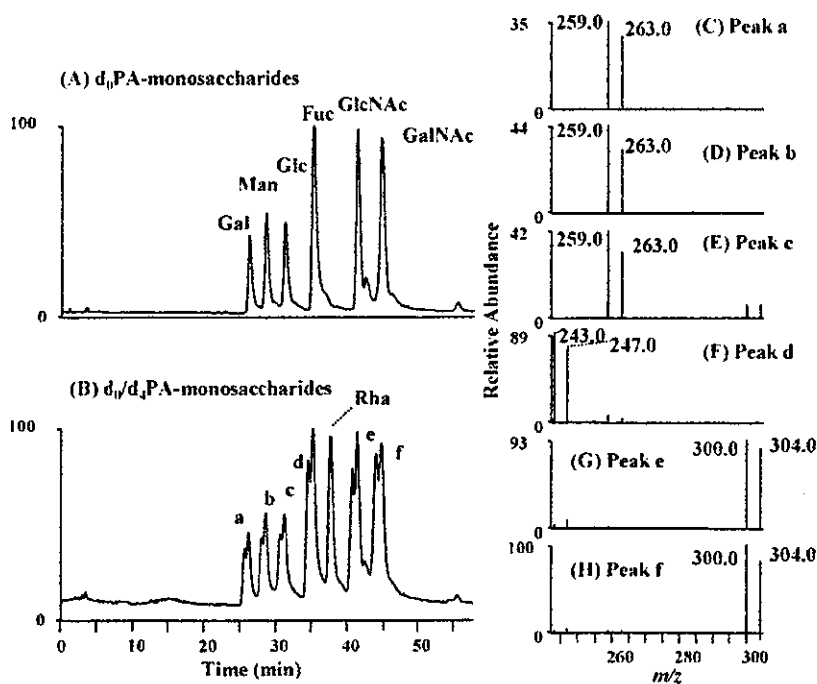


Fig. 2. (A) Extracted ion chromatogram (set  $m/z$  values, 243, 259, and 300) of  $d_0$ -PA monosaccharides (1 pmol Gal, Man, Glc, Fuc, GlcNAc, and GalNAc). (B) Extracted ion chromatogram (set  $m/z$  values, 243, 247, 259, 263, 300, and 304) of a mixture of  $d_0$ - and  $d_4$ -PA monosaccharides (1 pmol Gal, Man, Glc, Fuc, Rham, GlcNAc and GalNAc). (C) Mass spectra of peaks a (C), b (D), c (E), d (F), e (G), and f (H).

coproteins. An equal molar of each  $d_0$ -PA monosaccharide (Gal, Man, Glc, Fuc, GlcNAc, and GalNAc, 1 pmol each) was analyzed by GCC-LC/MS in the positive ion mode. The ions monitored were  $m/z$  259 (for  $d_0$ -PA-Gal,  $d_0$ -PA-Man, and  $d_0$ -PA-Glc),  $m/z$  243 ( $d_0$ -PA-Fuc), and  $m/z$  300 ( $d_0$ -PA-GlcNAc and  $d_0$ -PA-GalNAc). Fig. 2A shows the mass chromatogram of the  $d_0$ -PA monosaccharides. All six  $d_0$ -PA monosaccharides were retained and separated by GCC. The detection limit at a signal-to-noise ratio of 3 was 45 fmol.

The  $d_4$ -PA monosaccharides were prepared as internal standards by tagging of standard monosaccharides with  $d_6$ -AP and combined with  $d_0$ -PA monosaccharides. Fig. 2B shows the chromatogram of a mixture of  $d_0$ -,  $d_4$ -PA monosaccharides and PA-labeled Rhamnose, which is frequently used as an internal standard in the monosaccharide composition analysis. Paired ions with a difference of  $m/z$  4 were detected in the mass spectra of peaks a–f (Fig. 2C–H). When 0.5 pmol  $d_0$ -PA monosaccharides were determined in the presence of  $d_4$ -PA monosaccharides or Rhamnose by GCC-LC/MS, the relative standard deviation ( $n=5$ ) was 1.8–4.8% or 5.6–8.3%, respectively.

