

糖鎖含有タンパク製剤の評価試験法に関する研究 (IV)

- エリスロポエチン製剤 その4

太田美矢子[#], 川崎ナナ, 伊藤さつき, 早川堯夫

Study on evaluating methods for the quality control of glycoprotein products. (IV)

- Erythropoietin products. Part 4

Miyako Ohta[#], Nana Kawasaki, Satsuki Itoh and Takao Hayakawa

We have previously reported on peptide mapping of recombinant human erythropoietin (rhEPO) by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). Using this method, both peptides and glycosylation at each glycosylation site can be elucidated based on the mass chromatogram and mass spectrum. In this study, we evaluated the mass spectrometric peptide mapping with regard to its use in comparability assessment of both protein parts and carbohydrates parts in glycoprotein products. Models of closely related glycoprotein products used in this study are rhEPOs produced from three different sources. We demonstrated that the mass spectrometric peptide mapping can elucidate the identity of protein part, and differences in site-specific carbohydrates heterogeneity due to acetylation and sulfation among the three rhEPOs. Our method can thus be useful in comparability assessment of therapeutic glycoproteins.

Keywords: peptide mapping, LC/MS, erythropoietin, comparability

緒言

近年、バイオテクノロジーを応用した医薬品の開発がめざましく進展し、多くの糖タンパク質が医薬品として製造・販売されている。遺伝子組換えにより産生された糖タンパク質性医薬品の場合、完全に人為的制御が不可能な生きた細胞による生合成過程を利用していることから、生産物であるタンパク質に分子構造的な不均一性が発生する可能性がある。また、仮に挿入遺伝子により単一のタンパク質に翻訳されたとしても、糖鎖部分の構造は、産生細胞が有する糖転移酵素群の発現状況等に依存するため、産生細胞の種類、発現方法、培養条件などの要因により変化することが知られている。糖鎖部分は生物活性、体内動態、溶解性及び安定性に関与していることが明らかにされていることから¹⁾⁻³⁾、糖タンパク質性医薬品の製造方法を変更した場合、新旧医薬品のタンパク質部分及び複雑な糖鎖部分の構造の同等性/同質性 (comparability) を正しく評価することは重要である。しかし、糖鎖部分には、単糖組成、分岐構造、結合様式、及び硫酸基やアセチル基などによる修飾などの違いによ

る不均一性が存在し、これらを簡便かつ迅速に解析するのは容易ではない。従って、タンパク質部分だけでなく、糖鎖部分の構造の同等性/同質性を簡便かつ詳細に解析する方法の開発が望まれている。

エリスロポエチン (EPO) は腎臓で産生される赤血球前駆細胞の分化増殖を調節する糖タンパク質であり、組換え型ヒトEPO (rhEPO) が貧血を治療する薬として利用されている。EPOは165個のアミノ酸から成り、3本のN-結合糖鎖 (Asn24, Asn38及びAsn83) 及び1本のO-結合糖鎖 (Ser126) が結合している。さらに、これらの糖鎖はEPOの生物活性や体内挙動に、深く関与していることが報告されている^{4), 5)}。

我々は、糖タンパク質のタンパク質部分の構造及び部位特異的糖鎖不均一性を同時に解析するために、rhEPOをモデル糖タンパク質として用いて、LC/MSを用いたペプチドマッピング法を検討し、ペプチドマッピングは糖タンパク質のペプチドの確認、及び各糖鎖結合部位に付加している糖鎖の不均一性解析に有用であることを確認している^{6), 7)}。この分析法は、糖鎖の誘導体化及び精製過程を必要とせず、簡便かつ迅速にタンパク部分及び糖鎖部分の構造と不均一性を詳細に解析できることから、異なった産生細胞、発現方法、培養条件によって産生された糖タンパク質の糖鎖部分の同等性/同質性評価にも応用できるものと期待される。本研究では、製造方

[#] To whom correspondence should be addressed; Miyako Ohta; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141; Fax: 03-3700-6950; E-mail: ohta@nihs.go.jp

法の異なる3種類のrhEPOを類似構造を持つ糖タンパク質のモデルとして用いて、ペプチドマッピングによりrhEPOのペプチド部分及び糖鎖部分の同時解析を行い、同等性/同質性評価におけるLC/MSを用いたペプチドマッピング法の有用性を評価した。

実験方法

1) 試薬

3種のrhEPOはCHO細胞あるいはBHK細胞で産生し、精製したものを用い、便宜上、EPO-A, B, 及びCとした。Endoproteinase Glu-C (Glu-C) はペーリンガーマンハイム (株) 社製を用いた。

2) 装置

HPLCはFinnigan spectra systemを用いた。

MSはESI-MS (TSQ-7000, Finnigan) を使用した。

3) Glu-CによるrhEPOの消化

rhEPO 1mgを100mM酢酸アンモニウム溶液 (pH8.0)

100 μ lに溶解させた。これにGlu-C 0.25mgを同溶液62 μ lに溶解させたものを加え、37 $^{\circ}$ C, 20時間反応させた。

4) ペプチドマッピング

HPLC

分離カラム:Pegasil ODS (2.1 x 250 mm, センシユー科学 (株))

溶離液A: 0.05%トリフルオロ酢酸 (TFA) を含む水溶液

溶離液B: 0.05% TFAを含む50%アセトニトリル溶液
グラジエントプログラム: 1-90%B液 (0-130分)

