

- umbilical vein endothelial cells in serum-free culture, *Biologicals*, **35**, 247-254 (2007)
- 5) Yoshioka, S., Miyazaki, T., Aso, Y., Kawanishi, T.: Significance of Local Mobility in Aggregation of β -Galactosidase Lyophilized with Trehalose, Sucrose or Stachyose, *Pharm Res.*, **24**, 1660-1667 (2007)
- 6) Miyazaki, T., Yoshioka, S., Aso, Y., Kawanishi, T.: Crystallization rate of amorphous nifedipine analogues unrelated to the glass transition temperature, *Int J Pharm*, **336**, 191-195 (2007)
- 7) Aso, Y., Yoshioka, S., Miyazaki, T., Kawanishi, T., Tanaka, K., Kitamura, S., Takakura, A., Hayashi, T., Muranushi, N.: Miscibility of nifedipine and hydrophilic polymers as measured by (1)H-NMR spin-lattice relaxation, *Chem Pharm Bull.*, **55**, 1227-1231 (2007)
- 8) 川西徹: 平成17年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告—バイオ医薬品の日局収載環境の整備に関する研究— 医薬品研究, **38**, 381-390 (2007)
- 9) Yoshioka, S., Aso, Y., Osako, T., Kawanishi, T.: Wide-ranging molecular mobilities of water in active pharmaceutical ingredient (API) hydrates as determined by NMR relaxation times, *J Pharm Sci.*, **97**, 4258-4268 (2008)
- 10) Suzuki, T., Tamehiro, N., Sato, Y., Kobayashi, T., Ishii-Watabe, A., Shinozaki, Y., Nishimaki-Mogami, T., Hashimoto, T., Asakawa, Y., Inoue, K., Ohno, Y., Yamaguchi, T., Kawanishi, T.: The novel compounds that activate farnesoid X receptor: the diversity of their effects on gene expression, *J Pharmacol Sci.*, **107**, 285-94 (2008)
- 11) Kadoya, S., Izutsu, K., Yonemochi, E., Terada, K., Yomota, C., Kawanishi, T.: Glass-state amorphous salt solids formed by freeze-drying of amines and hydroxy carboxylic acids: effect of hydrogen-bonding and electrostatic interactions, *Chem Pharm Bull.*, **56**, 821-6 (2008)
- 12) Itoh, S., Hachisuka, A., Kawasaki, N., Hashii, N., Teshima, R., Hayakawa, T., Kawanishi, T., Yamaguchi, T.: Glycosylation analysis of IgLON family proteins in rat brain by liquid chromatography and multiple-stage mass spectrometry, *Biochemistry*, **47**, 10132-54 (2008)
- 13) Hashii, N., Kawasaki, N., Itoh, S., Nakajima, Y., Kawanishi, T., Yamaguchi, T.: Alteration of N-glycosylation in the kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus: relative quantification of N-glycans using an isotope-tagging method, *Immunology*, (in press)
- 14) Harazono, A., Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Matsuishi-Nakajima, Y., Kawanishi, T., Yamaguchi, T.: Simultaneous glycosylation analysis of human serum glycoproteins by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, **869**, 20-30 (2008)
- 15) 川西徹: 抗体医薬の現状と展望, 日薬理誌, **131**, 102-108 (2008)
- 16) 川西徹: 小児における抗サイトカイン薬の功罪 *Progress in Medicine* **28**, 1709-1713 (2008)
- 17) 川西徹: バイオ医薬品における規格接点・試験法の考え方, 分析法バリデーション実例集, pp409-418, 情報機構 (2008)
- 18) 川西徹: ICHガイドライン, 医薬品のグローバル化と GMP (浅越正監修), pp292-302 シーエムシー出版 (2008)
- 19) Izutsu, K., Kadoya, S., Yomota, C., Kawanishi, T., Yonemochi, E., Terada, K.: Freeze-drying of proteins in glass solids formed by basic amino acids and dicarboxylic acids, *Chem*

削除: 3

削除: 4

削除: 5

書式変更: フォント: 太字

削除: 9) 川西徹: 抗体医薬の現状と展望, 日薬理誌, **131**, 102-108 (2008)

削除: 10

削除: 6

削除: 7

削除: 11

削除: 8

削除: 9

削除: 2

削除: 20

Pharm Bull, 57, 43-48 (2009)

20) Aso, Y., Yoshioka, S., Miyazaki, T., Kawanishi, T.: Feasibility of $(19)\text{F}$ -NMR for Assessing the Molecular Mobility of Flufenamic Acid in Solid Dispersions, *Chem Pharm Bull.*, 57, 61-64 (2009)

2. 学会発表

なし

削除: 21

削除:

F. 参考資料

資料1, Q8 (R1): Pharmaceutical Development Revision 1, Step 2 document

生物薬品の特性・品質解析、品質評価法の開発に関する研究

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）

研究要旨 生物薬品の半数以上は糖タンパク質や多糖類などの糖鎖関連医薬品である。INN や JAN では、糖鎖構造の異なる医薬品は異なる名称で区別されている。しかし、糖鎖構造が異なる新規糖鎖関連医薬品やバイオ後続品・後発品の開発が活発化し、名称やその定義のあり方、及びいかに糖鎖部分の違いや類似性を評価するかが国際的重要課題になっている。本研究では、糖鎖構造の違いで区別されている医薬品の基原及び糖鎖構造に関する調査、糖鎖構造の違いで区別されている代表的糖タンパク質及び多糖類の糖鎖構造解析、並びに我が国におけるバイオ医薬品の本質記載、アミノ酸配列、糖鎖構造等、並びに分子式及び分子量の記載にあたって考慮すべき事項や要素に関する考察を行った。

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

原園 景 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部主任研究官

A. 研究目的

現在販売されている生物薬品の半数以上は、糖タンパク質や多糖類などの糖鎖関連医薬品である。これらは糖鎖構造が異なる分子の集合体であり（糖鎖不均一性）、各分子の比率は、由来組織・産生細胞や製造方法に依存する。糖鎖の不均一性の違いは製品の活性や体内動態等に影響を及ぼすことから、糖鎖構造の異なる医薬品は、異なる一般名称により区別されている。

医薬品の国際一般名 (international nonproprietary name, INN) は、世界保健機関 (WHO) の医薬品一般名称委員会 (INN 委員会) で審議され命名される。日本では、医薬品の一般的名称 (Japanese accepted name, JAN) は医薬品医療機器総合機構の医薬品名称専門協議 (JAN 専門協議) で審議され、厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知により公表される。INN や JAN では、アミノ酸配列が同じでも糖鎖部分異なる糖タンパク質性医薬品や、構成単糖や分子量分布の異なる多糖類には、異なる名称を与えるというルールがある。しかし、同一製造業者が製造方法を変更することによって生じた糖鎖の異なる医薬品、あるいは異なる

製造業者が製造した糖鎖の異なる医薬品（後続品/後発品）の名称や本質をどのように扱うか、また、糖鎖の同等性/同質性や類似性をいかに評価するかが国際的重要課題の一つとなっている。

そこで、本研究では、I. INN 及び JAN において糖鎖構造の違いによって区別されている品目の基原及び糖鎖構造に関する調査、及び II. 糖鎖構造の違いによって区別されている代表的糖タンパク質及び多糖類の糖鎖構造解析を行った。さらに、III. 我が国におけるバイオ医薬品の本質記載、アミノ酸配列、糖鎖構造等、並びに分子式及び分子量の記載にあたって考慮すべき事項や要素に関する考察、を行った。

B. 研究方法

1) 糖鎖構造の違いによって区別されている医薬品に関する調査

以下を参考にした。

- INTERNATIONAL NONPROPRIETARY NAMES (INN) FOR BIOLOGICAL AND BIOTECHNOLOGICAL SUBSTANCES (A REVIEW), INN Working Document 05.179, 08/11/2007, <http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRevforweb.pdf>
- pINN および rINN のリスト：
<http://www.who.int/druginformation/general/innlists.shtml>
- 日本医薬品一般名称データベース：

<http://moldb.nihs.go.jp/jan/Default.htm>

- 医療用医薬品の添付文書情報(医薬品医療機器総合機構) :
http://www.info.pmda.go.jp/info/pi_index.htm
- 医薬品一般名称辞典 JAN1996 (財)公定書協会(1996)
- FDA Drug information-Product approval : information-
<http://www.fda.gov/cder/drug/default.htm>
- 宮田直樹, 内田恵理子, 川崎ナナ: 薬の名前, ステムを知られば薬がわかる, 第1~28回, PHARM. TECH. JAPAN, vol.22 (2006)-vol.24 (2008)

2) 試薬

フォリトロピン アルファは市販のゴナールエフ(セローノ)を用いた。フォリトロピンベータは市販のフォリスチム(オレガノン)を用いた。

グルクロン酸(GlcA)は和光純薬より、ガラクトサミン(GalN)及びグルコサミン(GlcN)は生化学工業より、マンノサミン(ManN)はナカライテスクより、2,5-アンヒドロ-D-マンニトール(2,5anMan-ol), L-イズロン酸(IdoA)はトロントリサーケミカルより購入した。50%水酸化ナトリウム溶液及びトリフルオロ酢酸(TFA)は、和光純薬より購入した。

バルナパリンナトリウムはローヘパ注(味の素)及びミニヘパ注(伊藤ライフサイエンス), ダルテパリンナトリウムはダルテパリンナトリウム静注(メルク製薬)及びダルテパン静注(日医工), レビパリンナトリウムはクリバリン注(アボット ジャパン), 並びにエノキサパリンナトリウムはクレキササン皮下注キット(サノフィー・アベンティス)を購入して使用した。

その他の試薬は、入手できる高純度のものを用いた。

3) フォリトロピン アルファ及びベータ糖鎖の精製

ゴナールエフ注射液(凍結乾燥品)と、凍結乾燥したフォリスチム注射液を、電気泳動用サンプリングバッファーに溶解後、15%泳動ゲル(80×80×1 mm)を用いて、25 mM トリス塩酸塩, 0.19 M グリシン, 0.1% SDS を含む泳動用緩衝液中 20 mA で泳動させた。分離されたフォリトロピン アルファ及びベータは、Simply Blue™ SafeStain (Invitrogen) を用いて検出した。

