

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業  
(英語) Basic Science and Platform Technology Program for Innovative Biological Medicine
- 研究開発課題名： (日本語) 糖タンパク質バイオ医薬品の糖鎖の高機能化のための解析・制御・管理システムの開発  
(英語) Development of a glycosylation analysis and control system to manufacture functionalized glycoprotein products
- 研究開発担当者 所属 役職 氏名： (日本語) 公立大学法人横浜市立大学大学院生命医科学研究科 教授 川崎 ナナ  
(英語) Nana Kawasaki, Professor, Graduate School of Medical Life Science, Public University Corporation Yokohama City University
- 実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日
- 分担研究 開発課題名： (日本語) 研究統括及び自動糖鎖構造解析システム, 糖鎖比較定量法, 工程開発自動化システム, 抗体糖鎖制御・管理が可能なシングルユースパーフュージョン培養システムの開発  
(英語) Research managing. Development of an automated qualitative method for the analysis of glycosylation, a relative quantitation method for glycosylation, an automated system for process development, and a single use perfusion culture system capable of glycosylation control in mAb production
- 研究開発担当者 所属 役職 氏名： (日本語) 公立大学法人横浜市立大学大学院生命医科学研究科 教授 川崎 ナナ  
(英語) Nana Kawasaki, Professor, Graduate School of Medical Life Science, Public University Corporation Yokohama City University
- 分担研究 開発課題名： (日本語) 抗体糖鎖制御・管理が可能なシングルユースパーフュージョン培養システムの開発  
(英語) Development of a single use perfusion culture system capable of glycosylation

## control in mAb production

研究開発担当者 (日本語) 公益財団法人木原記念横浜生命科学振興財団 常務理事 後藤 譲治  
所属 役職 氏名: (英語) George Goto, Board of directors' meeting, Kihara Memorial Yokohama  
Foundation

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

### 工程開発自動化システムの開発 — 糖ペプチド濃縮 G-TIP

糖タンパク質消化物の LC/MS では、共存するペプチドや過剰試薬等によるイオン化抑制を避けるため、糖ペプチドの濃縮が必要である。グラファイトカーボン、レクチン、親水性相互作用担体などが用いられるが、微量サンプルに対応できないこと、処理に数時間かかることなどの課題があった。川崎ナナ及び太田悠葵ら (横浜市立大学) のグループは、Empore™ C18 disk が充填された Stage Tip (日京テクノス) の上層にセルロース微結晶を充填した cellulose-C18 Stage Tip を開発した。これにより、微量糖タンパク質のトリプシン消化物から糖ペプチドを簡便、短時間に濃縮することが可能となった。臼井貴史ら (日京テクノス) は、輸送に適した形態に加工し、G-TIP の商品名で販売を開始した。

### 糖鎖比較定量法の開発

MS による定量では、安定同位体標識内標準物質を用いるのが一般的である。糖ペプチドの定量では、不均一性の高い糖ペプチドすべての内標準物質を作製するのは困難であり、MS を利用することは難しかった。川崎らは、新しい内標準物質 G-TAG を開発した。抗体 Y-mAb を還元・アルキル化後、トリプシン消化し、G-TIP により糖ペプチドを濃縮した。エンドグリコシダーゼ F1, F2, F3 により糖鎖を切り離し、還元末端の GlcNAc 1 分子が結合したペプチド (G-TAG) を得た。さらに、G-TAG を用いた抗体糖鎖の定量法 G-TAQ を開発した。G-TAG を内標準物質として、Y-mAb の主要グリコフォームを 10-500 fmol の範囲で定量できた。今後、抗体医薬品の品質評価、PAT ツール、比較定量法への応用が期待される。

### 自動糖鎖構造解析法の開発

川崎らは N 結合型糖鎖修飾ペプチドのペプチド配列、糖鎖結合位置、糖鎖構造を自動で解析する方法を開発した。この方法では、G-TAG 及び元の糖ペプチドの LC 溶出位置が近接することを利用して、RP-LC/MS/MS における元の糖ペプチドの保持時間を推定する。また、元の糖ペプチドのプリカーサーの  $m/z$  をペプチド+GlcNAc の質量にヘキソース、N-アセチルヘキソサミン、シアル酸、デオキシヘキソースの質量の整数倍を加算することで推定する。この保持時間と  $m/z$  を用いて作成した糖ペプチドのインクルージョンリストを元に LC/MS/MS を行うことにより、効率的に糖ペプチドの product ion scan が得られるようになった。現在、横井靖人ら (三井情報) 及び岡田敦朗ら (ThermoFisher Scientific) と連携して、自動化のためのプログラムを作成中である。

### 抗体糖鎖制御・管理が可能なシングルユースパーフュージョン培養システムの開発

後藤健治らのグループ (木原財団) はトラスツズマブ製造用培地や培養条件を変動させ、10 種類以上培養条件を検討した。産生されたトラスツズマブについて横浜市大で糖鎖解析を行った結果、様々な糖鎖を持つトラスツズマブが得られ、糖鎖構造に寄与する工程パラメータの最適化を検討した。検討している

工程パラメータにおいて、抗体発現力価が前回より 76%高いものが確認できた。また、この工程パラメータで培養した 5 バッチのうち 2 バッチで抗体産物の糖鎖プロファイルが同等と認められ、残り 3 バッチについては解析中である。後藤秀幸らのグループ（横浜バイオリサーチアンドサプライ）は、本工程パラメータをベースとし、1L 容量の WAVE 式シングルユース培養槽を用いたパーフュージョン培養法を実施した。本培養期間は 20 日間で、パーフュージョン中の生細胞数は  $8 \times 10^6$  cells/mL 以上を維持した。1 細胞あたり 1 日あたりの抗体生産量が 6 pg. 以上であることを確認し、糖鎖プロファイルは工程パラメータの最適化を検討しているものと比較を行っている。

