

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) バイオ医薬品の先進的製造工程および品質管理における O 型糖鎖不均一性評価法の開発

(英語) Development of Evaluation Method for O-Glycan Heterogeneity in Advanced Manufacturing Process and Quality Control of Biopharmaceuticals

研究開発実施期間: 令和 3 年 7 月 1 日～令和 6 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 亀山 昭彦
(英語) Akihiko KAMEYAMA

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所・細胞分子工学研究部門・上級主任研究員
(英語) Chief Senior Researcher, Cellular and Molecular Biotechnology Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

和文: 糖タンパク質医薬品はバイオ医薬品の主流となっている。糖タンパク質に付加している N 型糖鎖は抗体医薬やエリスロポエチンなどでは薬効や動態に影響することが広く知られており、バイオ医薬品の品質特性解析において、糖鎖は重要品質特性 (CQA) の一つとされている。そのため、研究開発の上流段階から市販にいたる各段階における品質の一貫性確保、製造法変更や後続品における同等性/同質性の確保、異種抗原や予期しない糖鎖を付加する生産株のふるい落とし、さらには薬効/動態/安定性/凝集性と糖鎖との相関研究など、糖鎖の解析はバイオ医薬品ライフサイクルのあらゆる局面において必須の技術となっている。N 型糖鎖については、これらのニーズに対応した分析用標品や迅速分析キットなどが既に上市され、製薬企業において主に抗体医薬の品質特性解析に利用されている。

バイオ医薬品の売り上げ上位 10 位の中には抗体医薬の他に融合タンパク質という範疇に分類されるものが 3 種存在する。融合タンパク質とは抗体の Fc 領域やアルブミンなどに薬効を有するタンパク質すなわちレセプター類や凝固線溶系因子などを融合したものである。融合タンパク質医薬品の成長は今後も続き、2025 年には世界全体で推定 240 億ドルに達すると予測されている。この融合タンパク質では、N 型糖鎖ではなく O 型糖鎖の修飾を受けるものが多く、また融合させるためのリンカーペプチド部分には予期しない O 型糖鎖修飾が多数報告されている。そして O 型糖鎖がこれらの医薬品の薬効や安定性や凝

集性に関与するという報告もある。これまで 0 型糖鎖の解析は非常に難しかったため薬効や安定性などとの関連に関する知見は乏しいが、2019 年に研究代表者が開発した脱離オキシム化法（糖タンパク質から 0 型糖鎖を遊離する方法）をはじめとした糖鎖分析手法の進歩により、今後、多くの知見が得られるものと思われる。2022 年に FDA からエタネルセプトの 0 型糖鎖が薬効に影響する可能性を示唆する論文が発表された。これを機にバイオ医薬の 0 型糖鎖不均一性評価の重要性が再認識されている。このように融合タンパク質の品質特性解析においては、N 型糖鎖のみならず 0 型糖鎖の解析も重要なものとなるが、現時点において 0 型糖鎖の迅速分析キットは脱離オキシム化法を利用した 1 点のみが製品化されているに過ぎず、製薬企業におけるバイオ医薬品の品質特性解析において今後充実すべきテーマの一つといえる。

本研究課題では、脱離オキシム化法をバイオ医薬品の 0 型糖鎖不均一性評価に活用する上での問題点を明らかにした上で、その解決策を提案し、さらには簡便迅速な 0 型糖鎖不均一性評価法を確立することを目指して研究を進めてきた。そのために有機化学的に種々の糖鎖ペプチドを合成し、それを基質として脱離オキシム化を行い結果を解析してきた。そして、バイオ医薬品の品質特性解析に活用する上で、脱離オキシム化法には二つの問題があることを見出した。一つは、タンパク質の中での 0 型糖鎖結合部位によって糖鎖遊離速度が異なること、もう一つは遊離した糖鎖が反応条件下で徐々に分解することである。この事実、同じ糖鎖修飾を受けたバイオ医薬品であっても反応条件によって得られる結果に違いを生じる可能性があること、糖鎖遊離速度が遅い部位に結合した糖鎖の量を過小評価する可能性があることを意味する。これは将来的に融合タンパク質をはじめとするバイオ医薬品の品質評価におけるガイドラインを策定するためには看過できない重大問題である。これを解決するための検討実験に用いる糖鎖ペプチド標品（バリデーション用標品）を多種類デザインし合成した。これらの糖鎖ペプチドは一分子中に構造の異なる 2 種の 0 型糖鎖修飾があり、各修飾部位は糖鎖遊離速度が異なるようにデザインしたものである。真値が得られる分析法であれば、異なる 2 種の糖鎖が 1 : 1 の比率で得られるはずである。これらのバリデーション用標品を用いて糖鎖遊離速度の差を解消するために反応試薬として用いるヒドロキシルアミンの種類や濃度、塩基触媒の種類や濃度、反応温度、溶媒、添加物などを検討したが、いずれも糖鎖遊離速度の差異の解消や遊離した糖鎖の分解抑制の問題を解消するには至らなかった。マイクロ波照射による加熱を用いた場合には、反応速度の差が縮まる傾向が観察されたが、実用レベルで利用できるまでの効果は期待できなかった。

