

図1 血液凝固カスケード

けるために、これらに対応する遺伝子組換え医薬品が開発されてきている。なお、天然の血液製剤については、生物学的製剤基準による名称が使用されている。今回は、血液凝固因子、および、凝固阻止因子や抗凝固作用を持つ生物薬品のうち、ステムやINNが定義されている医薬品を中心に紹介する。

「-cog」：血液凝固因子類

「-cog」は、遺伝子組換え技術により製造される血液凝固因子類(blood coagulation factors)に共通のステムである。INNでは現在までに、第VII因子、第VIII因子、第IX因子に対応するサブステムとしてそれぞれ「-eptacog」、「-octocog」、「-nonacog」が決められている。アミノ酸配列が天然型と異なる場合は、接頭語を付けて表す。また、糖タンパク質の場合には、Alfa, Beta等を付けて区別する。さらに、活性型の血液凝固因子が医薬品である場合は、一般名の後に括弧書きで(Activated)(活性型)と表す、というINNのルールが定められている。

(1)「-eptacog」：血液凝固第VII因子

「-eptacog」は、遺伝子組換え技術により製造される血液凝固第VII因子を表すステムである。

第VII因子は、Ca²⁺との結合性を有するビタミンK依存性セリンプロテアーゼ前駆体であり、406個のアミノ酸残基からなる分子量約50,000の一本鎖糖タンパク質として肝臓で産生される。N末端から順に、γ-カルボキシグルタミン酸(Gla)に富むGlaドメイン、EGF様ドメイン、セリンプロテアーゼドメインからなる。第VII因子は、第IXa因子、第Xa因子、トロンビン、第XIIa因子などにより活性化され、Arg152とIle153の間が切断されて、GlaドメインおよびEGF様ドメインからなるL鎖とセリンプロテアーゼドメインからなるH鎖がジスルフィド結合で結ばれた2本鎖型の第VIIa因子(図2)に転換される。第VIIa因子は、外因系凝固経路における重要な凝固因子であり、局所の損傷部位で、Ca²⁺存在下、組織因子と複合体を形成し、第IX因子および第X因子を活性化する(図1)。

ステム「-eptacog」を持つ医薬品として、日本ではEptacog Alfa(Activated)(エプタコグアルファ(活性型))が承認されている。エプタコグアルファ(活性型)は、

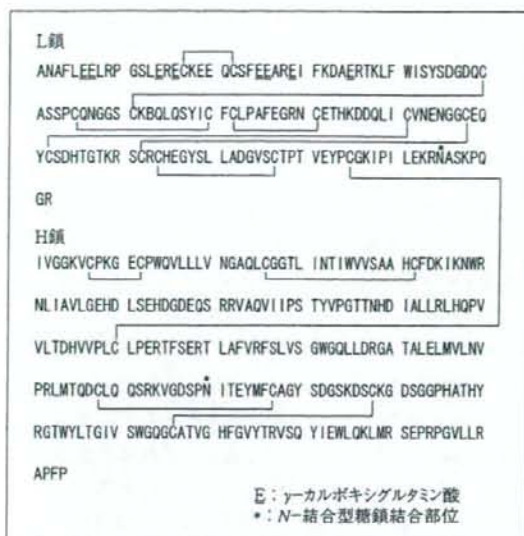


図2 血液凝固第Ⅶa因子の構造

ヒト第Ⅶ因子の遺伝子を導入したベビーハムスター腎臓(BHK)細胞で製造した第Ⅶa因子である。血友病患者では、急性出血時の止血管理に第Ⅶ因子または第Ⅸ因子製剤による補充療法が用いられる。しかし、反復投与により第Ⅶ因子または第Ⅸ因子に対する抗体(インヒビター)ができてしまうと補充療法は無効となり止血管理が困難となる。第Ⅶa因子は、血液循環中では不活性だが、損傷部位で局所的に組織因子と複合体を形成し、直接第Ⅸ因子を第Ⅹa因子に活性化する。したがって、第Ⅶa因子は、第Ⅶ因子や第Ⅸ因子に対するインヒビターを保有する血友病患者でも局所での止血が可能である。エプタコグ アルファは、インヒビターを保有する先天性血友病および後天性血友病患者の出血抑制を適応として2000年に承認されている。また、脳内出血への適応拡大について現在臨床試験中である。

(2)「-octocog」：血液凝固第Ⅶ因子

遺伝子組換え技術により製造される血液凝固第Ⅶ因子を表すシステムは、「-octocog」である。

第Ⅶ因子は、2,332個のアミノ酸残基からなる分子量約330kDaの糖タンパク質であり、一次構造上の相同性からN末端より順に、A1(1-328)、A2(380-711)、B(740-1648)、A3(1649-2019)、C1(2020-2172)、C2(2173-2332)というドメイン構造をとる。トロンピンにより活性化され、Bドメインがはずれて第Ⅶa因子とな

る。第Ⅶa因子は第Ⅸa因子の補酵素であり、第Ⅸa因子、リン脂質、Ca²⁺と複合体を形成し、第Ⅹ因子の活性化を促進することで血液凝固に関与している(図1)。血友病A患者は、X染色体上にある第Ⅶ因子の遺伝子異常により、生涯にわたる出血傾向を示す先天性第Ⅶ因子欠損症である。

なお、天然の血漿分画製剤では、「乾燥人血液凝固第Ⅶ因子」が、第Ⅶ因子欠乏患者の出血傾向抑制を適応として承認されている。

ステム「-octocog」を持つ医薬品として、日本ではOctocog Alfa(オクトコグ アルファ)、Ruriococog Alfa(ルリオクトコグ アルファ)の2品目が承認されている。

オクトコグ アルファは、ヒトT細胞ハイブリドーマのmRNAに由来するヒト第Ⅶ因子cDNAを導入したBHK細胞で産生される2,332個のアミノ酸残基からなる糖タンパク質(分子量:300,000-350,000)である。一方、ルリオクトコグ アルファは、ヒト肝細胞のmRNAに由来するヒト第Ⅶ因子cDNAを導入したチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞で産生される2,332個のアミノ酸残基からなる糖タンパク質(分子量:300,000-350,000)であり、オクトコグ アルファとは遺伝子多型によりアミノ酸残基1カ所(1,241番目)が異なる。オクトコグ アルファは1993年、ルリオクトコグ アルファは1996年に、いずれも血友病A患者の出血傾向の抑制を適応として承認されている。

その他、INNにはMorococog Alfa, Berococog Alfaが収載されている。Morococog Alfaは、CHO細胞で製造したBドメイン欠損型遺伝子組換え第Ⅶ因子製剤で、第Ⅶ因子の1-1,648番目のアミノ酸残基のうち743-1,636番目が欠損した90kDaのペプチドと1,649-2,332番目からなる80kDaのペプチドのヘテロ2量体からなる糖タンパク質である。血友病A患者の出血の治療、予防薬として欧州で1999年に承認されているが、日本では未承認である。Berococog Alfaも、Bドメイン欠損型遺伝子組換え第Ⅶ因子製剤で、第Ⅶ因子のアミノ酸残基のうち1-740番目のペプチドと1,649-2,332番目のペプチドのヘテロ2量体である。Berococog Alfaは、最近INNに収載された品目で、海外でも未承認である。

(3)「-nonacog」：血液凝固第Ⅸ因子

「-nonacog」は、遺伝子組換え技術により製造される血液凝固第Ⅸ因子を表すシステムである。

第Ⅸ因子は、ビタミンK依存性のセリンプロテアーゼ

前駆体であり、415個のアミノ酸残基からなる分子量約55kDaの一本鎖の糖タンパク質として肝臓で産生される。N末端から順に、Glaドメイン、EGF様ドメイン、活性化ペプチド、セリンプロテアーゼドメインからなる。第IX因子は、VIIa因子、組織因子、リン脂質、Ca²⁺の複合体(外因系凝固)またはCa²⁺存在下、XIa因子(内因系凝固)により開裂して、分子量約11kDaの活性化ペプチドが遊離し、27kDaのH鎖と17kDaのL鎖がジスルフィド結合で結ばれた2本鎖型の第IXa因子が生成される。第IXa因子は、第VIIa因子、リン脂質、Ca²⁺と複合体を形成し、X因子を活性化することで血液凝固に関与する(図1)。血友病Bは、X染色体上にある第IX因子の遺伝子異常により生涯にわたる出血傾向を示す先天性第IX因子欠損症である。

ステム「-nonacog」を持つJAN品目にはNonacog Alfa(ノナコグ アルファ)がある。ノナコグ アルファは、遺伝子組換え技術によりCHO細胞で産生されるヒト第IX因子である。血友病B患者の止血管理を適応として欧州で1997年に承認されているが、日本では未承認である。

なお、対応する天然の血漿分画製剤として、「乾燥濃縮人血液凝固第IX因子」および「乾燥濃縮人血液凝固第IX因子複合体」が、第IX因子欠乏患者の出血傾向抑制を適応として承認されている。

(4) その他

血液凝固因子のうち、トロンビンは、Thrombin(トロンビン)としてJANおよび局方に記載されているが、INNではない。局方のトロンビンは、ヒトまたはウシの血液から精製したプロトロンビンに、Ca²⁺存在下、トロンボプラスチンを作用させて製造し、滅菌、凍結乾燥したものである。トロンビンはフィブリノーゲンからフィブリンへの分解作用と第XIII因子の活性化作用を有し、両者により安定化したフィブリンを形成する(図1)。トロンビンは、通常の結紮によって止血困難な小血管、毛細血管および実質臓器からの出血(例えば外傷に伴う出血、手術中の出血、骨性出血、膀胱出血、抜歯後の出血、鼻出血および上部消化管からの出血など)、および上部消化管出血を適応として承認されている。

「-cogin」:血液凝固カスケード 阻止因子類

「-cogin」は、血液凝固カスケード阻止因子類(blood coagulation cascade inhibitors)に共通のステムである。INNには、「-cogin」をステムに持つものとして、Drotrecogin Alfa(Activated)、Tifacogin、Taneptacogin Alfaが記載されているが、JANには未記載である。

Drotrecogin Alfa(Activated)は、遺伝子組換えによりヒト培養細胞株で製造したヒト活性化プロテインCである。ヒトプロテインCは、凝固阻止因子の1つで、分子量約62,000の1本鎖糖タンパク質として肝臓で合成された後、トロンビン-トロンボモジュリン複合体により切断され、ジスルフィド結合で結ばれた2本鎖型の活性化プロテインCが生成される。活性化プロテインCは、セリンプロテアーゼで、第Va因子と第VIIIa因子を特異的に分解・不活化して血液凝固カスケードを阻害するほか、線溶系の促進作用もある。Drotrecogin Alfa(Activated)は、死亡リスクの高い重度敗血症(急性臓器不全を伴う敗血症)の治療薬として、米国で2001年、欧州で2002年に承認されているが、日本では未承認である。

