

In vitro glycoengineering – Suitability for BioPharma manufacturing

In vitro グリコエンジニアリング - バイオ医薬品製造への適合性

Application Note

April 2016

Sebastian Malik und Marco Thomann, Pharma Technical Development Penzberg,
Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany

イントロダクション

モノクローナル抗体 (mAb) のFc領域における糖鎖修飾 (Fcグリコシレーション) と生物学的活性との関連性は幅広く議論されており、多くの研究で検証されています。また、糖鎖構造の違いが治療用タンパク質の生物学的活性に異なった寄与をすることが知られています。¹ しかしながら、特定の糖鎖変異体が生物学的活性に好影響を与えることが判明していても、そのような糖鎖パターンを一貫して製造することは容易ではありません。細胞株構築やバイオプロセスの最適化により、糖鎖の均一性を高めたり特定の糖鎖パターンを部分的に達成することは可能ですが、多大な時間を要し、抗体収量など他の主要パラメータを阻害する可能性があります。さらに、このような煩雑な手法を用いて分析可能な量のmAbを特定の糖鎖パターンで作製することは経済的ではありません。

ただし、この課題は *in vitro* Glycoengineering (IVGE) によって解決が可能です。IVGEはダウンストリーム工程 (精製工程) で利用されるため、使用する細胞株やバイオプロセスに依存しません。従来、IVGEに必要な試薬である糖転移酵素 (グリコシルトランスフェラーゼ) が十分な量と品質で入手できなかったため、この手法は広く追求されていませんでした。近年になって、ロシュ・ダイアグノスティックスはロシュ・ファーマと共同でシアル酸転移酵素およびガラクトース転移酵素を開発し、バイオ医薬品産業においてIVGEを活用して治療用タンパク質の糖鎖プロファイルを大幅に改善することを可能にしました。

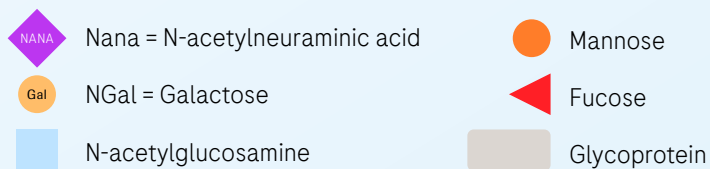
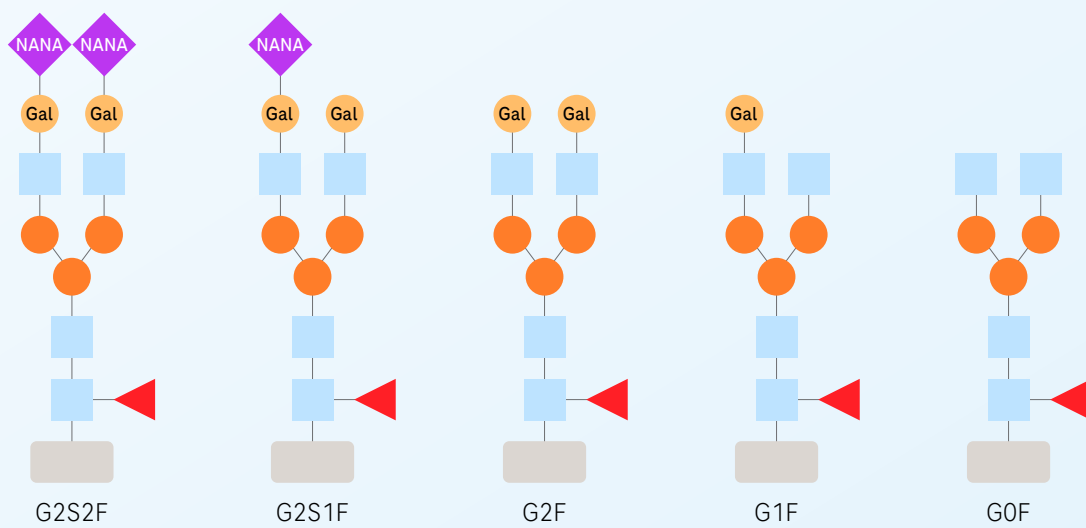
Note: 本稿では、治療用タンパク質の開発、製造および分析における *in vitro* glycoengineering テクノロジーの適合性について説明します。