To assess the linearity and reproducibility of the whole procedure, including reacetylation, pyridylation, the removal of excess derivatization reagents, and GCC-LC/MS, we tagged different amounts of monosaccharides (Gal, Man, Glc, Fuc, GlcN, and GalN, 1–1000 pmol) with  $d_0$ -AP, and  $d_4$ -PA monosaccharides (4 or 20 pmol) were added to the  $d_0$ -PA monosaccharides (1–10 pmol or 10–1000 pmol, respectively). The whole process of the isotope tag method was found to be linear for all six monosaccharides over the tested range of 1–1000 pmol (Fig. 3). The accuracy of this method was approximately 80–100% (Fig. 3), and the relative standard deviations (%R.S.D.) were less than 7.2% for all monosaccharides (based on the peak area ratio of monosaccharides from five samples).

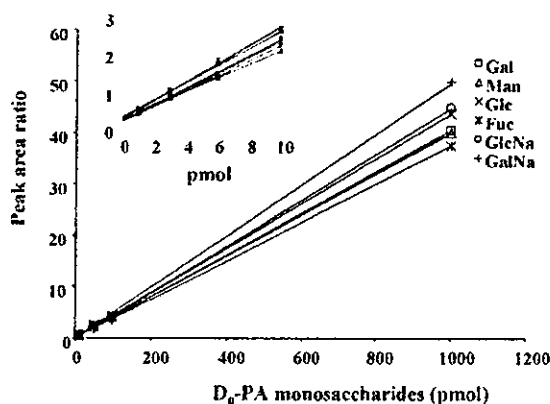


Fig. 3. Linearity on the isotope-tag method for monosaccharide quantification. For the internal standards, 1000 pmol monosaccharides were derivatized to  $d_4$ -PA monosaccharides. Different amounts of monosaccharides were derivatized to  $d_0$ -PA monosaccharides and co-injected with 4 pmol (A) or 20 pmol (B) internal standards into GCC-LC/MS.

We used this method for the monosaccharide composition analysis of fetuin and erythropoietin. Accuracy in the monosaccharide composition analysis of a glycoprotein relies on the condition of hydrolysis. Fan et al. [18] studied the hydrolysis of N-linked oligosaccharides and recommended 4 h with 2 M TFA at 100 °C for neutral sugars, and 6 h with 4 M HCl at 100 °C for amino sugars. While these hydrolysis conditions result in the complete release of neutral and amino sugars with no degradation, it takes two hydrolyses for a single sample. To quantify both neutral and amino sugars in glycoproteins in the same run, fetuin and erythropoietin (25 pmol) were heated in 2 M HCl–2 M TFA at 100 °C for 6 h [19], and a set of monosaccharide standards, 100 pmol of Gal, Man, Glc, Fuc, GlcN, and GalN, was treated identically as the analyte glycoproteins. After hydrolysis, the analyte and standard monosaccharides were tagged with  $d_0$ - and  $d_6$ -AP, respectively. Fig. 4A and E show the mass chromatogram of monosaccharides prepared from fetuin and erythropoietin in the presence of  $d_4$ -PA monosaccharides, respectively.

