

日本医療研究開発機構 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(糖鎖利用による革新的創薬技術開発事業)
事後報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 糖鎖構造の可変を可能にする糖タンパク質の精密半化学合成と
その品質分析技術の開発
(英語) Development of precise semi-synthesis of glycoproteins with variable glycan
structures and evaluation for quality of the synthetic glycoproteins

研究開発実施期間: 平成28年9月1日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 梶原 康宏
(英語) KAJIHARA Yasuhiro

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人大阪大学・大学院理学研究科化学専攻・教授
(英語) Graduate School of Science, Osaka University, Professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

近年、抗体、エリスロポエチン (EPO) をはじめとする糖タンパク質を基盤とする創薬が一般的であるが、動物細胞による発現法を利用するため、糖鎖構造が常に不均一で、その品質管理に多大な労力が払われている。貧血治療薬であるエリスロポエチン(EPO)は、N結合型糖鎖をもつ糖タンパク質として最初に承認され、いまではバイオシミラーと呼ばれるジェネリック様のタンパク質製剤として利用されている。また免疫を活性化しガン治療に利用するインターロイキン2 (IL2:プロロイキン) は、O結合型糖鎖を必須とする。そして、抗体においては、N型糖鎖を必要とする抗体依存的傷害活性、さらには、異物中和機能、補体活性を利用できることから世界で最も利用されている。これまで、糖鎖は、タンパク質の血中寿命を延ばすことが役割であると言われてきたが、その本質的な機能は理解されていない。そして、多くの糖タンパク質製剤の特許が切れ始めた2010年以降、糖鎖構造が不均一でも薬害の報告例がないことから、厳密な製造法が維持され、現在も糖鎖構造が不均一な糖タンパク質製剤が利用されている。

しかし、糖タンパク質製剤の糖鎖は、任意の構造を用意できればタンパク質の活性を向上できること

が期待され、その技術がいまだ問われている。本研究者は、これまで、様々な糖タンパク質を合成し、糖鎖構造が均一なシアリル糖鎖が結合すれば、より高い薬理活性が期待できることを示した。また、EPOの化学合成例では、遺伝子で決められる天然型の N 糖鎖付加部位に糖鎖を持つことが活性発現に必須であること、ならびに、糖鎖の構造や付加部位が糖タンパク質機能に影響を与えることを明確に示した。

そこで、本研究では、均一な構造の糖鎖を自在にタンパク質に組み込み、高活性な糖タンパク質を化学的に調製する実用的な方法の確立を目指した。特に、一般的な、化学的固相合成による糖ペプチドの調製法は、100g スケールでの合成には莫大な費用、手間、時間がかかるので、その新規合成法の開発が課題となる。創薬事業に利用するため、工程数、時間、費用がかかる従来のペプチド固相合成は極力使わず、短工程でかつ、信頼性の高い糖タンパク質合成法の開発を目指した。

その結果、比較的安価な細胞培養により長鎖ペプチドを調製し、それを糖ペプチドなどと連結し、糖タンパク質が合成できる方法を検討した。また、保管中の糖タンパク質製剤の品質管理に使える分析手法の開発、さらには糖鎖を利用する新しい創薬デザインを見出すことを検討した。

糖タンパク質を合成するにはペプチド同士ならびに、糖鎖アスパラギンを位置特異的に連結する方法が必要であり、本研究では、要となる大腸菌で発現したペプチドの C 末端をチオエステルにする 3 つの方法を確立した。まず、大腸菌で発現するペプチドの C 末端に、故意にシステイン残基を導入し、それを弱酸性処理することで、システインチオールを C 末端から 2 つ目のアミノ酸のカルボニル炭素に反応させ、システインチオールによるチオエステルを合成した。そこにチオールを 2 つもつ特異な構造のアミン試薬を反応させることで、ペプチドチオエステルと同じ活性化状態であるアミド誘導体を得ることに成功した。そして、このペプチド誘導体と N 末端にシステインをもつペプチドを緩衝溶液中で反応させると、**native chemical ligation(NCL)**反応を介してペプチドが連結できることを確認した。