イントロダクション

評価において最も関連性が高いと考えられるパラメータは以下の通りです。

- 酵素活性
- 製造プロセスへの導入可能性
- 酵素の汎用性
- 医薬品開発に伴うスケールおよび品質への拡張性

グリカンの命名法



グリコシルトランスフェラーゼの酵素活性

ターゲットタンパク質の糖鎖修飾に最適な反応条件は、用途ごとに異なる場合があります。したがって、提示したプロトコルはあくまで出発点としてください。それぞれの用途において、反応条件の最適化（例えば、酵素とIgGの比率を変えるなど）は有益な可能性があります。

β -1,4-Galactosyltransferase, GalT1 によるガラクトシル化

メソッド

1 mgのIgG1を、付録に記載のプロトコルに従ってガラクトシル化しました。グリコシル化の進行をモニタリングするため、異なる時間間隔でサンプルを採取し、質量分析法を用いてガラクトシル化の程度を分析しました。

結果

スタートサンプルは不均一なガラクトシル化パターンを示しました。ガラクトースが全くない（G0F）種とガラクトースが1つある（G1F）種が最も多く、ガラクトースが2つある変異体（G2F）の相対量は10%未満でした。

7時間の反応時間で、完全な二分岐ガラクトース化が達成されました（Fig. 01）

2時間のインキュベーション後の主要なグリカン種はG2Fグリカンであり、その相対量は90%以上でした。

α -2,3-Sialyltransferase, ST3 によるシアル酸化

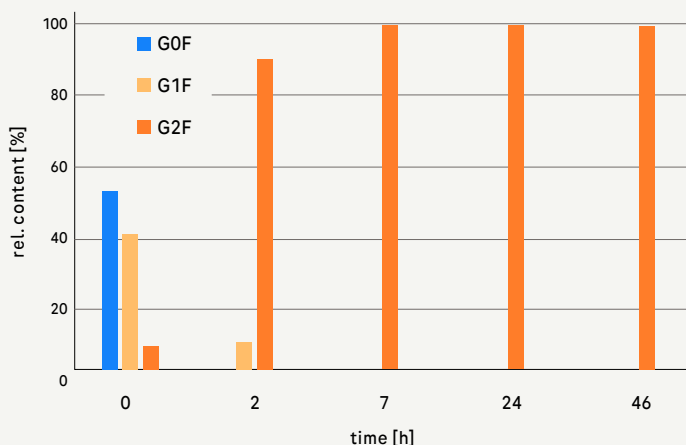
メソッド

1mgのIgG1を、付録に記載のプロトコルに従ってシアル酸化処理しました。糖鎖修飾の進行状況をモニタリングするため、異なる時点でサンプルを採取し、質量分析法を用いてシアル酸化の程度を分析しました。

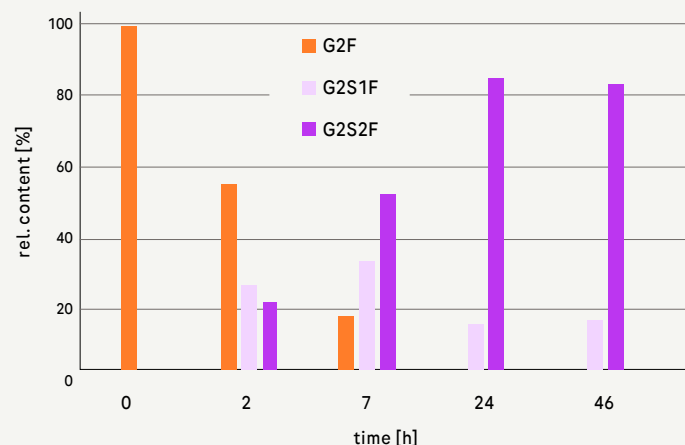
結果

24時間後、G2S2Fが約85%、G2S1Fが約15%という相対比率に達し、46時間培養後もこの比率は一定に保たれました。（Fig. 02）

完全にガラクトシル化されたIgG1をアクセプター分子として用いました。2時間後、グリカン組成はG2S1Fが25%、G2S2Fが20%でした。シアル酸含量はインキュベーション時間とともにさらに増加し、約24時間後に定常状態に達しました。アルカリホスファターゼ（AP）を反応系に添加しない場合、約7時間以降の培養時間ではシアル化の減少が観察されました（下記参照）。