#### **Development of an automated system for process development –A glycopeptide enrichment tool G-TIP**

Glycopeptides from glycoprotein digests should be enriched before performing LC/MS to avoid ion suppression by coexisting peptides and excess reagents. Graphitized carbon, lectins, and HILIC are often used for glycopeptide enrichment; however, some problems in the enrichment step need to be resolved, such as the time-consuming process and incapability for enrichment of a small amount of glycopeptides. Prof. Kawasaki and Dr. Ohta (Yokohama City University) developed Cellulose-C18 Stage Tip in which cellulose is packed on an Empore™ C18 disk (C-TIP, Nikkyo Technos ). The tip enables easy and rapid glycopeptide enrichment from a small quantity of tryptic digests. Dr. Usui was successful in optimizing Stage Tip for distribution and marketed it under the trade name G-TIP.

#### **Development of a relative quantitation method for glycosylation**

Stable isotope-labeled internal standards are generally used for quantitation with MS. However, the quantitation of glycopeptides is difficult because of the arduousness in preparing internal standards for heterogeneous glycopeptides. Prof. Kawasaki and Dr. Ohta developed a new internal standard named G-TAG. An antibody, Y mAb, was digested with trypsin, and glycopeptides were enriched using G-TIP. The glycopeptides were treated with endoglycosidase F1, F2, and F3 to release the glycans, and GlcNAc-modified peptides (G-TAG) were obtained. They also developed a novel quantitative method for antibody glycopeptides using G-TAG (G-TAQ: quantitation using G-TAG). Using G-TAQ, each glycoform was successfully determined within a range of 10–500 fmol.

#### **Development of an automated qualitative method for the analysis of glycosylation**

Prof. Kawasaki and Dr. Ohta developed a novel automated qualitative method for the analysis of N-glycosylated peptides using LC/MS/MS. This method allows determining the peptide sequence, glycosylation site, and glycan structure. This method uses G-TAG, whose retention time (RT) in LC/MS is close to that of the native glycopeptide. The inclusion list of the native glycopeptide  $m/z$  can be prepared by adding the  $m/z$  values of Hex, HexNAc, and dHex to the  $m/z$  value of G-TAG. Using the estimated RT and inclusion list for LC/MS/MS, the product ion spectra of native glycopeptides were effectively acquired. Based on this scheme, Prof. Kawasaki, Dr. Ohta, Dr. Yokoi (Mitsui Knowledge Industry Co., Ltd.), and Dr. Okada (ThermoFisher Scientific) are writing a program for the automated qualitative analysis of glycopeptides.

## Development of a single use perfusion culture system capable of glycosylation control in mAb production

Dr. Kenji Goto's group (Kihara) changed the trastuzumab culture methods that were set based on M17 and examined the cultures under more than 10 culture conditions. The group obtained various modified sugar chains of trastuzumab, and they continue to optimize parameters for culture conditions, which have an impact on sugar chain modification. Under a certain culture condition, they confirmed that the expression level of trastuzumab was 76% higher than M17. Dr. Hideyuki Goto's group (Yokohama Bioresearch and Supply) also preliminarily confirmed that sugar chains are equivalent in two of five batches produced under this culture condition. That group performed 1 L scale perfusion culture in a single-use WAVE bag using parameters based on M18. During perfusion culture, the culture period was 20 days, and the cell viability was  $>8 \times 10^6$  cells/mL. The group confirmed that the yield of antibodies pg per cell per day was  $\geq 6$  and we will confirm whether the sugar chain is equivalent to M18.

### Ⅲ. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 1 件、国際誌 0 件)

1. Yuki Ohta, Kotaro Kameda, Mei Matsumoto, and Nana Kawasaki: Rapid glycopeptide enrichment using cellulose hydrophilic interaction/styrene-divinylbenzene StageTips. Mass Spectrometry, 査読中
2. 川崎ナナ: バイオ後続品の品質評価. 病院薬剤師会誌. 52 (3) 257-262(2016).

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 質量分析による生体糖タンパク質解析のフロンティア、口頭、川崎ナナ、第 64 回質量分析総合討論会 (2016. 5.18) 大阪 国内
2. 松本 芽依, 太田 悠葵, 松野 宏樹,川崎 ナナ: 安定同位体標識内標準物質を用いない抗体医薬品糖鎖の定量解析. クロマトグラフィー会議 (2016. 11. 16-18) 東京 国内
3. 亀田康太郎, 太田悠葵, 川崎ナナ: 親水性相互作用/逆相 StageTip を用いた迅速糖ペプチド濃縮. 第 35 回日本糖質学会年会 (2016. 9. 1-3) 高知 国内

#### (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. バイオ医薬に関する規制、川崎ナナ、富山県若手エンジニアステップアップセミナー2016 生物学系コース バイオ医薬の基礎と実際 II 第 3 回 実践編、2016/10/12、国内
2. バイオテクノロジー応用医薬品の効果と可能性、川崎ナナ、横浜市立大学第 44 回 先端医科学研究センター 市民講座、2016/8/30、国内
3. 抗体医薬品開発の現状と展望、川崎ナナ、北陸 Oncology Pharmacist 研究会 第 6 回学術講演会、2016/8/27、国内

#### (4) 特許出願

なし