

新世代バイオ医薬品の品質評価に向けた糖鎖化学合成

岩城 隼*・石田 秀樹・松崎 祐二

バイオ医薬品の機能に大きく関与する糖鎖

抗体医薬をはじめとするバイオ医薬品は、CHO細胞を代表とする動物細胞により製造されるため、その多くが糖鎖付加を受ける。翻訳後修飾の一つとして知られる糖鎖付加においては、遺伝子配列を読み解くだけでは糖鎖構造を正確に知ることができないうえ、同一タンパク質上でも発現する場所や時期によって構造が異なり鎖長も均一ではないためタンパク質の修飾物として扱われて、分子機能の主役としてはあまり目立っていなかった。しかし近年、バイオ医薬品の作用機序に強く関与する分子として、この糖鎖が注目されている。

近年、抗体医薬が急成長し、低分子医薬に代わり新薬開発の主流となっているが、薬効として抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性を示すためには抗体Fc領域の297番目のアスパラギン残基にN型糖鎖が付加され、そのN型糖鎖が免疫細胞上のFc受容体に認識されることが必要となる¹⁾。さらに、糖鎖構造によってその効果は劇的に変化し、協和発酵キリン社が抗体医薬の糖鎖構造を改変してADCC活性を増強させるポテリジェント技術²⁾により抗体Fc領域上のN型糖鎖のコアフコース付加を抑えたモガムリズムマブ (製品名:ポテリジオ) を、次いで、Roche Glycart AG社がGlycoMAB技術によりコアフコースの付加を低減させたオピヌツズマブ (製品名:ガザイバ) を、そして、アストラゼネカ社もポテリジェント技術でベンラリズムマブ (製品名:ファセンラ) を開発し、糖鎖改変技術を用いて抗体医薬のエフェクター効果を飛躍的に増強させ、「糖鎖は翻訳後修飾で付加されるもの」から制御ないし活用すべきものへと変化した。他にもバイオ医薬品の糖鎖改変技術としては、アムジェン社が糖鎖付加部位を天然型以上に付与することで遺伝子組換えエリスロポエチン (EPO) のシアル酸含有糖鎖を増やしたダルベポエチンアルファ (製品名:アラネスプ) により血中半減期を引き延ばす効果を示し、ジェンザイム社のゴーシェ病治療薬イミグルセラゼ (製品名:セレザイム) においてはβグルコセレブロシダーゼの糖鎖構造をマンノース型にすることで標的細胞であるマクロファージへ取り込まれやすくなるなど、糖鎖自体に機能を持たせた画期的なバイオ医薬品が実用化されて

いる。このように、糖鎖改変技術は特許切れバイオ医薬品の効果を増強させたバイオバターの創製にも高いポテンシャルを秘めている。このような技術発展の流れのなか、これまでは主にバイオ医薬品の生産恒常性と品質同等性の程度を評価するために定性的に分析されてきた糖鎖プロファイリングが、今後はその本質となる薬効や有効性の主たる役割を担保するための定量的、かつ再現性の高い分析に置き換わっていくと考えられる。そのためには高純度で安定的に供給される糖鎖分析標品が不可欠となる。

糖鎖ブロックを用いた系統的な糖鎖合成

東京化成工業株式会社 (TCI) では、有機合成試薬の製造販売を行う国内試薬メーカーとして約30,000品目の試薬とファインケミカルを取り扱い、2017年より医薬中間体製造のためのGMP工場を稼働させた。多種多様な有機化合物の合成経験を生かして、2002年からの「バイオ・IT融合機器開発プロジェクト/糖鎖研究用試薬の製品化 (2002~2005年度)」および産業技術実用開発費補助事業「工業的糖鎖合成プロセスの開発及び糖鎖リソースの大量供給事業 (2006~2007年度)」プロジェクト (新エネルギー・産業技術総合開発機構: NEDO) では、産業化に向けた合成糖鎖ブロックの大量製造に成功した。

この成果を活用してTCIでは糖鎖事業を躍進させ、2014年からは次世代バイオ医薬品製造技術研究組合 (MAB) の組合員の一人として経済産業省 (METI) の「平成25年度産業技術実用化開発事業費補助金 (個別化医療に向けた次世代医薬品創出基盤技術開発 (国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術))」および「平成26年度産業技術実用化開発事業費補助金 (次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業 (国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術))」, および国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の「次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業」において糖鎖標準品の製造を課題の一つとして5年間のプロジェクトに参画し、「バイオ医薬品の翻訳後修飾に伴う不均一性評価技術の開発」を課題としてバイオ医薬品の主流となっている抗体医薬に見られるN型糖鎖の系統的な糖

