

About Sandoz

Sandoz, a Division of the Novartis group, is a global leader in the field of generic pharmaceuticals, offering a wide array of high-quality, cost-efficient products that are no longer protected by patents. Sandoz has a portfolio of more than 600 active substances in over 5 000 forms worldwide. Key product groups include antibiotics, treatments for central nervous system disorders, gastrointestinal medicines, cardiovascular treatments and hormone therapies. Sandoz develops, produces and markets these drugs along with pharmaceutical and biotechnological active substances and Anti-Infectives. In addition to the strong organic growth in recent years, Sandoz has made a series of acquisitions including Lek (Slovenia), Sabex (Canada), Hexal (Germany) and EonLabs (U.S.) and sells its products in more than 110 countries. In 2005, Sandoz employed around 20,000 people worldwide and posted sales of USD 4.7 billion.

This release contains certain "forward-looking statements" relating to the Group's business, which can be identified by the use of forward-looking terminology, or by express or implied discussions regarding strategies, plans and expectations. Such statements reflect the current plans or views of the Group with respect to future events and are subject to certain risks, uncertainties and assumptions. Management's expectations could be affected by, among other things, competition in general, and other risks referred to in Novartis AG's Form 20-F on file with the US Securities and Exchange Commission. Should one or more of these risks or uncertainties materialize, or should underlying assumptions prove incorrect, actual results may vary materially from those described herein as anticipated, believed, estimated or expected.

###

<p>Contact Kurt Leidner Media Relations Sandoz Tel: +49 8024 476 2591 Fax: +49 8024 476 2599</p>	
---	--



London, 23 February 2006
Doc.Ref. EMEA/CHMP/38181/2006

COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE
SUMMARY OF POSITIVE OPINION*
for
VALTROPIN

International Nonproprietary Name (INN): *somatropin*

On 23 February 2006 the Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) adopted a positive opinion,** recommending to grant a marketing authorisation for the medicinal product Valtropin 5 mg/1.5 ml intended for powder and solvent for solution for injection for treatment of growth disturbance and growth hormone deficiency. The applicant for this medicinal product is BioPartners GmbH.

The active substance of Valtropin is somatropin, a growth hormone produced by recombinant DNA technology (ATC code: H01 AC01). Somatropin is a hormone of importance for growth and for the metabolism of lipids, carbohydrates and proteins.

Valtropin is a biological medicinal product similar to the reference medicinal product Humatrope authorised in the EU. Studies have shown Valtropin to have a comparable quality, safety and efficacy profile to Humatrope.

The most common side effects are injection site pain, headache, mild hyperglycaemia and in adult patients adverse reactions related to fluid retention, such as peripheral oedema, hypertension, arthralgia, myalgia and paraesthesia.

A pharmacovigilance plan for Valtropin as for all medicinal products will be implemented as part of the marketing authorisation.

The approved indications are:

Paediatric patients

- Long-term treatment of children with growth failure due to an inadequate secretion of normal endogenous growth hormone.
- Treatment of short stature in children with Turner syndrome, confirmed by chromosome analysis.
- Treatment of growth retardation in pre-pubertal children with chronic renal insufficiency.

Adult patients

- Replacement therapy in adults with pronounced growth hormone deficiency of either childhood- or adult-onset aetiology.

It is proposed that therapy with Valtropin is initiated and monitored by physicians adequately experienced in the diagnosis and management of patients with growth hormone deficiency.

Detailed recommendations for the use of this product will be described in the Summary of Product Characteristics (SPC) which will be published in the European Public Assessment Report (EPAR) and will be available in all official European Union languages after the marketing authorisation has been granted by the European Commission.

* Summaries of positive opinion are published without prejudice to the Commission Decision, which will normally be issued within 67 days from adoption of the Opinion.

** Applicants may appeal any CHMP opinion, provided they notify the EMEA in writing of their intention to appeal within 15 days of receipt of the opinion.



現地報告BioSquare2006、Willex社、抗体医薬RencarexPIII着手、腎細胞がんを対象に、全世界臨床、2008年に申請計画

記事を読む

東芝、Antara BioSciences社、電流検出DNAチップのライセンス契約を締結と発表

記事を読む

総合科学技術会議ライフサイエンスPT、第3期計画の戦略まとめ、06年度から5年の集中投資分野を絞込み

記事を読む

再生医療学会特別セッションで総合機構の田中部長「回復・継続した供給は薬事法の規制対象」との見解

記事を読む

最新ニュースはこちら

関連テーマサイト

ファーマビジネス

2005-09-15 09:50:55

ニュース

バイオ・ジェネリック薬「Omnitrope」の承認めぐり Sandoz社がついにFDAを提訴



スイスNovartis社のジェネリック医薬開発子会社であるSandoz社は、2005年9月13日、組み換えヒト成長ホルモン製剤「Omnitrope」の承認が遅れていることを理由に、米食品医薬品局

(FDA)を提訴したと発表した。Omnitropeは、バイオ医薬品としては初めて、Sandoz社がジェネリック薬（後発医薬品）としての簡易審査による販売認可をFDAに申請していた薬剤。しかし、バイオ・ジェネリック薬の認可基準などの問題が解決しておらず、2年近く承認が先延ばしされていた。

Omnitropeの承認申請が行われたのは03年7月。その後、04年9月2日には、FDAから「Omnitropeを承認するかどうかの判断ができなかった」という通知があったことをSandoz社が発表した（[関連記事](#)）。その後、この申請に関しては、FDAから何のアクションもなかったという。

Sandoz社は、本件をコロンビア特別区の地方裁判所に提訴。Omnitropeの申請に関するFDAの誤った対応について、コミッショナーの法的責任で撤回することを要求する。Sandoz社のCEOであるAndreas Rummelt氏は、「われわれは、安全で既存薬と同等の治療効果を持ちながら、価格の安いOmnitropeのようなFollow-on Protein Products（後発のたんぱく質製剤）が使用できるようになることは、患者や医療関係者にとって重要なことだと考えている。申請時に十分な科学的な検証は行われているのだから、FDAはOmnitropeを承認すべきだ」とコメントしている。（田島健）