試料量: 50 μ l

流速: 0.2ml/min

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

UV検出波長: 206 nm

ESI-MS

測定モード: ネガティブイオンモード

シーガス: 70psi

オグジナリーガス: 10 unit

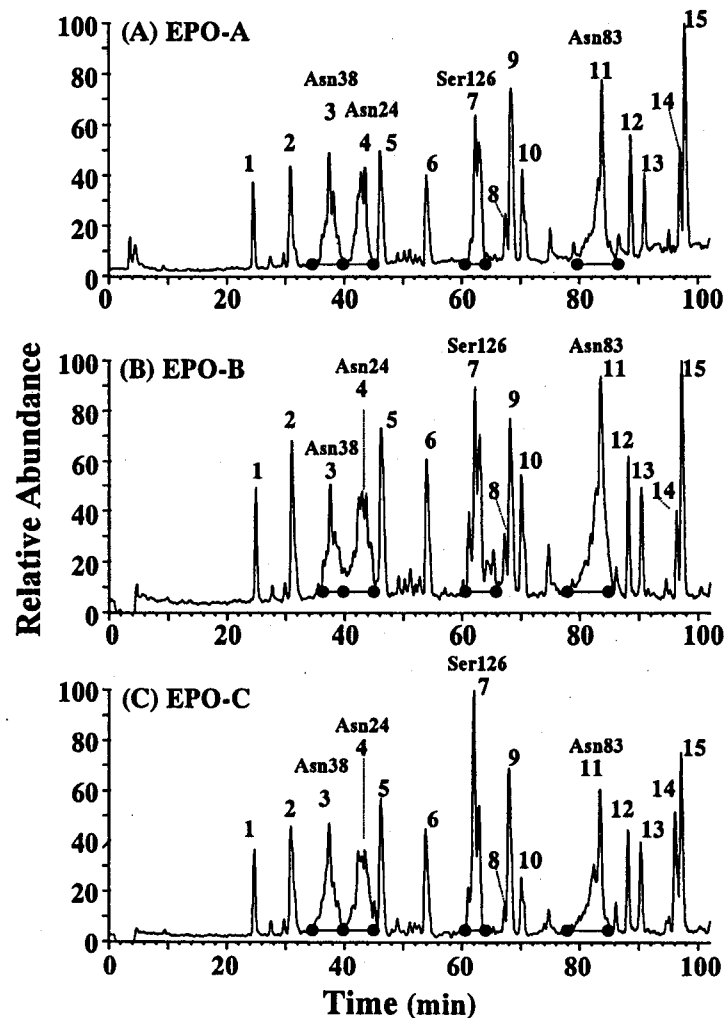


Fig. 1 TIC chromatograms of Glu-C digested EPO-A, EPO-B and EPO-C

キャピラリー温度：225℃
 マルチプライヤー：1,200V
 ESI電圧：4,500V
 スキャン範囲：550-2,400
 スキャン回数：4秒おき

結果

1. ペプチドマッピング

発現細胞の異なる3種のEPOをGlu-Cで消化し、ODSカラムを用いたLC/MSにより、ペプチドマッピングを行った。Fig. 1A, B及びCはそれぞれEPO-A, -B及び-Cのネガティブイオン測定によるtotal ion current (TIC)クロマトグラムである。各クロマトグラム中のピークは、4本の糖ペプチドを含むペプチド断片に由来するピークであり、保持時間の短い順に1から15と番号をつけた。各ピークのマススペクトル中の m/z 値を、アミノ酸配列から計算されるペプチドの理論値と照合した結果、11本のピークの m/z 値は一致し、これらはペプチドであることが確認された。一致しないものは糖鎖による修飾を受けているためと推定された。

2. ペプチド部分の比較

TICクロマトグラム上のペプチドピークをアサインした結果をTable 1に示す。ペプチドは単一ピークとして分離され、そのマススペクトルは1価及び2価イオンとして検出された。ネガティブイオン測定のため、ペプチドによっては1~数本のTFA(平均分子量; 114.0)が付加したピークが検出された。Glu-CはGlu-X及びAsp-Xの間の結合を切断する酵素であり、ピーク1, 2, 5, 6, 9, 12, 14, 15はGlu(Asp)-Xの切断により生じたペプチドであることが確認された。また、Glu-CはSer-X及びGly-Xの結合の一部を切断することが報告されているが^{8), 9)}、ピーク8及び10はこの反応によって、ピーク14から生じたものであり、ピーク13は同様にピーク15から生成したものであることが確認された。以上のように、3つのrhEPOから得られたペプチドマップ中の11個のピークのペプチドを特定することができた。その結果、EPO-A, -B及び-Cのペプチド部分に違いは存在しないことが確認された。

3. 糖ペプチド部分の比較

Fig.1においてペプチドとしてアサインされなかった幅広いピーク、ピーク3, 4, 及び11は、複雑なマススペクトルを示し、これは糖鎖構造の不均一性によるものと考えられた。一例として、EPO-A, -B及び-Cのピーク11のマススペクトルを示す(Fig.2)。これらの複雑なマススペクトルの各イオンは、 m/z 値を各糖ペプチドの理論値と照合することによりTable 2のように帰属する

ことができた。すなわち、ピーク3, 4, 及び11はそれぞれAsn38, Asn24及びAsn83にN-結合糖鎖が付加した糖ペプチドであると同定された。同様に、ピーク7はSer126にO-結合糖鎖が付加した糖ペプチドと特定された(Table 3)。TFAが付加したピークはN-結合糖鎖が結合したペプチドには検出されず、O-結合糖鎖が結合したペプチドにのみ少し検出された。

3-1. EPO-AのN-結合糖鎖

EPO-AのAsn83を含む糖ペプチドのマススペクトル(Fig.2A)を解析した結果、Asn83にはフコースが結合したジ、トリシアロ3本鎖(Tri-NA_{2,3})、モノ、ジ、トリ、テトラシアロ4本鎖糖鎖(Tetra-NA_{1,2,3,4})、ラクトサミン1分子結合ジ、トリ、テトラシアロ4本鎖(Tetra-Lac₁-NA_{2,3,4})、ラクトサミン2分子結合ジ、トリ、テトラシアロ4本鎖(Tetra-Lac₂-NA_{2,3,4})、及びラクトサミン3分子結合トリシアロ4本鎖(Tetra-Lac₃-NA₃)糖鎖が付加していることが確認された(Fig.2A, Table 2)。また、硫酸化糖鎖は観察できず、アセチル化糖鎖も少なかった。