さらに MUC1 ムチンのタンデムリピートの各種糖鎖ペプチドを合成し、これを用いた実験により、脱離オキシム化反応では糖鎖遊離に続いて、糖鎖結合部位でのペプチド切断が見出された。このため当初の想定よりも問題は大きくなった。この課題を解決するためにはもはや遊離速度の差の解消ではなく、遊離した糖鎖の分解を抑制する方向で研究開発を進めなければならない。分解抑制の方法の一案として当初、限外ろ過膜を用いて基質である糖タンパク質と遊離して生じた糖鎖オキシムを分離し、分離した糖鎖オキシムを直ちに中和するアイデアを考えていた。しかし糖鎖結合部位でペプチド切断が起きるため、当初計画の限外ろ過膜による方法では解決できないことが明らかとなった。そのため、糖タンパク質を分解して得られる糖鎖ペプチドを固相担体に固定化することによる新たな解決を図った。具体的には、糖鎖ペプチドを固相担体に固定化した上で糖鎖遊離反応に供し、遊離した糖鎖を迅速に反応系から除去する方法（オンライン法）である。

オンライン法の実験系は金属製の短いカラムに固相担体を詰め、カラムの出口にフィルターを入れることで担体の流出を防止した。糖鎖ペプチドの担体への固定化にはクリックケミストリーを用いた。すなわちペプチドの N 末端アミノ基にアジド基を有するリンカーを結合させ、担体側にはアルキン基を有するリンカーを結合させた。これらは混合するだけで共有結合を形成し、効率的に糖鎖ペプチドを固相担体に固定化することに成功した。固相担体は糖鎖遊離反応の条件で安定であり、また水溶液と反応液の間で膨

潤度が大きく異なるものとして TentaGel を選定した。また、遊離した糖鎖は糖鎖オキシムとしてカラムの出口から溶出されるがこの時点ではヒドロキシルアミンを含む塩基性の溶液となっており、遊離糖鎖の分解が起きる可能性がある。そこで、カラム出口でアセトンのラインと接続し、溶液中のヒドロキシルアミンをアセトキシムに変換することで糖鎖の分解を抑制した。糖鎖オキシムはヒドロキシルアミンが存在しなければ塩基性条件下でも安定であることを令和 4 年度に見出していた。また触媒として用いる塩基は有機塩基であるジアザビシクロウンデセン (DBU) ではなく水酸化リチウムを用い、アセトン処理後の溶液をイオン交換樹脂で処理することによりリチウムイオンを除去した。このオンライン糖鎖遊離法の実験系を用いてバリデーション用糖鎖ペプチドの糖鎖遊離条件を検討した。その結果、遊離速度の速いアミノ酸配列に結合した糖鎖と遅いアミノ酸配列に結合した糖鎖をほぼ 1 : 1 の比率で得られる糖鎖遊離条件を見出すことができた。

バイオ医薬品の 0 型糖鎖不均一性評価法の確立のためには、「糖鎖遊離→糖鎖蛍光標識→標識糖鎖の単離→糖鎖分析」という各ステップそれぞれの最適化が必要である。単糖類の分析もできるように各ステップの最適化を検討した。具体的には糖鎖遊離反応後の後処理として糖鎖を吸着回収する方法ではなく、試薬やペプチド残渣を吸着回収する方法を検討した。この手法により単糖類も回収できることが判った。また蛍光標識化後の後処理にも同様の問題がある。これについては蛍光標識剤を固相抽出で除去する方法について検討を開始した。またキャピラリー電気泳動での分析を念頭に 0 型糖鎖の 8-アミノピレン-1,3,6-トリスルホン酸 (APTS) 化およびその後処理法の検討を行った。APTS は硫酸基を 3 か所に有するため親水性の高い標識剤である。そのため標識糖鎖と標識剤を分離することが難しい。この課題は糖鎖部分をアセチル化することにより、標識剤との分離が容易になることを見出した。さらに実際のバイオ医薬品の糖鎖分析について、令和 4 年時点での技術を用いてエタネルセプトとその後続品の 0 型糖鎖不均一性評価を行った。0 型糖鎖遊離法の改良研究の結果、令和 5 年度は糖鎖遊離反応をオンライン法で行う事になったため、そのための試料の前処理法の検討が必要になった。オンライン法の糖鎖遊離反応の基質としては、糖タンパク質ではなく糖鎖ペプチドにする必要があり、その糖鎖ペプチドも一分子中に 0 型糖鎖修飾部位は一か所であることが理想である。そこでバイオ医薬品をプロテアーゼで分解し糖鎖ペプチドを濃縮する方法について検討を行った。しかしモデルとして用いたエタネルセプトは 0 型糖鎖修飾部位が二つのアミノ酸に連続して存在する部位がある。各種プロテアーゼも一般的には糖鎖修飾部位を避けて反応すること、また糖鎖修飾部位のアミノ酸の N 末端アミノ基や C 末端カルボキシ基が遊離となった場合には糖鎖がはずれなくなること、この 2 点の問題があることが判明した。したがって、オンライン法で 0 型糖鎖遊離反応を実施する場合は、分析対象のバイオ医薬品のペプチド配列と 0 型糖鎖修飾部位について調査し、その上で適切な処理法を決める必要があることを明らかにした。また、これらの成果を規制科学へスムーズに反映させるべく、0 型糖鎖遊離反応の問題やその解決策など、このプロジェクトで明らかにした事柄について、国立医薬品食品衛生研究所に情報を提供した。