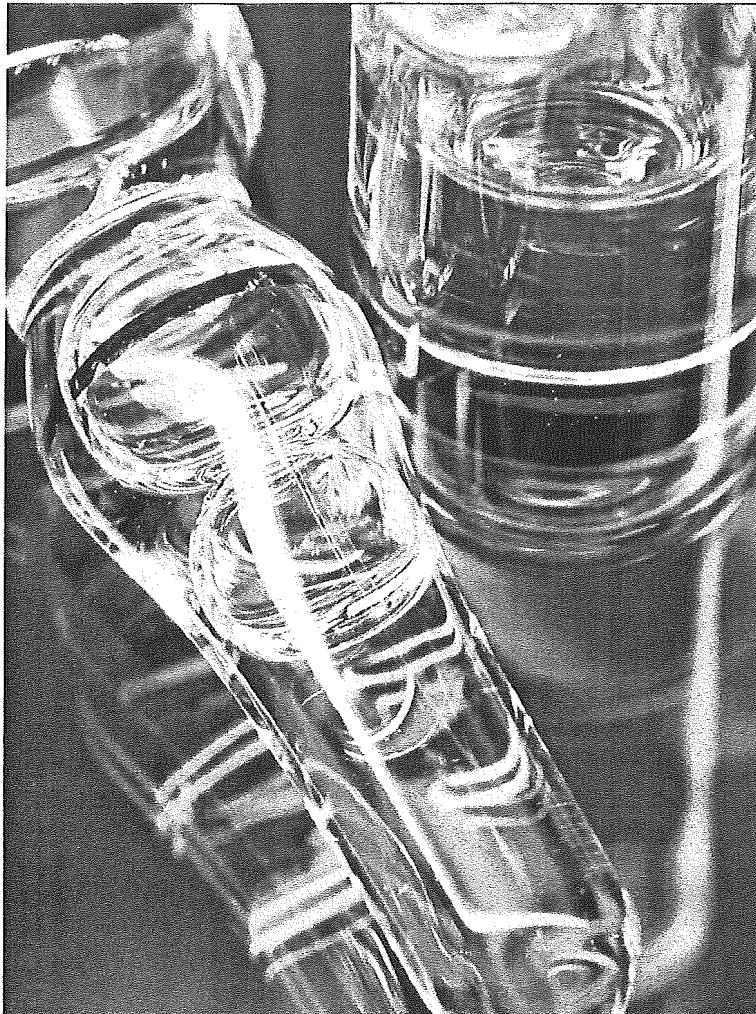
++ファーマ++

Copyright(c) Nikket Business Publications, Inc. All Rights Reserved

PR

昨日のランキング

- 1位 キリンのFGF-R2阻害剤、難治性がんへの有効性を示唆
- 2位 ナノバイオのクラスターテクノロジー、大証ヘラクレスに新規上場へ
- 3位 日本再生医療学会総会、幹細胞指針案の説明会開催、研究者から懸念が続々…
- 4位 四国がんセンター、前立腺がん患者でキノコ健康食品の効果を検証へ、3月1日に倫理委員会の承認獲得
- 5位 再生医療学会シンポジウム「再生医療 そのニーズを聞く」閉塞感募る現状に、「一緒に取り組んでいきたい」と総合機構の田中部長



Follow-on Biologics Workshop

*Scientific Issues in
Assessing the Similarity
of Follow-on Protein Products*

A New York Academy of Sciences Meeting
December 12 - 14, 2005
New York Marriott at the Brooklyn Bridge
Brooklyn, New York



Co-sponsored with the
US Food and Drug Administration

In collaboration with the
National Institute of Standards and Technology

Follow-on Biologics Workshop *Scientific Issues in Assessing the Similarity of Follow-on Protein Products*

The goal of this meeting is to address the scientific issues associated with the characterization and demonstration of similarity of protein pharmaceutical products. This event will provide an overview of currently available methodologies and technologies, as well as perspectives on future technology. The focus will be on the use of analytical techniques to characterize follow-on biologics, and on the role of the fermentation and purification processes in determining product quality attributes. The meeting will also address challenges to characterizing and comparing proteins in the absence of reference standards for the active pharmaceutical ingredient.

TUESDAY, DECEMBER 13, 2005 7:30 AM - 5:45 PM

7:30 - 8:30 AM Registration and Continental Breakfast

8:30 - 12:00 Noon Session I Continued

Protein-Protein Interactions - Quaternary Structure

Overview and Related Issues

Speaker to be announced

Critical Factors Governing Protein Aggregation and Particle Formation

John F. Carpenter, University of Colorado Health Sciences Center

Field Flow Fractionation

Karin D. Caldwell, Uppsala University

Light Scattering as a Tool for Assessing Protein Aggregates

Ewa Folta-Stogniew, Yale University

Imaging Proteins Using Atomic Force Microscopy

Roger E. Marchant, Case Western Reserve University

Intermission

Uses of Analytical Ultracentrifugation

Thomas M. Laue, University of New Hampshire

MS of Higher Order Protein Structures

Igor Kaltashov, University of Massachusetts

Panel Discussion

12:00 - 1:30 PM Luncheon

1:30 PM - 3:00 PM Session II

Effect of the Manufacturing Process on the Product

Product Definition by Process Design

Charles L. Cooney, Massachusetts Institute of Technology

Chromatography

Erik Fernandez, University of Virginia

Effects of the Bioreactor Environment on Product Quality

Sarah W. Harcum, Clemson University

Renaturation and Folding

Francois Baneyx, University of Washington

Intermission

3:30 - 5:45 PM Session III

Impurities and Contaminants

Overview - What Types of Impurities are of Concern and Why Impurities Matter?

Speaker, FDA

Immunological Techniques

Nadine M. Ritter, The Biologics Consulting Group, LLC

Proteomics Approaches

Timothy D. Veenstra, SAIC-Frederick, Inc.

Organics/Small Molecules:GC-MS

Speaker to be announced

Panel Discussion

WEDNESDAY, DECEMBER 14, 2005 7:30 AM - 4:45 PM

7:30 - 8:30 AM Registration and Continental Breakfast

8:30 - 11:30 AM Session IV

Bioassays and Potency

Overview

Speaker, FDA

Case Studies

Example 1: Enzyme Assays- Single Function vs. Pleiotropy

Laureen Little, Bioquality

Example 2: Binding Assays Versus Functional Bioassays

C Jane Robinson, National Institute for Biological Standards and Control

Intermission

Example 3: Challenges to Assaying Protein Concentration

David Bunk, NIST

Panel Discussion

11:30 AM - 1:00 PM Luncheon

1:00 - 2:00 PM Session V

Assessing Similarity of Active Ingredients

Overview of Issues

Speaker, FDA

Challenges in Developing Reference Materials for Biotech Products
Adrian Francis Bristow, National Institute for Biological Standards and Control

Case Studies on Structure-Activity-Stability Relationships with Therapeutic Proteins

Chris Jones, National Institute for Biological Standards and Control

Intermission

2:30 - 4:00 PM Roundtable Discussion

How to Compare Products/Proteins in the Absence of Reference Standards

4:00 - 4:45 PM Session VI

Workshop Wrap-Up

Wrap-Up

Janet Woodcock, FDA-CC

(Invited)

FDA Perspectives, Closing Remarks

Speaker, FDA

Follow-on Biologics Workshop

Scientific Issues in Assessing the Similarity of Follow-on Protein Products

PRELIMINARY PROGRAM

MONDAY, DECEMBER 12, 2005 7:00 AM - 7:00 PM

7:00 - 8:30 AM Registration and Continental Breakfast

8:30 - 9:00 AM Introduction and Goals of the Workshop

Welcoming Remarks

New York Academy of Sciences Representative

US Food and Drug Administration Representative

Office of Pharmaceutical Science Perspectives

Keith Webber, FDA

Meeting Goals and Agenda

Emily Shacter, FDA

9:00 AM - 5:30 PM Session I

Analytical Techniques to Examine Molecular Heterogeneity of Active Ingredient: Comparisons, Strengths and Weaknesses

Primary Structure

Overview of Primary Structure and Related Issues

David Bunk, NIST

Analysis of Post-Translationally Modified Peptides and Proteins by Mass Spectrometry: New Technology and Applications

Donald F. Hunt, University of Virginia

Chromatography Techniques

Speaker to be announced

Intermission

Fourier Transform MS

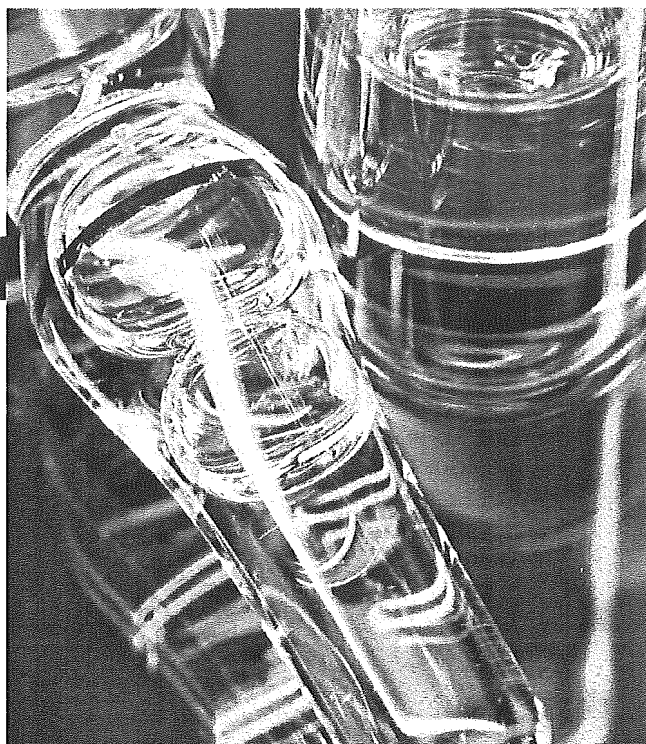
Jonathan Amster, University of Georgia

Molecular Heterogeneity of Proteins Due to Glycosylation

Vernon Reinhold, University of New Hampshire

Panel Discussion

12:30 - 2:00 PM Luncheon



Secondary and Tertiary Structure

Overview and Issues

Russ Middaugh, University of Kansas

NMR

Daron Freedberg, FDA/CBER

Spectroscopic Techniques -FTIR, Fluorescence, Other - For Secondary Structure Analysis