SDS-PAGE ゲルよりフォリトロピン α 及び β サブユニットを含むバンドを切り取り、約 1 mm 角のゲル片にした後、30%アセトニトリルでゲル片を脱色した。さらにゲル片をアセトニトリルで脱水した後、アセトニトリルを除去し、減圧濃縮遠心エバポレーター (Speed Vac) を用いて、ゲル片を乾燥させた。乾燥ゲル片に 10 mM DTT を含む 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液 200 μl を加え、56°C で 1 時間反応させた後、室温に戻した。還元化溶液を除いた後、25 mM 重炭酸アンモニウム溶液を用いてゲル片を洗浄した。洗浄用溶液を除いた後、55 mM モノヨード酢酸ナトリウムを含む 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液 200 μl を加え、室温で遮光下 45 分間反応させた。反応後、アルキル化溶液を除いた後、水でゲル片を洗浄し、50%アセトニトリルを用いてゲル片を脱水し、Speed Vac を用いてゲル片を乾燥させた。さらにゲル片に PNGase F (Roche Diagnostics GmbH) 5 unit を含む 50 mM リン酸緩衝液, pH 7.2, 200 μl を加え、37°C で一晩消化した。消化後、水 300 μl を加え、30 分間断続的に超音波を照射し、糖鎖を含む抽出液を回収した。合計 3 回の抽出を行い、抽出液をすべて回収し、Speed Vac を用いて乾固した後、0.25 M NaBH₄, 200 μl を加え、室温で 2 時間反応させた。反応後、希釈した酢酸を用いて過剰の試薬を分解させ、Envi-Carb (Supelco) を用いて還元化糖鎖を精製した。

4) LC/MS によるフォリトロピン アルファ及びベータの糖鎖分析

HPLC :

装置 : NanoFrontier nLC (日立)

カラム : Hypercarb (0.075×150 mm, 5□ ThermoFisherScientific)

溶離液 A : 5 mM 酢酸アンモニウムを含む 2%アセトニトリル水溶液 (pH9.6)

溶離液 B : 5 mM 酢酸アンモニウムを含む 80%アセトニトリル水溶液 (pH9.6)

グラジエントプログラム :

B 液 : 5~50% (110 分)

流速 : 200 nl/min

MSⁿ :

装置 : Finnigan LTQ-FT (ThermoFisherScientific)

イオン源 : nanoESI

キャピラリー温度 : 300°C

キャピラリー電圧 : 1.8 kV

スキャン範囲 (m/z): 600-2,000
衝突エネルギー: 35%

測定方法:

- ① Full MS¹ scan
(positive ion mode, 分解能: 50000)
- ② Data-dependent MS²⁻⁴ (positive ion mode)
- ③ Full MS¹ scan
(negative ion mode, 分解能: 50000)
- ④ Data-dependent MS²⁻⁴ (negative ion mode)

5) 低分子量ヘパリンの酸加水分解

100 IU 相当量の各低分子量ヘパリンをアセトン沈殿したのち、沈殿物を 400 μ l の 2 N TFA, 2 N 塩酸又は 4 N 塩酸に溶解し, 100°C で, 指定した時間加熱した後, 遠心減圧乾燥した。メタノールを 100 μ l 加え, 遠心減圧乾燥した。水 400 μ l に溶解し, 水で適当に希釈し, 0.5 IU に相当する量を HPAEC-PAD に供した。

6) 低分子量ヘパリン酸加水分解物の HPAEC-PAD

HPAEC-PAD 装置は, ICS-3000 ion Chromatography system (Dionex Co.) を用いた。カラムは CarboPacTM PA1 (Dionex Co., 4 X 250 mm) をガードカラム (4 X 50 mm) と共に使用した。試料はループを用いて 75 μ l 注入し, 流速 1.0 ml/min で, 20 分間 16 mM NaOH を用いてイソクラティック溶出した後, 5 分かけて 100 mM NaOH へ変更し, その後 30 分間に酢酸ナトリウム濃度を 0 から 500 mM に直線的に上げるグラジエント条件で溶出させた。5 分間 500 mM の酢酸ナトリウムを含む 100 mM 水酸化ナトリウムでカラムを洗った後, 16 mM の水酸化ナトリウム溶液に戻し, 20 分間平衡化した後, 次の試料の測定を行った。

PAD の電圧の条件は, 1 サイクルを 0.5 秒とし, 0 から 0.4 秒まで 0.1 V とした後, 0.41 秒に -2 V とし, -0.42 秒まで -0.2 V とした後, 0.43 秒に 0.6 V と上げ, 0.44 秒に -0.1 V とし 0.5 秒まで -0.1 V とした。電圧は直線的に変化させた。0.2 秒から 0.4 秒の間の電流を積分し, 検出値とした。

7) ウロン酸の定量

カルバゾール硫酸法を用いた。

略語

Fuc, フコース; Gal, ガラクトース; Man, マンノース; 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; GlcA, グルクロン酸; g GalN, ガクトサミン; GlcN, グルコサミン; ManN, マンノサミン; 2,5-anhMan-ol, 2,5-アンヒドロ-D-マンニトール; IdoA, L-イズロン酸

(倫理面への配慮)

ヒト由来サンプル及び動物を使用していないので, 特に配慮していない。

C. 結果

1. INN 及び JAN において糖鎖構造の違いによって区別されている品目の基原及び糖鎖構造に関する調査

INN や JAN では, 糖タンパク質の糖鎖の違いをギリシャ文字を用いた 2 語式で区別している。例えば, エポエチン アルファはアルファグリコフォーム分布をもつエポエチンを, 同様に, エポエチン ベータはベータグリコフォーム分布を持つエポエチンを意味する。このような 2 語式で区別されている品目を調査した結果, INN には 6 種類収載されていることが分かった (表 1)。また, 多糖類では, 低分子量ヘパリンが, 糖鎖の違いによって明確に区別されていることが分かった。

1. Agalsidase

Agalsidase は 398 個のアミノ酸残基からなる糖タンパク質で, ヒト α ガラクトシダーゼ A と同一のアミノ酸配列をもつ。 α ガラクトシダーゼ A はライソゾーム内で糖脂質の分解に携わる酵素で, この酵素の遺伝的欠損は, スフィンゴ糖質代謝異常症であるファブリー病の原因になる。ファブリー病ではライソゾーム内にスフィンゴ糖脂質が蓄積し, 主に腎臓, 心臓, 自律神経系障害を呈する疾患である。INN 及び JAN には *Agalsidase Alfa* (アガルシダーゼ アルファ (遺伝子組換え)) と *Agalsidase Beta* (アガルシダーゼ ベータ (遺伝子組換え)) が収載されている。

Agalsidase Alfa はヒト線維肉腫細胞株由来の細胞株により産生される糖タンパク質である。*Agalsidase Beta* は CHO 細胞で産生される糖タンパク質で, ファブリー病治療薬として 2004 年に承認されている。両品目の産生細胞はヒトと CHO 細胞と異なるので, 糖鎖構造も大きく

異なることが予想される。

2. Antithrombin

Antithrombin は、ヒトアンチトロンビン III と同一のアミノ酸配列を持つ糖タンパク質で、トロンビンや第 Xa 因子を阻害する作用を有する。ヒトアンチトロンビン III は、432 個のアミノ酸残基からなり、分子内に 4 つの N-結合型糖鎖が結合するサイトがある。INN には同一アミノ酸に異なる糖鎖が結合している *Antithrombin III* と *Antithrombin Alfa* が収載されている。尚、いずれの品目も JAN 未収載である。

Antithrombin III は、血漿分画製剤(乾燥濃縮人アンチトロンビン III 製剤)として、先天性アンチトロンビン III 欠乏に基づく血栓形成傾向治療薬、及びアンチトロンビン III 低下を伴う汎発性血管内凝固症候群(DIC)治療薬として承認されている。

Antithrombin Alfa は、遺伝子組換えヤギ(トランスジェニックヤギ)で産生した糖タンパク質で、ヤギの乳中に分泌タンパク質として発現される。2006 年に欧州で先天的アンチトロンビン欠損症治療薬として認可され、現在米国ではフェーズ III 臨床試験中である。

ヤギ由来の *Antithrombin Alfa* とヒト血漿由来の *Antithrombin III* の糖鎖構造の違いは詳細に調べられている (Blood, 91, 4561-4571, 1998)。ヤギ由来 *Antithrombin Alfa* はヒト血漿由来 *Antithrombin III* に比べてシアル酸含量が低く、NeuAc に加えて N-グリコシルノイラミン酸が結合している。*Antithrombin III* はフコース結合量が高く、Gal が GalNAc に置換された糖鎖が結合している。また、*Antithrombin Alfa* の Asn155 には高マンノース型糖鎖が結合しているが、*Antithrombin III* には複合型糖鎖しか結合していない。Asn155 はアンチスロンビン III とヘパリンの親和性に大きな影響を与える部位であることから、糖鎖の違いは、両者のヘパリン親和性の違いに関係があるだろうと推定されている。

3. Epoetin

Epoetin は、ヒトエリスロポエチンと同一のアミノ酸配列を持つ糖タンパク質である。エリスロポエチンは、赤血球前駆細胞に作用して赤血球への分化と増殖を促す造血因子で、主として腎臓から分泌される。天然のヒトエリスロポエチンは、165 個のアミノ酸残基からなる分子量約 30,000 の糖タンパク質で、Asn24, 38, 及び 83 に N-結合型糖鎖、また Ser126 に O-結合型

糖鎖が結合している。糖鎖の非還元末端に結合しているシアル酸数が多いものほど、血中半減期が長く、高い生物活性を示す。*Epoetin* は主に透析施行中の腎性貧血治療薬として用いられているほか、未熟児貧血にも用いられる。

JAN には、アミノ酸配列は同一で、結合している糖鎖の分布が異なる *Epoetin Alfa* (*Genetical Recombination*) (エポエチン アルファ(遺伝子組換え))、*Epoetin Beta* (*Genetical Recombination*) (エポエチン ベータ(遺伝子組換え))、*Epoetin Gamma* (*Genetical Recombination*) (エポエチン ガンマ(遺伝子組換え)) 及び *Epoetin Epsilon* (*Genetical Recombination*) (エポエチン イプシロン(遺伝子組換え)) が収載されている。INN にはこれらの他、*Epoetin Delta*、*Epoetin Zeta*、*Epoetin Theta*、*Epoetin Iota*、及び *Epoetin Omega* が収載されている。