* 著者紹介 東京化成工業株式会社 糖鎖技術部

鎖合成法を確立した。

生体内における糖鎖は直鎖構造から成る核酸やタンパク質とは異なり多様な分岐構造を有し、その結合様式は位置異性体・アノマー異性体（ α/β グリコシド）・立体配座異性体（ $^4C_1/^1C_4$ 配座）などの立体異性体を含むため構造多様性に富む生体分子である。さらに、硫酸化やリン酸化などの化学修飾を含むうえに構造不均一性も併せ持つことから、構造機能相関を調べる目的で均一糖鎖分子が必要な場合も天然リソースから大量に調製することは非常に難しい。糖質関連酵素や遺伝子組換え生物による生合成を利用した方法では不均一性の問題は今のところ完全には解決できておらず、特定のオリゴ糖を大量に調製する手法として化学合成技術に対する期待は大きい。

TCIでは糖鎖分野の発展に貢献すべく、構造が明確な糖鎖を試薬として産業スケールで安定提供するために、糖鎖ブロックを用いた系統的な合成に取り組んでいる。特に天然型糖鎖に見られる共通構造に着目し、汎用性の高い糖鎖ブロックを多種揃えて効率的な糖鎖合成を行っている。グリコシル化における位置異性体の制御のためには、結合に必要な水酸基のみを露出させて他の水酸基を保護した糖受容体を用いる。一方の糖供与体は、次に続くグリコシル化反応を見越して水酸基を適切に保護し、加えて還元末端にトリクロロイミデート基をはじめとした脱離基を導入してグリコシド結合を形成できるような機能を持たせたものを調製する。この時、グリコシル化における立体選択性をいかに α/β 選択的に行うかが

収量に大きく影響する。また、グリコシル化により位置/立体異性体が生成した場合に、カラム精製や望んだ結合様式のみを結晶化により取り出すことも糖鎖合成の重要な技術となる。この糖受容体と糖供与体の保護基選択、選択的グリコシル化による異性体の制御、異性体の選択的精製など、経験に裏付けられたノウハウの蓄積がTCIの強みとなっている。これらの技術を基盤として、質量分析やNMRなどの各種分析データに裏打ちされ構造が明確化された二糖・三糖ブロックを自社工場にてキログラムスケールで製造し、糖鎖合成試薬の提供だけでなくオリゴ糖の受託合成原料として活用している。この立体を制御した糖鎖ブロックによるグリコシド結合形成は、酵素合成法とは異なり鎖長の不均一性を解決し、糖鎖ブロックの導入順序や位置特異的なグリコシド形成を調節することにより構造の均一な糖鎖の調製を実現している。また、将来的な化学合成糖鎖の応用を見据えて、天然には存在しないアジド基などの生体反応と分立できる機能性官能基の導入や、抗インフルエンザ薬（リレンザ、タミフル、イナビルなど）で実用化されているような糖鎖ミミックに見られる電荷を帯びた官能基の導入が人為的に可能である点も化学的な糖鎖合成の大きな魅力である。

このような技術背景から、2014年からはMABの組合員としてMETIとAMEDのプロジェクトに参画し、N型糖鎖の共通構造に見られる分岐中心の β マンノースを含む共通二糖、共通四糖構造をキログラムスケールに