なお、対応する天然の血漿分画製剤として、「乾燥濃縮人活性化プロテインC」が、先天性プロテインC欠乏症に起因する深部静脈血栓症、急性肺血栓症、電撃性紫斑病を適応として承認されている。

Tifacoginは、遺伝子組換えで製造した組織因子経路インヒビター(TFPI)のアナログである。TFPIは内皮細胞が生産する276個のアミノ酸残基からなる分子量約38,000の1本鎖の糖タンパク質で、第VIIa因子-組織因子複合体および第Xa因子と結合し、外因系血液凝固反応の開始を阻止する。Tifacoginは、TFPIのN末端にAlaが1残基付加しており、糖鎖の結合はない。現在、重症の市中肺炎を対象として米国でフェーズIII臨床試験中である。

Taneptacogin Alfaは、臨床開発されていない。

「Thrombomodulin」: トロンボモジュリン類

トロンボモジュリン(thrombomodulin)類には、ステム「Thrombomodulin」が用いられている。ヒトトロンボモジュリンは、血管内皮細胞の膜表面に発現される557個のアミノ酸残基からなる分子量約105,000の膜貫通

APAEPOGPGS QCVHDFCAL YPGPATFLNA SQICDGLRGH LMTVRSSVAA
 DVISLLNGD GVGRRRLWI GLQLPPGGD PKRLGPLRGF QWVTGDNNTS
 YSRWARLDLN GAPLGGPLCV AVSAAEATVP SEPIWEEGQC EVKADGFLCE
 FHFPATCRPL AVEPGAASAAA VSITYGTPFA ARGADFQALP VGSSAAVAPL
 GLQLMCTAPP GAVGQHWARE APGAWDCSVE NGGCEHACNA IPGAPRCQCP
 AGAALQADGR SCTASATQSG NDLCEHFVCP NPDGPGSYSC MCETGYRLAA
 DQHRCEDVDD CILEPSPCPQ RCVNTQGGFE CHCYPNYDLV DGECVEPVDP
 CFRANCEYOC QPLNOTSYLK VCAEGFAPIP HEPHRCQMFQ NQTACPADCD
 PNTGASCECP EGYILDDGF CTDIDCEENG GFCGSHCHNL PGTFECICGP
 DSALVRHIGT DCDSGKVDGG DSGSGEPPPS PTPGSLTTP AVGLVHSG

*:糖鎖結合部位

図3 Thrombomodulin Alfa(トロンボモデュリン アルファ)
(日本未承認)の構造

型の糖タンパク質である。トロンボモジュリンは、トロンビンが関与する血液凝固反応系の調節因子で、トロンビンと結合し、トロンビンによるフィブリン形成、血小板活性化、第V因子や第VIII因子の活性化などを直接阻害

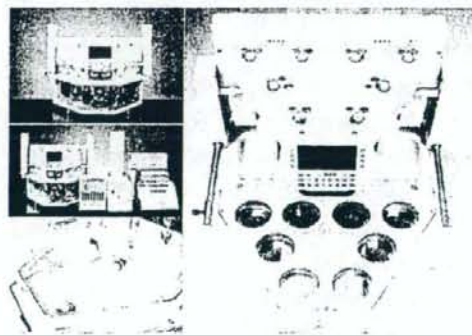
する。また、トロンビン-トロンボモジュリン複合体は、プロテインCの活性化作用があり、活性化プロテインCを介して凝固反応を阻害する(ステム95参照)。さらに、トロンボモジュリンには、アンチトロンビンⅢ(ステム97参照)のトロンビン阻害作用を促進する働きもある。

「Thrombomodulin」をステムに持つ品目として、JANにはThrombomodulin Alfa(トロンボモデュリン アルファ)が収載されている。トロンボモデュリン アルファは、ヒトトロンボモジュリンの活性部位を含む細胞外ドメインに相当する1~498番目のアミノ酸残基をコードするcDNAの発現により、CHO細胞で産生される分子量約64,000の可溶性糖タンパク質である(図3)。現在、トロンボモデュリン アルファは、造血器悪性腫瘍・感染症を基礎疾患とする汎発性血管内血液凝固症(DIC)の治療薬として承認申請中である。

「Antithrombin」: アンチトロンビン類

「Antithrombin」は、アンチトロンビンⅢ類(antithrombinⅢ)に共通のステムである。アンチトロンビンⅢは、トロンビンや第Xa因子などの凝固因子に結

究極の溶出試験グローバルスタンダード VK7025 溶出試験器は世界標準の溶出試験器です



USP キャリブレーターでお困りではありませんか?
溶出試験器間誤差の問題はありませんか?

- VK7025 の特長
- ① フルオープンアクセス
- ② 調整不要のトゥルーセンターベッセル
- ③ 最短ロッドで極小のバドル偏心
- ④ メンテナンス性抜群

バリアン社の溶出試験器なら
問題解決できます

信頼をお届けする

UNIFLEX® 株式会社 ユニフレックス

ホームページ: <http://www.uniflex.co.jp>

東京営業部 〒277-0861 千葉県柏市高田 537-1

TEL.04-7147-3751 FAX.04-7144-8242

大阪営業所 〒533-0033 大阪市東淀川区東中島 1-17-18 新大阪ビル東館 2F

TEL.06-6323-8344 FAX.06-6323-8257

本社 〒113-0033 東京都文京区本郷 3-26-4 ドルミ本郷 7F

TEL.03-3816-1004 FAX.03-3816-1392

DM資料請求カードNo.110

ステムを知れば薬がわかる

薬作用

合し、それらを不活性化させる。ヒトアンチトロンビンⅢは、432個のアミノ酸残基からなる糖タンパク質で、N-結合型糖鎖結合部位が4カ所存在する。[Antithrombin]をステムを持つ医薬品として、INNにはAntithrombinⅢとAntithrombin Alfaが記載されている。

AntithrombinⅢ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、およびアンチトロンビンⅢ低下を伴うDIC治療薬として国内承認されている。

Antithrombin Alfaは、遺伝子組換えヤギ(トランスジェニックヤギ)で産生される糖タンパク質で、ヤギの乳中に分泌タンパク質として発現される。Antithrombin Alfaは、AntithrombinⅢとアミノ酸配列が同一であるが、結合している糖鎖の構造が異なる。2006年に欧州で先天のアンチトロンビン欠損症治療薬として承認され、米国では現在フェーズⅢ臨床試験中である。

「-parin」：ヘパリン類
および低分子量ヘパリン

「-parin」は、ヘパリン類(heparin)および低分子量ヘパリン(low molecular weight heparin)を含むヘパリン誘導体に共通するステムである。

ヘパリンは、健康な食用獣の肝、肺、または、腸粘膜から得たD-グルコサミンおよびウロン酸(L-イイズロン酸またはD-グルクロン酸)の2糖単位からなる硫酸化グリコサミノグリカンで、平均分子量10,000~15,000である。アンチトロンビンⅢと結合することによりトロンビンや第Xa因子などの凝固因子を阻害し、血液凝固阻止作用を発揮する。ヘパリン類としてJANにはHeparin Sodium(ヘパリンナトリウム)およびHeparin Calcium(ヘパリンカルシウム)が記載されている(図4)。

ヘパリンナトリウムおよびヘパリンカルシウムは、DIC治療、血栓塞栓症の治療および予防、ならびに血液体外循環時における血液凝固防止等に適用されている。ヘパリンナトリウムは、日局収載品目である。ヘパリンカルシウムは、第16改正日局に収載が予定されている。

低分子量ヘパリンは、ヘパリンナトリウムやヘパリンカルシウムを亜硝酸や過酸化水素等により分解して得られる分子量約数千のヘパリン誘導体である。アンチトロンビンⅢには結合するがトロンビンには結合しないので、

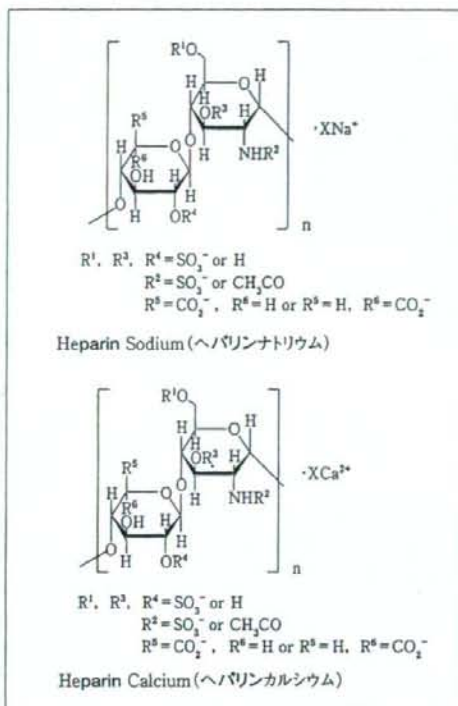


図4 ステム「-parin」を持つヘパリン医薬品

第Xa因子活性を阻害するがトロンビンの作用を阻害しない。低分子量ヘパリンは、出血の副作用が少ない抗凝固薬として用いられている。INNに収載されている低分子量ヘパリンを表1にまとめた。

Parnaparin Sodium(パルナパリンナトリウム)は、ヘパリンナトリウムを過酸化水素および酢酸第二銅で分解して得られる低分子量ヘパリンナトリウムで、平均分子量は4,500~6,500である。血液体外循環時の灌流血液の凝固防止に適用されている。日局には第15改正から収載され、欧州でも販売されている(EP収載)。

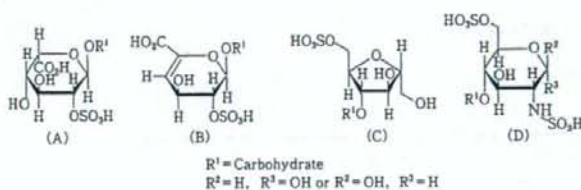
Dalteparin Sodium(ダルテパリンナトリウム)は、ヘパリンナトリウムを亜硝酸で分解して得られる低分子量ヘパリンナトリウム(平均分子量5,600~6,400)で、血液体外循環時の灌流血液の凝固防止およびDIC治療薬に適用されており、今後日局への収載が予定されている。ダルテパリンナトリウムは、欧州や米国でも販売されている(EP収載)。