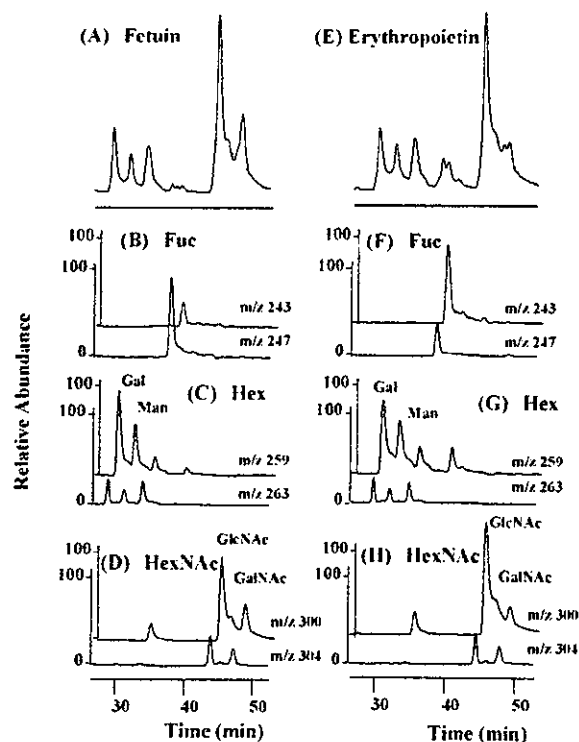


Fig. 4. Monosaccharide composition analysis of glycoproteins. Extracted ion chromatograms of  $d_0$ -PA monosaccharides from fetuin and  $d_4$ -PA standard monosaccharides (set  $m/z$  values, 243, 247, 259, 263, 300, and 304) (A),  $d_0$ -PA Fuc from fetuin and  $d_4$ -PA standard Fuc (set  $m/z$  values, 243 and 247) (B),  $d_0$ -PA Hex from fetuin and  $d_4$ -PA standard Hex (set  $m/z$  values, 259 and 263) (C), and  $d_0$ -PA HexNAc from fetuin and  $d_4$ -PA standard HexNAc and (set  $m/z$  values, 300 and 304) (D). Extracted ion chromatograms of  $d_0$ -PA monosaccharides from erythropoietin and  $d_4$ -PA standard monosaccharides and (set  $m/z$  values, 243, 247, 259, 263, 300, and 304) (E),  $d_0$ -PA Fuc from erythropoietin and  $d_4$ -PA standard Fuc (set  $m/z$  values, 243 and 247) (F),  $d_0$ -PA Hex from erythropoietin and  $d_4$ -PA standard Hex (set  $m/z$  values, 259 and 263) (G), and  $d_0$ -PA HexNAc from erythropoietin and  $d_4$ -PA standard HexNAc (set  $m/z$  values, 300 and 304) (H).



Table 1  
Monosaccharide composition analysis by isotope-tag method

Glycoprotein	Monosaccharide	mol/mol <sup>a</sup>	mol/mol
Fetuin	Fuc	0.3	0 [20]
	Gal	10.4	12
	Man	7.6	9
	GlcNAc	14.7	15
	GalNAc	3.4	3
Erythropoietin	Fuc	3.4	4.1 [21]
	Gal	12.8	13.8
	Man	8.1	8.7
	GlcNAc	15.6	17.2
	GalNAc	1.5	0.9

<sup>a</sup> Values were expressed as mol detected in 1 mol glycoprotein.

Fig. 4B, and F show the mass chromatograms of d<sub>0</sub>-, and d<sub>4</sub>-PA fucose, Fig. 4C and G indicate those of d<sub>0</sub>-, d<sub>4</sub>-PA hexose, and Fig. 4D and H show those of d<sub>0</sub>-, d<sub>4</sub>-PA HexNAc. The monosaccharide compositions of fetuin and erythropoietin calculated from the peak area ratios (d<sub>0</sub>-PA/d<sub>4</sub>-PA monosaccharides) were in good agreement with the reported values (Table 1) [20,21]. By heating the standard monosaccharides simultaneously the decomposition of monosaccharides during hydrolysis can be corrected, and a use of isotope analogs as the internal standards can reduce deviation in ESIMS analysis.

### 3.2. Quantitative oligosaccharide profiling using the isotope tag method

Next, we explored the capability of the isotope-tag method for the quantitative oligosaccharide profiling. When d<sub>0</sub>-PA oligosaccharides prepared from an analyte glycoprotein are analyzed with an equal part of d<sub>4</sub>-PA oligosaccharides prepared from a standard glycoprotein, oligosaccharides which link to both the analyte and the standard glycoproteins are expected to appear as paired ions with a difference of 4 Da, and the individual oligosaccharides in the analyte glycoprotein ought to be detected as single ions. Oligosaccharides released from rhCG and hCG were tagged with d<sub>0</sub>- and d<sub>6</sub>-AP, respectively, and the tagged oligosaccharides were analyzed by GCC-LC/MS in both positive and negative ion modes.