Keith Oberg, MannKind Inc

Spectroscopic Techniques for Tertiary Structure Analysis

Curtis Meuse, NIST

Intermission

Thermodynamic Characterization of Protein Pharmaceutical Products by Calorimetry

Frederick P. Schwarz, CARB/NIST

Surface Hydrophobicity/HIC

Steve Cramer, Rensselaer Polytechnic Institute

Panel Discussion

5:30 - 7:00 PM Wine and Cheese Reception

生物薬品の特性・品質解析、品質評価法の検討

分担研究者： 川崎ナナ （国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第1室長）

協力研究者： 伊藤さつき （国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部）

要 旨

我々は、液体クロマトグラフィー／質量分析法（LC/MS）を用いた糖タンパク質構造特性解析法を開発し、様々な糖タンパク質性医薬品の糖鎖構造解析や糖鎖部分の同等性／同質性評価に応用することを検討してきた。昨年度は、イオントラップMSを用いたよりインフォーマティブな糖鎖プロファイリング法を開発することに成功した。最終年度である本年度は、糖タンパク質性医薬品のモデルとしてヒト絨毛性性腺刺激ホルモンを用いて、昨年度開発した糖鎖プロファイリング法、及び別途見出した糖ペプチド解析法を用いた、糖タンパク質性医薬品の糖鎖に関する迅速・簡便な構造特性解析のためのストラテジーを確立した。

A. 研究目的

バイオテクノロジー応用技術の進歩に伴い、様々な糖タンパク質がバイオ医薬品として開発されている。糖タンパク質の糖鎖部分は、活性等に影響を及ぼすだけでなく、糖鎖抗原として有効性や安全性にも影響を及ぼすことが知られている。また、糖鎖付加は、人為的に制御することが困難である上、製造方法の影響を大きく受けて変化することから、糖タンパク質関連医薬品においては、糖鎖部分の恒常性を確保することが重要とされている。しかし、糖鎖の構造は複雑で不均一性が高く、解析が容易ではないことから、糖タンパク質性医薬品の特性解析・品質評価、製造方法変更時における同等性／同質性評価、並びに昨今の国際的重要課題の一つであるバイオジェネリック医薬品の評価において、最終産物の糖鎖の恒常性を評価するための技術開発が国際的にも強く望まれている。

我々は、LC/MSを用いて、糖タンパク質の糖鎖に関する構造特性解析法の開発を行ってきた。これまでに、グラファイトカーボンカラム(GCC)を接続したLC/MSを用いた糖鎖プロファイリング法を開発

し、糖タンパク質性医薬品の糖鎖部分の特性解析、及び同等性／同質性評価に活用することを検討してきた。特に昨年の本研究では、イオントラップ型(IT)質量分析装置を用いて、よりインフォーマティブな改良型糖鎖プロファイリング法を開発することに成功した。また、別途我々は、LC/ITMSとタンパク質データベースを利用した糖ペプチド解析法を見出した。これは、従来困難とされてきた糖ペプチドの同定と部位特異的糖鎖構造解析を可能にするものである。そこで本年度は、モデルとして局方医薬品でもあるヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)を用いて、改良型糖鎖プロファイリング法と部位特異的糖鎖解析法を取り入れた、糖タンパク質性医薬品の糖鎖部分に関する迅速・簡便な構造特性解析のストラテジーを確立する。

B. 研究方法

1) 試薬

hCGはシグマ社より購入した。

2) hCG の還元カルボキシメチル化

hCG (200 µg) を 8 M グアニジン塩酸塩, 5 mM EDTA を含む 0.5 M Tris-HCl, pH 8.6 (270 µl) に溶解し, 2-メルカプトエタノール 2 µl を加え, 室温で 2 時間放置した. モノヨード酢酸ナトリウム 5.7 mg を試料溶解溶液 45 µl に溶かして試料溶液に加え, 遮光下, 室温にて 2 時間放置した. PD-10 カラム (Amersham Bioscience) を用いて脱試薬し, 得られた試料溶液を凍結乾燥した.

3) ペプチドの調整

還元カルボキシメチル化した hCG (100 µg) を 95 mM トリス塩酸 (pH 8.0) 100 µl に溶かし, トリプシン (3 µg) を加えて, 37 °C で 18 時間消化した.

4) 糖鎖の調製

還元カルボキシメチル化 hCG (100 µg) を 95 µl のリン酸緩衝液 (pH 7.2) に溶解し, 5 単位の PNGaseF と 37 °C で 18 時間反応させて糖鎖を切り出した. 70% 冷エタノールを加えてタンパク質を沈殿させ, 上清を SpeedVac で減圧乾固した. 糖鎖を 50 µl の水に溶解し, 0.5 M NaBH₄ (50 µl) と反応させて糖アルコールとした. カーボンカートリッジ ENVI-Carb (Supelco) を用いて脱塩し, 減圧乾固後, 50 µl の水に溶解して試料溶液とした.

5) ペプチドマッピング

以下の条件で LC/MS¹⁻⁴ を用いたペプチドマッピングを行い, データ依存的に得られた MS²⁻⁴ スペクトルを用いてデータベース検索を行った.

HPLC :

装置 : Paradigm MS4 (Michrom BioResource 社)

カラム : MAGIC C18 (Michrom BioResource 社製, 0.2×50 mm, 3 µ)

溶離液 A : 0.01% ギ酸を含む 2% アセトニトリル水溶液

溶離液 B : 0.01% ギ酸を含む 90% アセトニトリル水溶液

グラジエントプログラム :

B 液 : 5% (0~10 分), 5~65% (10~70 分)

流速 : 2 µl/min

MSⁿ :

装置 : Finnigan LTQ (Thermo Electron 社)

イオン源 : nanoESI

キャピラリー温度 : 200 °C

キャピラリー電圧 : 1.8 kV

スキャン範囲 (*m/z*) : 300-2,000

衝突エネルギー : 35%

測定方法 :

① Full MS¹ scan (positive ion mode)

② インソース CID

③ Data-dependent MS²⁻⁴ (positive ion mode)

Database search analysis :

検索エンジン : TurboSEQUENT (Thermo Electron)

データベース : NCBIInr

6) 糖鎖の解析

以下の条件で糖鎖の LC/MSⁿ を行った.