Asn38を含む糖ペプチドには、Asn83と同様に、シアロ3本鎖及びシアロ4本鎖糖鎖、並びに僅かのアセチル化糖鎖の結合が確認された。Asn24には、Asn83と同様にシアロ3, 4本鎖糖鎖の結合が確認されたが、一番大きいイオンピークはフコシル結合ジシアロ2本鎖糖鎖(Bi-NA₂)であった。また、モノシアロ2本鎖糖鎖も確認された(Table 2)。

3-2. EPO-BのN-結合糖鎖

EPO-BのAsn83に結合している主な糖鎖は、EPO-Aと共通のシアロ3, 4本鎖であるが、それら以外にも多数の糖鎖が結合していることが分かった(Fig.2B)。これらのEPO-Aでは認められなかった糖鎖は3価イオンの m/z 値が14ずつ異なっていることから、複数のアセチル基が結合した糖鎖であることが明らかになった。例えば、Tetra-NA₄ではモノ、ジ、トリ、テトラ、ペンタ、ヘキサ、ヘプタ、オクタアセチル結合糖鎖(Ea₁-Ea₈)が観察された。Asn24及びAsn38にはEPO-Aと共通の糖鎖の他に、それぞれに1-3個のアセチル基が付加した糖鎖が結合していた。代表的な糖鎖Tetra-NA₄(E)に対するTetra-NA₄-Ac₁(Ea₁)の含有率は、各糖ペプチドに結合しているEのピーク高さに対するEa₁のピーク高さ比を計算するとき、Asn38, Asn24及びAsn83ではそれぞれ約17%, 27%及び43%であった(Fig.3A)。これらのことから、アセチル化はAsn24やAsn38よりもAsn83に多いことが確認された。

Table 1 Peak number in Fig.1, amino acid residues, and theoretical mass and observed m/z values

Peak No.	Residues	Theoretical mass (average)	Observed m/z		
			EPO-A	EPO-B	EPO-C
1	56-62	729.8	728.5 [M-H] ⁻	728.7 [M-H] ⁻	728.7 [M-H] ⁻
			842.5 [M+TFA-H] ⁻	842.6 [M+TFA-H] ⁻	842.7 [M+TFA-H] ⁻
			956.5 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	956.6 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	956.7 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻
2	9-13	602.7	601.5 [M-H] ⁻	601.5 [M-H] ⁻	601.5 [M-H] ⁻
			715.5 [M+TFA-H] ⁻	715.6 [M+TFA-H] ⁻	715.5 [M+TFA-H] ⁻
			829.5 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	829.6 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	829.6 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻
3 ^a	38-43 (Asn38)				
4 ^a	22-37 (Asn24)				
5	(1-8) S-S (160-165)	1,503.7	1,502.0 [M-H] ⁻	1,502.2 [M-H] ⁻	1,502.2 [M-H] ⁻
			1,616.3 [M+TFA-H] ⁻	1,616.3 [M+TFA-H] ⁻	1,616.3 [M+TFA-H] ⁻
			1,730.3 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	1,731.0 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	1,730.8 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻
6	14-18	692.8	691.6 [M-H] ⁻	691.6 [M-H] ⁻	691.7 [M-H] ⁻
			805.6 [M+TFA-H] ⁻	805.6 [M+TFA-H] ⁻	805.7 [M+TFA-H] ⁻
			919.6 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	919.7 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	919.7 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻
7 ^a	118-136 (Ser126)				
8	137-146 ^b	1,316.6	1,315.2 [M-H] ⁻	1,315.3 [M-H] ⁻	1,315.1 [M-H] ⁻
			1,429.1 [M+TFA-H] ⁻	1,429.9 [M+TFA-H] ⁻	1,429.3 [M+TFA-H] ⁻
			1,543.6 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	1,543.2 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	1,543.3 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻
			1,657.6 [M+(TFA) ₃ -H] ⁻	1,657.2 [M+(TFA) ₃ -H] ⁻	1,657.1 [M+(TFA) ₃ -H] ⁻
			1,771.5 [M+(TFA) ₄ -H] ⁻	1,771.5 [M+(TFA) ₄ -H] ⁻	1,771.8 [M+(TFA) ₄ -H] ⁻
9	44-55	1,572.9	1,571.3 [M-H] ⁻	1,571.2 [M-H] ⁻	1,571.3 [M-H] ⁻
			1,685.6 [M+TFA-H] ⁻	1,685.6 [M+TFA-H] ⁻	1,685.2 [M+TFA-H] ⁻
			1,799.2 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	1,800.1 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	1,799.3 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻
10	147-159 ^b	1,538.8	1,537.2 [M-H] ⁻	1,537.4 [M-H] ⁻	1,537.7 [M-H] ⁻
			1,651.7 [M+TFA-H] ⁻	1,651.6 [M+TFA-H] ⁻	1,651.4 [M+TFA-H] ⁻
			1,765.8 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	1,765.4 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	1,765.5 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻
11 ^a	73-96 (Asn83)				
12	63-72	1,115.3	1,113.9 [M-H] ⁻	1,114.0 [M-H] ⁻	1,114.1 [M-H] ⁻
			1,228.0 [M+TFA-H] ⁻	1,228.0 [M+TFA-H] ⁻	1,228.1 [M+TFA-H] ⁻
13	102-117 ^c	1,770.1	1,768.8 [M-H] ⁻	1,769.1 [M-H] ⁻	1,769.0 [M-H] ⁻
			1,883.2 [M+TFA-H] ⁻	1,882.8 [M+TFA-H] ⁻	1,883.3 [M+TFA-H] ⁻
14	137-159 ^b	2,837.4	1,418.3 [M-2H] ²⁻	1,417.7 [M-2H] ²⁻	1,417.7 [M-2H] ²⁻
			1,474.7 [M+TFA-2H] ²⁻	1,474.4 [M+TFA-2H] ²⁻	1,475.4 [M+TFA-2H] ²⁻
			1,531.6 [M+(TFA) ₂ -2H] ²⁻	1,531.6 [M+(TFA) ₂ -2H] ²⁻	1,531.9 [M+(TFA) ₂ -2H] ²⁻
			1,589.0 [M+(TFA) ₃ -2H] ²⁻	1,588.5 [M+(TFA) ₃ -2H] ²⁻	1,588.9 [M+(TFA) ₃ -2H] ²⁻
			1,645.3 [M+(TFA) ₄ -2H] ²⁻	1,645.8 [M+(TFA) ₄ -2H] ²⁻	1,646.1 [M+(TFA) ₄ -2H] ²⁻
15	97-117 ^c	2,212.6	2,211.4 [M-H] ⁻	2,211.7 [M-H] ⁻	2,212.2 [M-H] ⁻
			2,326.1 [M+TFA-H] ⁻	2,325.9 [M+TFA-H] ⁻	2,326.1 [M+TFA-H] ⁻
			1,105.3 [M-2H] ²⁻	1,105.7 [M-2H] ²⁻	1,105.3 [M-2H] ²⁻
			1,162.8 [M+TFA-2H] ²⁻	1,162.4 [M+TFA-2H] ²⁻	1,162.2 [M+TFA-2H] ²⁻
			1,219.3 [M+(TFA) ₂ -2H] ²⁻	1,219.5 [M+(TFA) ₂ -2H] ²⁻	1,219.2 [M+(TFA) ₂ -2H] ²⁻
			1,276.2 [M+(TFA) ₃ -2H] ²⁻	1,276.2 [M+(TFA) ₃ -2H] ²⁻	1,276.3 [M+(TFA) ₃ -2H] ²⁻
			1,333.2 [M+(TFA) ₄ -2H] ²⁻	1,333.3 [M+(TFA) ₄ -2H] ²⁻	1,333.4 [M+(TFA) ₄ -2H] ²⁻