Enoxaparin Sodium(エノキサパリンナトリウム)は、米国および欧州で販売されており(EP収載)、日本では現在承認申請中である。その他、ステム「-parin」を持つ医薬品として、JAN収載品目であるReviparin Sodium

表1 ステム「-parin」を持つ低分子量ヘパリン医薬品

医薬品名	主成分	分子量	平均分子量	糖鎖	特徴
Enoxaparin Sodium	亜硝酸	5,600~6,400 (6,000)	2.0~2.5	A	C
Bivalirudin Sodium	亜硝酸	90%は1,000~8,000 (1,700~3,300)	2.1	A	C
Nadroparin Sodium	亜硝酸	3,600~5,000 (4,300)	2.1	A	C
Lepirudin Sodium	亜硝酸	3,150~5,150 (4,150)	2.1	A	C
Pegomab Sodium	亜硝酸イソアミル	70%は10,000以下 (5,000~7,000)	2~2.5	A	C
Flucloparin Sodium	亜硝酸	75%は8,000以下 (3,000~5,000)	2	A	6-O-sulfo- structure
Flucloparin Sodium	過酸化水素/第二銅塩	4,500~6,500	2.0~2.6	A	D
Flucloparin Sodium	<i>Flavobacterium heparinum</i> 由来ヘパリナーゼ	5,500~7,500 (6,500)	1.8~2.5	B	D
Flucloparin Sodium	ベンジルエステル誘 導体をアルカリ分解	3,500~5,500 (4,500)	約2	B	記載なし
Flucloparin Sodium	4級アンモニウム塩 によるアルカリ分解	3,000~4,200 (3,600)	約2	2-O-sulfo-4-ene- pyranosuronic acid	D
Deligoparin Sodium	金属イオン/ 過酸化水素	2,250~3,850 (3,200)	2.5	記載なし	記載なし
Acetaparin Sodium	過酸化物/加熱	98%は2,000~15,000 (5,500~6,500)	2.7		異常な糖を含まない

*主成分の構造



(レピパリンナトリウム)。欧米で販売されている Tinzaparin Sodium (EP 収載)、および欧州で販売されている Nadroparin Sodium (EP 収載) などがある。

「-irudin」: ヒルジン誘導体

「-irudin」は、ヒルジン(hirudin)誘導体に共通するステムである。ヒルジンは、医用ヒルの唾液腺から分泌される65個のアミノ酸残基からなるポリペプチドで、63番目の Tyr が硫酸化されている。酸性アミノ酸残基が多い C 末端側でトロンピンと結合し、トロンピンの活性を阻害する。「-irudin」を持つ医薬品として4品目が INN に収載されている(図5)。Bivalirudin, Desirudin および Lepirudin の3品目は米国および欧州で承認されているが、日本では未承認である。

Bivalirudin は、20個のアミノ酸残基からなる合成ヒル

ジン誘導体であり、9~20番目のアミノ酸の配列はヒルジンの52~63番目の配列に一致する。トロンピンに特異的かつ可逆的に結合し、トロンピン活性を阻害する。冠動脈形成手術を実施する不安定狭心症患者に適用されている。Desirudin は、酵母から産生される遺伝子組換え型ヒルジン誘導体であり、天然のヒルジンと異なり、Tyr63 が硫酸化されていない。静脈血栓塞栓症の予防薬として認められている。Lepirudin は、遺伝子組換え技術によって酵母から産生されるヒルジン誘導体であり、1番目と2番目のアミノ酸が置換され、Tyr63 が硫酸化されていない。ヘパリン誘導による血小板減少症および血栓塞栓性合併症の患者に適用されている。Pegmusirudin は、ヒルジン改変体の Lys27 および Lys32 にポリエチレングリコールが結合した PEG 化改変ポリペプチドである。

ステムを知れば薬がわかる

【333】

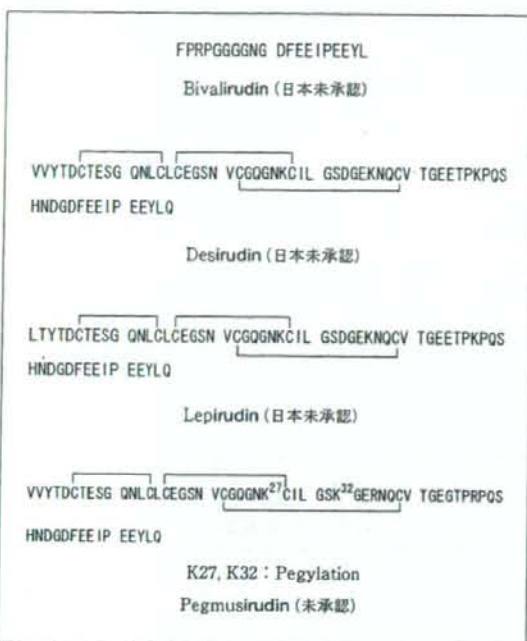


図5 ヒルジンを示すステム「-irudin」を持つ医薬品

以上、今回は、血液凝固因子類および抗凝固作用を持つ生物薬品のステムとして「-cog」、「-cogin」、「thrombomodulin」、「antithrombin」、「-parin」、「-irudin」を紹介した。

■参考文献

本稿作成に際してこれまでに紹介した参考文献を使用した。



精製グレードのポリオキシエチレン硬化ヒマシ油
NIKKOL HCO シリーズ

- 安全性、安定性の高い可溶化剤です
- 長期間、おりの発生がありません
- 製剤の味にほとんど影響を及ぼしません
- 内服用液剤、口腔医薬品、点眼剤などに最適です

ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 40 (NIKKOL HCO-40 (医薬用))

ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 50 (NIKKOL HCO-50 (医薬用))

ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60 (NIKKOL HCO-60 (医薬用))

日光ケミカル株式会社

www.nikkol.co.jp

お問合せ先 営業部: TEL 03-3662-7055 FAX 03-3664-8679

東京都中央区日本橋馬喰町1-4-8

大阪支店: TEL 06-6262-0371 FAX 06-6262-9700

大阪府大阪市中央区安土町1-6-14

DM資料請求カードNo.264

話題

医薬品の品質のためのガイドライン ICH Q8 及び Q9 について

檜山行雄

Yukio HIYAMA

国立医薬品食品衛生研究所薬品部室長

医薬品規制調和国際会議(ICH: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)により、最近発効された製剤開発ガイドライン(Q8)、品質リスクマネジメント(Q9)の概略・意義を解説する。

1 ICHの経緯

「優れた新薬は患者の手にすみやかにわたるべきである。しかし、医薬品開発の中心となっている日本、米国、欧州の3つの地域(3極)間での新規医薬品の審査の基準の違いがこの目的の障害になっている」との認識から3極の行政(日本:厚生労働省、米国:食品医薬品庁(FDA)、EU:欧州委員会(EC))、企業(日本:日本製薬工業協会(JPMA)、米国:米国研究製薬工業協会(PhRMA)、EU:欧州製薬団体連合会(EFPIA))の6者が集まり、提出データの国際調和を進めるためICHが1990年に組織された。¹⁾ これまでに、有効性(E; efficacy)、安全性(S; safety)、品質(Q; quality)の3分野で50を超えるガイドラインが作成され規制の国際調和に大きな貢献をしてきた。当初、品質(Q)分野においては、安定性(ICHコード; Q1)など、試験のプロトコルの調和が行われ、その後、規格及び試験法設定(Q6)、原薬GMP(Q7A)のような包括的な議題が採用された。さらに申請資料の項目の調和(CTD; コモンテクニカルドキュメント)が行われ、2001年に発効した。

その後、2003年7月にGMP(Good Manufacturing Practices)ワークショップが開催され、医薬品品質保証の現状と将来のあるべき姿を考え、具体的に国際調和ガイドラインとして何が必要であるのかが議論された。開催を提案したFDAの問題意識には、①GMPは過去30年にわたり成功をおさめてきたが、規制そのものが医薬品産業に近代的な製造・品質管理手法に導入されにくい状況を作っているのではないかと、②新薬審査、変更審査の行政手続きにメリハリが少なく資源の無駄使いをしているのではないかと2点が含まれた。これらの認識は、ほぼ6者共通のものであった。厚生労働省は、改正薬事法下における品質関連規制の概説をするともに、経営者責任、技術移転などの新しい項目を取り込んだ品質保証の構築を提案した。会議は“科学とリスクマネジメントに基づいた医薬品のライフサイクル(開発から市販後)全般に適用可能な調和された品質保証体系: A harmonised pharmaceutical quality system applicable across the lifecycle of the product emphasizing an integrated approach to risk management and science”とのビジョンを採択した。これに基づき製剤開発(Q8; Pharmaceutical Development)と品質リスクマネジメント(Q9; Quality Risk Management)を新たなトピックにとりあげることを合意し、段階的にビジョン達成をめざすこととなった。

ほぼ2年をかけQ8、Q9の2つのガイドラインが作成され、我が国では2006年9月に厚生労働省より通知された。この間、様々な国際会議が開催され活発な議論が行われた。主な意見・課題はおよそ次のとおりである。

- ・医薬品品質保証システムは企業の自主性が最重要であり、例えば変更管理などの企業行動に対する行政の関与は必要最小限にすべきだ。
- ・現在、世界的に行政と企業の間には相互不信があるのではないか。これを解決するためにICHなどの場で積極的なコミュニケーションを図るべきだ。この議論のベースはリスクマネジメントと科学である。
- ・医薬品の製造プロセスは他の産業のそれと比較し遅れが目立つ。この理由には、規制の妨げ、開発スピードの要求により本質的な“品質”がおろそかになったことが考えられる。
- ・製造工程管理の重要点は変動を管理することが本質である。今までGMPでは逸脱管理の名のもとに異常事態、異常値に対する special cause だけが追跡される傾向があったが、実際には special cause による逸脱はほとんどなく、ただ、通常の変動要因(normal cause)に対する解析がおろそか過ぎたのではないか。
- ・様々な新分析法を応用したデータとりがここ1~2年で行われた。その結果想定していた以上に、今までの製造工程におけるブラックボックスが理解され、次々にきめ細かいプロセス管理法が採用されつつある。このような動きを規制側は支援すべきである。
- ・承認規格(及び試験法)をもって製造工程を管理する(管理できているとする)ような不条理が製薬業では多く行われてきた。承認規格の意義・目的を国際的に議論し直す必要がある。ICHで製剤開発、リスクマネジメントがとりあげられている。現在のCTD申請資料には、これらの結果を記載する適切な場所がない。モジュール2を、現在日本だけがが要求しているやり方に国際的にまとめるのが良いのではないか。