4. Follitropin

Follitropin は、ヒト卵胞刺激ホルモン(FSH)と同一のアミノ酸配列を持つヘテロダイマー型の糖タンパク質である。FSH は下垂体前葉から分泌される性腺刺激ホルモンで、女性では、卵巣に作用して卵胞成長、排卵、及びエストロゲン合成を促進させる。男性では、精巣セルトリ細胞に作用して精子形成を促す。ヒト FSH は 92 個のアミノ酸残基からなる α 鎖 1 分子、及び 111 個のアミノ酸残基からなる β 鎖 1 分子から構成される。 α 鎖及び β 鎖にそれぞれ 2 本の N-結合型糖鎖が結合しており、糖鎖は血中半減期に影響する。INN 及び JAN には糖鎖が異なる *Follitropin Alfa* (*Genetical recombination*) (ホリトロピン アルファ(遺伝子組換え)) と *Follitropin Beta* (*Genetical recombination*) (フォリトロピン ベータ(遺伝子組換え)) が収載されている。

Follitropin Alfa は、2006 年、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)との併用で、視床下部または下垂体前葉の機能及び器質的障害に由来する低ゴナドトロピン性男子性腺機能低下症患者を対象とした精子形成誘導薬として国内承認された。*Follitropin Beta* は、体外受精などの生殖補助技術を受ける患者を対象とした複数卵胞発育のための調節卵巣刺激に適応されている(2005 年国内承認)。*Follitropin Alfa* 及び *Beta* 共に CHO 細胞産生糖タンパク質であるが、糖鎖の違いは不明である。

5. Nasaruplase

Nasaruplase は、ヒトウロキナーゼの前駆体(プロウロキナーゼ)と同一のアミノ酸配列を持つ糖タンパク質である。プロウロキナーゼは、411個のアミノ酸残基からなる約54kDaの1本鎖糖タンパク質で、プラスミンやカリクレインによって2本鎖に切断されて活性型のウロキナーゼになる。INNには、*Nasaruplase* と *Nasaruplase Beta* が収載されている。

Nasaruplase は、ヒト腎臓に由来する2倍体細胞の培養により線維芽細胞をクローン化し、株化した細胞で産生される。急性心筋梗塞における冠動脈血栓の溶解を効能とした血栓溶解剤として承認されている。*Nasaruplase* と同一アミノ酸配列を持ち、糖鎖が異なる品目として、INNに *Nasaruplase Beta* が収載されている。これは、murine hybridoma cell で産生した遺伝子組換え糖タンパク質である。*Nasaruplase* の糖鎖がヒト型であるのに対して、*Nasaruplase Beta* はマウス型糖鎖を有する。*Nasaruplase* は、*Alfa* が収載されず、*Beta* が収載されている唯一の例である。

6. Urokinase

ウロキナーゼは尿に分泌される分子量約54,000(411アミノ酸残基)の酵素であり、20年以上前から血栓溶解の目的で臨床的に使用されてきた。尿中には二本鎖(活性型)の高分子型とそれが一部分解された低分子型が存在している。INNには、*Urokinase* 及び *Urokinase Alfa* が収載されている。

INN 及び JAN に収載されている *Urokinase* (ウロキナーゼ)は、「A plasminogen activator isolated from human sources」と定義されている。我が国で承認されている *Urokinase* は、ヒト尿から精製した高分子量ウロキナーゼ(分子量約54,000)で、急性心筋梗塞における冠動脈血栓の溶解剤として適応されている。これに対して米国で承認されている *Urokinase* は、尿由来ではなく、組織培養(新生児腎細胞由来)型のウロキナーゼで、分子量28,000~34,000の低分子量ウロキナーゼである。糖鎖部分だけでなく、ペプチド部分も異なるため、国内では *Urokinadse* (tissue culture)として区別することもあるが、このような名称をもつ *Urokinase* は INN にも JAN にも収載されていない。*Urokinase Alfa* は遺伝子組換え型糖タンパク質で、非ヒト哺乳動物由来細胞で産生された高分子量ウロキナーゼである。*Urokinase* と *Urokinase Alfa* はヒト由来と非ヒト細胞由来糖タンパク質であることから、糖鎖は大きく異なることが予想される。

7. 低分子量ヘパリン

ヘパリンは、ウロン酸(イズロン酸またはグルクロン酸)とグルコサミンが $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合した2糖繰り返し構造に平均2.5個の硫酸エステル基が結合した酸性ムコ多糖である。ヘパリンは、アンチトロンビンIIIと結合することによって、第Xa因子などの凝固因子を阻害し、血液凝固阻止作用を示すことから、血液透析その他の体外循環装置使用時の抗凝固剤として、世界各国で広く用いられている。低分子量ヘパリンは、ヘパリンを種々の方法により低分子化したものであり、ヘパリンに見られる第IIa因子(トロンビン)への結合性が低いことから、出血傾向の副作用が少ない抗凝固剤として利用されている。低分子量ヘパリンとして、国内では *Prnamarin Sodium* (パルナパリンナトリウム)、*Dalteparin Sodium* (ダルテパリンナトリウム)、*Reviparin Sodium* (レビパリンナトリウム)、及び *Enoxaparin Sodium* (エノキサパリンナトリウム)が承認されている。INNには他にも低分子量ヘパリンが収載されており、これらは還元末端及び非還元末端の構造や分子量分布が異なるものとして区別されている(表2)。

II. 糖鎖構造の違いによって区別されている代表的糖タンパク質及び多糖類の糖鎖構造解析

1. フォリトロピン アルファ及びベータ製剤の糖鎖プロファイルの比較

フォリトロピン アルファとベータはいずれもCHO細胞で産生された糖タンパク質で、両者の糖鎖構造の違いは明らかにされていない。そこで、市販のゴナールエフ注射液及びフォリスチム注射液を購入し、SDS-PAGEで添加剤等から目的物質を分離した後、LC/MSを用いて糖鎖プロファイルの比較を行った。

図1はSDS-PAGEの泳動図である。 α 鎖及び β 鎖のバンドをまとめて切り取り、それぞれのゲルにPNGase Fを作用させてN-結合型糖鎖を切り出した。LC上でアノマーが分離されるのを避けるため、還元末端を NaBH_4 で還元した後、グラファイトカーボンカラムを用いたLC/MSにより糖鎖プロファイリングを行った。

図2A及びBは、フォリトロピン アルファ及びベータに由来するN-結合型糖鎖のプロファイルである。上段はpositive ion測定で得られたプロファイル、また、下段はnegative ion測定で得られた糖鎖プロファイルである。フォ

リトロピン アルファ及びベータの糖鎖のプロファイルはよく似ていることが明らかになった。主な糖鎖の構造は、MS/MS スペクトルから、図 3 中に示すように推定された。その結果、フォリトロピン アルファ及びベータの主な糖鎖はいずれも、シアル酸が結合していない 2 本鎖コンプレックス型糖鎖であることが明らかになった。その他に、3 本鎖のコンプレックス型糖鎖や、N-結合型糖鎖のトリマンノシルコア構造に Fuc が結合した 2 本鎖及び 3 本鎖のコンプレックス型糖鎖が存在することが判った。また、シアル酸が 1 または 2 個結合した 2 本鎖のコンプレックス型糖鎖も存在しており、シアル酸が結合した糖鎖の割合は、フォリトロピン ベータよりもフォリトロピン アルファの方がやや高い傾向にあることが明らかになった。

2. 低分子量ヘパリンの構造特性の比較

低分子量ヘパリンは、欧州ではバイオ後続品として扱われており、EMA が定めるバイオ後続品評価ガイドライン対象医薬品である。これに対して日本では、低分子量ヘパリンは後発品として扱われており、複数の業者により製造された同一 JAN を持つ低分子量ヘパリンがすでに後発品として販売承認されている。低分子量ヘパリンは不均一性が高く、直接構造特性を明らかにすることが困難であることから、先行品と後続品/後発品における構造特性の類似性評価は重要である。また、2007 年秋に主に米国で発生したヘパリンナトリウムの有害事象に関連して、低分子量ヘパリンにおいても、構造的によく似たその他のムコ多糖類の混入を評価することの必要性が国際的にも議論されている。

そこで、同一 JAN を持つ低分子量ヘパリン間の類似性の確認、異なる JAN を持つ低分子量ヘパリンの識別、並びにその他のムコ多糖類の混入を調べることを目的として、酸加水分解により低分子量ヘパリンを単糖及びオリゴ糖とし、HPLC を行った後、クロマトグラムを比較した。酸加水分解物の HPLC として、糖を誘導体化することなく分離・検出できる高性能陰イオン交換クロマトグラフィー-パルス式電気化学検出法 (HPAEC-PAD) を用いた。低分子量ヘパリンとして、パルナパリン 2 製品、ダルテパリン 2 製品、レビパリン 1 製品及びエノキサパリンナトリウム 1 製品を分析した。

(1) 低分子量ヘパリンの酸加水分解条件の検

討

予め標準物質を用いて、HPAEC-PAD により GalN, ManN, GlcN, GlcA 及び IdoA はそれぞれ約 9.5, 10.5 分, 13 分, 38.5 分及び 41 分に溶出されることを確認した (図 4a)。つぎに、パルナパリン製品 1 を用いて、低分子量ヘパリンの加水分解条件を検討した。図 4b-d, 図 4e-g 及び図 4h-j は、それぞれパルナパリン製品 1 を 2 N TFA, 2 N HCl 及び 4 N HCl に溶解し、4, 8, 及び 12 時間 100°C で加熱して得られた分解物の HPAEC-PAD パターンである。いずれの加水分解条件でも GlcN に相当するピークは強く観測されたが、GlcA 及び IdoA に相当するピークはわずかししか観測されなかった。2 N TFA による加水分解では、加熱時間が長いほど GlcN のピークは大きくなる傾向があった (図 5a)。また、36 分から 38 分に GlcN, GlcA 及び IdoA 以外の複数のピークが観測され、もっとも目立つ 37.5 分のピークは、8 時間前後で最大になることがわかった。2 N HCl を用いた酸加水分解でも、GlcN のピーク面積は時間の経過とともに増加すること (図 5b)、また、36~38 分のピークは、8 時間で減少することが確認された。4 N HCl を用いた場合は、GlcN のピーク面積は 4 時間で最大になり、12 時間加熱しても変化がないこと、また、36~38 分に目立ったピークは検出されないことが確認された。さらに、2N 及び 4N HCl を用いた場合には、約 54 分頃に TNF を用いた場合には検出されないピークが溶出されることが分かった。