The peptide contained amino acid residues from 19 to 21 was not detected. TFA, trifluoroacetic acid; ^a, glycopeptides;

^b, the part of peak 14 was hydrolyzed peaks 8 and 10; ^c, the part of peak 15 was hydrolyzed peak 13.

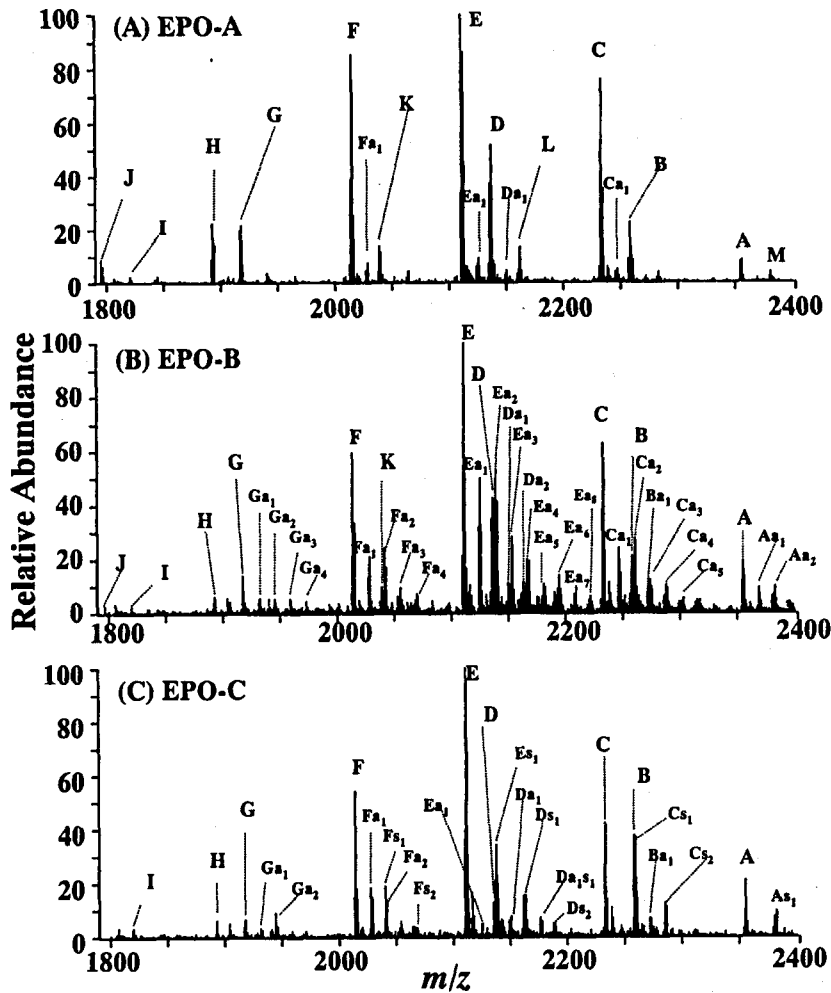


Fig. 2 Mass spectra of Asn83 glycopeptides (peak 11) in EPO-A, EPO-B and EPO-C

A, Tetra-Lac₂-NA₄; B, Tetra-Lac₂-NA₃; C, Tetra-Lac₁-NA₄; D, Tetra-Lac₁-NA₃; E, Tetra-NA₄; F, Tetra-NA₃; G, Tetra-NA₂; H, Tri-NA₃; I, Tetra-NA₁; J, Tri-NA₂; K, Tetra-Lac₁-NA₂; L, Tetra-Lac₂-NA₂; M, Tetra-Lac₃-NA₃; a, acetylated; s, sulfated.