Fig. 5A and B show the mass spectra of the peak which was detected at 21.5 min in the positive and the negative ion mode, respectively. In the positive ion mode, ions at *m/z* 863.0, 1359.4 and 1197.2 were detected (Fig. 5A), and they can be assigned to d<sub>4</sub>-PA [Hex]<sub>5</sub>[HexNAc]<sub>4</sub><sup>2+</sup> (an asialobiantennary oligosaccharide), d<sub>4</sub>-PA[Hex]<sub>3</sub>[HexNAc]<sub>4</sub><sup>+</sup> (a fragment of the asialobiantennary form) and d<sub>4</sub>-PA[Hex]<sub>4</sub>[HexNAc]<sub>4</sub><sup>+</sup> (a fragment of the asialobiantennary form), respectively. In contrast, only an ion at *m/z* 860.9 (d<sub>4</sub>-PA[Hex]<sub>5</sub>[HexNAc]<sub>4</sub><sup>2-</sup>, asialobiantennary oligosaccharide) was detected in the negative ion mode (Fig. 5B). This result suggests that mass spectra

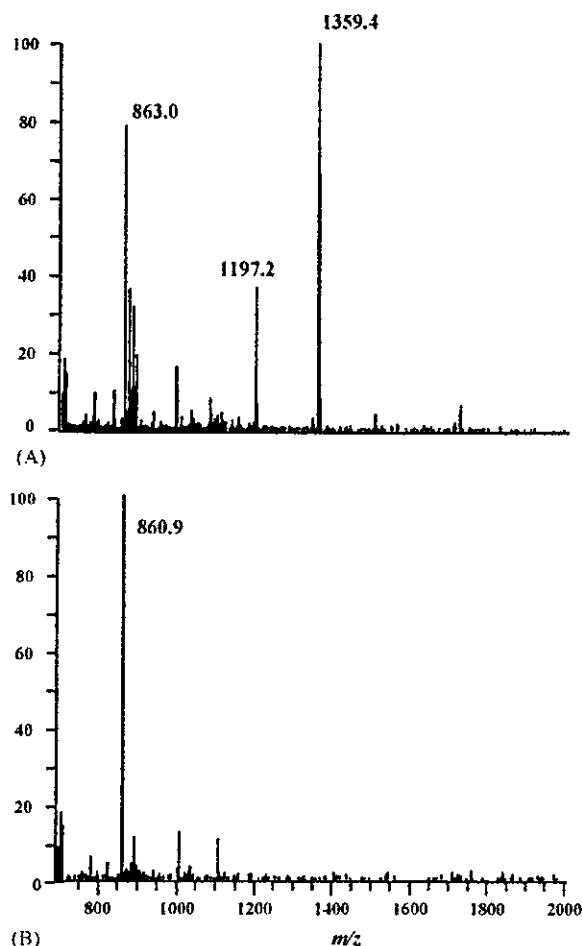


Fig. 5. Mass spectra of d<sub>4</sub>-PA oligosaccharide. D<sub>4</sub>-PA oligosaccharide eluted at 21.5 min from GCC was analyzed by ESIMS in the positive ion mode (A) and negative ion mode (B).

of PA oligosaccharides become complicated due to fragmentation in the positive ion mode, while only molecular ions can be detected in the negative ion mode. Therefore, ESI analysis in the negative ion mode was chosen for the PA oligosaccharide profiling.

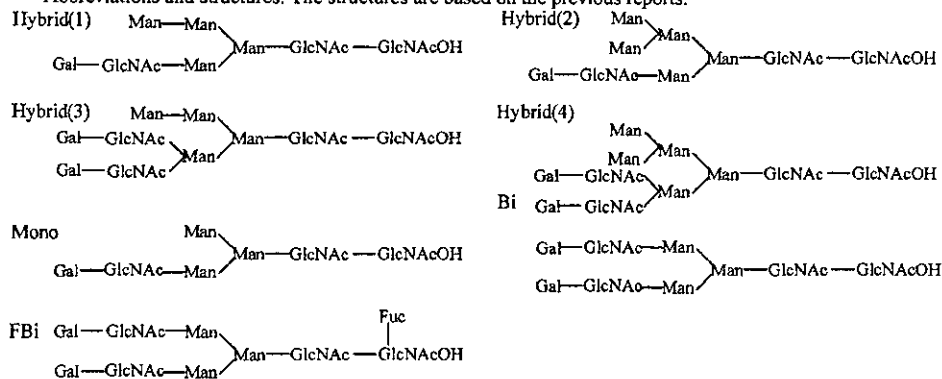
Fig. 6A and B show the TIC of a mixture of equal parts of d<sub>0</sub>-PA oligosaccharides prepared from rhCG and d<sub>4</sub>-PA oligosaccharides from hCG, and its two-dimensional display (retention time versus *m/z*), respectively. The carbohydrate structures, which can be deduced from *m/z* values, are indicated in Table 2. Paired ions at *m/z* 757.5, 759.5 were observed in the mass spectrum of peak a1. Based on carbohydrate composition [Hex]<sub>5</sub>[HexNAc]<sub>3</sub>, it can be assigned to a hybrid type oligosaccharide. Likewise, peak 11, 12, 14, 15, p1, p2, and p4 consisted of paired ions and can be assigned to monosialylated (11, 12, 14, 15) and disialylated (p1, p2) biantennary oligosaccharide without Fuc. Fig. 7 shows TIC of d<sub>0</sub>-, d<sub>4</sub>-PA oligosaccharides (A), extracted ion chromatograms of d<sub>0</sub>-PA (B), d<sub>4</sub>-PA (C), and d<sub>0</sub>-, d<sub>4</sub>-PA monosialylated biantennary form (D). The mass spectra of peaks 11–15 are shown in Fig. 7E–I. Peak 13 was not observed in Fig. 7D and only