以上のように、2 N TFA を用いた場合、HCl を用いた場合と比べて多くのピークが比較的強く観測されること、及び 8~12 時間の加水分解により 37.5 分のピークが最大となることから、以後、低分子量ヘパリンを 2 N TFA に溶解し、100°C で 12 時間加熱する条件を用いることにした。別に単糖を 2 N TFA 中 100°C で 12 時間加熱しても、GalN 及び GlcN は分解しないこと、また、GlcA 及び IdoA の残存率はそれぞれ約 65 % 及び 55 % であることを確認した (図 5c)。

(2) 各種低分子量ヘパリン酸加水分解物の HPAEC-PAD パターン

各種低分子量ヘパリンを 2N TFA 中 100°C で 12 時間加熱して得られた分解物の HPAEC-PAD パターンを図 6 に示す。各低分子量ヘパリンとも、GlcN に相当するピーク及び 37.5 分のピークが強く観測された。

パルナパリン製品 1 及び 2 のパターンは類似

していたが、わずかな違いが認められた。即ち、パルナパリン製品 1 には、ManN の溶出位置 (10.5 分) に小さなピークが認められたが、製剤 2 ではほとんど認められなかった。また、パルナパリン製剤 2 では GalN に相当するピークが強く観測され、そのピーク面積はパルナパリン製剤 1 の約 3.7 倍であった。ManN は原料であるヘパリンナトリウムを製造する過程で、還元末端の GlcNAC が異性化したもの、また、GalN は、ヘパリンナトリウムの製造工程で製造工程由来不純物として混入したデルマトン硫酸エステル由来のものと考えられた。

ダルテパリン 2 製品はほぼ同一のパターンを示した。また、6 分、32.5 分前後及び 34 分前後に、パルナパリン及びエノキサパリンからは検出されないピークが検出された。6 分のピークは 2,5-anhMan-ol の溶出位置に相当していたことから (データ非表示)、還元末端の 2,5-anhMan-ol と推定された。34 分前後のピークは、2,5-anhMan-ol にウロン酸が結合した二糖と推定された (未確認)。

レビパリンからも、ダルテパリンと同様に 6 分、34 分前後及び 42.5 分に、それぞれ還元末端の 2,5-anhMan-ol、2,5-anhMan-ol にウロン酸が結合した二糖 (推定) 及び idoA に相当するピークが検出された。これらの 3 つのピークのピーク面積の GlcN のピーク面積に対する割合をダルテパリンと比較すると、いずれもダルテパリンよりも大きくなっていることが確認された。2NTFA を用いた加水分解条件では、末端側の糖が遊離される傾向があることから、レビパリンにおいて末端由来と考えられる 6 分、34 分前後及び 42.5 分のピークの比率が高くなっていたことは、レビパリンの平均分子量が (約 4,000) がダルテパリンの平均分子量 (約 5,000) よりも小さいことを反映していると考えられた。

エノキサパリンのクロマトグラムでは、他の低分子量ヘパリンの酸加水分解物に認められる 42.5 分の idoA に相当するピークは僅かしか認められなかった。これは、エノキサパリンの非還元末端の主要な構造が 4 位に二重結合が入った構造 (α -threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸 (Δ 4 不飽和ウロン酸)) であること、及びヘパリン鎖内部の idoA はほとんど遊離されないか、されても分化されてしまうことを示唆していると思われる (α -threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸の溶出位置は未確認)。また、10.5 分に ManN に相当するピークや、ほぼボイド容量の約 2 分に他の低分子量ヘパリンには

観測されていないピークが認められた。エノキサパリンには、還元末端に ManNAc や 1,6-アンヒドロ環構造を持つ分子が含まれていることが報告されており、これらのピークは、1,6-アンヒドロ環構造をもつ GlcN や ManN である可能性が示唆された。

カルバゾール硫酸法にて、グルクロン酸を標準として各低分子量ヘパリンのウロン酸を定量したところ、パルナパリン製品 1 及び 2、ダルテパリン製品 1 及び 2、レビパリン及びエノキサパリンの 1 IU 当たりのウロン酸の量は、それぞれ 4.7 μ g、5.0 μ g、3.5 μ g、3.5 μ g、4.3 μ g 及び 4.5 μ g であった。つぎに、酸加水分解後 HPAEC-PAD により得られた 2,5-anhMan-ol、GalN、ManN、GlcN、Gal、GlcA 及び IdoA 並びに、比較的強く観測された peak1-7 (図 6) のウロン酸 1 nmol 当たりのピーク面積比を求めたところ表 3 に示す値が得られた。相対標準偏差は、一部の強度の低いピークや分離が不十分なピーク (IdoA 等) を除き、10% 以内であった ($n = 3$)。パルナパリン製品 2 の GlcN のピーク比は、パルナパリン製品 1 よりも若干小さくなったが、これは GalN が混入していたからと考えられた。また、Peak7 のピーク面積は、パルナパリン製品 1 及び 2、ダルテパリン製品 1 及び 2 並びにレビパリンではほぼ同程度であり、還元末端の構造とは関係しないことが示唆された。

さらに、加水分解効率を調べる目的で、ピーク面積より GlcN を定量したところ、パルナパリン製品 1 及び 2、ダルテパリン製品 1 及び 2、レビパリン及びエノキサパリンのウロン酸 1 nmol 当たりの遊離 GlcN は、それぞれ 119, 105, 86, 84, 86 及び 94 pmol であった (データ非表示)。ウロン酸と GlcN が 1:1 で含まれていると仮定した場合、本酸加水分解条件により、全体の約 10% 程度の GlcN が遊離してきたことが分かった。

D. 考察

I. INN 及び JAN において糖鎖構造の違いによって区別されている品目の基原及び糖鎖構造に関する調査

INN には、アミノ酸配列が同一でグリコフォーム分布が異なる品目として、*Agalsidase*、*Antithrombin*、*Epoetin*、*Follitropin*、*Nasaruplase*、及び *Urokinase* が記載されていることがわかった。*Agalsidase*、*Epoetin*、及び *Follitropin* は、

収載時期が比較的最近で、早くから遺伝子組換え型が開発されていること、また、グリコフォームが異なる品目の開発時期が近いことから、INN 収載時に *Alfa* や *Beta* として区別されたものと推察される。これに対して、*Antithrombin*, *Nasaruplase*, *Urokinase* は、遺伝子組換え型が開発される以前にすでに医薬品として利用されていた品目が存在する糖タンパク質で、後に遺伝子組換え型が開発されたため、*Antithrombin Alfa*, *Nasaruplase Beta*, 及び *Urokinase Alfa* として区別されたものと思われる。現在、新規収載される遺伝子組換え型タンパク質性医薬品の多くは糖タンパク質であるが、最初に収載される品目に予め *Alfa* がつけられている例は *Darbepoetin Alfa* など二十数品目しかない。現在、糖鎖工学の発展に伴う糖鎖改変体などの開発が進んでおり、アルファが収載されていない品目に、ベータが命名される例が出てくるのが予想される。今後、糖タンパク質には予めアルファをつけるなどの工夫が必要になってくるかもしれない。

II. 糖鎖構造の違いによって区別されている代表的糖タンパク質及び多糖類の糖鎖構造解析

1. フォリトロピン アルファ及びベータの糖鎖プロファイルの比較

グリコフォーム分布の違いを解析する方法の一つとして、遊離糖鎖のプロファイリングが挙げられる。糖鎖プロファイリング法としてこれまで、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 を組み合わせた方法や、HPAEC-PAD が利用されてきた。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法を開発し、3種類のエポエチン原薬や、2種類の甲状腺刺激ホルモンの糖鎖プロファイリングに応用してきた。さらに最近、SDS-PAGE と nanoLC/MS を導入することによって、夾雑物を含む微量糖タンパク質の分析が可能となり、注射液等製剤への応用も可能となった。本研究では、その改良型糖鎖プロファイリング法を用いて、糖鎖分布の違いが明らかにされていない CHO 細胞由来のフォリトロピン アルファとベータの N-結合型糖鎖のプロファイルを比較した。その結果、シアル酸の結合に若干の違いはあるが、フォリトロピン アルファ及びベータの糖鎖構造はほぼ共通していることが明らかとなった。

分担研究者らは別の厚生労働科学研究事業（ヒトゲノム・再生医療等研究事業「細胞組織

利用医薬品の品質・安全性等の評価に関する基盤技術開発研究」主任研究者山口照英）において、細胞の培養条件を変更すると、アシアロ糖鎖部分を含めて、細胞の糖鎖プロファイルが大きく変わることを見出し報告している（平成18年度分担研究報告書）。これらの分析結果は、同一細胞由来糖タンパク質のグリコフォームを定義したり、同種細胞由来糖タンパク質のグリコフォームを区別したりすることの難しさを示唆しているものといえよう。

2. 低分子量ヘパリンの構造特性の比較

低分子量ヘパリンは、硫酸エステル化の位置と程度、及びウロン酸の種類などが異なる分子の混合物であり、直接構造を明らかにすることは困難である。従って、低分子量ヘパリンを後続品/後発品として開発するにあたって、先行品との構造特性の類似性を評価することが重要となる。本研究では、低分子量ヘパリンを酸加水分解産物とし、HPAEC-PAD によって得られたクロマトグラムのパターンを比較することにより、JAN の異なる低分子量ヘパリンの識別、及び同一 JAN を持つ低分子量ヘパリンの構造特性の類似性評価が可能かどうかを検討した。

糖鎖の加水分解法として一般的に用いられる TFA 及び HCl を用いた条件を検討したところ、いずれの酸加水分解条件でも、GlcN のピークは観測されたが、ウロン酸 (GlcA 及び IdoA) のピークはわずかししか観測されなかった。これは、ヘパリン類のウロン酸は、負電荷と(脱硫酸化又は脱アセチル化後の)グルコサミンの正電荷の相互作用により酸加水分解に対して安定化されること、及び酸性溶液中で脱炭酸を起こしたり、ラクトン環を形成したりすることが原因と考えられた。それでも、2 N TFA 中 100°C で 8~12 時間加水分解する条件によって、ある程度の単糖やオリゴ糖を検出することができたこと、また、比較的多くのピークが得られたことから、本研究では、TFA による酸加水分解を選択した。