3-3. EPO-CのN-結合糖鎖

EPO-CのAsn83にはEPO-Aと共通のシアロ3, 4本鎖の他に, それらがアセチル化 (Ba₁, Da₁, Da₁s₁, Ea₁, Fa₁₋₂, Ga₁₋₂) または硫酸化 (As₁, Cs₁₋₂, Ds₁₋₂, Da₁s₁, Es₁, Fs₁₋₂) された糖鎖が付加していることが観察された (Fig.2C). アセチル化糖鎖の種類はEPO-Bとは異なり, 非還元末端がシアル酸で飽和されているTetra-NA₄には少なく, 飽和されていないTetra-NA_{2,3}がモノ, ジアセチル化されていることが観察された. Tetra-NA₃ (F) に対するTetra-NA₃-Ac₁ (Fa₁) の含有率は, Asn38, Asn24及びAsn83ではそれぞれ約48%, 91%及び19%であり, Asn24にはFa₁がFと同程度結合していることが分かった (Fig.3B). また, Asn24に結合しているBi-NA₁, Tri-NA₂, 及びTetra-Lac₁-NA₃のモノアセチル化糖鎖は非アセチル化糖鎖の, それぞれ約2.6, 3.5及び0.9倍であることが確認された.

Fig.2CにはEPO-A及びEPO-Bでは検出されないピ

ークEs₁が検出された. ピークEs₁のm/z値は2137.9であり, Tetra-NA₄ (E) の3価イオンのm/z値より26.5増加していることから, モノ硫酸化糖鎖であることが明らかになった. Es₁はAsn24には含まれておらず, Eに対するEs₁の含有率は, Asn38及びAsn83ではそれぞれ約20%及び37%であった (Fig.3C). Tetra-NA₄以外に, Tetra-NA₃, Tetra-Lac₁-NA₃, Tetra-Lac₁-NA₄及びTetra-Lac₂-NA₄にも硫酸化が認められた (Table 2).

3-4. Ser126のO-結合糖鎖

Ser126を含む糖ペプチドのマスペクトルから3種のEPOには共通してNA₂-Gal-GalNAc及びNA-Gal-GalNAcが結合していることが確認された. また, Fig.1のピーク7の形状がEPO-Bのみ異なっているが, それは共通ピーク以外に, それらのモノ, ジアセチル化糖鎖が結合していることに起因することが確認された (Table 3).

Table 2 Structural assignments of N-linked glycopeptides peaks in Fig 1, and the theoretical masses and observed m/z values

Glycoform ^a	Peak 3 (Asn38 glycopeptide)				Peak 4 (Asn24 glycopeptide)				Peak 11 (Asn83 glycopeptide) ^b							
	Theoretical Charge		Observed m/z		Theoretical Charge		Observed m/z		Theoretical Charge		Observed m/z					
	mass ^c	state	EPO-A	EPO-B	EPO-A	EPO-B	EPO-C	EPO-C	mass ^c	state	EPO-A	EPO-B	EPO-C			
Bi-NA ₁																
Bi-NA ₂ -Ac ₁																
Bi-NA ₂																
Bi-NA ₂ -Ac ₁																
Bi-NA ₂ -Ac ₂																
Tri-NA ₁																
Tri-NA ₁ -Ac ₁																
Tri-NA ₁ -Ac ₂																
Tri-NA ₂	3,375.2	2-	1,686.8	1,686.8	1,686.7	1,686.7	1,686.7	1,686.7	2-	2,202.7	2,202.5	2,203.4	5,388.5	3-	1,795.1	1,795.8
Tri-NA ₂ -Ac ₁	3,417.3	2-	-	-	1,708.2	1,708.2	1,708.2	1,708.2	2-	2,202.7	2,202.5	2,203.4	5,388.5	3-	1,795.1	1,795.8
Tri-NA ₂ -Ac ₂	3,666.5	2-	1,831.8	1,832.0	1,832.5	1,832.5	1,832.5	1,832.5	3-	1,565.6	1,565.4	1,565.3	5,679.8	3-	1,892.8	1,892.7
Tri-NA ₃	3,708.6	2-	-	1,853.2	-	1,853.2	-	1,853.2	3-	1,579.4	1,579.4	-	5,679.8	3-	1,892.8	1,892.7
Tri-NA ₃ -Ac ₁																
Tri-NA ₃ -Ac ₂																
Tetra-NA ₁ (or Tri-Lac ₁ -NA ₁)																
Tetra-NA ₂ (or Tri-Lac ₁ -NA ₂)	3,740.6	2-	1,869.1	1,869.8	1,869.4	1,869.4	1,869.4	1,869.4	3-	1,590.7	1,590.6	1,590.2	5,462.6	3-	1,820.5	1,819.8
Tetra-NA ₂ -Ac ₁ (or Tri-Lac ₁ -NA ₂ -Ac ₁)	3,782.6	2-	-	1,890.2	1,889.8	1,889.8	1,889.8	1,889.8	3-	1,590.7	1,590.6	1,590.2	5,462.6	3-	1,820.5	1,819.8
Tetra-NA ₂ -Ac ₂ (or Tri-Lac ₁ -NA ₂ -Ac ₂)	3,822.5	2-	-	-	1,910.2	1,910.2	1,910.2	1,910.2	3-	1,590.7	1,590.6	1,590.2	5,462.6	3-	1,820.5	1,819.8
Tetra-NA ₂ -Ac ₃ (or Tri-Lac ₁ -NA ₂ -Ac ₃)																
Tetra-NA ₂ -Ac ₄ (or Tri-Lac ₁ -NA ₂ -Ac ₄)																
Tetra-NA ₃ (or Tri-Lac ₁ -NA ₃)	4,031.8	2-	2,014.5 ^d	2,015.1	2,014.7	2,014.7	2,014.7	2,014.7	3-	1,687.3	1,687.5	1,687.7	5,922.0	3-	1,973.3	-
Tetra-NA ₃ -Ac ₁ (or Tri-Lac ₁ -NA ₃ -Ac ₁)	4,073.9	2-	2,035.8	2,036.5	2,036.1	2,036.1	2,036.1	2,036.1	3-	1,687.3	1,687.5	1,687.7	5,922.0	3-	1,973.3	-
Tetra-NA ₃ -Ac ₂ (or Tri-Lac ₁ -NA ₃ -Ac ₂)	4,115.9	2-	-	2,057.4	-	2,057.4	-	2,057.4	3-	1,687.3	1,687.5	1,687.7	5,922.0	3-	1,973.3	-
Tetra-NA ₃ -Ac ₃ (or Tri-Lac ₁ -NA ₃ -Ac ₃)																
Tetra-NA ₃ -Ac ₄ (or Tri-Lac ₁ -NA ₃ -Ac ₄)																
Tetra-NA ₃ -SO ₁ (or Tri-Lac ₁ -NA ₃ -SO ₁)	4,111.9	2-	-	-	2,055.4	-	2,055.4	-	3-	1,687.3	1,687.5	1,687.7	6,045.1	3-	2,014.2	2,014.0
Tetra-NA ₃ -SO ₂ (or Tri-Lac ₁ -NA ₃ -SO ₂)	4,323.1	2-	2,160.2	2,160.9 ^d	2,160.3 ^d	2,160.3 ^d	2,160.3 ^d	2,160.3 ^d	3-	1,687.3	1,687.5	1,687.7	6,045.1	3-	2,014.2	2,014.0
Tetra-NA ₄ -Ac ₁	4,365.1	2-	2,181.6	2,182.1	2,181.8	2,181.8	2,181.8	2,181.8	3-	1,784.5	1,784.4	1,784.4 ^d	6,336.4	3-	2,111.1 ^d	2,111.4 ^d
Tetra-NA ₄ -Ac ₂	4,407.1	2-	-	2,202.3	-	2,202.3	-	2,202.3	3-	1,784.5	1,784.4	1,784.4 ^d	6,336.4	3-	2,111.1 ^d	2,111.4 ^d
Tetra-NA ₄ -Ac ₃	4,449.2	2-	-	2,223.6	-	2,223.6	-	2,223.6	3-	1,784.5	1,784.4	1,784.4 ^d	6,336.4	3-	2,111.1 ^d	2,111.4 ^d
Tetra-NA ₄ -Ac ₄																
Tetra-NA ₄ -Ac ₅																