以上のような国際的な議論の中で、Q8は科学とリスクマネジメントにもとづいた製剤開発に関するハイレベルなガイドラインを目指し、Q9は医薬品の製品ライフサイクルを通した、効果的で一貫した意思決定のためのリスクマネジメントの原則と手法を提供することを目的とし、共に品質関係の業務及び方針の設定の基礎となるガイドラインを作成した。

2 ICH Q8 製剤開発ガイドラインの概略

ガイドラインの構成は目的、適用範囲、製剤成分(原薬、添加剤)、製剤(製剤設計、過量仕込み、物理的・化学的性質及び生物学的性質)、製造工程の開発経緯、容器及び施栓系、微生物学的観点から見た特徴、溶解液や使用時の容器/用具との適合性、用語で合計8ページと簡潔にまとめられている。また、この分野では使われていなかった「QbD; Quality by Design」、 「デザインスペース」という新しい概念が導入されている。

製剤開発研究とは「適正な品質を有する製品を設計すること」及び「意図した機能を有する製品を一貫して供給できる製造工程を設計すること」と規定している。ガイドラインのもともとの意図は、新薬申請資料の「製剤開発の経緯」の項にどのような記載をするかを示すことであったが、審査に用いるだけでなくGMP査察官に対する情報提供も行うこととなった。

このガイドラインでは科学的手法と品質リスクマネジメントの適用を強く推奨している。「製剤開発研究や製造経験を通して得られた情報や知識により科学的理解が深まり、これがデザインスペース、規格、及び製造管理の確立に役立つ」

「意図した品質の製品を確実に生産する工程の能力(異なる操作条件、異なる製造スケールまたは異なる装置を用いた場合の製造工程の性能など)に関する評価結果をこの項に示すことができる。工程の頑健性に対する理解があれば、リスク評価とリスク低減に有用であり、将来の製造と工程の改善、特にリスクマネジメント手法を用いた改善に役立てることができる」とある。

製剤研究のあり方として最低限記載が必要な事項と追加的(任意)事項と分け、示されている。前者として「原薬、添加剤、容器及び施栓系、製造工程に関わる性質のうち製品の品質にとって重要なものを特定し、それらを管理する戦略の妥当性を示す。一般に、どの製剤処方の特性と工程パラメータが重要であるかは、その変動が製剤の品質に及ぼし得る影響の程度を評価して特定する」ことが期待されている。一方、後者は「原料特性、代替の操作、製造工程パラメータなどの製品性能に関する知識をより広い範囲にわたってさらに深めるための研究、実験計画法；Process analytical Technology；品質リスクマネジメントの適用とデザインスペースの拡大など、高度な科学的理解の提示」である。追加的事項も示した場合には「弾力的な規制」が可能となるとしている。これには、リスクに基づいた規制当局の判断(審査及び査察)、追加の審査を受けることなく、承認書に記載されたデザインスペース内で製造工程を改善すること、承認後申請の低減、最終の製品出荷試験の減少につながる「リアルタイム」の品質管理を挙げている。

新しい概念として導入された「QbD」は、「製品の品質は、製造工程で造り込まれるものであって、試験(Quality by Testing)によって造られるものではない」という考え方である。一方「デザインスペース」は品質を確保することが立証されている入力変数(原料の性質など)と工程パラメータの多面的な組み合わせと相互作用と定義され、このデザインスペース内で運用することは、行政手続き上では変更とはみなされない。

製剤研究のあり方として最低限記載が必要な事項と追加的(任意)事項と分けて示し、規制の弾力性の程度は、提示した関連する科学的知識のレベルによって決まるという原則を明確に示したことは大きな意義がある。しかし、最低限記載が必要な事項に関する「具体的な製剤開発のとり組み方、評価法」の記載を望む声は、トピックが採用された時点から根強くある。また、「QbD」は、概念的には理解できるが、「QbD」によるもの、そうでないものは解釈が異なるようである。すなわち、最低限記載が必要とされている事項も「QbD」に当てはまるとする解釈と、追加的事項とされる部分がQbDであるとの解釈がある。このため今後、剤形ごとの具体的な記述を通じ、「QbD」及び「デザインスペース」のより明確な説明が改訂版のQ8Rでなされることが期待される。

3 ICH Q9 品質リスクマネジメントガイドラインの概略

ガイドラインの構成は序文、適用範囲、原則、一般的なプロセス、リスクマネジメントの手法、医薬品業界及び規制当局における活動への統合、定義、参照文献である。リスクの定義として(ISO/IEC Guide 51の)「危害の発生の確率とそれが発生したときの重大性の組み合わせ」を採用し、危害の定義を「健康への被害、製品品質の不良又は安定供給の欠如による被害を含む」とし、製品の供給欠如も含めている。

序文において、「リスクマネジメントとは「リスクのアセスメント、コントロール、コミュニケーション、レビューの各作業に対し、品質マネジメントの方針、手順、実施を系統立てて適用すること」であり、多くの産業活動や行政活動、及びこれらの企業を規制管轄する機関において有効に活用されている。製薬企業においても品質システムの重要性は認識されてきており、リスクマネジメントは、効果的な品質システムにおける重要な構成要素であるということが明らかになりつつある。しかし、医薬品の品質分野ではリスクマネジメントが十分に適用されていない。このため、医薬品品質のためのリスクマネジメントの定義、典型的なプロセスを示し、品質リスクマネジメントの体系的なアプローチを提供することである」と現状認識及び

ガイドラインの目的を述べている。また、現行の規制要件を超えた新たな要件の創出は意図されないこと、遵守すべき規制要件、企業と規制当局間のコミュニケーションは、このガイドラインの発行により何ら変わらないことが明記されている。

具体的な適用範囲としては原料、溶剤、添加剤、包装及び表示材料を含み、医薬品原薬、製剤、生物起源由来医薬品、及びバイオテクノロジー応用医薬品における開発、製造、配送、査察、承認申請/審査といったライフサイクルにわたる医薬品品質のあらゆる側面とされている。

原則としては、品質に対するリスクの評価は科学的知見に基づき、かつ最終的に患者保護に帰結すること及びリスクマネジメントの過程における資源配分はリスクの程度に相応するべきであることの2つが挙げられている。

その上で、品質リスクマネジメントのモデル(図1)を示しプロセス全般を説明している。プロセスの各要素のうち、強調すべきものは事例によって異なるが、頑健なプロセスでは、これらすべての要素が妥当なレベルの詳細さで検討されるべきとしている。以下、段階を追って解説する。

品質リスクマネジメントプロセスの開始にあたっては、①何がリスクかを定義する、②背景情報・データを収集する、③リーダー、投入資源を明確にする、実施計画・成果物、及び意思決定の適切なレベルを明確にすることが必要である。

リスクアセスメントは「リスク特定」、「リスク分析」、「リスク評価」から構成され、リスクマネジメントプロセスの中での意思決定を支持する情報を整理して組み立てる系統だったプロセスである。

以下の3つの質問が多くの場合助けとなる。「何がうまくいかないかもしれないのか」「うま

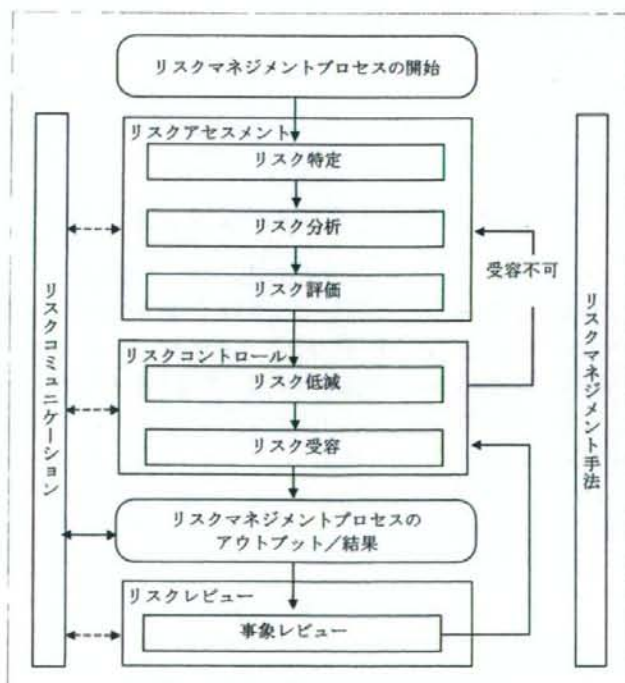


図1 典型的な品質リスクマネジメントプロセスの概要

くいかない可能性はどれくらいか」「うまくいかなかった場合、どんな結果(重大性)となるのか」効果的なリスクアセスメントのために、考慮されるデータセットの頑健性・質が重要となる。また、推定や不確実性の根源を明らかにしておくことは、結果の信頼性を高める事及びその限界を明確にする事に役立つ。不確実性は、対象としているプロセスに対する理解が不完全であることと、プロセスの変動の組み合わせから生じる。不確実性をもたらす典型的な原因には、製剤科学と製造工程理解間の知識ギャップ(製造法の操作と製品特性の関係、製品特性と製品性能の関係の理解の不十分さ)、危害要因及び問題の検出確率の低さが挙げられる。

リスクコントロールの段階においては「リスク低減」、「リスク受容」の意思決定を含む。リスクマネジメントにおける決定を実施する行動(ISO Guide 73)である。この段階では以下の質問に焦点をあてる。「リスクは受容レベルを超えているか?」「リスクの低減、除去に何が出来るか?」「利益、リスク、資源のバランスの程度は?」「リスクコントロールの結果、新たなリスクは発生しないか?」

また、リスクコミュニケーションはリスク及びリスクマネジメントの情報を、意思決定者及び他の利害関係者の間で共有することである。ここでの情報にはリスクの存在の有無、本質、形態、発生の可能性、重篤性、受容可能性、対応、検出可能性、その他の側面がふくまれる。

リスクレビューは新しい知見や経験を考慮に入れ、リスクマネジメントプロセスの結果を照査・監視する過程である。これには、計画されたもの(製品品質照査、査察、監査、変更管理など)、偶発的のもの(不良調査で判明した根本原因、回収など)がある。

リスクマネジメントの手法の付属書には欠陥モード影響解析など代表的なリスクアセスメントの方法の適用領域及び各方法の特徴が記述されている。リスクマネジメントの潜在用途の付属書には品質マネジメント、規制当局の業務活動、開発、施設、資材管理、生産、試験検査室管理、包装及び表示の適用領域の項目が記述され、適用を推奨している。