Table 2  
Structural assignment of peaks in Fig. 6B

Peak nos.	Carbohydrate composition <sup>a</sup>	Deduced structure <sup>b</sup>	Theoretical mass (d <sub>0</sub> -PA-sugar)	Observed <i>m/z</i>			Ion-pair intensity ratio d <sub>0</sub> /d <sub>4</sub>
				d <sub>0</sub> -PA-rhCG		d <sub>4</sub> -PA-hCG	
				M <sup>2-</sup>	M <sup>3-</sup>	M <sup>2-</sup>	
a1	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>3</sub>	Hybrid (1)	1517.5	757.5		759.5	0.27
b1	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuNAc] <sub>2</sub>	Bi + NA <sub>2</sub>	2303.1		768.2		
c1	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuNAc] <sub>2</sub>	FBi + NA <sub>2</sub>	2449.3		816.7		
d1	[Hex] <sub>4</sub> [HexNAc] <sub>3</sub> [NeuNAc] <sub>1</sub>	Mono + NA	1646.6			824.3	
d2	[Hex] <sub>4</sub> [HexNAc] <sub>3</sub> [NeuNAc] <sub>1</sub>	Mono + NA	1646.6			824.0	
e1	[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>3</sub>	Hybrid (2)	1679.6	838.6			
e2	[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>3</sub>	Hybrid (2)	1679.6			840.6	
f1	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub>	Bi	1720.7	858.9			
f2	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub>	Bi	1720.7			861.2	
g1	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>3</sub> [NeuNAc] <sub>1</sub>	Hybrid (1) + NA	1807.7	902.9			
g2	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>3</sub> [NeuNAc] <sub>1</sub>	Hybrid (1) + NA	1808.7			905.0	
h1	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub>	FBi	1866.8			934.0	
i1	[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>4</sub>	Hybrid (3)	1882.8	940.2			
j1	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>5</sub>	Bi + GN	1924.9			962.7	
k1	[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>3</sub> [NeuNAc] <sub>1</sub>	Hybrid (2) + NA	1970.8			986.8	
k2	[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>3</sub> [NeuNAc] <sub>1</sub>	Hybrid (2) + NA	1970.8			986.2	
l1	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuNAc] <sub>1</sub>	Bi + NA	2011.9	1004.7		1006.7	0.77
l2	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuNAc] <sub>1</sub>	Bi + NA	2011.9	1004.6		1007.3	0.56
l3	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuNAc] <sub>1</sub>	Bi + NA	2011.9	1004.6			
l4	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuNAc] <sub>1</sub>	Bi + NA	2011.9	1004.6		1006.5	0.67
l5	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuNAc] <sub>1</sub>	Bi + NA	2011.9	1004.6		1006.4	0.49
m1	[Hex] <sub>7</sub> [HexNAc] <sub>4</sub>	Hybrid (4)	2044.9	1021.4			
n1	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuNAc] <sub>1</sub>	FBi + NA	2158.0			1079.8	
n2	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuNAc] <sub>1</sub>	FBi + NA	2158.0			1079.8	
n3	[Fuc] <sub>1</sub> [Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuNAc] <sub>1</sub>	FBi + NA	2158.0			1079.8	
o1	[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuNAc] <sub>1</sub>	Hybrid (3) + NA	2174.0	1085.6			
o2	[Hex] <sub>6</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuNAc] <sub>1</sub>	Hybrid (3) + NA	2174.0	1085.7			
p1	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuNAc] <sub>2</sub>	Bi + NA <sub>2</sub>	2303.1	1150.3		1152.1	5.76
p2	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuNAc] <sub>2</sub>	Bi + NA <sub>2</sub>	2303.1	1150.2		1152.2	5.92
p3	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuNAc] <sub>2</sub>	Bi + NA <sub>2</sub>	2303.1	1150.1			
p4	[Hex] <sub>5</sub> [HexNAc] <sub>4</sub> [NeuNAc] <sub>2</sub>	Bi + NA <sub>2</sub>	2303.1	1150.3		1152.4	0.45