Continued

Table 2. Continued

Glycoform ^a	Peak 3 (Asn38 glycopeptide)			Peak 4 (Asn24 glycopeptide)			Peak 11 (Asn83 glycopeptide) ^b		
	Theoretical Charge		Observed <i>m/z</i>	Theoretical Charge		Observed <i>m/z</i>	Theoretical Charge		Observed <i>m/z</i>
	mass ^c	state		mass ^c	state		mass ^c	state	
Tetra-NA ₄ -Ac ₆						6,588.6	3-	2,194.9	EPO-C
Tetra-NA ₄ -Ac ₇						6,630.7	3-	2,209.7	EPO-B
Tetra-NA ₄ -Ac ₈						6,672.7	3-	2,223.5	EPO-A
Tetra-NA ₄ -SO ₁	4,403.1	2-	2,200.4			6,416.5	3-	-	2,137.9
Tetra-Lac ₁ -NA ₂ (or Tri-Lac ₂ -NA ₂)				3-	1,712.2	6,119.2	3-	2,038.9	2,039.1
Tetra-Lac ₁ -NA ₃ (or Tri-Lac ₂ -NA ₃)	4,397.1	2-	2,198.0	2,197.2	1,808.6	6,410.5	3-	2,135.5	2,135.8
Tetra-Lac ₁ -NA ₃ -Ac ₁ (or Tri-Lac ₂ -NA ₃ -Ac ₁)	4,439.2	2-	2,219.0	-	-	6,452.5	3-	2,150.3	2,149.8
Tetra-Lac ₁ -NA ₃ -Ac ₂ (or Tri-Lac ₂ -NA ₃ -Ac ₂)				3-	-	6,494.5	3-	2,163.3	-
Tetra-Lac ₁ -NA ₃ -SO ₁ (or Tri-Lac ₂ -NA ₃ -SO ₁)				3-	-	6,490.5	3-	-	2,162.4
Tetra-Lac ₁ -NA ₃ -SO ₂ (or Tri-Lac ₂ -NA ₃ -SO ₂)				3-	-	6,570.6	3-	-	2,188.8
Tetra-Lac ₁ -NA ₃ -SO ₁ -Ac ₁ (or Tri-Lac ₂ -NA ₃ -SO ₁ -Ac ₁)	4,688.4	2-	2,343.2	2,342.9	1,906.5	6,532.6	3-	-	2,176.5
Tetra-Lac ₁ -NA ₄	4,730.4	2-	2,364.8	-	-	6,701.7	3-	2,233.4	2,233.2
Tetra-Lac ₁ -NA ₄ -Ac ₁	4,772.5	2-	2,385.5	-	-	6,743.8	3-	2,247.5	2,246.9
Tetra-Lac ₁ -NA ₄ -Ac ₂				3-	-	6,785.8	3-	2,260.7	-
Tetra-Lac ₁ -NA ₄ -Ac ₃				3-	-	6,827.8	3-	2,274.5	-
Tetra-Lac ₁ -NA ₄ -Ac ₄				3-	-	6,869.9	3-	2,288.9	-
Tetra-Lac ₁ -NA ₄ -Ac ₅	4,768.5	2-	2,383.1	-	-	6,911.9	3-	2,302.8	-
Tetra-Lac ₁ -NA ₄ -SO ₁				3-	1,834.0	6,781.8	3-	-	2,259.5
Tetra-Lac ₁ -NA ₄ -SO ₂				3-	-	6,861.9	3-	-	2,286.2
Tetra-Lac ₂ -NA ₂				3-	1,931.1	6,484.6	3-	2,161.6	-
Tetra-Lac ₂ -NA ₃	4,762.5	3-	1,586.1	1,586.8	1,930.9	6,775.8	3-	2,258.2	2,258.5
Tetra-Lac ₂ -NA ₄				3-	2,028.1	6,817.9	3-	2,271.8	2,271.6
Tetra-Lac ₂ -NA ₄ -Ac ₁	5,053.7	3-	1,683.6	1,683.5	2,028.1	7,067.1	3-	2,354.4	2,354.6
Tetra-Lac ₂ -NA ₄ -Ac ₂				3-	-	7,109.1	3-	2,368.9	-
Tetra-Lac ₂ -NA ₄ -Ac ₃				3-	-	7,151.1	3-	2,382.9	-
Tetra-Lac ₂ -NA ₄ -SO ₁				3-	-	7,147.1	3-	-	2,381.6
Tetra-Lac ₂ -NA ₄				3-	2,379.7	7,141.1	3-	-	-

^a, All carbohydrates contain fucosylated core; ^b, Mass spectra of peaks 11 in three EPO digests are shown in Fig. 2; ^c, average mass; ^d, The highest *m/z* peak of mass spectra of peaks 3, 4, and 11 in three EPO digests are shown; Bi, biantennary; Tri, triantennary; Tetra, tetraantennary; NA, NeuAc; Lac, *N*-acetylglucosamine; Ac, acetyl; SO, sulfate.