パルナパリン、ダルテパリン、レビパリン及びエノキサパリンの酸加水物の HPAEC-PAD パターンを比較したところ、それぞれ末端構造や平均分子量に応じた特徴的なパターンを示すことが明らかになった。また、同一 JAN を持つ低分子量ヘパリンの HPAEC-PAD パターンは類似していることも確認された。HPAEC-PAD は、酸加水分解で得た糖を誘導体化することなく高感度で検出できること、また、

操作が簡便であることから、先行品と後続品/後発品の類似性評価に利用可能と思われる。

低分子量ヘパリンの原料であるヘパリンは、ブタ小腸より精製されるが、製造工程由来不純物として、デルマタン硫酸エステルが混入することが知られている。また、2007年秋～2008年春、主に米国において、ヘパリンナトリウムを使用した患者に、ヘパリンナトリウムに混入された高度に硫酸エステル化されたコンドロイチン硫酸エステル(OSCS)による有害事象が発生した際、低分子量ヘパリン製剤にもOSCSが混入されていることが国際的な問題となった。デルマタン硫酸エステルもOSCSも、ヘパリンには含まれないGalNAcを構成成分とすることから、日局を含む各国関係機関では、ヘパリン純度試験法としての単糖分析に高い関心を持っている。本研究で得られた結果は、単糖分析がヘパリンや低分子量ヘパリンの純度試験法として利用できることを示唆するものであり、加水分解条件検討の結果等は、今後の日局各条ヘパリンナトリウム等の純度試験法整備に応用できるものと期待される。

III. 我が国におけるバイオ医薬品の本質記載、アミノ酸配列、糖鎖構造等、並びに分子式及び分子量の記載にあたって考慮すべき事項や要素

糖鎖構造の違いにより名称が異なる医薬品の調査研究及び糖鎖部分の解析によって、命名と定義づけの難しさが明らかになった。しかし、そうであっても、名称、本質記載、アミノ酸配列、糖鎖構造、並びに分子式及び分子量は、医薬品の定義に係わる重要な事項であり、また、医療用医薬品の添付文書やインタビューフォーム等を通じて公表されることも多いので、正確に分かりやすい表現で提供されるべきである。日本では、医薬品の一般的名称(Japanese accepted name, JAN)は医薬品医療機器総合機構の医薬品名称専門協議(JAN専門協議)で審議され、厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知により公表される。JAN申請もしくは届出者は、平成18年3月31日付薬食発第0331001号厚生労働省医薬食品局長通知及び平成18年3月31日付薬食審査発第0331001号厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知に示されている医薬品の一般的名称の取り扱いに関する事務手続き等に従って、申請書もしくは届出書に必要事項を記入し、厚生労働省医薬食品局長宛提出する。申請書及び届出書の作成方法は、それぞれ平成18年3月31日の薬食審査発第

0331003号中の【別添2医薬品一般的名称命名申請書作成上の注意】及び【別添3医薬品一般的名称届出書(INN収載品目)作成上の注意】に示されており、申請/届出品目の名称、化学名又は本質記載、化学構造式又はアミノ酸配列等、CAS登録番号、薬理作用を記載することとされている。

バイオテクノロジー応用医薬品(バイオ医薬品)の本質及びアミノ酸配列等の記載方法に対する基本的方針は、平成3年5月2日付薬新薬第23号厚生省薬務局新医薬品課長通知で示され、それ以来記載方法に大きな変更はなかった。その一方で、バイオ医薬の開発は急速に進歩し、多種多様な製品開発が行われるようになってきた。特に最近では、改変型、断片型、修飾型、融合型、あるいはそれらの複合型など複雑な構造特性を有するバイオ医薬品の開発が進み、天然型ペプチドやタンパク質、あるいは一部の改変を想定して作成された当時の記載方法では構造特性を表現することが難しくなってきた。また、当時は糖鎖構造解析技術が現在のように進歩しておらず、糖鎖の記載方法については触れられていない。このような科学進歩や製品開発の多様化に対応できるようにするためには、バイオ医薬品の本質及びアミノ酸配列、及び糖鎖構造等記載方法の充実化を図る必要があると考えられる。また、JANの本質記載やアミノ酸配列等、並びに分子式及び分子量の記載方法は、日本薬局方(日局)における基原、アミノ酸配列等、並びに分子式及び分子量の記載方法といくつかの点で異なっており、今後、JANから日局へ移行されるバイオ医薬品が増えることを考えると、日局の記載方法との整合性を考慮することが重要かと思われる。そこで、INN、米国及びEUにおける本質、アミノ酸配列等、糖鎖構造、並びに分子式及び分子量の記載方法を調査することによって、我が国におけるバイオ医薬品の本質記載、アミノ酸配列、糖鎖構造等、並びに分子式及び分子量の記載にあたって考慮すべき事項や要素について考察した。

1. 本質記載

- (1) 本文には、由来及び構造情報を記載し、製造方法の詳細や遺伝子情報の記載は最小限に留める

本文には、ペプチド/タンパク質等の由来や構造情報を記載し、有効性・安全性等に特に影響がない限り、製造方法や遺伝子情報に関する記載は最小限に留めてよいと考える。例えば、

最終産物に含まれないシグナルペプチドや、mRNA の由来組織は本質記載に記す必要はない。また、DNA の種類 (例えば合成 DNA、ゲノム DNA、または cDNA 等) に関する記載は今後省略してよいだろう。

- (2) 本文は、「●は、・・・」で始める。ここで●は、該当品目の JAN を意味する

これまで JAN の本質は、「ヒト肝細胞の mRNA に由来するヒト xxxxx cDNA の発現により、チャイニーズハムスター卵巣細胞で産生される一個のアミノ酸残基 (C H N O S ;分子量:--,---) からなる糖たん白質 (分子量:約--,000)」のように、「・・・からなるたん白質」や「・・・からなるペプチド」で終わる 1 文で記載するのが一般的であった。しかし、最近では、改変型、断片型、修飾型、融合型、もしくはそれらを組み合わせた複雑な構造特性を有するバイオ医薬品が開発されるようになり、従来の記載方法で構造特性を表現することが難しくなっている。一方、第 16 改正日局原案作成要領において基原の書きだしは「本品は・・・」とするとされており、基原、構造、活性、及び含量等を含む多くの情報を複数の文に分けて記載することが可能になっている。そこで、JAN の本質記載においても、日局の基原の記載方法に準じ、「●は、・・・(●は、該当品目の JAN を意味する)」で書きだすこととし、必要に応じて本質記載を複数の文に分けてもよいこととするのが適切と考えられる。以下に、具体的な記載方法を示す。

- (3) 本文には、1) 基原 ①製造方法 (抽出、合成、又は遺伝子組換え等)、②由来、及び型 (天然型、類縁型、又は融合型等)、③改変、断片、修飾、及び/又は融合等の内容; 2) 基材 (産生細胞); 3) 構造 (アミノ酸残基数、サブユニット数、及び分子量 (不均一性が高い場合)) を記す

1) 基原

① 製造方法

従来通り、申請/届出品目が天然から抽出したもので、合成品、もしくは遺伝子組換え技術によって製造したものであることを明らかにする。細胞・組織から抽出した場合は、「ヒトリンパ芽球で産生される」あるいは「ヒト尿に由来する」のように細胞の種類や由来組織等が明確になるように記載する。合成型、及び遺伝子組換え型の場合は、それぞれ「合成」及び「遺

伝子組換え」と記載し、さらに②及び③に示すような構造情報を記載する。表 1 の①に製造方法の記載例を示す。

② 由来、及び型

合成または遺伝子組換え型の場合は、ペプチド/タンパク質等の由来と型を明らかにする。ここで型とは、天然型、類縁型、及び融合型を意味する。天然型とは、天然に存在するペプチド/タンパク質等と同一のアミノ酸配列を有し、改変や修飾が施されていないものを指す。類縁型とは、ある一つのペプチド/タンパク質のアミノ酸配列の一部を改変したもの、断片に相当するもの、あるいは修飾したものを指す。融合型とは、2 つ以上のペプチド・タンパク質の全体もしくは一部分から構成されているものを指す。表 1 の②に由来及び型の記載例を示す。

a. 天然型

天然型の場合は、「ヒト成長ホルモンで」、または「組織プラスミノゲンアクチベータで」のようにペプチド/タンパク質等の由来を明らかにする。多型が知られている場合は、「□の多型の主要なバリエーションの一つで」のように記載する。また、第 VIII 因子やインターフェロンのように複数のアイソフォームが存在する場合は、「△の主要なアイソフォームで」、あるいは「△のアイソフォームの一つで」のように記載するのが望ましい。

b. 類縁型

類縁型の場合は、「ヒト成長ホルモンの類縁体で」、または「ヒト組織プラスミノゲンアクチベータの類縁体で」のように、何の類縁体であるかを明らかにする。さらに下の③に示すように、改変・修飾あるいは断片化等の内容について説明する。

c. 融合型

融合型の場合は、「ヒト IgG1 の Fc ドメインとヒト受容体からなる融合タンパク質」のように、構成している成分を明確にする。モノクローナル抗体の場合は、抗体の型がわかるように「ヒト化モノクローナル抗体」や「キメラモノクローナル抗体」のように記載する。