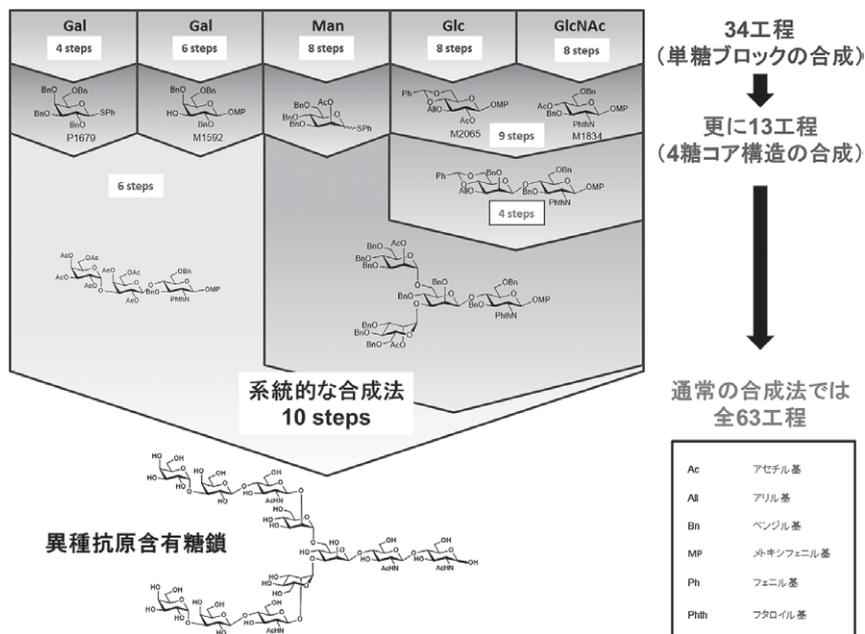


図1. 糖鎖ブロックを用いた系統的な均一糖鎖化学合成法

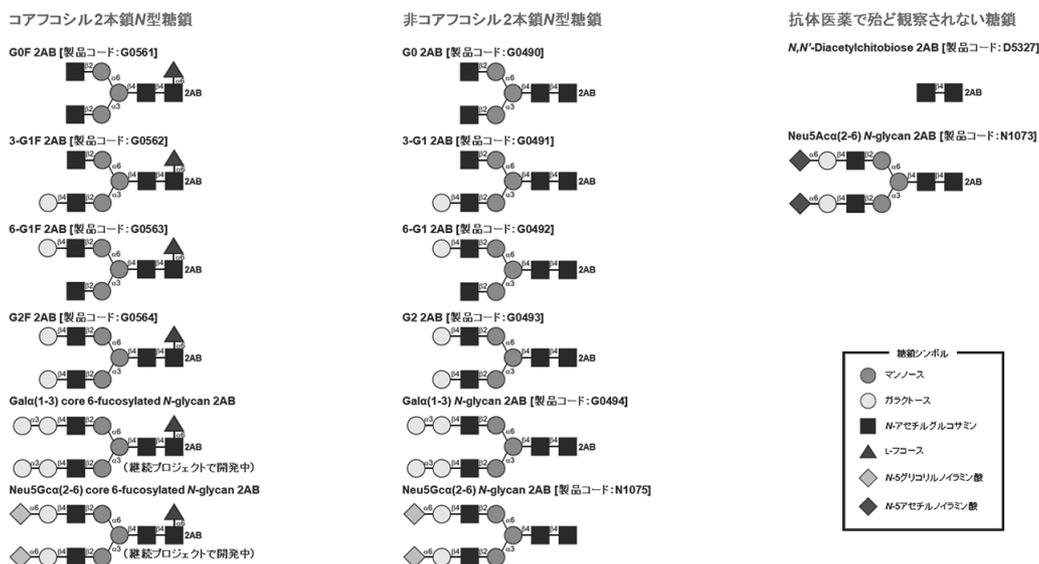


図2. 化学合成を基盤とした標識化N型糖鎖の試薬ラインナップ

て大量製造を行った(図1). この共通構造の還元末端側と非還元末端側の双方に多様な糖鎖ブロックをつなぎ合わせる系統的糖鎖合成法を開発し, 抗体医薬に見られるガラクトース残基をもたず非還元末端がN-アセチルグルコサミン構造のG0タイプ, β マンノースの6位側の非還元末端にガラクトース残基を一つもつ6-G1タイプ, 3位側の非還元末端にガラクトース残基を一つもつ3-G1タイプ, 2本鎖の各非還元末端にガラクトース構造をもつG2タイプのN型糖鎖(それぞれコアフコースあり・なし)に加え, 抗原性やアナフィラキシーが懸念されている異種抗原N-グリコリルノイラミン酸(Neu5Gc), もしくは α ガラクトース(α Gal)を含むN型糖鎖を調製した. 液体クロマトグラフィーによる高感度分析のために2-アミノベンズアミド(2-AB)で各N型糖鎖の還元末端を蛍光標識した試薬をプロジェクトの成果として上市した(図2). これらの試薬については, 分析に量を必要とするNMRをはじめとして質量分析やHPLCのデータを取得して高い品質を確認している.

特に糖鎖化学合成の利点として, 同じ分子量を示しながらもガラクトース1残基だけを互いに異なる非還元末端に有している6-G1タイプと3-G1タイプの各N型糖鎖異性体について糖受容体の保護基を工夫し, 長さの異なる糖供与体を巧みにつなぎ合わせることで, 位置異性体同士が混合しない純粋な異性体を合成技術によって作り分けることができた. 現行市販されている多くの糖鎖標準品は, 細胞内の生合成により伸長された糖鎖を生体試料から切り出した後に蛍光標識して逆相カラムの分離効率を向上させて精製した製品が一般的であるが, 筆者ら

は化学合成により異種抗原含有糖鎖ブロックを天然型の糖鎖ブロックと入れ替えることで簡便, かつ系統的に非ヒト型の糖鎖を作ることに成功した. つまり, オリゴ糖の化学合成においては, 糖鎖ブロックがあれば多量にも柔軟に対応することができるということが実証された.