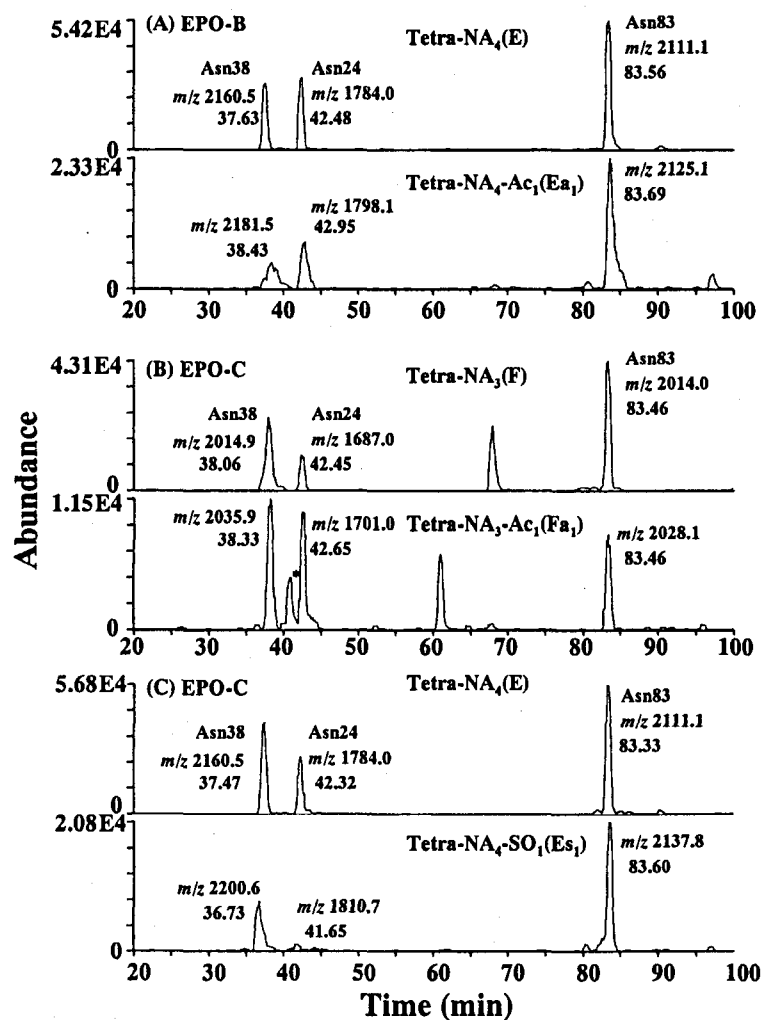


Fig. 3 Special mass range chromatograms of EPO-B and EPO-C

*; Tetra-Lac₂-NA₄ (theoretical *m/z* value of 3-ion; 2028.0) peak of Asn24 glycopeptide.Table 3 Structural assignments of *O*-linked glycopeptide peak (peak 7) in Fig 1, and the theoretical mass and observed *m/z* values

Glycoform	Theoretical mass		Observed <i>m/z</i>		
	(Average)	EPO-A	EPO-B	EPO-C	
NA ₂ -Gal-GalNAc	2,785.9	1,391.6 [M-2H] ²⁻	1,391.6 [M-2H] ²⁻	1,391.7 [M-2H] ²⁻	
		1,448.7 [M+TFA-2H] ²⁻	1,449.0 [M+TFA-2H] ²⁻	1,448.8 [M+TFA-2H] ²⁻	
NA ₂ -Gal-GalNAc-Ac ₁	2,827.9	-	1,412.8 [M-2H] ²⁻	-	
NA ₂ -Gal-GalNAc-Ac ₂	2,869.9	-	1,433.9 [M-2H] ²⁻	-	
NA-Gal-GalNAc	2,494.6	1,246.1 [M-2H] ²⁻	1,246.3 [M-2H] ²⁻	1,246.2 [M-2H] ²⁻	
		1,303.1 [M+TFA-2H] ²⁻	1,303.2 [M+TFA-2H] ²⁻	1,303.2 [M+TFA-2H] ²⁻	
NA-Gal-GalNAc-Ac ₁	2,536.6	-	1,267.2 [M-2H] ²⁻	-	
NA-Gal-GalNAc-Ac ₂	2,578.6	-	1,288.6 [M-2H] ²⁻	-	

TFA, trifluoroacetic acid.