HPLC :

装置 : Paradigm MS4 (Michrom BioResource 社)

カラム : Hypercarb (Thermo electron 社製, 0.2×150 mm, 5 µ)

溶離液 A : 2% アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 9.6)

溶離液 B : 80% アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 9.6)

グラジエントプログラム :

B 液 : 5~40% (0~60 分)

流速 : 2 µl/min

MSⁿ :

装置 : Finnigan LTQ (Thermo Electron 社)

イオン源 : nanoESI

キャピラリー温度 : 200 °C

キャピラリー電圧 : 1.8 kV

スキャン範囲 (*m/z*) : 450-2,000

衝突エネルギー : 35%

測定方法 :

- ① Full MS¹ scan (positive ion mode)
- ② Data-dependent MS²⁻⁴ (positive ion mode)
- ③ Full MS¹ scan (negative ion mode)
- ④ Data-dependent MS²⁻⁴ (negative ion mode)

略語

Fuc, フコース; Gal, ガラクトース; Hex, ヘキソース; HexNAc, N-アセチルヘキソサミン; NeuAc, N-アセチルノイラミン酸

C. 結果と考察

(1) hCG のペプチドマッピング

ペプチドマッピングは、タンパク質性医薬品の一次構造を確認することを目的として、従来から取り入れられている試験法の一つである。最近では、LC/MS と組み合わせ、MS¹ で得られた分子量や MS² で得られたペプチド配列情報からピークを帰属するのが一般的になっている。この MS² を利用したペプチドマッピングは、プロテオミクスにおけるペプチド同定の定法としても知られている。これは、MS² によってペプチドから生じた b イオン及び y イオンを、データベースに登録されているタンパク質から生じるペプチドに由来する b 及び y イオンの理論値と照合することによって、ペプチドの配列を推定するものである。糖ペプチドの場合は、MS² によって糖鎖部分が優先的に開裂するため、データベースとの照合が難しく、これまで、データベース検索による糖ペプチドの同定は難しいとされてきた。しかし、先に我々は、MS² で糖鎖を開裂させて糖鎖構造情報を得、さらに、GlcNAc 結合ペプチドを前駆イオンとして MS³ を行い、生じた b 及び y イオンを利用してデータベース検索することにより、ペプチド配列情報を得られることを見出した。この方法を利用することによって、糖ペプチドの同定はもとより、結合部位毎の糖鎖の構造・不均一性解析が可能になると思われる。そこで我々は、hCG をモデルとして、糖タンパク質のペプチドマッピングへの

LC/MSⁿ とデータベース検索の応用可能性について検討を行った。

hCG は α サブユニット、及び β サブユニットのヘテロダイマーからなる糖タンパク質である。α サブユニットは 92 アミノ酸残基からなり、Asn52 と 78 に N 結合型糖鎖が結合している (図 1)。β サブユニットは 145 アミノ酸残基からなり、Asn13 と 30 に N 結合型糖鎖、並びに Ser121, 127, 132, 及び 138 に O 結合型糖鎖が付加している。酵素消化を完全に行うために hCG を還元カルボキシメチル化した後、トリプシンで消化し、N 結合型糖鎖が結合した 4 つの糖ペプチド (A6, A9, B3, 及び B4), 並びに O 結合型糖鎖が結合した 3 つの糖ペプチド (B13, B14, 及び B15) を含むペプチド混合物を調製した。

図 2 は、C18-LC/ITMS 装置を用いて得られた hCG トリプシン消化物のペプチドマップである。ここではポジティブイオンモードでフル MS¹ スキャン、インソース CID、及びデータ依存的 MS²⁻⁴ 測定を行った (表 1)。尚、インソース CID とは、イオン化してから検出器に導入されるまでの間に気体を衝突させてイオンを開裂させる方法である。また、データ依存的 MSⁿ では、MSⁿ⁻¹ の各スキャンで最も強く検出されたイオンを前駆イオンとして自動的に MSⁿ を行った。図 2A は MS¹ のトータルイオンクロマトグラム (TIC) で、ペプチド及び糖ペプチドに由来するピークが表れている。図 2B は、インソース CID によって生じた糖鎖に特徴的な GlcNAc の B イオンのみを抜き出したクロマトグラムで、主に糖ペプチドに由来するピークが表れている。これらの糖ペプチドの配列を推定するために、タンパク質データベース解析エンジン TurboSEQUENT を用いて、得られたマススペクトルとタンパク質データベース NCBI nr に登録されているタンパク質の照合を行った。その際に、糖ペプチドの同定を可能にするため、検索条件に Asn, Thr, 及び Ser に GlcNAc が結合している可能性を追加して検索した。その結果、図 2B の 19-22, 20, 及び 53 分に溶出されたピークは、GlcNAc が結合したペプチド A9, A6, 及び B4 と帰属された。また、3, 22-27, 及び 32-35 に溶出されたピークは、ペプチド B13, B3, 及び B15 と同定された。

これらのペプチドからは糖鎖が完全に脱離したペプチドイオンが生じたため、データベース検索上では糖ペプチドとして特定されなかったが、MS²スペクトル上に糖鎖に特徴的なイオンが検出されることから、糖ペプチドと判定した。26分のピークは、データベース検索によって同定されなかったが、MS²スペクトルを解析した結果、B14であることが推定された。このペプチドには糖鎖が2本結合しているため、データベース検索では同定できなかったものと思われる。

各ペプチドに結合している糖鎖の構造は、MS²スペクトルから推定した。図3は7つの糖ペプチドの典型的なMS²スペクトルと、その帰属結果を示している。A-DはN結合型糖鎖が結合したA6, A9, B3, 及びB4で、E-GはO結合型糖鎖が結合したB13, B14, 及びB15である。N結合型糖鎖は、混成型及び複合型糖鎖で、O結合型糖鎖は、シアル酸が結合した3-4糖からなる糖鎖であることが確認された。

(2) hCGの糖鎖プロファイリング

糖タンパク質性医薬品の糖鎖部分の恒常性を評価するため、遊離糖鎖のプロファイリングが糖鎖試験として設定されている。これまでは、2-アミノピリジンや2-アミノベンザミドによる糖鎖の標識とHPLCによるプロファイリングや、HPAEC-PADによるプロファイリングが取り入れられてきた。我々はより情報量が豊富なLC/MSを用いた糖鎖プロファイリングを開発し、エリスロポエチン、肝細胞増殖因子、甲状腺刺激ホルモン、トロンプモジュリン等の構造特性解析に応用してきた。今年度は、昨年度開発したLC/MSⁿに基づく改良型糖鎖プロファイリング法(表2)を用いて、hCGのN結合型糖鎖のプロファイリングを行った。

図4A及び4Bは、ポジティブ及びネガティブイオンモードのフルMS¹スキャンによって得られた糖鎖プロファイルである。各ピークの糖鎖配列は、MS¹によって測定された分子量及びMS²スペクトルから解析した。糖鎖配列解析の一例として、図5に37分に溶出された糖鎖のMS²スペクトルを示す。一連

のBイオンシリーズ、及びYイオンシリーズが検出され、シアル酸が結合した複合型糖鎖と推定された。

以下同様に主なピークのMS²スペクトルを解析した結果、hCGの主な糖鎖の構造はシアル酸結合混成型及び複合型2本鎖と推定され、ペプチドマッピングの結果とよく一致した。さらに、2本鎖糖鎖に加えて、ペプチドマッピングでは検出されなかったトリシアロ3本鎖型糖鎖が検出された。糖鎖プロファイリングは糖鎖の詳細な解析に適していることが示唆された。

(3) 糖タンパク質性医薬品の糖鎖構造に関する構造特性解析のためのストラテジー

hCGを用いた実験により、LC/MSⁿシステムを用いたペプチドマッピングによって、部位毎の糖鎖の概略が明らかになること、さらに、改良型糖鎖プロファイリングによって、糖鎖構造や不均一性の詳細が明らかになることが確認された。この2つの手法を用いることによって、分子内に複数の糖鎖結合部位を持つ糖タンパク質の構造解析や、類似糖タンパク質の同等性・同質性評価が可能になることが示唆された。

図6は、LC/MSⁿを利用した糖タンパク質性医薬品の糖鎖に関する構造特性解析の流れを示したものである。まず、酵素消化を完全に行うため、糖タンパク質は予め還元カルボキシメチル化する。サンプルを2つに分け、一方をトリプシン等でペプチドに断片化する。このとき、LC/MS²に適したサイズのペプチド、すなわちC18カラムに保持される程度の疎水性を持ち、MS²が可能な分子量で、かつ、分子内に糖鎖を1分子しか含まないペプチドが得られるように消化酵素を選択するのが望ましい。Lys-C、Glu-C、またはAsp-Nやそれらの組み合わせも検討する。そして、得られたペプチド断片のLC/MSⁿを行う。

