

2. 64 糖鎖試験法

前文, 1.2.及び4.の項を次のように改める.

糖鎖試験法は、糖タンパク質医薬品等に結合している糖鎖の恒常性を確認する方法である。糖タンパク質に結合している糖鎖には、主に、アスパラギン残基に結合するN-結合型糖鎖及びセリン又はスレオニン残基に結合するO-結合型糖鎖がある。糖鎖の構造は多様であり、同一タンパク質や同一糖鎖付加部位において均一ではないことが多い。糖タンパク質の多くは、糖鎖の違いにより生じた多様な分子種(グリコフォーム)からなる不均一な集合体である。糖鎖の中には、タンパク質の構造の安定化、プロテアーゼによる分解の防止、生物活性の調節、血中からのクリアランスや細胞への取り込み、及び免疫原性に関与するものがある。遺伝子組換え技術を利用して製造された糖タンパク質医薬品においては、使用する細胞株及び培養条件などにより糖鎖の構造と分布が変化する可能性があるため、糖タンパク質医薬品の有効性及び安全性を確保するためには、糖鎖の恒常性を確保することが重要である。糖鎖を評価する方法には、1)単糖に分解して分析する方法(単糖分析)、2)遊離糖鎖として分析する方法(オリゴ糖分析・糖鎖プロファイル法)、3)糖ペプチドとして分析する方法(糖ペプチド分析)、及び4)糖タンパク質として分析する方法(グリコフォーム分析)がある。規格及び試験方法として設定する場合は、当該医薬品の有効性及び安全性に影響を及ぼす糖鎖の特徴を考慮して、適切に選択又は組み合わせる。

1.2. 単糖の定量的試験

単糖の定量的試験法として、遊離した単糖をそのまま高pH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により分析する方法、及び誘導体化した後、蛍光検出又はUV検出法を用いた液体クロマトグラフィー(2.01)により分析する方法などがあり、いずれも内標準法又は絶対検量線法により各単糖の含量を求める。誘導体化には、中性糖及びアミノ糖の分析では、2-アミノ安息香酸、2-アミノピリジン、エチル-4-アミノ安息香酸、及び3-メチル-1-フェニル-5-ピラゾロンなどが用いられる。シアル酸分析では1,2-ジアミノ-4,5-メチレンジオキシベンゼンや1,2-フェニレンジアミンなどが用いられる。誘導体化した単糖は、逆相クロマトグラフィーや、ホウ酸錯体の形成を利用した陰イオン交換クロマトグラフィーなどにより分析される。測定結果は、通例、タンパク質当たりの各単糖のモル比として示され、設定された範囲内であることを確認する。

4. 糖タンパク質のグリコフォーム分析

グリコフォーム分析は、糖鎖修飾の特徴及びその恒常性を糖タンパク質として確認する方法である。有効性及び安全性に関与する糖鎖構造の違いを反映したグリコフォームプロファイルを取得することが望ましい。シアル酸結合量が有効性に影響する場合には、等電点電気泳動、キャピラリー等電点電気泳動、キャピラリーゾーン電気泳動、又は液体クロマトグラフィーなどを用いて電荷の違いにより分離されたグリコフォームプロファイルを得る。質量分析法では、質量の違いによるグリコフォームプロファイルを得ることができる。サイズ排除クロマトグラフィー、キャピラリーゲル電気泳動及びSDS-PAGEは、糖

鎖修飾の有無の確認に役立つ。試料のグリコフォームプロファイルにおいて、同様に操作して得られた標準物質のプロファイルと同様の位置に同様のピークが認められることやピークの分布が設定された範囲内であることを確認する。分子量が大きい場合や、複数の糖鎖結合部位を含む場合は、十分な分離を得ることが難しいこともあるので、分離及び再現性を十分に検討する必要がある。

59