01
IgG1 ガラクトシル化のタイムコース (10 μ g GalT1/mg IgG1)



02
ST3を用いたIgG1のシアル酸化のタイムコース (100 μ g ST3/mg IgG1)

α -2,6-Sialyltransferase, ST6 によるシアル酸化

メソッド

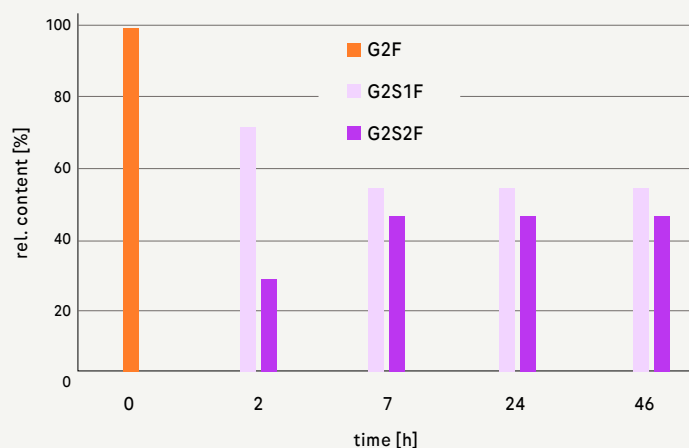
1mgのIgG1を付録に記載のプロトコルに従ってシアル酸化処理しました。シアル酸化の進行状況は質量分析法を用いて解析しました。完全にガラクトシル化されたIgGをアクセプター分子として使用しました。

結果

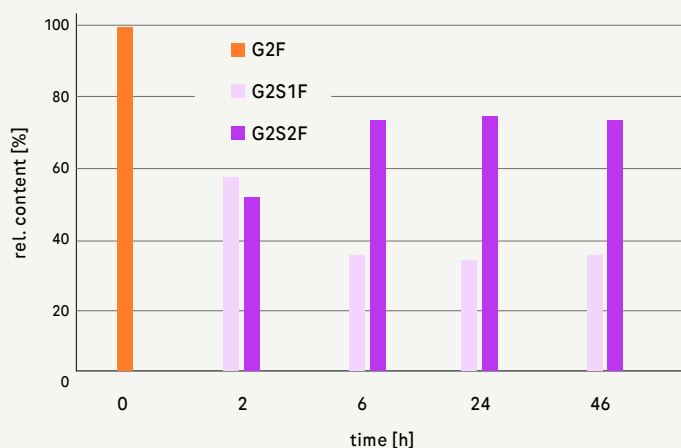
2時間後、グリカン組成はG2S1Fが72%、G2S2Fが28%となりました。二分岐型シアル酸付加は、インキュベーション時間の経過とともにさらに増加し、定常状態に達しました。約7時間のインキュベーション後、シアル酸付加は最大レベルに達し、G2S2Fが46%、G2S1Fが54%となり、46時間後も一定に保たれました。(Fig. 03) 反応系にAPを添加しない場合、約7時間以降のインキュベーション時間ではシアル酸付加の減少が観察されました (Fig. 03 にはデータを示していません)。

ST3またはST6を用いたシアル酸化は、反応ミックスが pH6~7 の範囲内であれば、異なる緩衝液系においても非常に信頼性が高く安定していることが確認されました。

Fig. 03のデータはMES緩衝液を用いた反応ですが、イオン強度の低い緩衝液を用いた反応では、最大シアル化レベルが70% G2S2Fまで上昇する可能性もあることが示されました。(Fig. 04)