つぎに、ペプチドマップで得られたデータを基に、以下の手順で糖ペプチドを解析する。まず、すべてのペプチド・糖ペプチドのマスマスペクトルデータを使ったデータベース検索を行い、ペプチド及び糖ペプチドの配列を推定する。このとき、データベース検索エンジンの検索条件に糖鎖付加の可能性を追加

する。つぎに、MS² スペクトルの中から、糖鎖に特徴的なイオンを指標にして糖ペプチドを選別する。

その中で既にデータベース検索エンジンによって同定された糖ペプチドは、MS²⁻⁴ スペクトルから糖鎖構造を推定する。データベース検索で同定されなかった糖ペプチドについては、MS² スペクトル中の各プロダクトイオンを帰属してペプチド関連イオンを探し出し、マニュアルでペプチド配列と糖鎖配列を推定する。

残りの還元カルボキシメチル化糖タンパク質には PNGaseF を作用させて N 結合型糖鎖を遊離させる。LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングを行い、糖鎖構造を詳細に解析する。両者を比較し、構造特性を明らかにする。

我々は、今回用いた hCG 以外に、ラットやマウス組織中の微量糖タンパク質の構造特性解析に本ストラテジーが応用可能であることを確認している。このストラテジーは今後、開発途中の微量糖タンパク質やバイオジェネリックの糖鎖解析にも応用可能と期待される。

D. 結論

hCG をモデル糖タンパク質として用いて、昨年度開発した糖鎖プロファイリング法、及び別途開発した糖ペプチド解析法を利用した糖タンパク質性医薬品の糖鎖部分に関する迅速・簡便な構造特性解析のためのストラテジーを確立した。

E. 健康危害情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Akira HARAZONO, Nana KAWASAKI, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Site-specific glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Glycobiology*. 15, 447-462

(2005)

2) Kayoko TAKAGI, Reiko TESHIMA, Haruyo OKUNUKI, Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA, Yuichi KOHNO, Atsuo URISU, and Jun-ichi SAWADA: Kinetic analysis of peptide digestion of chicken egg white ovomucoid and allergenic potential pepsin fragments, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 136, 23-32 (2005)

3) Jin YUAN, Noritaka HASHII, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Isotope tag method for quantitative analysis of carbohydrates by liquid chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1067, 145-152 (2005)

4) Hideki TAGAWA, Yasuhiko KIZUKA, Tomoko IKEDA, Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Hidetake KURIHARA, Maristela Lika ONOZATO, Akihiro TOJO, Tasuo SAKAI, Toshisuke KAWASAKI Shogo OKA, and: A non-sulfated form of the NHK-1 carbohydrate is specifically expressed in mouse kidney, *J. Biol. Chem.*, 280, 23876-23883 (2005)

5) Makoto HIRANO, Bruce Yong MA, Nana KAWASAKI, Kazumichi OKIMURA, Makoto BABA, Tomoaki NAKAGAWA, Keiko MIWA, Nobuko KAWASAKI, Shogo OKA, Toshisuke KAWASAKI: Mannan-binding protein blocks the activation of metalloproteases meprin α and β , *J. Immunol.*, 175, 3177-3185 (2005)

6) Noritaka HASHII, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Masashi HYUGA, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Glycomic/ glycoproteomic analysis by LC/MS: Analysis of glycan structural alternation in the cells. *Proteomics*, 5, 4665-4672

(2005)

- 7) Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Akira HARAZONO, Noritaka HASHII, Yukari MATSUIISHI, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA: Characterization of a gel-separated unknown glycoprotein by liquid chromatography/multiple tandem mass spectrometry. Analysis of rat brain Thy-1 separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1094, 105-1017 (2005)
 - 8) Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Akira HARAZONO, Noritaka HASHII, Yukari MATSUIISHI, Takao HAYAKAWA, and Toru KAWANISHI: Mass spectrometry of glycoprotein, *Trends in Glycosci. Glycotech.* 17, 193-203 (2005)
 - 9) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 早川堯夫: 糖タンパク質の質量分析, 「糖鎖科学の新展開」谷口直之, 伊藤幸成監修, エヌ・ティー・エス, 東京 pp69-75, (2005)
 - 10) Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Noritaka HASHII, Akira HARAZONO, Yukari MATSUIISHI, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: N-linked oligosaccharide analysis by liquid chromatography with graphitized carbon column/ liner ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry in positive and negative ion modes, *J. Chromatogr. A*, 1103, 296-306 (2006)
 - 11) Akira HARAZONO, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Noritaka HASHII, Akiko ISHII-WATABE Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Site-specific N-glycosylation analysis of human plasma ceruloplasmin using liquid chromatography/ electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 348, 259-268 (2006)
 - 12) Noritaka HASHII, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Akira HARAZONO, Yukari MATSUIISHI, Takao HAYAKAWA and Toru KAWANISHI: Specific detection of Lewis x-carbohydrates in biological samples using liquid chromatography/multiple-stage tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19, 3315-3321 (2005)
 - 13) Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH and Toru KAWANISHI: LC/MS strategies in the characterization of glycoproteins, *Encyclopedia of mass spectrometry*, Vol. 8, Elsevier, in press
 - 14) 川崎ナナ, 橋井則貴, 伊藤さつき, 原園 景, 川西 徹: LC/MS を用いたグライコーム解析, *臨床化学*, 34, 309-318 (2005)
 - 15) 川崎ナナ: LC/MSⁿ による糖タンパク質糖鎖の解析, 未来を拓く糖鎖科学. 永井克孝監修, 20-21, 金芳堂 (2005)
2. 学会発表
- 1) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 橋井則貴, 原園 景, 松石 紫, 川西 徹, 早川堯夫: リニアイオントラップ型 MS を用いたゲル内糖タンパク質の部位特異的糖鎖解析. 第 53 回質量分析総合討論会 (2005, 5, 19) 大宮
 - 2) 橋井則貴, 伊藤さつき, 川崎ナナ, 原園 景, 松石 紫, 川西 徹, 早川堯夫: multiple-stage tandem mass spectrometry (MSⁿ) による Lewis^x の特異的解析. 第 53 回質量分析総合討論会 (2005, 5, 19) 大宮
 - 3) 福原 潔, 石井明子, 川崎ナナ, 川西 徹, 宮田直樹, 奥田晴宏: 脂溶性平面型カテキンの抗酸化作用とがん細胞増殖阻害効果. 第 64 回日本癌学会学術総会 (2005, 9, 14-16) 札幌