考察

遺伝子組換えにより産生された糖タンパク質性医薬品の場合、生きた細胞による生合成システムを利用しているため、細胞の種類、培養条件等の製造方法を変更した場合、生産された糖タンパク質の分子構造上に変化が生

じる可能性がある。特に、糖鎖部分の構造は、産生細胞の種類、発現方法、培養条件などの変更により変化することが知られている。これらの構造上の変化は生物活性や体内動態に影響することが明らかにされており、製法変更後、新旧糖タンパク質の同源性/同質性を評価する

ことが重要である。そこで、新旧糖タンパク質のモデルとして3種のrhEPOを用いて同等性/同質性を評価法としてのLC/MSによるペプチドマッピングの有用性評価を行った。その結果、まず、LC/MSによるペプチドマッピングにより、3種のrhEPOのペプチド部分の同一性を明らかにできることが確認された。つぎに、本分析法によって、4つの糖鎖結合部位ごとの糖鎖の不均一性の違いを明らかにできることが確認された。すなわち、1) EPO-AのAsn38とAsn83にはシアロ3、4本鎖糖鎖が、Asn24にはこれらの糖鎖に加えてシアロ2本鎖糖鎖が、またSer126にはNA₂-Gal-GalNAc及びNA-Gal-GalNAcが結合しており、これらはEPO-B及び-Cに共通に結合していること、2) EPO-Bではすべての部位に結合している糖鎖にアセチル化が起こっており、アセチル基の結合数及びアセチル化糖鎖の割合はAsn83で顕著に大きいこと、3) EPO-C結合糖鎖におけるモノ、ジアセチル化は非還元末端がシアル酸で飽和されていない糖鎖に多く、特にAsn24で顕著であること、また、硫酸化糖鎖がAsn38及びAsn83にのみに結合していること、を明らかにすることができた。

我々は、すでにEPO-C結合糖鎖における硫酸基の結合位置は、我々の開発したLC/MSによる糖鎖マッピング法¹⁰⁾、エキソグリコシダーゼ消化法、及びNMRによってGlcNAcの6位の水酸基であることを明らかにしている¹¹⁾。また、エキソグリコシダーゼ消化糖鎖の糖鎖マッピングによりEPO-B及び-Cの結合糖鎖のアセチル化は、それぞれシアル酸及びガラクトースに起こっていること¹²⁾、を明らかにしている。LC/MSを用いたペプチドマッピングは類似糖タンパク質におけるこれらの修飾糖鎖の分布の違いを簡単に識別できることが明らかになった。

これまで、著者らは、high-pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD法)を用いて、本研究と同じ3種のrhEPOの糖鎖構造を分析し、活性に参与しているN-結合糖鎖のシアル酸結合数と分岐構造等の違いを簡便で比較的高感度に解析できることを明らかにした^{13), 14)}。さらに、糖ペプチドのみがピークとして検出され、各糖ペプチドは結合している糖鎖の違いによって分離されるLC/MSによる糖ペプチドマッピング法を開発し、3種のrhEPOの部位特異的な糖鎖の不均一性を解析できることを明らかにした^{15), 16)}。今回用いたLC/MSによるペプチドマッピングは、一度の分析でペプチドのアミノ酸部分の違いはもちろんのこと、各糖結合部位に付加している糖鎖構造とその分布の違いを簡単に識別できる。従って、本分析法は製法変更に伴う糖タンパク質性医薬品の同等性/同質性評価法としても有用であると思われる。

謝辞

本研究は、創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業の支援を受けて行われたものである。

文献

- 1) Morimoto, K., Uchida, E., Kawasaki, N., Said, AA., Tokunaga, Y., Kasugai, I. and Hayakawa, T.: *Iyakuhin Kenkyu*, **25**, 405-425 (1994)
- 2) Morimoto, K., Uchida, E., Kawasaki, N., Said, AA., Tokunaga, Y., Kasugai, I. and Hayakawa, T.: *Iyakuhin Kenkyu*, **25**, 501-523 (1994)
- 3) Hayakawa, T.: "Drug Biotechnology Regulation", eds. by Chiu, YH. and Gueriguian, JL., MARCEL DEKKER, INC., New York, pp. 468-498 (1991)
- 4) Imai, N., Higuchi, M., Kawamura, A., Tomonoh, K., Oheda, M., Fujiwara, M., Shimonaka, Y. and Ochi, N.: *Eur. J. Biochem.*, **194**, 457-462 (1990)
- 5) Misaizu, T., Matsuki, S., Strickland, TW., Takeuchi, M., Kobata, A. and Takasaki, S.: *Blood*, **86**, 4097-4104 (1995)
- 6) Kawasaki, N., Ohta, M., Hyuga, S., Hyuga, M. and Hayakawa, T.: *Anal. Biochem.*, **285**, 82-91 (2000)
- 7) Itoh, S., Kawasaki, N., Ohta, M., Hyuga, M., Hyuga, S. and Hayakawa, T.: *Bull. Nat. Inst. Health Sci.*, **119**, 65-69 (2001)
- 8) Chance, RE., Hoffmann, JA., Kroeff, EP., Johnson, MG., Schirmer, EW. and Bromer, WW.: "Peptides", eds. By Rich, DH. And Gross, E., PIERCE CHEMICAL COMPANY., Rockford, Illinois, pp. 721-728 (1981)
- 9) Canova-Davis, E., Kessler, TJ. and Ling VT.: *Anal. Biochem.*, **196**, 39-45 (1991)
- 10) Kawasaki, N., Ohta, M., Hyuga, S., Hashimoto, O. and Hayakawa, T.: *Anal. Biochem.*, **269**, 297-303 (1999)
- 11) Kawasaki, N., Haishima, Y., Ohta, M., Itoh, S., Hyuga, M., Hyuga, S. and Hayakawa, T.: *Glycobiology*, **11**, 1043-1049 (2001)
- 12) Kawasaki, N., Ohta, M., Itoh, S., Hyuga, M., Hyuga, S. and Hayakawa, T.: *Biologicals*, **30**, 113-123 (2002)
- 13) Kawasaki, N., Morimoto, K. and Hayakawa, T.: *Bull. Nat. Inst. Health Sci.*, **113**, 69-73 (1995)
- 14) Kawasaki, N., Ohta, M., Hyuga, S., Hashimoto, O., Morimoto, K. and Hayakawa, T.: *Bull. Nat. Inst. Health Sci.*, **116**, 117-121 (1998)
- 15) Ohta, M., Kawasaki, N., Hyuga, S., Hyuga, M. and Hayakawa, T.: *J. Chromatogr.*, **910**, 1-11 (2001)
- 16) Ohta, M., Kawasaki, N., Itoh, S. and Hayakawa, T.: *Biologicals*, **30**, 235 (2002)