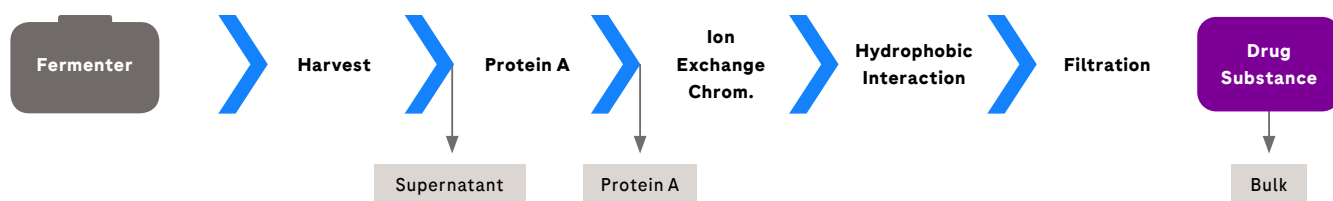
03
ST6を用いたIgG1のシアル酸化のタイムコース (100 μ g ST6/mg IgG1)



04
CMP-NANAをMES緩衝液にかわり水に溶解した場合、シアル酸化が改善 (100 μ g ST6 /mg IgG1)

製造プロセスへの導入

最終医薬品原薬（Drug Substance）から糖転移酵素、反応バッファーおよび活性化糖を除去する必要があるため、ダウンストリームの精製工程を繰り返さないよう、IVGEを中間体の早期段階で適用することが本法の利点になります。また、コストと時間、特に大規模化を想定した用途における重要な点として、IVGEの2ステップを同時に行う 1-potプロセスで実施できる可能性があげられます。これらの課題に対処するため、IVGEを用いて、培養上清、プロテインA溶出液、高純度バルクなど、異なる工程由来のIgG1に対して、ガラクトシル化とシアル化を同時に行う反応を行いました。（Fig. 05）



05

IVGEを適用するサンプル,異なるダウンストリーム中間体と精製バルクとの比較

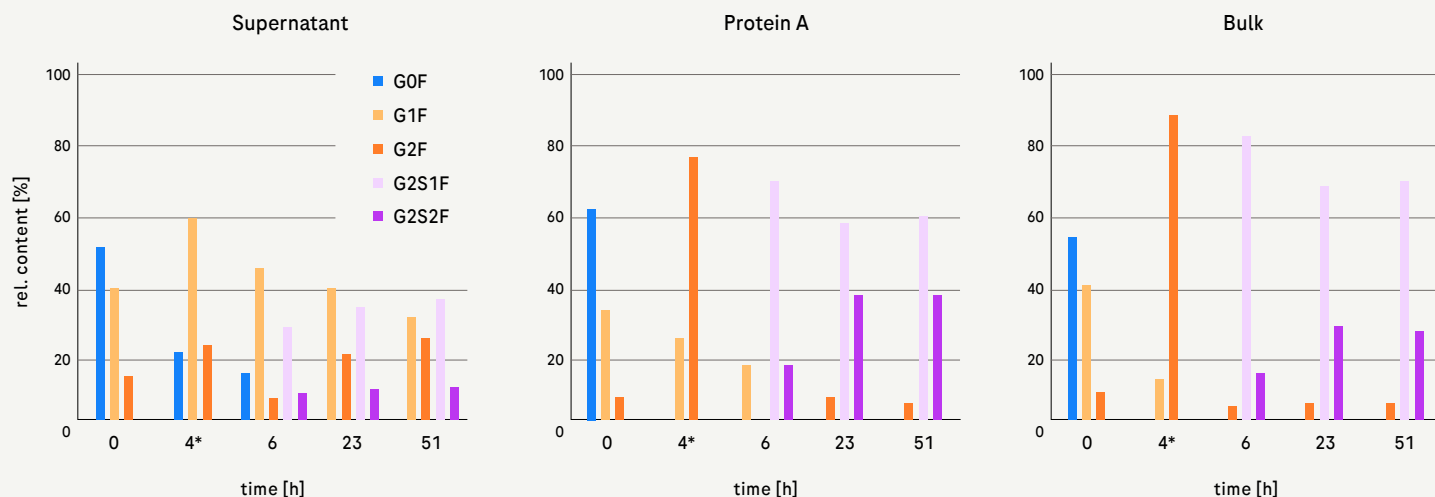
ガラクトシル化とシアル化の同時進行 （“1-pot-reaction”）

メソッド

バルク試料、プロテインA溶出液、および培養上清（それぞれIgG1を1mg含有）を、精製工程を経ずにガラクトシル化およびシアル酸付加反応を行った。（プロトコルは付録を参照）グリコシル化の進行状況は、異なる時点で分取した試料を質量分析法によりモニタリングした。