- 4) 原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 松石 紫, 川西 徹: LC/ESI/MS/MS によるタンパク質混合物中のヒト血漿ビトロネクチンの部位特異的糖鎖解析. 第 25 回日本糖質学会 (2005, 7, 20)大津
- 5) 佐野琴音, 宮本泰則, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 玉井幸恵, 加藤恵己, 赤松 暢, 内堀・岩城はるひ, 浅沼公恵, 鈴木理沙, 小川温子: 肝再生時のビトロネクチン糖鎖がマトリックスリガンド結合と細胞伸展活性に与える影響. 第 回日本糖質学会 (2005, 7, 20)大津
- 6) 川崎ナナ, 橋井則貴, 松石 紫, 伊藤さつき, 原園 景, 川西 徹: LC/MSⁿ による糖鎖の構造特異的検出. 日本プロテオーム機構第 3 回大会 (2005, 8, 1)横浜
- 7) 永石貴之, 野村和子, 水口惣平, 出嶋克史, 川崎ナナ, 松石 紫, 野村一也: 線虫の糖鎖付加タンパク質の決定. 日本プロテオーム機構第 3 回大会 (2005, 8, 1)横浜
- 8) 野村和子, 水口惣平, 永石貴之, 安藤恵子, 三谷昌平, 平林義雄, 松石 紫, 川崎ナナ, 野村一也: *C. elegans* を用いた糖鎖の網羅的機能解析—二次元電気泳動(2D-DIGE)による定量解析. 日本プロテオーム機構第 3 回大会 (2005, 8, 1)横浜
- 9) Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Noritaka HASHII, Akira HARAZONO, Yukari MATSUISHI, Akiko HACHISUKA, Reiko TESHIMA, Jun-ichi SAWADA, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA: Glycosylation analysis of IgLON family glycoprotein in rat brain by LC/MSⁿ. 第 77 回日本生化学会大会 (2005, 10, 19) 神戸
- 10) Noritaka HASHII, Nana KAWASAKI, Akira HARAZONO, Satsuki ITOH, Yukari MATSUISHI, and Toru KAWANISHI: Decrease in alpha-glucosidase II expression in the kidney of a MRL/lps murine model of human systemic lupus erythematosus (SLE). 第 77 回日本生化学会大会 (2005, 10, 19) 神戸
- 11) Risa INOUE, Motoki TERADA, Kay-Hooi Khoo, Nana KAWASAKI, Bruce Y. MA, Shogo OKA, Toshisuke KAWASAKI, Nobuko KAWASAKI: Isolation of glycoproteins carrying the characteristic MBP-ligands oligosaccharide from the human colon cancer cells. 第 77 回日本生化学会大会 (2005, 10, 19) 神戸
- 12) Miho ASAHI, Kotone SANO, Noritaka HASHII, Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Maiko YANAGIBASHI, Haruhi UCHIBORI-IWAKI, Haruko OGAWA: Characterization of glycan moieties of fibronectin and vitronectin during liver regeneration. 第 77 回日本生化学会大会 (2005, 10, 19) 神戸
- 13) 佐野琴音, 内堀一岩城はるひ, 浅沼公恵, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 鈴木理沙, 玉井幸恵, 加藤恵己, 赤松 暢, 小川温子: 肝再生時ビトロネクチンの部位特異的糖鎖修飾ならびに糖鎖構造変化が多量体形成に与える影響. 文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節」第 3 回夏期シンポジウム(2005, 8) 浜松
- 14) 福原 潔, 中西郁夫, 石井明子, 川崎ナナ, 川西 徹, 浦野四郎, 小澤俊彦, 宮田直樹, 伊古田暢夫, 奥田晴宏: カテキンの立体構造固定による抗酸化効果の増強と生物作用. 第 20 回生体機能関連化学シンポジウム (2005, 9, 17)名古屋
- 15) 川崎ナナ, 橋井則貴, 伊藤さつき, 原園 景,

松石 紫, 川西 徹: 自己免疫疾患モデルマウス腎臓における糖鎖異常. 第1回臨床プロテオーム研究会 (2005, 10, 15) 東京

16) 澤田 均, 澤 彩映子, 伊藤さつき, 川崎ナナ: マボヤ卵黄膜上の精子レセプターHrVC700 の糖鎖構造. 日本動物学会第76回大会 (2005, 10, 6-8)つくば

17) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 中島 紫, 原園 景, 川西 徹: LC/MS のグライコミクスへの応用. 文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節」第4回公開シンポジウム (2006, 1, 31) 名古屋