Q9の作成過程では、本文によるプロセスなどの説明と付属書の説明だけでは、具体的にどのように使ってよいか分からないとの意見が多く寄せられた。これに応えるためQ9のメンバーは400枚を超える教育スライドを作成し、ICHのホームページに掲載した。日本語訳もまもなく掲載予定である。それらも参考にしつつ、医薬品品質保証領域において企業、行政を問わず、リスクマネジメントの概念・手法が今後有効に使われ、他の品質関連のガイドラインあるいは行政方針の基礎となるような重要ガイドラインとなることが期待される。

4 2つのガイドラインの役割と展望

Q8には製剤開発が科学とリスクマネジメントに基づき行われるべきことと製剤開発によって得られた知識がその他の領域のリスクマネジメントの基礎となることが強調されている。一方、Q9には製剤開発はリスクマネジメントの適用領域とされ、付属書II3「開発におけるリスクマネジメント」には、適用機会として以下の例示がされている。

①安定生産のための製剤設計及び製造工程設計過程全体、②幅広い物質物性(粒度分布、水分含量、流動特性など)について化合物特性や、③製造法の選択や、製造工程のパラメータに関する深い知識取得、④原材料、溶媒、原薬の出発原料、原薬、賦形剤、包装材料の重要特性の評価、⑤適切な規格や製造管理法を確立(製剤開発で得られた、品質特性が持つ臨床使用における重要性に関する知見の活用と製造工程でその品質特性を管理する技量)、⑥品質特性の変動(製品・材料の不良、製造不良)の抑制/スケールアップや技術移転時に関連して必要な追加検討項目(生物学的同等性、安定性など)の評価、⑦デザインスペース(Q8)の有効活用

このように、製剤開発の過程はリスクマネジメントの適用が強く推奨される領域である。製剤・工程開発から製造・品質管理にいたる過程をリスクマネジメントの言葉で説明すると「研究開発において行われる基礎データ収集、製品設計、プロセス設計、評価法設計を理化学試験、臨床試験、科学的判断に基づき行われる開発はリスクアセスメント段階と捉えられ、開発段階できめられた製造プロセスに従い製造し、品質試験の結果により品質の恒常性を保証しようとする実生産はリスクコントロール段階ととらえることができる」となる。

一方、Q8ガイドラインの目的には“(申請書の)製剤開発の経緯の項において、製品及びその製造工程の開発に対して科学的手法と品質リスクマネジメントを適用することで得られた知識を提示する機会が提供されることとなる。製剤開発の経緯の項は、製造販売承認申請のためにまず作成されるが、製品のライフサイクルを通じて新たな知識が得られた場合は、これを更新することができる。また、審査官及び査察官が製品と製造工程を総合的に理解できるように設けたものである。本ガイドラインには、製剤学と製造科学の観点から理解が進んだことを証明できた場合、規制当局が柔軟な取組みを行うための基盤となる領域を示す。規制の柔軟性の程度は、提示した関連の科学的知識のレベルによって決まる”とある。これにより、製品設計・製造プロセス設計におけるリスクアセスメント及び製造におけるリスクコントロールの重要点を申請書に記述すること(民から官へのリスクコミュニケーション)を求めている。さらに、規制適用の程度がリスクの程度によることを述べている。

このように2つのガイドラインは、企業へ対しては「科学」と「リスクマネジメント」に根ざした努力を促し、それに呼応し、行政の係わりを弾力的に行える体制を構築していくことを推奨している。これらのことは、最近の国際会議を通じよく観察できる。²⁾ FDAの講演内容からは、規制の柔軟性を通じ企業活動を活性化するとともに、医薬品を審査・監視の効率性を同時に上げようとする意図が見える。一方、EUの講演からは国際基準を新薬だけでなく医療用医薬品すべてに適用すべく、欧州薬局方、審査手順をICH基準に合わせ、さらに拡大EUに浸透させる努力がうかがわれる。我が国においてはQ8及びQ9ガイドラインは、2005年から施行された改正薬事法下の品質関連の制度(例えば、製造法の詳細な約束をする制度)に大きく貢献することが期待される。

参考文献

- 1) ICHのホームページは<http://www.ich.org/>、日本におけるICHのホームページは<http://www.nihs.go.jp/dig/ich/ichindex.html>で英文ガイドラインとともに日本語訳が掲載されている。
- 2) 例えば、第五回医薬品品質フォーラムシンポジウム、最新のQ8の考え方及びそれを新医薬品申請にどのように生かすべきか?。(2006年6月、横浜); 2006 ISPE/PDA Joint Workshop Challenges of Implementing ICH Q8 and ICH Q9 Practical Applications, 2006年12月, Washington DC, 2007年2月, Brussels.



Comparison of the methods for profiling glycoprotein glycans—HUPO Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study

Yoshinao Wada^{1,2}, Parastoo Azadi³, Catherine E. Costello⁴, Anne Dell⁵, Raymond A. Dwek⁶, Hildegard Geyer⁷, Rudolf Geyer⁷, Kazuaki Kakehi⁸, Niclas G. Karlsson^{9,10}, Koichi Kato¹¹, Nana Kawasaki¹², Kay-Hooi Khoo¹³, Soohyun Kim¹⁴, Akihiro Kondo¹⁵, Erika Lattova¹⁶, Yehia Mechref¹⁸, Eiji Miyoshi¹⁶, Kazuyuki Nakamura¹⁹, Hisashi Narimatsu²⁰, Milos V. Novotny²¹, Nicolle H. Packer⁹, Hélène Perreault¹⁷, Jasna Peter-Katalinić²¹, Gottfried Pohlentz²¹, Vernon N. Reinhold²², Pauline M. Rudd^{6,23}, Akemi Suzuki²⁴, and Naoyuki Taniguchi^{16,25}

²Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health, 840 Murodo-cho, Izumi, Osaka 594-1101, Japan; ³Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia, 315 Riverend Road, Athens, GA 30602-4712; ⁴Department of Biochemistry, Mass Spectrometry Resource, Boston University School of Medicine, 670 Albany Street, Boston, MA 02118-2646; ⁵Division of Molecular Biosciences, Imperial College, London SW7 2AZ, UK; ⁶Department of Biochemistry, Oxford Glycobiology Institute, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3QU, UK; ⁷Institute of Biochemistry, University of Giessen, Friedrichstrasse 24, D-35392 Giessen, Germany; ⁸Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University, Kowakae 3-4-1, Higashiosaka-shi, Osaka 577-8502, Japan; ⁹Proteome Systems Limited, Unit 1, 35-41 Waterloo Road, North Ryde, Sydney, NSW 2113, Australia; ¹⁰Chemistry Department, National University Ireland-Galway, Galway, Ireland; ¹¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan; ¹²Division of Biological Chemistry and Biologics, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kami-yoga, Setagaya-Ku, Tokyo 158-8501, Japan; ¹³Institute of Biological Chemistry, Academia Sinica, Taipei 115, Taiwan; ¹⁴Glycomics Team, Korea Basic Science Institute, 52 Eoun-dong, Daejeon 305-333, South Korea; ¹⁵Department of Glycotherapeutics and ¹⁶Department of Biochemistry, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka 565-0871, Japan; ¹⁷Department of Chemistry, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba R3T 2N2, Canada; ¹⁸Department of Chemistry, Indiana University, Bloomington, IN 47405; ¹⁹Department of Biochemistry and Biomolecular Recognition, Yamaguchi University School of Medicine, Minami-Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan; ²⁰Research Center for Glycoscience (RCG), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Open Space Laboratory Central-2, 1-1-1 Umezono, Tsukuba, Ibaraki 305-8568, Japan; ²¹Institute for Medical Physics and Biophysics University of Münster, Robert-Koch-Str. 31 D-48149, Münster, Germany; ²²Department of Chemistry, University of New Hampshire, Durham, NH 03824; ²³NIBRT, Conway Institute, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland; ²⁴RIKEN Frontier Research System, 2-1 Hirosawa, Wako-shi, Saitama, 351-0198, Japan; and ²⁵Department of Disease Glycomics, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

Received on October 27, 2006; revised on December 25, 2006; accepted on January 2, 2007

Mass spectrometry (MS) of glycoproteins is an emerging field in proteomics, poised to meet the technical demand for elucidation of the structural complexity and functions of the oligosaccharide components of molecules. Considering

the divergence of the mass spectrometric methods employed for oligosaccharide analysis in recent publications, it is necessary to establish technical standards and demonstrate capabilities. In the present study of the Human Proteome Organisation (HUPO) Human Disease Glycomics/Proteome Initiative (HGPI), the same samples of transferrin and immunoglobulin-G were analyzed for *N*-linked oligosaccharides and their relative abundances in 20 laboratories, and the chromatographic and mass spectrometric analysis results were evaluated. In general, matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) time-of-flight MS of permethylated oligosaccharide mixtures carried out in six laboratories yielded good quantitation, and the results can be correlated to those of chromatography of reductive amination derivatives. For underivatized oligosaccharide alditols, graphitized carbon-liquid chromatography (LC)/electrospray ionization (ESI) MS detecting deprotonated molecules in the negative ion mode provided acceptable quantitation. The variance of the results among these three methods was small. Detailed analyses of tryptic glycopeptides employing either nano LC/ESI MS/MS or MALDI MS demonstrated excellent capability to determine site-specific or subclass-specific glycan profiles in these samples. Taking into account the variety of MS technologies and options for distinct protocols used in this study, the results of this multi-institutional study indicate that MS-based analysis appears as the efficient method for identification and quantitation of oligosaccharides in glycomic studies and endorse the power of MS for glycopeptide characterization with high sensitivity in proteomic programs.

Key words: *N*-linked/transferrin/immunoglobulin/mass spectrometry/glycopeptide

Glycosylation is a common posttranslational modification, providing a highly diverse structure variation to more than half of all secretory and cellular proteins (Apweiler et al. 1999). Several lines of evidence have indicated that attachment of a specific monosaccharide to core glycans or branches changes glycoprotein function, and the resulting transformation of cellular phenotypes is suggested to be involved in various biological or pathological processes such as cancer, infection, and reproduction (Taniguchi et al. 2001; Hakomori 2002; Helenius and Aebi 2004). From a pharmacological point of view, glycosylation profoundly affects biological activity, function, clearance from the circulation, and crucially the antigenicity of recombinant proteins (Brooks 2004; Jefferis 2005). Increasing knowledge of the biological significance of glycosylation has resulted from the development of analytical

¹To whom correspondence should be addressed; e-mail: waday@rnc.h.pref.osaka.jp

methods, among which mass spectrometry (MS) is an essential tool as it allows rapid and high sensitivity profiling and detailed characterization of heterogeneous glycan structures. In fact, in recent years, mass spectrometric analysis by soft ionization techniques, electrospray ionization (ESI) or matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI), has been employed in most studies of oligosaccharide structure (Harvey 1999; Dell and Morris 2001; Mechref and Novotny 2002; Zaia 2004).