結果

3つのサンプルすべてにおいて、二分岐型シアル酸付加は23時間後に最大レベルに達しました。（Fig. 06） 1-pot法におけるシアル酸付加の最大レベルは、プロテインAおよびバルクサンプル共に、それぞれ約30% G2S2Fおよび60% G2S1Fでした。上清サンプルでは、これらのレベルがはるかに低い結果となりました。したがって、素材としてはプロテインA精製物またはバルク材料の使用が推奨されます。



06

異なるダウンストリーム工程の中間体を用いたIVGEの結果 (*incubation with GalT1 for 4 hours, followed by addition of ST6, CMP-NANA, and AP)

酵素の汎用性

3種類の酵素（GalT1、ST3、ST6）はいずれもIgG1およびIgG4に対して同程度の高い活性を示しました。また、これらの酵素は他の組換え糖タンパク質の糖鎖修飾にも有効でした（データ非開示）。

医薬品開発における 規模と品質の向上

商業用医薬品の開発においてIVGEを利用するためには、単純な研究・分析用途と異なり、原材料とテクノロジーが、プロジェクトを通して、スケールアップと規制への準拠まで伴走していくことが求められます。

ロシュのグリコシルトランスフェラーゼは、そのための重要な以下の要件を満たしています。

- **スケーラビリティ:** ご要望に応じてキログラム単位で酵素を提供することも可能です。
- **クオリティ:** ご要望に応じてGMPグレード品を提供可能です。
- **アニマルフリー:** 培養・精製・製品化の工程で動物由来成分を一切使用しておりません。

概要と展望 – バイオ医薬品製造に おけるIVGEの利用

In vitro glycoengineering, IVGEは、様々な分析目的において、少～中容量（最大1g程度）の物質を生産するために既に利用されています。例えば、初期研究プロジェクトにおける構造機能解析（作用機序の解明など）²、前臨床試験（薬物動態試験など）、比較試験、あるいはプロジェクト後期の重要品質特性（CQA）評価を支援するために用いられてきました。ロシュで開発されたグリコシルトランスフェラーゼ酵素は、IgG1抗体やIgG4抗体といった様々な治療用タンパク質に対して、既に良好な結果が得られています。

IVGEのステップは、プロテインA精製IgG1の場合と同様に、既存のダウンストリーム工程に組み込むことができます。

弊社では、グリコシルトランスフェラーゼと活性化糖をGMPグレード・アニマルフリー製品としてご要望に応じて大量生産し、臨床用製品の修飾に使用していただくことができます。また、ELISAベースの残留酵素試験もご用意があり、IVGE後の酵素除去のモニタリングが可能です。

IVGEのルーチン製造工程への適用に向けた必要なものは揃っています。ぜひ、皆様の用途での実現に向けて最適化と検証を始めてみてください。

付録

Galactosylation of IgG

1. Preparation of the reaction buffer, containing 10 mM UDP-Gal, 5 mM Manganese(II) Chloride (MnCl₂), and 100 mM MES, pH 6.5.
 - Dissolve 61 mg UDP-Gal, 6.3 mg MnCl₂, and 195 mg MES in 6 ml water.
 - Adjust pH to 6.5, and adjust to a final volume of 10 ml with water.
2. Setting up the galactosylation reaction, containing 976 µg UDP-Galactose, 10 µg GalT1, and 1 mg IgG.
 - 160 µl reaction buffer
 - 33.3 µl of IgG (30 mg/ml, pH 6)
 - 1.8 µl Galactosyltransferase
 - 4.9 µl water
3. Incubate the reaction at 37°C, then take aliquots and stop the reaction by freezing the tube at -15°C to -25°C for mass spectrometry analysis.