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

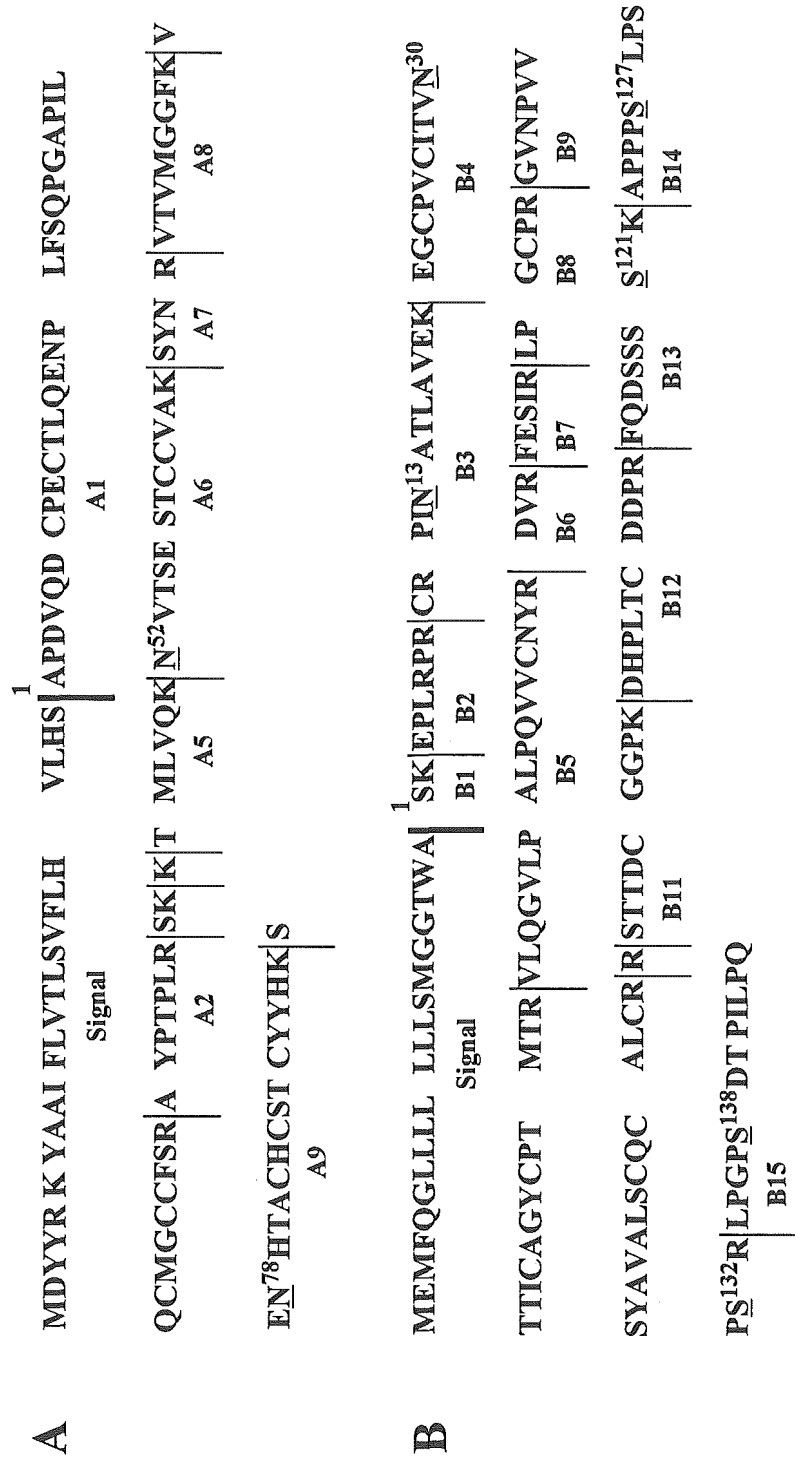


Fig. 1 絨毛性腺刺激ホルモンの一次構造及び糖鎖結合位置

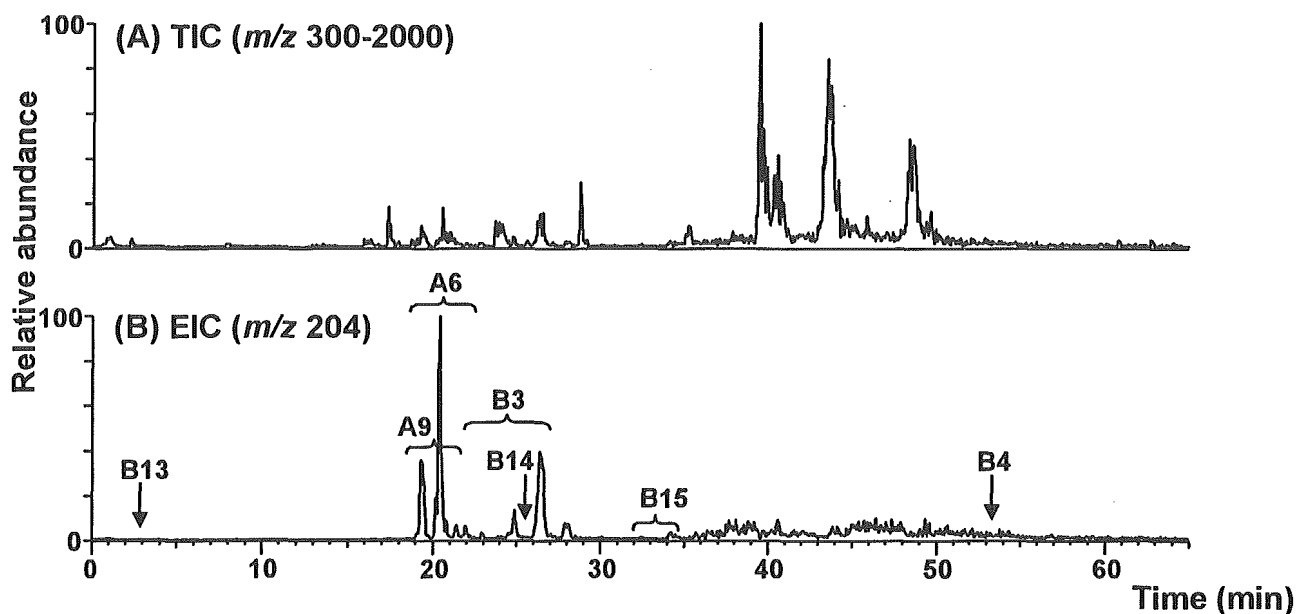


Fig. 2 LC/MSⁿによって得られたhCGのペプチドマップ

Table 1 ペプチドマッピングの分析条件

Sample: Tryptic digest of carboxymethylated hCG (1 μ g)

LC:

Column: Magic C18 (0.2 x 50 mm, 3 μ , Michrom BioResources)

Instrument: Paradigm MS4 (Michrom BioResources)

Eluent:

A, 0.1% HCOOH/ 2% CH₃CN

B, 0.1% HCOOH/ 90% CH₃CN

Gradient: 5 % of B in 10 min, 5-65 % of B in 70 min

MS:

Instrument: LTQ (Thermo Electron)

Scan program:

MS¹: *m/z* 300-2000

In-source CID: *m/z* 80-700

Data-dependent MS²⁻⁴

Spray voltage: 1.8 kV

Database search analysis:

Search engine: TurboSEQUENT (Thermo electron)