The capability of MS and data interpretation is based on various instrumental factors. For example, the physicochemical properties such as charge and internal energy of generated ions are largely dependent on the ionization methods employed. Different types of mass analyzers have specific time frames for detection and this affects the fragmentation patterns observed in the mass spectrum. Moreover, there are still other factors to consider with oligosaccharides such as derivatization, ion polarity and the nature of ion species derived from protonation and deprotonation, alkali-metal cations, and different anion adduction. Although all of these factors affect, to varying extents, the relative intensities of the molecular ions for different oligosaccharide structures, it is also true that good quantitation can be expected with appropriately designed measurements, as already reported (Viseux et al. 2001). While detailed reviews of current mass spectrometric techniques and analysis workflow are available, the emerging need for rapid and sensitive analysis of glycoprotein glycans makes it desirable to compare the performance of standard method(s). To this end, the Human Proteome Organisation (HUPO) Human Disease Glycomics/Proteome Initiative (HGPI) has formed a consortium with expertise in glycobiology and has distributed *N*-glycosylated protein samples, transferrin and immunoglobulin-G (IgG) from healthy individuals to participating members for analysis. The released oligosaccharides were analyzed by MS or conventional chromatography, and in some cases, glycopeptides obtained by enzymatic proteolysis were also analyzed by MS. This report describes these analyses of glycoprotein glycans, focusing mainly on relative quantitative profiling of structural heterogeneity.

Results

The laboratories enrolled in this study analyzed released oligosaccharides or glycopeptides, or both. The methods are summarized in Table I (The laboratory numbers designated in Table I and the succeeding figures are not the same as those given to the authors in the title.).

Human transferrin contains two *N*-linked complex type oligosaccharides at Asn-432 and Asn-630 (Spik et al. 1975). Human IgG has a conserved *N*-linked glycosylation site, Asn-297, in the heavy chain of the fragment crystallizable (Fc) region, with variable glycosylation in the fragment antigen binding (Fab) depending on the presence or absence of the glycosylation motif in the variable region. The oligosaccharides attached within the Fc region are of a complex type (Takahashi et al. 1987), showing higher heterogeneity than transferrin, and were the subject of this study.

For transferrin, the evaluation was primarily focused on the *N*-acetylneuraminic (sialic) acid levels. Sialic acids are major residues giving negative charge to the molecule and play a

key role in various biological processes such as infection and cellular communication. The rather labile glycosidic linkage of sialic acid to the oligosaccharide chain can be cleaved during sample preparation or analysis, thus making quantitation difficult. For IgG, galactosylation levels were evaluated because of the possible alterations implicated in pathological conditions (Axford 1999). In these respects, detection of minor glycans, specifically, the fucosylation and triantennary branching of the transferrin glycans and the bisecting *N*-acetylglucosamination of IgG glycans, was evaluated.

In addition, in the glycopeptide analysis, different oligosaccharide profiles at two glycosylation sites of transferrin and those of different IgG subclass molecules were identified.

Chromatographic analysis

Chromatography of reductively aminated oligosaccharides is generally accepted as a standard method of quantitation, in which the fluorescence correlates with the amounts of individual components. In the present study, five laboratories carried out this type of analysis utilizing 2-aminopyridine, 2-amino-benzamide, or 2-aminobenzoate, as the labeling agent (Table I), and the results were compared with those obtained by MS.

The chromatographic measurements of the oligosaccharides from sample A transferrin are shown in Figure 1A (labs 1–4), in which the relative abundances of differently sialylated biantennary chains and trisialo-triantennary and fucosylated disialo-biantennary chains in the total oligosaccharides are presented. One laboratory (lab 1) discriminated the monosialo-biantennary isomers bearing a sialic acid at either antenna, and the values were summed for data presentation. In labs 1–4, the levels of monosialo- and disialo-biantennary, fucosylated disialo-biantennary, and trisialo-triantennary chains were 7.6 ± 7.0 , 70.8 ± 12.3 , 5.1 ± 2.9 , and 9.7 ± 7.5 [mean \pm standard deviation (SD), %] respectively, apparently showing a considerable variance among reports. No laboratories detected significant amounts of asialo-biantennary chain.

A majority of IgG oligosaccharides are of the fucosylated biantennary type, and are partially galactosylated. The contents of each differently galactosylated species among total fucosylated biantennary oligosaccharides from sample B IgG were calculated and are shown in Figure 2A (labs 1–5). Two laboratories (labs 1 and 5) discriminated the isomers with a galactose at either antenna, and the values were combined and represented by the monogalactosyl species. The most abundant structure was the monogalactosyl form, in three reports, whereas it was either agalactosyl or digalactosyl species in other laboratories. The number of galactose residues in a fucosylated biantennary oligosaccharide from this sample ranged from 0.82 (lab 3) to 1.59 (lab 4), and had a mean of 1.16 ± 0.28 for the five laboratories (Table II). The relative abundance of the monogalactosylated/fucosylated species with versus without bisecting *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) ranged from 2.2 to 3.4% in three laboratories (labs 1, 4, and 5), whereas others overestimated abundance or did not present the data due to insufficient separation of the oligosaccharides with or without bisecting GlcNAc.

MS of oligosaccharides

MS of oligosaccharides was carried out with MALDI or liquid chromatography (LC)/ESI MS (Table I). The former was

Table 1. Methods of glycoprotein glycan analysis

Lab ^a	Analyte/ derivatization	Methods of separation and quantitation	Ion polarity, TOF mode, MALDI matrix	Supportive or supplemental measurements and others
Lab 1	Os/PA	AE/RP/NP-LC/FL		
Lab 2	Os/PA	NP-LC/FL		Structure verification by LC/ESI MS (- ion)
Lab 3	Os/AA	NP-LC/FL		Structure verification by MALDI linear TOF MS (- ion, DHB)
Lab 4	Os/AB	NP-LC/FL		Structure verification by MALDI linear TOF MS (+ ion, DHB)
	Gp	MALDI TOF MS	+ ion, linear, CHCA	Qualitative data only
Lab 5	Os/AB	NP-LC/FL		
	Os/none	MALDI TOF MS	+ ion, DHB	Exoglycosidase digestion followed by ESI MS/MS (- ion) for linkage analysis. Transferrin not examined
Lab 6	Os/perMe	MALDI TOF MS	+ ion, ref, DHB	Glycosyl composition by GC/MS
Lab 7	Os/perMe	MALDI TOF MS	+ ion, ref, DHB	ESI TOF MS
Lab 8	Os/perMe	MALDI TOF MS	+ ion, ref, DHB	Detailed structures by ESI MS/MS (+ ion)
	Gp	RP-LC/ESI MS/MS	+ ion	Structural analysis and mostly qualitative data
Lab 9	Os/perMe	MALDI TOF MS	+ ion, ref, DHB	Detailed structures by MALDI MS/MS (+ ion)
	Gp	RP-LC/ESI MS/MS	+ ion	Data submission of each single sample for transferrin and IgG
Lab 10	Os/PH	MALDI TOF MS	+/- ion, ref, DHB	Data submission of each single sample for transferrin and IgG
Lab 11	Os/perMe	MALDI TOF MS	+ ion, ref, DHB	Structure verification by esi ms (+/- ion) and detailed structures by ESI MS ^a (+ ion) for underivatized Os
Lab 12	Os/perMe	MALDI TOF MS	+ ion/ref/DHB	
	Gp	RP-LC/ESI MS/MS	+ ion	Qualitative data only
Lab 13	Os/PA	MALDI TOF MS	+ ion, DHB	Detailed structures by MALDI MS ^a (+ ion)
Lab 14	Os/none	MALDI TOF MS	+/- ion, ATT/DHB	- ion for sialylated Os. Transferrin not examined
Lab 15	Os/NaBH ₄	Gr-LC/ESI MS/MS	- ion (Tf), + ion (IgG)	
	Gp	RP-LC/ESI MS/MS	+ ion	
Lab 16	Os/NaBH ₄	Gr-LC/ESI MS/MS	- ion	
Lab 17	Gp	MALDI TOF MS	+ ion, linear, DHB	
Lab 18	Gp	RP-LC/ESI MS/MS	+ ion	Structural analysis and mostly qualitative data
Lab 19	Gp	RP-LC/ESI MS/MS	+ ion	Structural analysis and mostly qualitative data
Lab 20	Gp	MALDI TOF MS	+ ion	Qualitative data only

^aThe laboratory numbers are not the same as those given to the authors.

AA, aminobenzoic acid; AB, aminobenzamide; AE, anion-exchange; ATT, 6-aza-2-thiothymine; DHB, 2,5-dihydroxybenzoic acid; FL, fluorescence; Gp, glycopeptides; Gr, graphitized carbon; NP, normal phase; Os, released oligosaccharides; PA, pyridylamination; perM, permethylation; PH, phenylhydrazine; RP, reversed phase; ref, reflectron; Tf, transferrin; +/- ion, positive/negative ion.

employed by many laboratories, most of which derivatized by permethylation prior to analysis. Permethylation stabilizes the sialic acid residues by converting them to methyl esters, thus preventing sialic acid loss while also improving the efficiency of positive ion formation.