<sup>a</sup> Hex, hexose; HexNAc, *N*-acetyl hexosamine; NeuNAc, *N*-acetyl neuraminic acid; Fuc, fucose.

<sup>b</sup> Abbreviations and structures. The structures are based on the previous reports.



single ion was detected in Fig. 7G. These results suggest that one of monosialylated binantennary oligosaccharides isomers links to only rhCG.

We determined relative amounts of some oligosaccharides in rhCG on the basis of ion-pair intensity ratios (Table 2). The amount of monosialylated biantennary forms (l1, l2, l4, and l5) linked to rhCG were 50–70% of those to hCG. The amount of disialylated biantennary forms (p1 and p2) linked to rhCG

was five-fold of those to hCG, and the linkage of p4 to rhCG was one-half of that of hCG. The isotope tag method clearly shows the difference in distribution of isomers between rhCG and hCG.

In this procedure, oligosaccharides linked to either rhCG or hCG were detected as single ions. As shown in Table 2, nine oligosaccharides were detected as single ions in rhCG, and they are reduced to hybrid type and complex type.

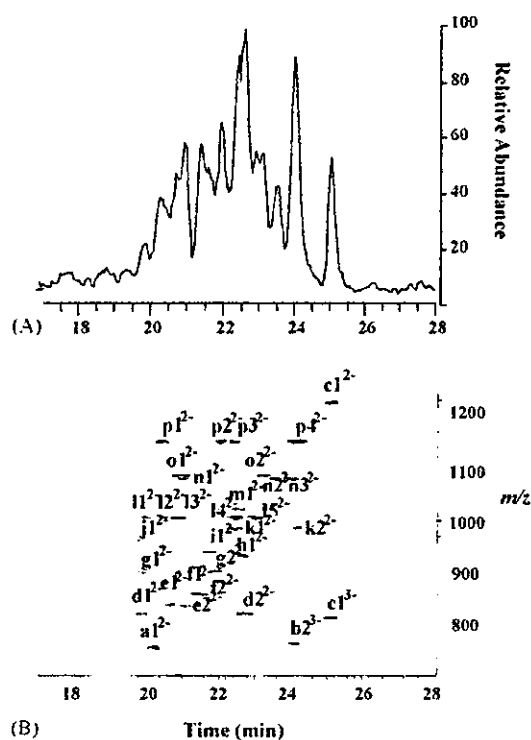


Fig. 6. TIC of a mixture of equal amount of  $d_0$ -PA N-linked oligosaccharides from rhCG and  $d_4$ -PA N-linked oligosaccharides from hCG (A), and its 2D display (B). Oligosaccharides (from 2  $\mu$ g rhCG and hCG) were analyzed by GCC-LC/MS in the negative ion mode.