2 つ目のチオエステル化法は、前述の方法ではチオエステル化しにくいアミノ酸配列をもつ場合に有効で、2 段階で実施する方法である。まず、大腸菌で発現するペプチドの C 末端に **CysGlyCys** という特異な配列を導入し **peptide-X-CysGlyCys**(X はアミノ酸)を得る。そして、末端の **GlyCys** は、前述の方法で処理することで、**Gly** 部分がチオエステルとなった **peptide-X-CysGly-S-Cys thioester** を合成する。そして、弱塩基処理をするとシステインのチオールがひとつ N 末端側の X のアミノ酸のカルボニルに反応し、**CysGly** 残基が脱離しながら **peptide-X-thioester** を与えるというものである。このチオエステル化法は、X に相当するアミノ酸の β 位に置換基をもつバリンなどでも有効であった。この手法を利用することで、大腸菌で発現したほぼ全てのペプチドの C 末端をチオエステルに変換可能となり、ここに他のペプチドを連結できるようになった。

3 つ目の方法は、本研究グループが 2014 に報告した C 末端のシステインチオールをシアノ化し、ヒドラジン処理して **peptide-NHNH₂** を得る方法の改良法である。特に収率を向上させるための条件検討を実施し、利用できるようにした。

そして、これら方法を利用することで、アミノ酸が 160 残基からなり、N 型糖鎖が 1 本、あるいは 3 本ある糖タンパク質製剤をモデルにその合成を検討し、目的物する糖タンパク質を合成することに成功した。しかし、これら合成法では一部配列については、固相合成を利用したので、さらに、固相合成を利用せずに容易に糖タンパク質を合成できるルートの検討に着手した。

次に、短工程で、糖タンパク質を合成する方法の検討を開始した。この方法では、鶏卵から単離したヒト型糖鎖アスパラギンのカルボン酸を硫黄原子で活性化したチオアシッドを利用した。末端にチオアシッドをもつペプチドと糖鎖アスパラギンチオアシッドを反応させるとジスルフィド結合を介してペプチドと糖鎖アスパラギンが連結し、**peptide-Asn(glycan)-COSH** を与えた。ここでは、再度その C 末端にチオアシッドが生成するので、N 末端にシステインをもつペプチドとこのチオアシッドを反応させ、**peptide-Asn(glycan)-peptide** を得ることに成功した。ここまで、糖鎖アスパラギンチオアシッドか

ら2工程で peptide-Asn(glycan)-peptide を得ることができた。そして、ペプチドの保護基を除去後、フォールディングすることで糖タンパク質を合成することに成功した。ここでは、アミノ酸 100 残基程度の糖タンパク質を2種類得ることに成功した。これまで報告されている糖タンパク質類の化学合成法では、その工程数が 100 工程にも及ぶが、今回の検討でその工程数の大幅な削減、ならびに高効率な方法を開発した。今後合成した高純度糖タンパク質の創薬への応用に見通しを立てることができた。

また、大腸菌発現により調製した長鎖ペプチドを前述のチオールを2つもつ特異な構造のアミン試薬と反応させ、長鎖ペプチドチオエステルを調製し、そして NCL を利用して新規な糖タンパク質製剤候補を合成した。ここでは、活性化状態にある T 細胞を抑制する効果のある糖タンパク質製剤の候補を選び合成することに成功した。以上のように工程数が多く量産の目処が立たなかった糖タンパク質の化学合成法を大幅に改善させ実用的な方法を確立することができた。今後はさらにより効率的な合成法の探索について、本研究の知見を利用し検討していく予定である。

現在、糖タンパク質製剤の品質管理は、主には含有タンパク質量と活性量(unit/mg)との関係で評価されるが、糖鎖構造の変化に加え、タンパク質部分がどの程度構造が変化しているか、その3次構造を追跡する手法も取り入れることが望ましい。本研究では、高純度な糖タンパク質製剤を合成し、そして、それを始点として水素重水素交換質量分析 (HDX 法) によりどこのタンパク質構造が微妙に崩れてくるかを追跡することを検討する。

まず、均一な構造の糖鎖をもつ小型糖タンパク質と、そのジスルフィド結合の組み合わせを故意に変えたミスフォールド体もちいて重水素交換様式がどの程度変わるか調べた。その結果、ミスフォールド体になることでタンパク質表面の重水素化様式が顕著に変化することを確認し、HDX 法が糖タンパク質表面の分析法として有用であることを確認した。