Transferrin

The results of sample A transferrin with attention to the sialylation of biantennary oligosaccharides and the minor glycans with triantennary branching or fucosylation are summarized in Figure 1A (labs 6–13, 15, and 16), and a typical MALDI time-of-flight (TOF) mass spectrum of permethylated oligosaccharides is shown in Figure 3. SDs of the data provided by two laboratories, lab 12 ($n = 7$) and lab 16 ($n = 2$), were small especially for the combination of permethylation and

MALDI MS (lab 12). The abundance of monosialylated species was $11.0 \pm 5.1\%$ (mean \pm SD) in seven laboratories using a combination of permethylation and MALDI MS, a little higher than the results obtained with chromatography (Figure 1B). Four laboratories had levels below 15% for the monosialylated chain, whereas the higher levels obtained by others (labs 10–12) were probably due to sialic acid loss during sample preparation. The (fully sialylated) triantennary oligosaccharide level ranged from 0 to 5.6%, apparently lower than the chromatographic data, and two laboratories (labs 6 and 10) failed to detect this oligosaccharide. The fucosylated oligosaccharide in seven laboratories (labs 6–12) ranged from 0 to 9.2%, comparable to the chromatographic results. One laboratory (lab 12) repeated the measurement for the same sample and reported good intra-assay coefficients

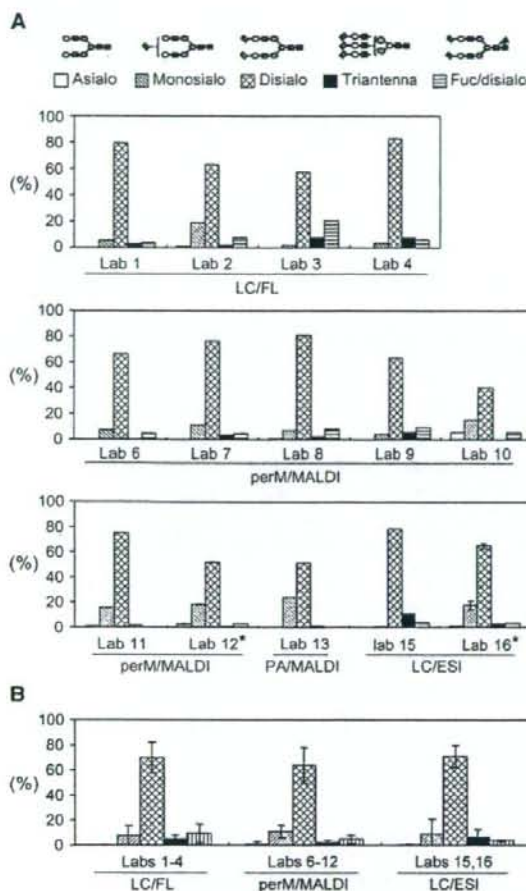


Fig. 1. Relative quantities of transferrin oligosaccharides from sample A. The amounts of all glycoforms in total oligosaccharides are presented. Abbreviations are those presented in Table 1. (A) The laboratory numbers for the data are not the same as the numbers given to the authors. (*) The error bars representing SD from repeated measurements by lab 12 ($n = 7$) and lab 16 ($n = 2$) show intra-assay variance. The SDs of lab 12 were quite small. (B) Comparison of the quantitation by different methods. The data from different laboratories were averaged: chromatography ($n = 4$), a combination of permethylation and MALDI MS ($n = 7$), and LC/ESI MS ($n = 2$). Lab 5 was excluded from the calculation (see text). The error bars representing SD indicate inter-laboratory, or inter-assay, variance.

of variation (CVs) less than 5% for either oligosaccharide. One laboratory applied pyridylaminated oligosaccharides to MALDI TOF MS, which showed significant sialic acid loss. LC/ESI MS was employed by two laboratories (labs 15 and 16), and the results were a little different from each other with respect to the levels of monosialo and triantennary species. In most measurements employing MALDI MS or LC/ESI MS, the fucosylated species was more abundant than the triantennary branching species, consistent with the chromatographic data. In summary, the results from three

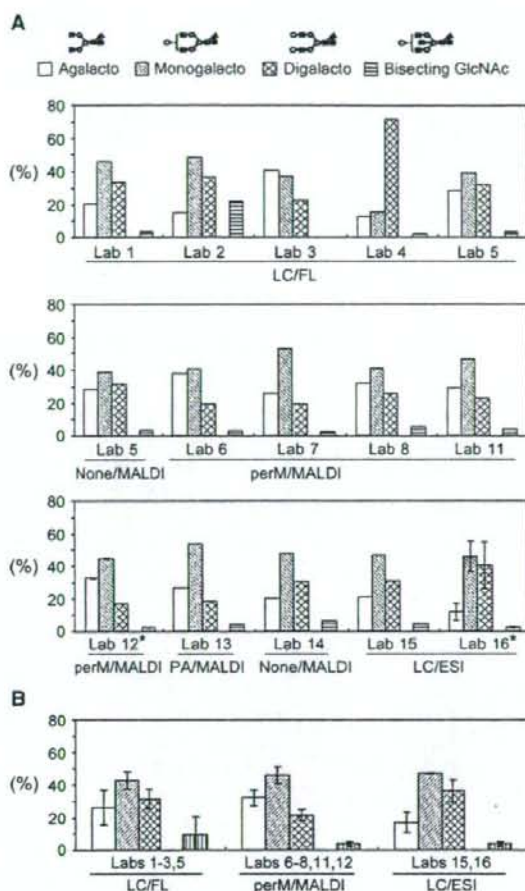


Fig. 2. Relative quantities of IgG oligosaccharides from sample B. Three bars on the left, for each laboratory, show the relative abundance of differently galactosylated species as a percentage of the total. That for monogalactosylated biantennary oligosaccharide bearing bisecting GlcNAc represents the content of total oligosaccharides identified. (A) The laboratory numbers for the data are not the same as the numbers given to the authors. (*) The error bars representing SD from repeated measurements by lab 12 ($n = 7$) and lab 16 ($n = 2$) show intra-assay variance. The SDs of lab 12 were quite small. (B) Comparison of the quantitation by different methods. The data from different laboratories were averaged: chromatography ($n = 4$), a combination of permethylation and MALDI MS ($n = 5$), and LC/ESI MS ($n = 2$). Lab 4 was excluded from the calculation. The error bars representing SD indicate inter-laboratory, or inter-assay, variance.

different methods, which were carried out in different laboratories, were similar to each other as shown in Figure 1B.

IgG

The results for sample B IgG are presented in Figure 2A (labs 5–8, 11–16), with attention to the galactosylation levels as well as the minor component, monogalactosylated biantennary oligosaccharide bearing bisecting GlcNAc. Galactosylation in this sample was evaluated according to the relative abundance

Table II. Galactosylation levels of different IgG samples (mol)

		A	B	C
Lab 1	Chromatography	0.91	1.13	1.14
Lab 2	Chromatography	1.15	1.21	1.31
Lab 3	Chromatography	0.74	0.82	0.94
Lab 4	Chromatography	1.54	1.59	1.69
Lab 5	Chromatography	0.95	1.03	1.10
Lab 5	MALDI	0.71	0.83	0.87
Lab 6	MALDI	0.77	0.81	0.95
Lab 7	MALDI	0.73	0.93	1.05
Lab 8	MALDI	0.86	0.94	1.04
Lab 11	MALDI	0.97	0.94	1.07
Lab 12	MALDI	0.76	0.84	0.96
Lab 13	MALDI	0.89	0.91	0.96
Lab 14	MALDI	0.95	1.10	0.96
Lab 15	LC/ESI MS	1.10	1.10	1.25
Lab 16	LC/ESI MS	1.20	1.29	1.32
	Mean	0.95	1.03	1.11
	SD	0.22	0.21	0.21

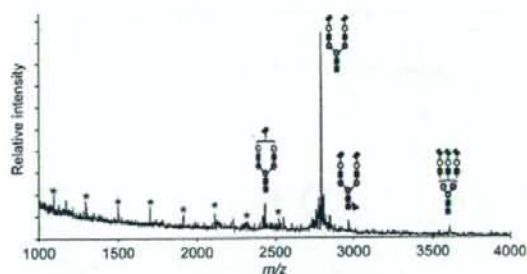


Fig. 3. MALDI mass spectrum of permethylated oligosaccharides from sample A transferrin. Oligosaccharides released by PNGase F were permethylated, and analyzed by MALDI TOF MS in positive ion and reflectron mode. The signals from polyhexose as an internal calibrant are indicated by asterisks. The mass spectrum was provided by lab 7.

of three major species as a percentage of the total. Repeated measurements were performed in labs 12 and 16. The CVs in lab 12 with permethylation and MALDI MS were quite small. SDs of the measurement by lab 16 were exceptionally large for this specific sample, but the CVs for these species were less than 10% for samples A and C in the same laboratory. With either MALDI or LC/ESI MS, the most abundant *N*-linked oligosaccharide from sample B IgG was monogalactosylated species by both MALDI and LC/ESI MS. The galactosylation levels calculated from the MALDI MS measurements ranged from 0.80 to 1.10 (0.93 ± 0.10) mol per fucosylated biantennary oligosaccharide chain, but those calculated from LC/ESI MS measurements (1.10 and 1.29 mol) were slightly higher (Table II). The relative levels of the monogalactosylated and fucosylated glycan bearing bisecting GlcNAc calculated by mass spectrometric

measurements were within the range of 2.2–14.0% of total oligosaccharides, which was comparable to that obtained by chromatography. Similarly to the transferrin study described above, the results on IgG oligosaccharides from three different methods were comparable with each other (Figure 2B). Typical mass spectra of permethylated oligosaccharides are shown in Figure 4.

Reproducibility of MALDI MS quantitation of permethylated oligosaccharides

Reproducibility of MALDI MS quantitation was evaluated by a supplementary experiment carried out in one laboratory (lab 17), where sample B (0.3 mg) was divided into three portions and each sample was separately subjected to permethylation followed by MS.

The CVs of the five repeated measurements, or intra-assay CV, were less than 10% (1.3–8.8% for three major oligosaccharide species and 12–34% for the minor one (Table III)). The inter-assay CV was 0.1–4.2% for major species and 13% for the minor one. In this experiment, the sensitivity for small components was approximately 0.4% of their proportion among total oligosaccharides, when defined by the detection of ions with a signal-to-noise ratio of more than 2.

MS of glycopeptides

Nine laboratories performed MS of glycopeptides, and seven presented qualitative data or quantitative results for a single sample. Two laboratories presented sufficient, as well as remarkable, data with LC/ESI MS/MS (lab 15) or MALDI TOF MS (lab 17).

First, the difference between the oligosaccharide profiles at the two glycosylation sites of transferrin was revealed as shown in Figure 5A, where the levels of fucosylation and triantennary branching of transferrin were higher for the oligosaccharide attached to Asn-630 than for that attached to Asn-432, and this site-specific oligosaccharide profile difference was quite consistent between the results from these two laboratories. As shown by the MALDI TOF mass spectra in Figures 5B and C, the heterogeneity of oligosaccharide structures was more obvious at Asn-630, whereas a very low level of fucosylation could be identified in the Asn-432 oligosaccharides by tandem MS of the ion observed at m/z 3830 (data not shown). In addition, the level of fucosylated biantennary oligosaccharide exceeded that of the triantennary oligosaccharide, consistent with the chromatographic or mass spectrometric analyses of the released oligosaccharides. On the other hand, sialic acid loss was observed in the glycopeptide ions generated by MALDI. Good reproducibility was reported by lab 17 (Figure 5A).