今回の研究はウェット研究であり、バイオ医薬品、特に融合タンパク質の 0 型糖鎖不均一性評価において信頼できる迅速簡便な方法を開発することを目指してきたが、将来的にはこれを端緒として、バイオ医薬品の糖鎖不均一性評価における国際的なガイドライン策定につなげることを想定したものである。最も優れた 0 型糖鎖遊離法である脱離オキシム化法の課題は現時点では一切未発表であり、その課題解決を目指す本研究課題の成果はバイオ医薬品の 0 型糖鎖不均一性評価における国際的なガイドライン策定において先導的な役割を担う重要な基盤となることが期待される。そのために、バイオ医薬品のガイドライン案策定において重要な役割を担う国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部に早い段階で情報を共有し、本研究終了後にバトンを渡すことができた。融合タンパク質をはじめとするバイオ医薬品を安全かつ高品質なものになるよう支援し、国民の保健・医療の向上に寄与するものと期待している。

英文：

Glycoprotein drugs have become the major modality of biopharmaceuticals. It is widely known that N-glycans of glycoproteins affect the efficacy and kinetics of antibody therapeutics and erythropoietin, and glycosylations are considered one of the critical quality attributes (CQAs) in the quality characterization of biopharmaceuticals. Therefore, heterogeneity evaluation of glycosylation is essential in all phases of the biopharmaceutical lifecycle, including ensuring consistency of quality at each stage from the upstream of research and development to production. For N-glycans, analytical samples and rapid analysis kits have already been launched to meet these needs, and are used by pharmaceutical companies mainly for quality characterization of antibody therapeutics.

In addition to antibody therapeutics, three of the top 10 selling biopharmaceuticals are classified as fusion proteins. Fusion proteins are proteins that combine the Fc region of an antibody or albumin with a protein that has a medicinal effect, such as receptors or coagulation/fibrinolytic factors. The growth of the fusion protein market is expected to continue, reaching an estimated \$24 billion worldwide by 2025. Many of these fusion proteins are modified with O-glycans instead of N-glycans, and many unexpected O-glycosylation have been reported in the linker peptide portion for fusion. There are also reports that O-type sugar chains are involved in the efficacy, stability, and aggregation of these fusion proteins. With advances in glycan analysis methods, such as the eliminative oximation method (a method to release O-glycans from glycoproteins) developed by the Principal Investigator in 2019, much knowledge concerning the functions of O-glycans is expected to be obtained in the future. In 2022, the FDA published a paper suggesting that the O-glycans of etanercept may affect the efficacy of the pharmaceutical. This has reaffirmed the importance of evaluating O-glycan heterogeneity in biopharmaceuticals. In the quality characterization of fusion proteins, it is important to analyze not only N-glycans but also O-glycans, but at present, only one rapid analysis kit for O-glycans has been commercialized using the eliminative oximation. The brush-up of rapid analysis kit for O-glycans should be enhanced in the quality characterization of biopharmaceuticals in the pharmaceutical industry in the future.

In this research project, we have clarified the problems in utilizing the eliminative oximation for the evaluation of O-glycan heterogeneity of biopharmaceuticals, proposed a solution to these problems, and furthermore, conducted research with the goal of establishing a simple and rapid method for evaluating O-glycan heterogeneity. For this purpose, we have synthesized various glycopeptides and analyzed the results of eliminative oximation using them as substrates. We found that there are two problems in the eliminative oximation for quality characterization of biopharmaceuticals. One is that the glycan release rate differs depending on the O-glycan binding site in the protein, and the other is that the released glycans are gradually degraded under the reaction conditions. This fact means that even biopharmaceuticals with the same glycosylation may yield different results depending on the reaction conditions, and that the important glycans such as xenoantigens may be underestimated. This is a serious problem that cannot be overlooked in order to establish

guidelines for the quality evaluation of biopharmaceuticals, including fusion proteins, in the future. To solve this problem, we synthesized a variety of model glycopeptides and conducted various studies. Then we propose that the peptide sequences and O-glycosylation sites of the biopharmaceuticals should be investigated prior to performing eliminative oximation, and chose the appropriate method for the O-glycan release reaction. In addition, to smoothly reflect our findings to regulatory science, we provided the National Institute of Health Sciences with information on the issues we identified in this project, including problems with O-glycan release reactions and their solutions.