この方法を長期間保管している糖タンパク質製剤の品質管理への応用を考え、高純度糖鎖を3本もつアミノ酸 166 残基からなるサイトカインを合成し、応用した。また、そのサイトカインの細胞増殖活性と合わせて評価するシステムの構築が可能かも検討した。糖鎖が高純度なので、HDX による方法はアミノ酸 166 残基のサイトカインでも実施が可能で、通常の分解能の質量分析装置でヒートマップ (タンパク質表面の重水素率に依存したマップ) を作成することができた。しかし、その一方で、合成した糖鎖化サイトカインを長期 (半年以上) 保管する実験ができず、短時間で変性させた糖鎖化サイトカインを熱処理で用意した。細胞増殖活性は、予測通り、半分程度に減少したが、その質量分析データでは、正しい構造をとったサイトカインの質量分析ピークのみ観測され、変性した化合物の質量分析ピークを HDX 法で分析できるほどの強度で観測することができなかった。これは、変性が不規則に発生し、各構造の存在比が低いために質量分析ピークを観測できなかったものと考えられる。長期保管における糖タンパク質製剤の質量分析を本プロジェクトの期間内に実施することはできなかったが、タンパク質の吸光度等による定量よりも、質量分析による感度低下は、品質管理に利用できると判断できた。また、この分析に加え、本プロジェクトでは、保管している糖タンパク質を重水溶液に溶かし、一定時間後、糖タンパク質の純度が低下するとともに、各イオンピークの半値幅が広域化する現象を利用した分析法も有効であることを確認した。

以上のように、本プロジェクトでは、大腸菌で発現したペプチドを利用し、糖鎖アスパラギンを組み込むことで糖鎖アスパラギンから5工程程度で糖タンパク質を合成できる方法を確立することができた。またその際必要となるペプチドの C 末端の選択的活性化法についても3つの方法を確立することができた。抗炎症作用のある高純度糖鎖をもつ糖タンパク質製剤候補の合成にも成功した。そして、質量分析装置を利用する品質管理法の確立にも目処を立てることができた。

Recently, biologics based on glycoproteins such as antibodies and erythropoietin (EPO) have become common protein drugs, but due to the mammalian cell expression methods, the glycan attached to the glycoproteins show a considerable structural heterogeneity. Erythropoietin (EPO), a drug for anemia, was first approved as a glycoprotein with *N*-linked glycans and is now used as a generic-like protein drug such as a biosimilar. Interleukin 2 (IL2: proleukin), which activates the immune system, requires *O*-linked glycans. Antibodies are the most widely used for cancer treatments because of their antibody-dependent cellular cytotoxicity, which requires *N*-linked glycan functions. It has been known that the role of glycans is to extend the half-life of proteins in blood, but their essential functions remain ambiguous. Since 2010, many patents of glycoprotein-drugs began to expire, glycoprotein products with heterogeneous glycan structures have continued to be used under the strict manufacturing conditions.

Under these circumstances, the preparation methods of homogeneous glycoprotein drugs are still essential. Therefore, in this project, we studied the synthetic method of homogeneous glycoproteins. Especially we studied the manipulation of long peptides prepared in *E. coli*. for semi-synthesis of glycoproteins. For the coupling of long peptides with glycosyl peptide or glycosyl amino acid, we found three methods to convert the C-termini of the long peptides expressed in *E. coli*. into a thioester form. We established a method for synthesizing glycoproteins within 4-5 steps via coupling of these peptides with glycopeptides. In this method, long peptides were coupled to the N- and C-terminal sides of the oligosaccharyl asparagine-thioacid that assists coupling of these peptides. After removing the protecting groups of the resultant glycopeptides, folding experiments of the glycopeptides successfully yielded homogeneous glycoproteins. The conventional chemical synthetic methods of glycoproteins need over 100 steps, but in this study, the synthetic steps were dramatically reduced by a highly efficient new method.

In addition, using these methods, we also synthesized a candidate of glycoprotein drug that can suppress the activated T cells.

We also studied the evaluation method of the quality of homogeneous glycoproteins synthesized by mass spectrometry. In this project, we focused on hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry and analytical methods monitoring the half-width of each ion peaks. These methods were found to be an efficient method for the evaluation of glycoprotein purity.