Database: NCBIInr

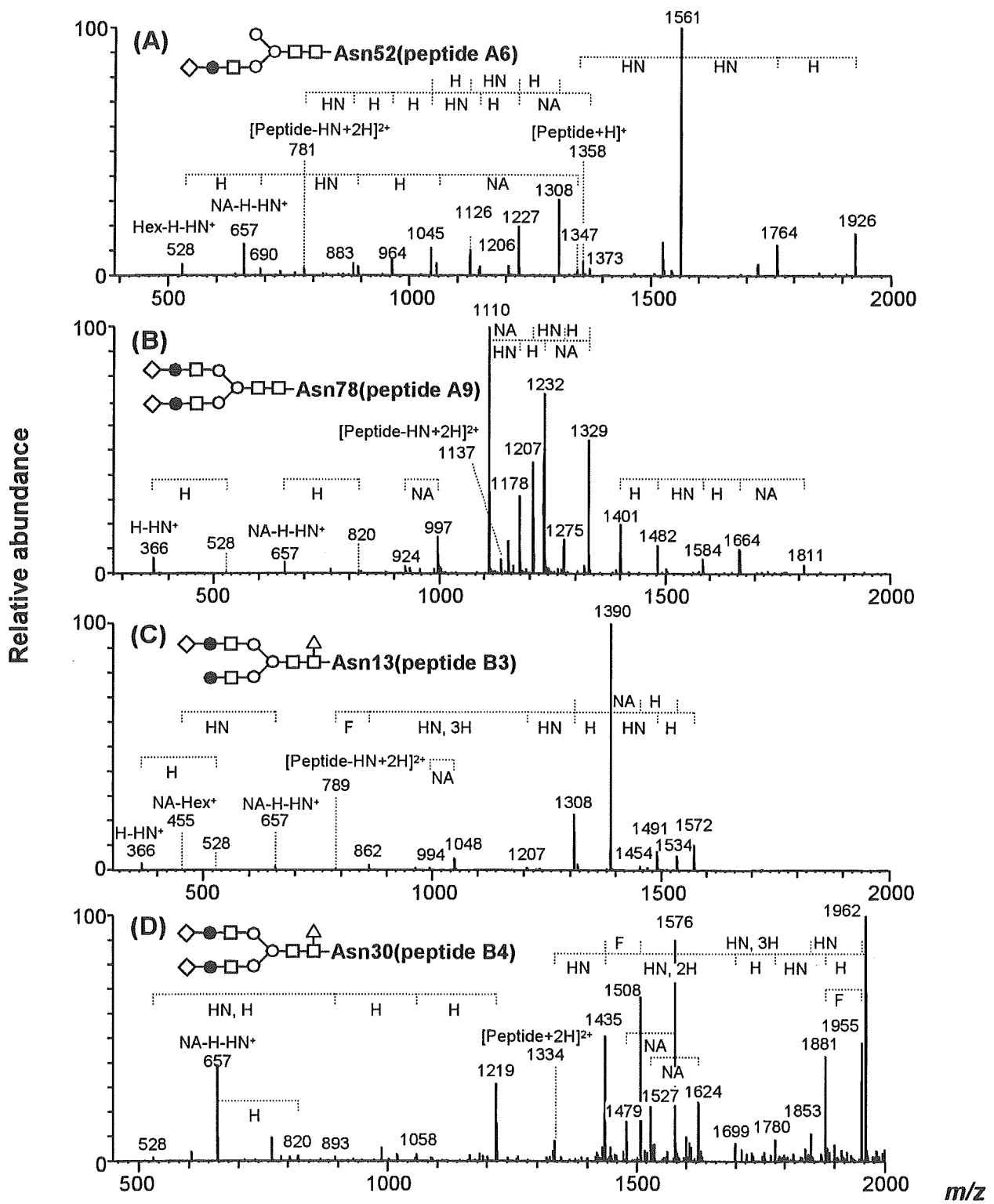


Fig. 3-1 主な糖ペプチドのMS²スペクトル

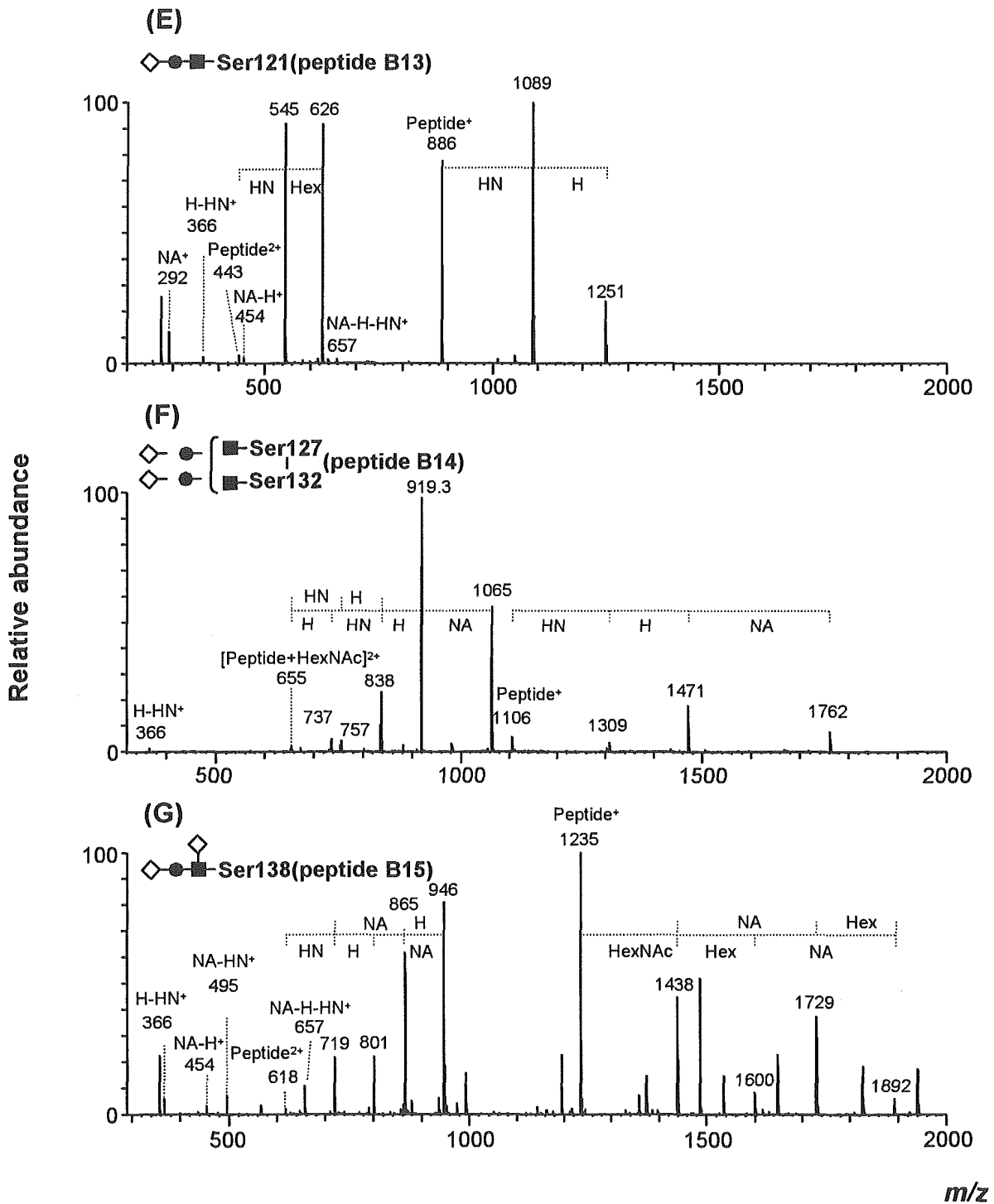


Fig. 3-2 主な糖ペプチドのMS²スペクトル

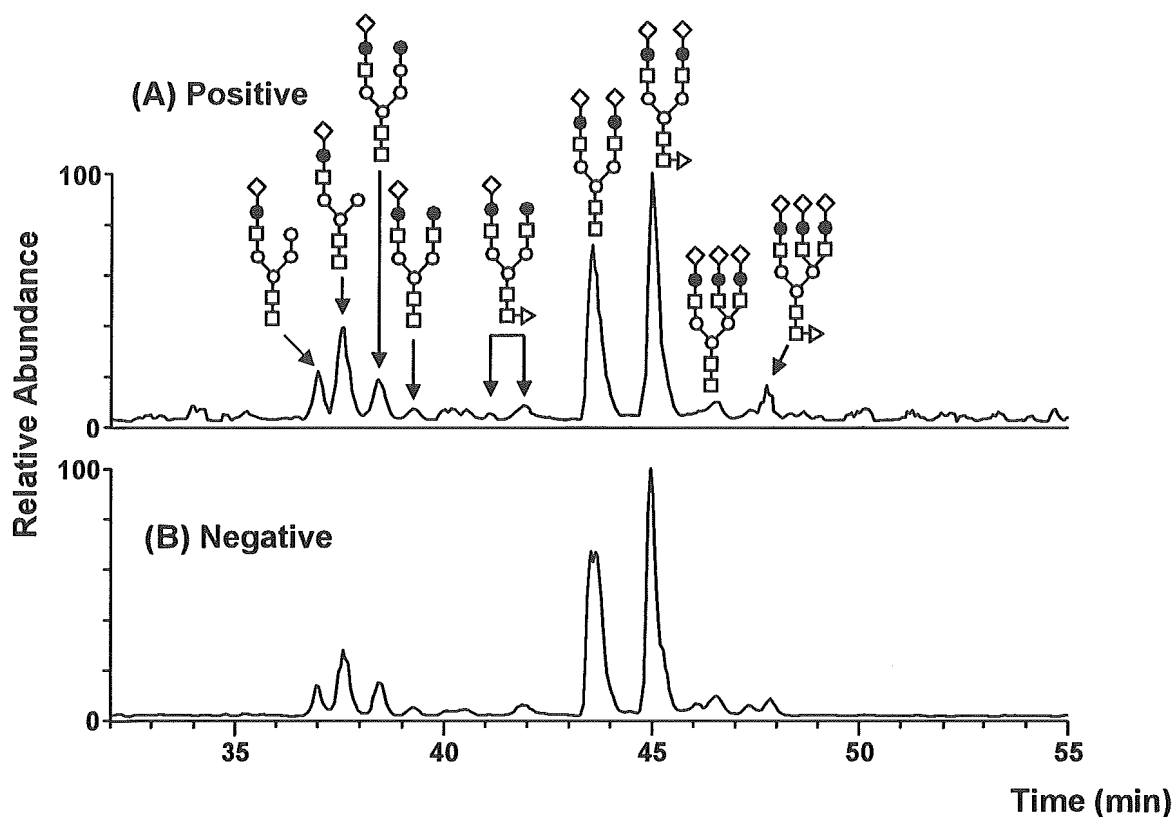


Fig. 4 LC/MSⁿによって得られたhCGの糖鎖プロファイル

Table 2 糖鎖プロファイリングの分析条件

Sample: Borohydride-reduced *N*-linked oligosaccharides from hCG (6 μ g)

LC:

Column: Hypercarb (0.2 x 150 mm, Thermo Electron)

Instrument: Paradigm MS4 (Michrom BioResources)

Eluent:

A, 5mM NH₄OAc, pH 9.6/ 2% CH₃CN

B, 5 mM NH₄OAc, pH 9.6/ 80% CH₃CN

Gradient: 5-40 % of B in 60 min

MS:

Instrument: LTQ (Thermo Electron)

Scan program:

MS¹: *m/z* 450-2000

Data-dependent MS²⁻⁴

Spray voltage: 1.8 kV

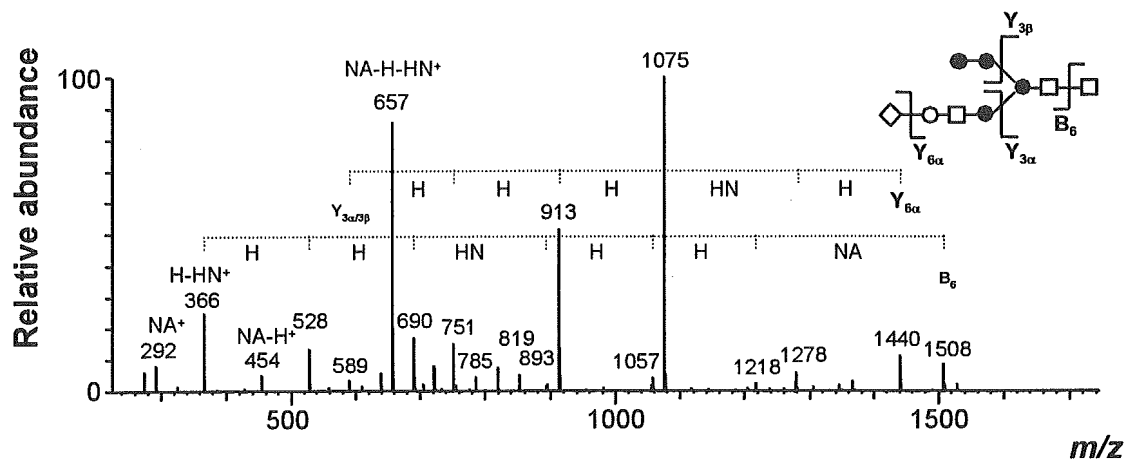


Fig. 5 糖鎖のMS²スペクトル