糖鎖分析における将来の展望

生体リソースに依らず化学的な分析データに裏打ちされた合成糖鎖を大量調製できるようになったことで, 抗体から糖鎖を切り出した後に高品質の非標識化糖鎖標品を外部標準として加えることが可能となった. また, これらの非標識化糖鎖標品は糖鎖捕集や糖鎖の標識化の評価に有効であり, 蛍光標識化された糖鎖標品はこれまでプロファイリングに留まっていた糖鎖分析に効率的な同定と定量的な側面を与えると考えられる. 糖鎖不均一性の恒常性を確かめるためにグルコースラダーをリファレンスとして相対量によりプロファイリングされていた糖鎖分析は, 図3に示すような高純度の構造が明確な糖鎖標品をリファレンスとした定量分析に置き換わり, 今後明らかとなっていくバイオ医薬品における糖鎖機能の本質を保証する重要な評価技術へと変貌を遂げる可能性がある.

また, バイオ医薬品製造における α GalやNeu5Gcを含む非ヒト型糖鎖抗原の混入は, 宿主自体に内因する場合や細胞培養時にウシなどの血清を用いることで外因的に導入される危険性が考えられる. 異種抗原糖鎖を含むバイオ医薬品の安全性については, 危険性を含む異種糖

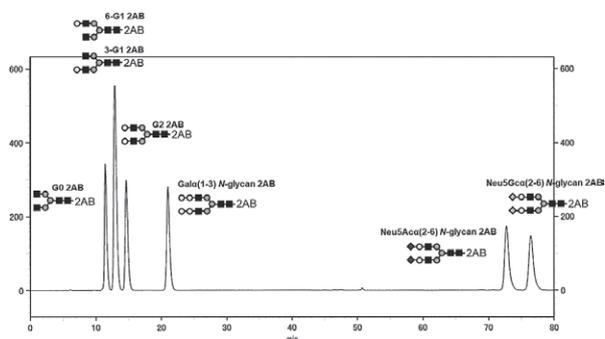


図3. 2AB標識化N型糖鎖標品のHPLCによる混合分析データ

鎖抗原が市販のキットなどで検出限界以下であることを指標に安全性を示している状況である。その検出限界値を含めて国際的にも糖鎖試験法が未だに設定されていないのは、評価に利用できる糖鎖標品が世界規模で安定的に供給されていないことが原因の一つであると考えられる。現状において異種抗原を含む糖鎖標品についてはサプライヤーがきわめて少ないものや、市場に出回っておらず入手困難なものもあることから、安定的に分析を行う以前に先進的な検出系や分析系の開発が遅れている。化学合成によりこれらの糖鎖が構造的確認を伴い供給されることによって、ヒトには発現されない異種抗原糖鎖構造の高感度解析法の構築が可能となる。この解析法における検出限界情報を基に、バイオ医薬品における異種抗原糖鎖の定量的な規格を設けることができ、将来的には、これらの異種抗原糖鎖が定量的に検出限界以下であることが証明できるようになるだろう。実際に α Galはブタの臓器をヒトに移植する際の拒絶反応の直接的な抗原となっていることを背景に、現に市場から入手できるバイオ医薬品に異種抗原糖鎖が含まれていることを抗糖鎖抗体やレクチンで実験的に検出している例も報告されている³⁾。

バイオ医薬品の安全性を保障するうえで、化学合成糖鎖標品を用いた分析から明確に分析値を示すことは糖鎖分析における課題解決につながるのではないかと考えている。TCIでは、現在も後続プロジェクト「バイオ医薬品の高度製造技術の開発（バイオ医薬品連続生産等の基盤技術開発）」に参画しており、「バイオ医薬品連続生産における各要素技術及びプラットフォーム技術の開発」の課題の一つとして異種抗原を含むN型糖鎖の合成と糖鎖検出プローブ（抗体、レクチン）の開発を進めている。

今後、本稿で述べたように、バイオ医薬品の生産恒常性や品質同等性の評価に限らず、安定性、有効性、局在、クリアランス、免疫原性などの指標として糖鎖解析の活躍の場が増えていき、医薬品製造において大切とされる安全性と有効性の担保がTCIの糖鎖合成技術によって堅牢・頑健になるように試薬の提供を通じて寄与し、糖鎖の化学合成技術を基盤として糖鎖試験法の標準化に向けて国内外で糖鎖分析のデファクトスタンダードとなる糖鎖関連製品の提供を目指して行きたいと考えている。

謝 辞

本研究の一部は、経済産業省の「平成25年度個別化医療に向けた次世代医薬品創出基盤技術開発（国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術）」及び「平成26年度次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業（国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術）」、及び国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の「次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業」の課題番号（JP17ae0101003）の支援によって行われた。

文 献

- 1) Kiyoshi, M. *et al.*: *Sci. Rep.*, **8**, 3955 (2018).
- 2) 設楽研也: *Yakugaku Zasshi*, **129**, 3 (2009).
- 3) Chuanfei, Y. *et al.*: *Sci. Rep.*, **6**, 20029 (2016).