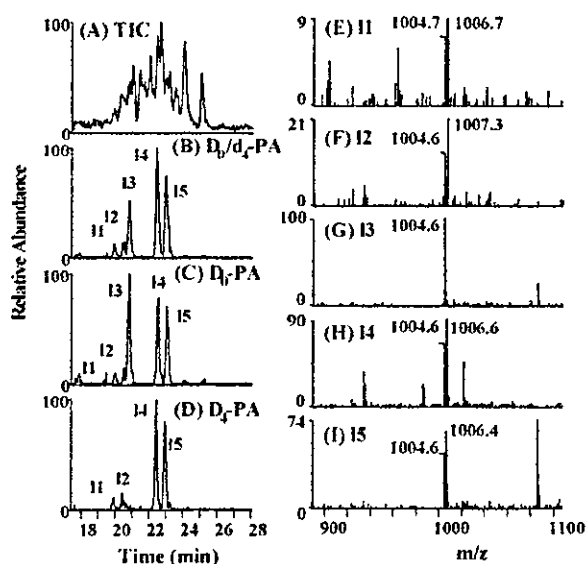


Fig. 7. TIC of a mixture of equal amount of  $d_0$ -PA N-linked oligosaccharides from rhCG and  $d_4$ -PA N-linked oligosaccharides from hCG (A). Extracted ion chromatograms of  $d_0$ - and  $d_4$ -PA monosialylated biantennary (set  $m/z$  values, 1004–1007) (B),  $d_0$ -PA monosialylated biantennary (set  $m/z$  values, 1004–1005) (C), and  $d_4$ -PA monosialylated biantennary oligosaccharides (set  $m/z$  values, 1006–1007) (D). Mass spectra of peak 11–15 (E–I).

Fourteen oligosaccharides were detected only in hCG, and most of them were fucosylated complex type. These results show the differences in glycosylation between rhCG and hCG and suggest that many hybrid type oligosaccharides linked to rhCG, while fucosylated oligosaccharides attach to hCG.

#### 4. Discussion

Alteration of glycosylation is known to cause many changes in the biological activity as well as the physical properties of proteins. Several procedures of oligosaccharide profiling have been reported for the assessment of alteration of glycosylation, however, most of them can be used for only either qualitative or quantitative analysis. Although mass spectrometric oligosaccharide profiling is useful for the qualitative analysis, it has a problem on precision, and some isomers are still indistinguishable if their retention times are closed to others. In this study, we demonstrated that the use of isotope-tagged internal standards and GCC-LC/MS made it possible to do both quantitative and qualitative carbohydrate analysis.

First, we demonstrated the monosaccharide composition analysis using the isotope tag method. The use of internal standards that were heated under the same hydrolysis condition as an analyte glycoprotein resulted in good precision and accuracy in the monosaccharide composition analysis. Several HPLC methods for determination of monosaccharides have been reported. High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) has been widely used for monosaccharide composition analysis [20,22–25]. Although HPAEC-PAD gives high resolution of all common monosaccharides and has the advantage of not requiring derivatization, this method is also known to have a disadvantage of limited selectivity [26]. The isotope tag method with SIM mode is equal to the HPAEC-PAD in sensitivity and is better than it in selectivity.

Next, we demonstrated the potentiality of the isotope tag method for quantitative oligosaccharide profiling using rhCG and hCG as model glycoproteins. hCG consists of an  $\alpha$  subunit (MW 14.7 kDa) and a  $\beta$  subunit (MW 23.0 kDa), and oligosaccharides link to Asn52, and 78 in the  $\alpha$  subunit and Asn13 and 30 in the  $\beta$  subunit. It has been reported that the majority of N-linked oligosaccharides in rhCG and hCG are fucosylated or non-fucosylated di-, tri-, and tetra-antennary forms with a various level of sialylation [27–30]. We prepared  $d_0$ -PA oligosaccharides and  $d_4$ -PA oligosaccharides from rhCG and hCG, respectively, and an equal part of  $d_0$ -PA and  $d_4$ -PA oligosaccharides was injected into LC/MS. We demonstrated that the oligosaccharides existing in one side protein were detected as single ions, whereas common oligosaccharides were detected as paired ions. We could easily realize that monosialo-, and disialobiantennary oligosaccharides linked to both hCG and rhCG, while fucosylated oligosaccharides and some hybrid type oligosaccharides linked to only hCG and rhCG, respectively. In addition, we demonstrated the pos-

sibility of the quantitative comparison the oligosaccharides between two quite similar glycoproteins. This quantitative oligosaccharide profiling is expected to be a powerful tool in various stages, including quality control and comparability assessment of glycoprotein products, and elucidation of glycan alteration in some diseases.

### Acknowledgements

This study was supported in part by the Japan–China Sasakawa Medical Fellowship (J.Y.) and by a grant-in-aid for Research on Health Sciences focusing on Drug Innovation from The Japan Health Sciences Foundation (N.K.).