Serum IgG is polyclonal and is thus a mixture composed of different primary protein structures. The amino acid sequence of the tryptic peptide involving the *N*-glycosylation site Asn-297 is heterogeneous; and EEQYNSTYR and EEQFNSTFR representing two subclass molecules, IgG1 and IgG2, respectively, are abundant. In this study, three IgG samples (A, B, and C) from different individuals were analyzed. The relative abundances of subclass molecules were estimated as 1/3, 1/4, and 2/1 (IgG1/IgG2), for samples A, B, and C, respectively, on the basis of the total intensities of the corresponding groups of ions in the MALDI linear TOF mass spectra of enriched glycopeptides (Supplementary Figure 1). The

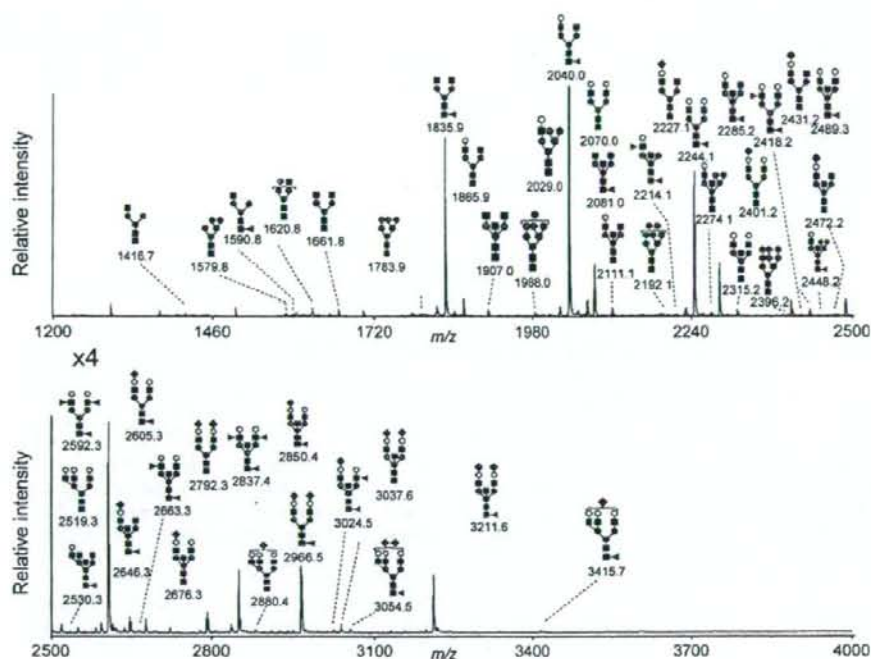






Fig. 4. MALDI mass spectra of permethylated oligosaccharides from sample B IgG. The mass spectrum was provided by lab 8.

Table III. Reproducibility of quantitation by MALDI MS of permethylated oligosaccharides

IgG sample B	 (%) ^a	 (%) ^a	 (%) ^a	 (%) ^a
1 (n = 5)	38.9 ± 2.5	44.4 ± 1.4	16.7 ± 1.5	0.91 ± 0.32
2 (n = 5)	37.7 ± 1.1	44.5 ± 0.7	17.8 ± 0.9	0.84 ± 0.14
3 (n = 5)	37.3 ± 0.5	44.5 ± 0.8	18.1 ± 0.4	1.08 ± 0.13

^aRelative abundance as a percentage of the total of these major species.

^bProportion among total oligosaccharides.

amino acid sequences of these glycopeptide ions were verified by tandem MS in a separate experiment (data not shown). The galactosylation levels of IgG1 or IgG2 for each sample were calculated from the corresponding signals observed in the LC/ESI or MALDI mass spectrum (Supplementary Figure 2A) and summarized in Table IV. The results from these independent analyses were consistent, i.e., the agalacto species was more abundant than the digalactosylated species in the IgG2 from samples A and B, but not in the IgG1 from sample C. The oligosaccharides on the major subclass molecules, IgG2 for samples A or B, and IgG1 for sample C, should contribute more to the global glycan profiles of total IgG in each sample. The results from the MS of IgG glycopeptides were quite consistent with the chromatographic or mass spectrometric measurements of the corresponding released oligosaccharides (Supplementary Figure 2B). Hypogalactosylation of IgG2 relative to IgG1 is

not a common finding among different individuals (unpublished observation by YW).

The levels of minor glycans with bisecting GlcNAc in the major IgG subclass molecules were comparable between LC/ESI MS and MALDI MS (data not shown). The numbers of oligosaccharide structures identified as constituting more than 1% of the total oligosaccharides from sample B IgG were compared by different methods. Fifteen structures were seen by lab 1 using chromatography, 9 and 14 by lab 7 and lab 8, respectively, analyzing permethylated oligosaccharides with MALDI MS, 15 by LC/ESI MS of glycopeptides and 10 by MALDI TOF MS of glycopeptides (Supplementary Figure 3), indicating glycopeptide analysis to be sufficiently sensitive to detect minor glycans on IgG. No significant amounts of glycopeptides derived from other regions of IgG were found in these samples.

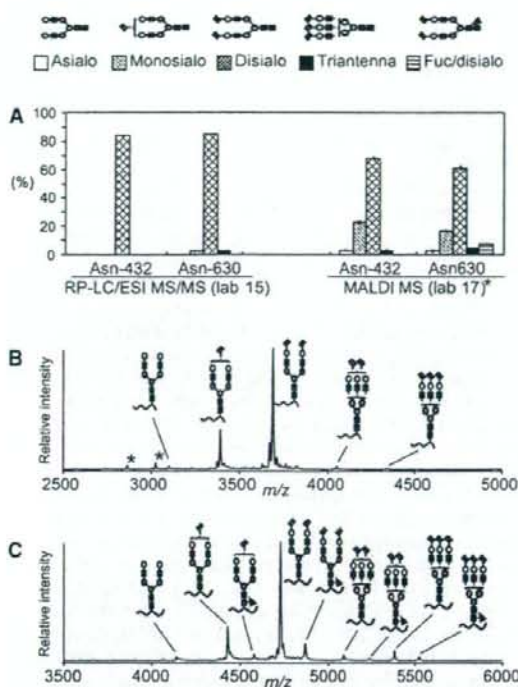


Fig. 5. Mass spectrometric analysis of glycopeptides for site-specific glycan profiling of sample A transferrin. (A) Relative abundances of the oligosaccharides at each *N*-glycosylation site measured by RP-LC/ESI MS/MS (lab 15) or MALDI linear TOF MS of tryptic glycopeptides (lab 17). (*) The error bars representing SD from repeated measurements by lab 17 ($n = 5$) show intra-assay variance. (B, C) MALDI mass spectra of tryptic glycopeptides. The glycopeptides containing Asn-432 (B) or Asn-630 (C) were isolated by reversed phase chromatography and analyzed by MALDI linear TOF MS (lab 17). The ions indicated by asterisks are derived from the glycosidic cleavage during measurements.

Discussion

Oligosaccharides

The chromatographic quantitation of the reductively aminated oligosaccharides showed a significant variance among laboratories, despite the fact that the method has been accepted as established. Whether or not labeling efficiency is uniform for different glycan structures and/or different fluorescent aromatic amines remains unclear, but the variance seems to be attributable to the use of different reaction protocols, which can result in incomplete derivatization. In addition, the insufficient separation of specific glycans, e.g., those with or without bisecting GlcNAc, resulted in a considerable variation in the quantitation (Figure 2B), while the chromatographic method discriminates isomers, e.g., monogalacto species bearing a galactose at either antenna in IgG.

It is generally accepted that MS does not allow real quantitation for oligosaccharides unless stable isotope-labeled analogs are incorporated as internal standards. In this multi-institutional study, analyzing the same transferrin and IgG glycoprotein samples, however, MS has yielded quite comparable

Table IV. Galactosylation levels of different IgG subclass molecules (mol)

		A	B	C
Lab 15	IgG1	0.85	0.97	1.07
	IgG2	0.89	0.79	0.99
Lab 17	IgG1	Not determined	Not determined	1.16
	IgG2	0.90	0.91	Not determined

results with chromatography in the (relative) quantitation of oligosaccharides (Figures 1B and 2B). For MALDI, especially, the in-source and postsource decay of glycans are so well-known that one suspects it would be too difficult to detect their intact structures. Parameters such as laser wavelength and power, extraction voltages, and "hot" or "cool" matrices directly influence the internal energy of generated ions and the resulting fragmentation (Harvey 1999). Furthermore, the distribution of molecular species in complex glycan mixtures within the matrix spot on the target depending on sample preparation is also a critical point and sufficient "averaging" of laser shots is essential. However, there are publications describing good quantitation of oligosaccharides based on the signal intensities observed in the MALDI mass spectrum (Harvey 1993; Garozzo et al. 1994). Indeed, a comparative study of the signal intensities generated from a mixture of equimolar amounts of various *N*-linked glycans did not show any significant difference for compounds with molecular masses over about 1 kDa (Naven and Harvey 1996). In the present study, although different MALDI TOF instruments were used, the analytical parameters, such as the type of laser (nitrogen that emits at 337 nm), the choice of matrix (2,5-dihydroxybenzoic acid, DHB), the type of ion species for permethylated oligosaccharide detection (sodium-adduct ions $[M+Na]^+$), and the mode of TOF analysis (reflectron) were the same among the laboratories and yielded consistent results. In MALDI MS, the ions generated by hundreds of laser shots, each of which produces one mass spectrum, are accumulated from different points of laser irradiation. The procedure makes the reproducibility excellent in the repeated measurements by lab 12 and in the supplemental experiment, and the inter-assay reproducibility in the same laboratory was also quite good (Table III).

Regarding the determination of sialylation levels, the glycosidic linkage of sialic acid is susceptible to prompt (in-source) decay in the MALDI process, and the sialic acid-substituted oligosaccharides are likely to decompose in the flight tube in the TOF instrument as well. In addition, the number of sialic acids affects the relative ionization efficiencies (Sutton et al. 1994). Consequently, the signal intensity of underivatized sialylated oligosaccharides in the MALDI mass spectrum cannot be directly related to concentration as shown by the results obtained by lab 13 for oligosaccharides only derivatized at the reducing end by aminopyridine (Figure 1). Permethylated, which has been used for more than 40 years in order to modify hydroxyl groups of sugars (Hakomori 1964; Ciucanu and Kerek 1984; Ciucanu and Cotello 2003) methylates the carboxylic acid group of the sialic acid to produce a neutral sugar, whereupon esterified sialic acid loss is avoided and the ionization efficiency becomes equivalent to that of natively neutral oligosaccharides. In addition, this type