③ 置換、断片、修飾、及び/又は構成成分等の説明

類縁型の場合は、以下の a~c に示すように、置換したアミノ酸、相当するアミノ酸の位置、

あるいは修飾方法等について説明する。また、融合タンパク質の場合は、以下のdに示すように、構成ペプチド/タンパク質について説明する。尚、一部の分子にのみ生じた意図しない修飾で、有効性・安全性等に特に影響しない場合は、本質記載に記載する必要はない(2. アミノ酸配列、糖鎖構造、及びその他の修飾等を参照)。(例 N末端のプログルタミン酸形成、C末端のプロセッシング)。表1の③に置換、断片、修飾、及び又は融合に関する説明の例を示す。

a. 置換

アミノ酸残基の一部が置換されたペプチド/タンパク質の場合は、置換された位置と置換後のアミノ酸残基がわかるように、「A鎖の5番目のAsnがSerに、B鎖の8番目のThrがProに置換されている」もしくは「Fcドメインの300、305及び310番目のアミノ酸残基がSerに置換されている」のように記載する。

b. 断片

あるペプチドやタンパク質の一部分からなるペプチド/タンパク質の場合は、「ヒト成長ホルモンの101~191番目のアミノ酸残基に相当する」、「組織プラスミノゲンアクチベータのクリングル2ドメイン及びセリンプロテアーゼドメインからなる」、もしくは「 $\alpha\alpha$ 抗体のFab断片からなる」のように、そのペプチド・タンパク質が元のペプチド/タンパク質のどの部分に相当するかを記載する。

c. 修飾

脂質、合成化合物、PEG、あるいは改変糖鎖等が共有結合しているペプチド/タンパク質の場合は、修飾物質の種類(化学名、分子式及び分子量等)、結合数、主な結合位置、並びに結合方法等を記載する。例えば、「平均2本のメトキシポリエチレングリコール(平均分子量5,000)が共有結合している(主な結合部位:Lys5, Lys15)」、「20番目のLysにパルミチン酸が結合している」、もしくは「H鎖のAsn305にフコース非結合糖鎖が結合している」のように記載する。

d. 融合

2つ以上のペプチド/タンパク質の全体もしくは一部が融合した形で構成されるペプチド/タンパク質の場合は、各ペプチド/タンパク質の由来と、それぞれが最終産物のどの部分に相当するかを説明する。例えば、ヒト化モノクロー

ナル抗体、及びFcドメインと受容体の一部からなる融合タンパク質の場合は、それぞれ「マウス抗ヒトCD Δ 抗体の相補性決定部、並びに \square 鎖を含むヒトIgG1のフレームワーク部及び定常部からなる」、及び「1~133番目はヒトCD28の細胞外領域、また134~356番目はヒトIgG1のFc領域からなる」のように記載する。

2) 基材

従来通り、糖タンパク質の場合は、「チャイニーズハムスター卵巣細胞により産生される」、「 Δ 酵母により産生される」、「マウスミエローマ(NS0)細胞により産生される」のように細胞の種類を記載する。尚、産生細胞のサブラインは記載する必要はない。また、ペプチドやタンパク質の場合は原則として細胞を記載しない。表1の④に記載例を示す。

3) 構造

構造情報として、従来通り、アミノ酸残基数、鎖数及びサブユニットの数を記載する。モノマーの場合は、「 --- 個のアミノ酸残基からなるタンパク質」、ホモダイマーの場合は、「 --- 個のアミノ酸残基からなるサブユニット2分子から構成されるタンパク質」、また、ヘテロダイマーの場合は、「 --- 個のアミノ酸残基からなるA鎖及び --- 個のアミノ酸残基からなるB鎖から構成されるタンパク質」のように記載する。抗体の場合は、「 --- 個のアミノ酸残基からなるL鎖2分子及び --- 個のアミノ酸残基からなるH鎖2分子から構成される糖タンパク質」と記載する。

分子量が均一なペプチド、タンパク質(修飾ペプチド、修飾タンパク質、糖ペプチド、及び糖タンパク質を含む)の分子式及び分子量は、分子式及び分子量欄に記載し、本質記載には記載しないこととする(3. 分子式及び分子量参照)。分子量が不均一なペプチド、タンパク質(例:糖ペプチド、糖タンパク質、修飾ペプチド、及び修飾タンパク質等)の場合は、分子全体の分子量を適正に反映する方法、例えば、理化学分析(質量分析法、超速心分析法、電気泳動法、サイズ排除クロマトグラフィー等)による測定値、あるいは、アミノ酸部分の理論分子量に修飾部分の化学分析等による分子量測定値を加えた値を、「約35,000」のように記載すればよい(百位以下の桁は四捨五入)。分子量の根拠は、理化学的研究に関する資料の中で説明する。尚、測定値と理論的な値に大きな差があ

るときは、測定方法を記載することが望ましい。
表1の⑤に記載例を示す

2. アミノ酸配列、糖鎖構造、及びその他の修飾等

(1) アミノ酸配列及び翻訳後修飾の位置

第16改正日局原案作成要領に準じ、概ね20アミノ酸残基以下のペプチドは3文字で表記する。また、概ね21アミノ酸残基を超えるペプチド・糖ペプチドは1文字で表記し、50残基で改行する。

意図せず生じた翻訳後修飾等は、本質記載ではなく、脚注に翻訳後修飾されているアミノ酸残基と翻訳後修飾の種類を記載することとする。対象となる主な翻訳後修飾として、N末のアセチル化やピログルタミン酸形成、C末のプロセッシング、糖鎖付加などが挙げられる。また、一部の分子にのみ生じた修飾は「Gln1:ピログルタミン酸形成(部分的)」や「N100:糖鎖付加(部分的)」のように記載する。

(2) ジスルフィド結合

ポリペプチド鎖内ジスルフィド結合は、システイン残基を「C-C」を用いてなるべく線同士が交差しないように結ぶ。ポリペプチド鎖間ジスルフィド結合は、「A鎖 Cys10-B鎖 Cys15」や「C300:ポリペプチド鎖間ジスルフィド結合」のように記載する。

(3) 糖鎖構造

糖鎖は、代表的な数個の糖鎖の構造を結合位置ごとに記載するのが望ましい。糖鎖の有無や糖鎖構造が活性等に影響しない場合は、結合の割合が多い数個の糖鎖を記載すればよい。また、糖鎖の構造が活性等に影響する場合は、結合数の多い糖鎖を数個と活性等に寄与する代表的糖鎖構造を数個記載する。部位ごとの糖鎖構造が明らかでない場合はまとめて記載してよいものとする。

(4) その他の翻訳後修飾

脂質、合成化合物、またはPEG等が結合している場合は、その構造及びペプチド/タンパク質への結合方法がわかるように記載する。

3. 分子式及び分子量

(1) 対象

1) 均一なペプチド/タンパク質

均一なペプチド/タンパク質(分子量及び分子式が均一なペプチド及びタンパク質の場合は、分子式及び分子量欄に分子式及び分子量を記載する。修飾ペプチド、修飾タンパク質、糖ペプチド、もしくは糖タンパク質等で、修飾の種類及び結合数が均一な場合は、修飾もしくは糖鎖付加された分子の分子式及び分子量を記載する(例 N末のアセチル化、C末のアミド化、アシル基付加など)。意図せず生じた部分的修飾は、修飾されていないものとして計算する(例 N末の部分的ピログルタミン酸形成、C末の部分的プロセッシングな

2) 不均一なペプチド/タンパク質

糖ペプチド、糖タンパク質、修飾ペプチド、あるいは修飾タンパク質(例 PEG化タンパク質)等で、分子式及び分子量が不均一な場合は、日局に準じ、ペプチドもしくはタンパク質部分の分子式及び分子量を記載する。単純タンパク質であっても、分子式及び分子量が不均一な場合は、分子式及び分子量記載欄に分子式及び分子量を記載する必要はない(例 インターフェロナルファ, 第VIII因子等

(2) 計算方法

分子量は、最新の原子量表を使って分子式から理論分子量を計算した後、小数点以下3桁目で四捨五入して計算する。

N末端、C末端、及び側鎖は非解離状態で計算する。

分子全体の分子式は、ジスルフィド結合をS-Sとして計算する。サブユニットの分子式は、ポリペプチド鎖内ジスルフィド結合をS-Sとして計算し、ポリペプチド鎖間ジスルフィド結合をSH(還元型)として計算する。

4. 記載例

(1) 置換型合成ペプチドの例 (表4における分類: ①b, ②b, ③a, ④a, ⑤a)

オキシトシンの8番目のLeu残基がLysに置換された合成ペプチドの場合、本質記載は以下になる。アミノ酸配列は3文字で表記し、C末端のアミド結合とジスルフィド結合を記載する。分子量及び分子式はアミド結合及びジ

スルフィド結合したものとして計算する。

本質記載：

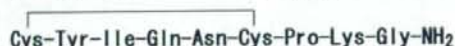
[英名]

- is a synthetic human oxytocin analog in which Leu at position 8 is substituted by Lys.
- is a peptide consisting of 9 amino acid residues.

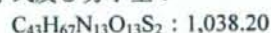
[日本名]

- は、合成ヒトオキシトシン類縁体で、8番目の Leu が Lys に置換されている。●は、9個のアミノ酸残基からなるペプチドである。

アミノ酸配列及びジスルフィド結合：



分子式及び分子量：



(2) 断片型遺伝子組換えペプチドの例 (①c, ②b, ③b, ④a, ⑤a)

ヒト成長ホルモンの101番目から191番目のアミノ酸配列と同じ配列をもつ遺伝子組換えペプチドの場合、本質記載及びアミノ酸配列は以下の通りとなる。アミノ酸配列は1文字で表記する。

本質記載：

[英名]

- is a recombinant human growth hormone analog which corresponds to amino acids 101 - 191 of human growth hormone. ● is a peptide consisting of 91 amino acid residues.

[日本名]

- は、遺伝子組換えヒト成長ホルモンの類縁体で、ヒト成長ホルモンの101～191番目のアミノ酸に相当する。●は、91個のアミノ酸残基からなるペプチドである。

アミノ酸配列及びジスルフィド結合：

分子式及び分子量：



(3)断片型・置換型・修飾型遺伝子組換えタンパク質(均一)の例 (①c, ②b, ③a, b及びc, ④a, ⑤a)

ヒト成長ホルモンの51～191番目のアミノ酸配列と同じ配列を持つ遺伝子組換えタンパク質で、N末端側から90番目のアミノ酸残基がSerに置換され、20番目のLys残基にミリスチン酸が結合している場合、本質記載は以下のようになる。アミノ酸配列等には、一次構造及びジスルフィド結合に加えて、ミリスチン酸の結合位置及び構造を記載する。この類縁体の分子式及び分子量は均一なので、分子式及び分子式はミリスチン酸が結合しているものとして計算する。

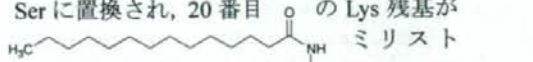
本質記載：

[英名]

- is a recombinant human growth hormone analog corresponding to amino acids 51-191 of human growth hormone, whose Lys at position 90 is substituted by Ser, and whose Lys at position 20 is myristoylated. ● is a modified protein consisting of 141 amino acid residues.