### References

- [1] A. Varki, *Glycobiology* 3 (1993) 97.
- [2] T. Hayakawa, in: Y.-y.H. Chiu, J.L. Gueriguian (Eds.), *Drug Biotechnology Regulation. Scientific Basis and Practices*, Marcel Dekker Inc., New York, 1991, p. 468.
- [3] N. Takahashi, H. Nakagawa, K. Fujikawa, Y. Kawamura, N. Tomiya, *Anal. Biochem.* 226 (1995) 139.
- [4] R.R. Townsend, M.R. Hardy, O. Hindsgaul, Y.C. Lee, *Anal. Biochem.* 174 (1988) 459.
- [5] G.R. Guile, P.M. Rudd, D.R. Wing, S.B. Prime, R.A. Dwek, *Anal. Biochem.* 240 (1996) 210.
- [6] L. Royle, T.S. Mattu, E. Hart, J.I. Langridge, A.H. Merry, N. Murphy, D.J. Harvey, R.A. Dwek, P.M. Rudd, *Anal. Biochem.* 304 (2002) 70.
- [7] J. Delaney, P. Vouros, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 325.
- [8] K.A. Thomsson, H. Karlsson, G.C. Hansson, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4543.
- [9] N. Kawasaki, M. Ohta, S. Hyuga, M. Hyuga, T. Hayakawa, *Anal. Biochem.* 285 (2000) 82.
- [10] N. Kawasaki, S. Itoh, M. Ohta, T. Hayakawa, *Anal. Biochem.* 316 (2003) 15.
- [11] N. Kawasaki, M. Ohta, S. Itoh, M. Hyuga, S. Hyuga, T. Hayakawa, *Biologicals* 30 (2002) 113.
- [12] S.P. Gygi, B. Rist, S.A. Gerber, F. Turecek, M.H. Gelb, R. Aebersold, *Nat. Biotechnol.* 17 (1999) 994.
- [13] S. Hase, T. Ikenaka, Y. Matsushima, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85 (1978) 257.
- [14] S. Hase, S. Hara, Y. Matsushima, *J. Biochem. (Tokyo)* 85 (1979) 217.
- [15] S. Suzuki, K. Takehi, S. Honda, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2073.
- [16] M. Wuhler, H. Geyer, M. von der Ohe, R. Gerardy-Schahn, M. Schachner, R. Geyer, *Biochimie* 85 (2003) 207.
- [17] S. Itoh, N. Kawasaki, M. Ohta, T. Hayakawa, *J. Chromatogr. A* 978 (2002) 141.
- [18] J.Q. Fan, Y. Namiki, K. Matsuoka, Y.C. Lee, *Anal. Biochem.* 219 (1994) 375.
- [19] H. Takemoto, S. Hase, T. Ikenaka, *Anal. Biochem.* 145 (1985) 245.
- [20] M.R. Hardy, R.R. Townsend, Y.C. Lee, *Anal. Biochem.* 170 (1988) 54.
- [21] H. Sasaki, B. Bothner, A. Dell, M. Fukuda, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 12059.
- [22] M.R. Hardy, *Methods Enzymol.* 179 (1989) 76.
- [23] C.C. Ip, V. Manam, R. Hepler, J.P. Hennessey Jr., *Anal. Biochem.* 201 (1992) 343.
- [24] A. Lampio, J. Finne, *Anal. Biochem.* 197 (1991) 132.
- [25] Y.C. Lee, *Anal. Biochem.* 189 (1990) 151.
- [26] M. Weitzhandler, C. Pohl, J. Rohrer, L. Narayanan, R. Slingsby, N. Avdalovic, *Anal. Biochem.* 241 (1996) 128.
- [27] A. Kobata, *J. Cell Biochem.* 37 (1988) 79.
- [28] Y. Endo, K. Yamashita, Y. Tachibana, S. Tojo, A. Kobata, *J. Biochem. (Tokyo)* 85 (1979) 669.
- [29] A. Amoresano, R. Siciliano, S. Orru, R. Napoleoni, V. Altarocca, E. De Luca, A. Sima, P. Pucci, *Eur. J. Biochem.* 242 (1996) 608.
- [30] A. Gervais, Y.A. Hammel, S. Pelloux, P. Lepage, G. Baer, N. Carte, O. Sorokine, J.M. Strub, R. Koerner, E. Leize, A. Van Dorselaer, *Glycobiology* 13 (2003) 179.