Sialylation of IgG using either ST6 or ST3

1. Preparation of the reaction buffer, containing 6.1 mM CMP-NANA, 200 mM MES, pH6.5.
 - Dissolve 40 mg CMP-NANA and 390.4 mg MES in 6 ml of water.
 - Adjust pH to 6.5, and adjust to a final volume of 10 ml with water.
2. Setting up the sialylation reaction, containing 500 µg CMP-NANA, 100 µg Sialyltransferase, and 1 mg IgG.
 - 125 µl reaction buffer
 - 100 µl IgG (10 mg/ml, pH 6)
 - 18 µl Sialyltransferase (ST3 or ST6)
 - 2.8 µl Alkaline Phosphatase (1 mg/ml)
 - 2.53 µl ZnCl₂ solution (10 mM)
 - 1.67 µl water
3. Incubate the reaction at 37°C, then take aliquots and stop the reaction by freezing the tube at -15°C to -25°C for mass spectrometry analysis.

Simultaneous galactosylation and sialylation (“1-pot-reaction”)

1. Setting up the galactosylation reaction, containing 976 µg UDP-Galactose, 10 µg GalT1, and 1 mg IgG.
 - 160 µl reaction buffer
 - 33.3 µl of IgG (30 mg/ml, pH 6)
 - 1.8 µl Galactosyltransferase
 - 4.9 µl water
2. Incubate the reaction for 4 hours at 37°C, then take 50 µl of this reaction for mass spectrometry analysis.
3. Add reagents for subsequent sialylation to the remaining 150 µl galactosylated IgG, to set up the sialylation reaction, containing 375 µg CMP-NANA, 75 µg Sialyltransferase, and 0.75 mg IgG.
 - 94 µl reaction buffer
 - 13.6 µl Sialyltransferase ST6
 - 2.9 µl Alkaline Phosphatase (1 mg/ml)
 - 2.6 µl ZnCl₂ solution (10 mM)
4. Incubate the reaction at 37°C, then take aliquots and stop the reaction by freezing the tube at -15°C to -25°C for analysis.

Note: In case of varying IgG concentrations, the protocol must be adapted. The most important parameter to be considered is the mass ratio of activated sugar, IgG and glycosyltransferase.

オーダーインフォメーション

Glycosyltransferases for research	包装サイズ	アニマルフリー*	製品番号
α -2,3-Sialyltransferase, rec.	custom fill		07 429 916 103
Glycotransferases for drug development	包装サイズ	アニマルフリー*	製品番号
α -2,6-Sialyltransferase, rec. EQ	custom fill		08 098 174 103
β -1,4-Galactosyltransferase, rec. EQ	custom fill		08 098 182 103
活性化糖供与体	包装サイズ	アニマルフリー*	製品番号
UDP-Galactose animal-free (UDP-Gal)	custom fill		07 703 562 103
CMP-N-Acetylneuraminic acid (CMP-NANA)	custom fill		05 974 003 103
UDP-N-Acetylgalactosamine	custom fill		06 369 855 103
関連製品, 残留酵素検出キット	包装サイズ	アニマルフリー*	製品番号
Alkaline Phosphatase	custom fill		03 137 031 103
Residual Protein α -2,6-Sialyltransferase Kit	96 tests		08 011 478 001
Residual Protein β -1,4-Galactosyltransferase Kit	96 tests		08 182 990 001

* 培養、精製、最終製剤化において動物由来原材料を使用していません。

Regulatory disclaimers and license limitations

are listed on the respective product pages on custombiotech.roche.com

References

¹ Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins, Gary Walsh & Roy Jefferis, Nat Biotechnol. 2006, Oct;24(10):1241-52

² In vitro glycoengineering of IgG1 and its effect on Fc receptor binding and ADCC activity, M. Thomann et al., PLoS One. 2015 Aug 12;10(8):e0134949

© 2026 All rights reserved.

Published by

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
〒108-0075
東京都港区港南1-2-70
品川シーズンテラス

Global: custombiotech.roche.com

日本: custombiotech-roche.jp

お近くのRoche CustomBiotech
または代理店へご連絡ください

Japan

japan.custombiotech@roche.com