[日本名]

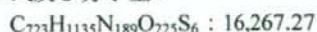
- は、遺伝子組換えヒト成長ホルモンの類縁体で、ヒト成長ホルモンの51～191番目のアミノ酸に相当し、90番目のLys残基がSerに置換され、20番目のLys残基が



イル化され
ている。●は、
141個のアミノ酸残基からなる修飾タンパク質である

アミノ酸配列、ジスルフィド結合、及び修飾

分子式及び分子量：



(4) 変型・修飾(PEG化)型遺伝子組換え

2 本鎖ペプチド (不均一) の例 (①c, ②b, ③a 及び c, ④a, ⑤b)

インスリンをモデルに、PEG 化されたペプチド/タンパク質の記載方法を考える。インスリンは A 鎖及び B 鎖からなる 2 本鎖ペプチド

である。モ
 GASDSNV YDLLKLEEG IQTLMGRLED GSPRTGQIFK QTYSKFDTNS
 DALLKNY GLLYCFRQDM DKVETFLRIV QCRSVEGSCG F
 デルペプチドの A 鎖 10 番目及び B 鎖

15 番目のアミノ酸残基は Lys に置換され、平均 2~3 個の PEG が共有結合している。PEG 化予想部位は A 鎖の N 末端 Gly と 10 番目の Lys, 並びに B 鎖の N 末端の Phe と 15 及び 29 番目の Lys である。この PEG 化インスリンの本質記載は以下ようになる。この分子は不均一であるので、本質記載に分子量を約〇〇と記載する。また、分子量に幅がある場合は、〇~〇のように幅記載してもよいものとする。分子式及び分子量欄には、ペプチド部分全体、及び A 鎖と B 鎖のペプチド部分の分子式及び分子量を記載する。A 鎖の分子式及び分子量は、鎖内ジスルフィド結合は S-S として、また鎖間ジスルフィド結合は還元型 (SH) として計算する。ペプチド部分全体は、すべてジスルフィド結合しているものとして計算する。アミノ酸配列、PEG 化部位及び PEG の構造を記載する。

本質記載:

[英名]

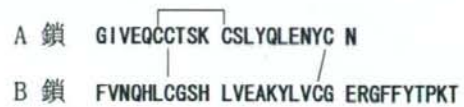
● is a recombinant human insulin analog in which Ile10 in the A-chain and Leu15 in the B-chain are substituted by Lys, and to which an average of 2 to 3 polyethylene glycol polymers (molecular weight: ca. 5,000) are covalently bound (probable attachment sites: A-chain: Gly1, Lys10; B-chain: Phe1, Lys15, Lys29). ● is a pegylated peptide (molecular weight: ca. 15,000 - 20,000) whose peptide moiety is composed of a A-chain consisting of 21 amino acid residues and a B-chain consisting of 30 amino acid residues.

[日本名]

●は、遺伝子組換えヒトインスリンの類縁体で、A 鎖 Ile10 及び B 鎖 Leu15 が Lys に置換され、平均して 2~3 個のポリエチレングリコール (平均分子量: 約 5,000) が結合している (主な結合位置: A 鎖 Gly1, Lys10; B 鎖 Phe1, Lys15, Lys29)。●は、21 個のアミノ酸残基からなる A 鎖及び 30 個のアミノ酸残基からなる B 鎖から構成される PEG 化ペプチド (分子量: 約 15,000

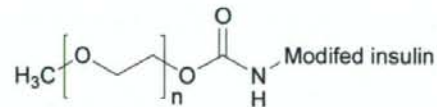
~20,000) である。

アミノ酸配列及びジスルフィド結合



A 鎖 G1, A 鎖 K10, B 鎖 F1, B 鎖 K15, B 鎖 K29: PEG 化部位

PEG 結合



分子式及び分子量:

C₂₅₇H₃₈₅N₆₇O₇₇S₆: 5,837.60 (ペプチド部分)
 A 鎖 C₉₉H₁₅₄N₂₆O₃₅S₄: 2,396.70
 B 鎖 C₁₅₈H₂₃₅N₄₁O₄₂S₂: 3,444.94

(5) 遺伝子組換え糖タンパク質の例 (①c, ②a, ④b, ⑤a)

インターフェロンガンマの 2 箇所に高マンノース型糖鎖と複合型糖鎖が結合している場合、本質記載には産生細胞と分子量を記載する。分子量及び分子式欄には、ペプチド部分の分子式及び分子量を記載する。また、一次構造の脚注に糖鎖結合部位を示し、別に部位毎の主な糖鎖構造を示す。

本質記載:

[英名]

● is a recombinant human interferon gamma, which is produced in Chinese hamster ovary cells. ● is a glycoprotein (molecular weight: ca.21,000) consisting of 146 amino acid residues.

[日本名]

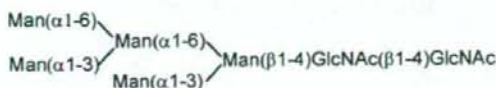
●は、遺伝子組換えヒトインターフェロンガンマで、チャイニーズハムスター卵巣細胞から産生される。●は、146 個のアミノ酸からなる糖タンパク質 (分子量: 約 21,000) である。

アミノ酸配列：

CYGDPPYVKE AENLKKYFNA GHSDVADNGT LFLGLLKNWK EESDRKIMQS
 QIVSYFYKLF KNFKDDQSIQ KSVETIKEDM NVKFFNSNKK KRDDFEKLTN
 YSVTDLNVQR KAIHELIVQM AELSPAAKTG KRKRSQLFR GRRASQ
 K28, K100：糖鎖結合部位

主な糖鎖の推定構造：

N28



N100



分子量及び分子式：

C₇₆₁H₁₂₀₆N₂₁₄O₂₂₅S₆：17,145.41(タンパク質部分)

(6) 遺伝子組換えヒト化抗体の例 (①c, ②c, ③d, ④b, ⑤b)

ヒト化抗体の場合、本質記載には以下のように、相補性決定部の由来とフレームワーク及び定常部の由来をサブクラス(IgG1~4)及びL鎖(□鎖または□鎖)を含めて記載する。キメラ型の場合は、可変部の由来と定常部の由来をサブクラス(IgG1~4)及びL鎖(□鎖または□鎖)を含めて記載する。N末端のピログルタミン酸形成やC末端のプロセッシングのように意図しない修飾が一部の分子に生じている場合は、本質記載ではなく、一次構造の脚注にK459：プロセッシング(部分的)のように記載する。分子式及び分子量は、修飾されていないものとして計算する。

本質記載：

[英名]

● is a recombinant humanized monoclonal antibody composed of complementarity-determining regions derived from mouse anti-human ○ monoclonal antibody and framework regions and constant regions derived from human IgG1. ● is produced in Chinese hamster ovary cells. ● is

a glycoprotein (molecular weight: ca.155,000 - 160,000) composed of 2 H-chain (□1-chain) molecules consisting of 459 amino acid residues each and 2 L-chain (□-chain) molecules consisting of 214 amino acid residues each.

[日本名]

●は、遺伝子組換えヒト化モノクローナル抗体であり、マウス抗ヒト○抗体の相補性決定部、並びにヒトIgG1のフレームワーク及び定常部からなる。●は、CHO細胞により産生される。●は、459個のアミノ酸残基からなるH鎖(□1鎖)2分子及び214個のアミノ酸残基からなるL鎖(□鎖)2分子で構成される糖タンパク質(分子量：約155,000~160,000)である。

アミノ酸配列及びジスルフィド結合：

```

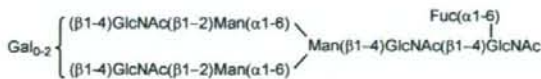
ELGMTQSPSS VSASVGRDVT ITCRASHSIS TYLWYQQKPK GKAPKLLIYA
ASLSQSGVPS RFSGSQSGTD FSLTIINSLQPF EDFATYYCOQ TFSPSGTFGG
GTVKELKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWVK
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYKHK LYACEVTHGG
LSSPVTKSFN RGEK

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTT SYWMSVVRQA PGKGLEWVAN
IKQEGSEKTY VDATKGRFTI TRDNAKNSLY LQMNSLRAED VAVYYCAREF
ESTMTSVNAD YYYFYMDVWG KGITVTVSSA STKGPSVFPL APSKSTSGG
TAALGQLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSVGH TFPVAVLOSSG LYSLSVVTV
PSSSLGTOTY ICNVNHKPSN TKVDKRVPEK SCDKTHTCP CPPELLGGP
SVFLFPPKPK DTLMIKSRTE VTCVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK
TKPREQYNS TYRVVSVLTV LHQDNLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK
AKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNOVSLTQL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
NNYKTTTPVVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFCSSVM HEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

```

H鎖E1：部分的ピログルタミン酸；H鎖N309：糖鎖結合；H鎖K459：部分プロセッシング；L鎖C214-H鎖C232, H鎖C238-H鎖C238, H鎖C241-H鎖C241：ジスルフィド結合

主な糖鎖の推定構造：



分子量及び分子式：

$\text{C}_{6536}\text{H}_{10096}\text{N}_{1736}\text{O}_{2054}\text{S}_{48}$: 147,395.62 (タンパク質部分, 4本鎖)

H鎖 $\text{C}_{2251}\text{H}_{3472}\text{N}_{594}\text{O}_{693}\text{S}_{18}$: 50,520.39

L鎖 $\text{C}_{1017}\text{H}_{1580}\text{N}_{274}\text{O}_{334}\text{S}_6$: 23,181.45

(7) 遺伝子組換え改変型融合型二量体(ホモ)糖タンパク質の例 (①c, ②c, ③a及びd, ④b, ⑤c)

N末端側は受容体タンパク質の細胞外領域に由来し, C末端側はFcドメインに由来する融合タンパク質で, N末端側から147番目のアミノ酸がSer置換されている場合, 本質記載は以下ようになる. この融合タンパク質の6箇所に糖鎖が結合しており, その内シアル酸結合糖鎖は活性に影響するものとする. アミノ酸配列とは別に糖鎖結合部位毎に代表的な糖鎖の推定構造を記載し, シアリル糖鎖が結合している3箇所については, シアリル酸が結合していることがわかるように記載する. 分子式及び分子量は単量体及び二量体について記載する.

本質記載：

[日本名]

- は, 遺伝子組換え融合糖タンパク質であり, 1~133番目はヒトCD28の細胞外領域, また134~356番目は改変型ヒトIgG1のFcドメインからなり, 147番目のアミノ酸残基がSerに置換されている.
- は, マウスミエローマ(NS0)細胞から産生される.
- は, 356個のアミノ酸残基からなるポリペプチド2分子から構成される糖タンパク質(分子量: 約90,000)である.

[英名]

- is a recombinant fusion glycoprotein composed of an extracellular domain of human CD28 in positions 1 - 133 and modified Fc domain of human IgG1 at positions 134 - 356, and whose amino acid residue at position 147 is substituted by Ser.
- is produced in mouse myeloma (NS0) cells.

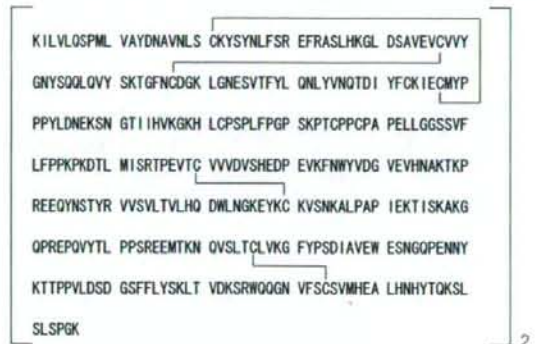
is a glycoprotein (molecular weight: ca. 90,000) composed of 2 polypeptide molecules consisting of 356 amino acid residues each.

分子量及び分子式：

$\text{C}_{3604}\text{H}_{5534}\text{N}_{934}\text{O}_{1070}\text{S}_{34}$: 80,156.33 (タンパク質部分, 2量体)

単量体 $\text{C}_{1802}\text{H}_{2769}\text{N}_{467}\text{O}_{535}\text{S}_{17}$: 40,080.18

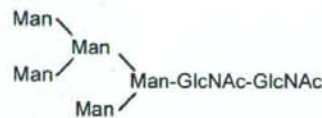
アミノ酸配列及びジスルフィド結合：



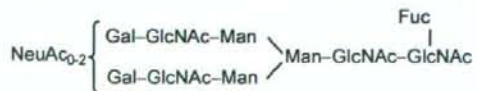
N18, N52, N73, N86, N110, N206 : 糖鎖結合 ; K356 : 部分的プロセッシング ; C135, C138 : サブユニット間ジスルフィド結合

主な糖鎖及び活性に寄与する主な糖鎖の推定構造：

N18, N86



N52, N73, N110



N206



E. 結論

I. INNには同一アミノ酸配列で異なるグリコフォームを持つ6種類の糖タンパク質が収載されており、基原及び糖鎖構造等が明らかに異なるものと、糖鎖構造の違いが明確ではないものがあることが確認された。

II. 1) 同一アミノ酸配列で糖鎖構造が異なる糖タンパク質の例として、フォリトロピン アルファ及びベータの糖鎖プロファイルを比較し、両者はよく似ていることが明らかになった。2) HPAEC-PADは、同一JANを持つ低分子量ヘパリンの類似性確認、異なるJANを持つ低分子量ヘパリンの識別、ヘパリンに構造的によく似た不純物の評価に利用できることが示唆された。

III. パイオ医薬品の本質、アミノ酸配列、糖鎖構造等、及び分子式及び分子量を記載するにあたって考慮すべき事項や要素について考察し、記載例を作成した。

F. 研究業績

誌上発表

- 1) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Daisuke Takakura, Yuan Qin, Huang Xiaoyu, Teruhide Yamaguchi: The significance of glycosylation analysis in development of biopharmaceuticals, *Biol. Pharm. Bull.*
- 2) Satsuki Itoh, Daisuke Takakura, Nana Kawasaki, Teruhide Yamaguchi: Glycosylation analysis using LC/MS and LC/MSn. Site-specific glycosylation analysis of a glycoprotein. The protein Protocols Hand-book. Third Edition. Published by Humana Press, USA. Edited by John Walker. In press
- 3) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, and Teruhide Yamaguchi: LC/MSn for glycoproteome analysis: Glycosylation analysis and peptide sequencing of glycopeptides, *Methods in Molecular Biology*, in press
- 4) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Akira Harazono, Daisuke Takakura, Teruhide Yamaguchi: Mass spectrometry for analysis of carbohydrate heterogeneity in characterization and evaluation of glycoprotein products. *Trends in Glycosci. Glycotech.* 20, 97-116 (2008)
- 5) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, and Teruhide Yamaguchi: LC/MS of oligosaccharides. *Experimental Glycoscience*, Eds. Naoyuki Taniguchi, Akemi Suzuki, Yasunari, Itoh, Hisashi Narimatsu, Toshisuke Kawasaki, Sumihiro Hase, 39-41, Springer (Tokyo) 2008
- 6) 蜂須賀暁子, 川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹: 薬の名前. ステムを知らば薬がわかる. 第28回, *Pharm. Tech. Japan*, 24, 2515-2523 (2008)
- 7) 内田恵理子, 川崎ナナ, 宮田直樹: 薬の名前. ステムを知らば薬がわかる. 第24回, *Pharm. Tech. Japan*, 24, 1605-1611 (103-109) (2008)
- 8) 川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹: 薬の名前. ステムを知らば薬がわかる. 第21回, *Pharm. Tech. Japan*, 24, 651-656 (2008)
- 9) 川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹: 薬の名前. ステムを知らば薬がわかる. 第18回, *Pharm. Tech. Japan*, 24, 101-105 (2008)
- 10) 川崎ナナ, 橋井則貴, 山口照英: 糖鎖異常の網羅的解析. 蛋白質核酸酵素増刊号「糖鎖情報の独自性と普遍性」. 53, 1690-1696 (2008)
- 11) 川崎ナナ: ヘパリン問題と日局一部改正. *ファルマシア*, 44, 1167-1171 (2008)
- 12) Yoshinao Wada, Parastoo Azadi, Catherine E. Costello, Anne Dell, Rudolf Geyer, Kazuki Takechi, Niclas G. Karlsson, Koichi Kato, Nana Kawasaki, Kay-Hooi Khoo, Soohyun Kim, Akihiro Kondo, Kazuyuki Nakamura, Hisashi Narimatsu, Milos V. Novotny,

- Nicolle H. Packer, Helene Perreault, Jasna Peter-Katalinic, Gottfried Pohlentz, Vermin N. Reinhold, Pauline M. Rudd, Akemi Suzuki, And Naoyuki Taniguchi: Comparison of the methods for profiling glycoprotein glycans--HUPO Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study. *Glycobiology*, 17, 411-422 (2007)
- 13) 内田恵理子, 川崎ナナ, 宮田直樹: 薬の名前. ステムを知れば薬がわかる. 第15回, *Pharm. Tech. Japan*, 23, 2187-2194 (2007)
- 14) 川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹: 薬の名前. ステムを知れば薬がわかる. 第12回, *Pharm. Tech. Japan*, 23, 1603-1611 (2007)
- 15) 川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹: 薬の名前. ステムを知れば薬がわかる. 第9回, *Pharm. Tech. Japan*, 23, 101-109 (2007)
- 16) 川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹: 薬の名前. ステムを知れば薬がわかる. 第7回, *Pharm. Tech. Japan*, 23, 81-87 (2007)
- 17) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井則貴, 山口照英: 液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いた糖タンパク質構造解析. *実験医学増刊号*, 25, 1127-1136 (2007)
- 18) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 山口照英: 抗体のLC/MS. 「抗体医薬品の最前線」105-115, 植田充美監修, シーエムシー (東京) 2007
- 19) 川崎ナナ, 早川堯夫: 糖鎖構造解析, バイオ医薬品の品質, 安全性評価, 早川堯夫監修, 308-329, エル・アイ・シー (東京) (2006)
- 20) 内田恵理子, 川崎ナナ, 宮田直樹: 薬の名前 ステムを知れば薬がわかる 第5回, *Pharm. Tech. Japan*, 22, 91-99 (2006)
- 21) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh and Toru Kawanishi: LC/MS strategies in the characterization of glycoproteins, *Encyclopedia of mass spectrometry*, Vol. 8: Hyphenated, Editor Wilfried M. A. Gross & Richard M. Caprioli, Methods, Elsevier Science, Oxford, 923-930 (2006)
2. 学会発表
- 1) 原園 景, 川崎ナナ, 橋井則貴, 山口照英: 低分子量ヘパリンの酸加水分解及びHPAEC-PADを用いた確認試験及び純度試験法の検討. 日本薬学会第129年会, 京都 (2009年3月) 予定
- 2) 秦 艶, 橋井則貴, 川崎ナナ, 山口照英: 強陰イオン交換 HPLC を用いたヘパリンナトリウム確認試験及び限度試験に関する研究. 日本薬学会第129年会, 京都 (2009年3月) 予定
- 3) Nana Kawasaki, Low Molecular Mass Heparins in the Japanese Pharmacopoeia. 2nd Workshop on the characterization of Heparin products ストラズブール(2008, 6, 20)
- 4) 川崎ナナ: LC/MS を用いた糖鎖の微量かつ網羅的解析と創薬への応用. 日本薬学会第128年会一般シンポジウム「グライコサイエンスから創薬へ」. 横浜 (2008. 3. 26-28)
- 5) 橋井則貴, 川崎ナナ, 原園 景, 伊藤さつき, 中島 紫, 高倉大輔, 山口照英: 質量分析法を用いたグリコサミノグリカンの構造特性解析. 日本薬学会第128年会, 横浜 (2008. 3. 26-28)
- 6) 原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 石川リカ, 高井俊紀, 古賀明子, 岡本寿美子, 山口秀人, 濱詰康樹, 佐藤貴之, 窪田雅之, 掛樋一晃, 木下充弘, 山口照英: ペプチド及びタンパク質医薬品の質量分析試験の標準化に関する研究. 日本薬学会第128年会, 横浜 (2008. 3. 26-28)
- 7) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 橋井則貴, 山口照英: LC/MS を用いた抗体医薬品の特性解析, 日本薬学会第128年会, 横浜 (2008. 3. 26-28)
- 8) 平野 真, Bruce Y. Ma, 川崎ナナ, 川寄伸子, 川寄敏祐: マンナン結合タンパク質による meprin のプロテアーゼ活性調節. 日本薬学会第128年会, 横浜 (2008. 3. 26-28)
- 9) 川崎ナナ: LC/MSⁿを用いた糖蛋白質の特性解析大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質翻訳後修飾」吹田市(2008. 1. 10,11)
- 10) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 橋井則貴, 原園 景, 中島 紫, 高倉大輔, 内田恵理子, 押澤 正,