From the Research on Cell Recognition to the Development of Glycotechnology Drug - Report from Glycotechnology Meeting in San Francisco (May 17-19, 1993) -

細胞認識についての研究から糖鎖工学による薬剤開発へ
—San Franciscoでの糖鎖工学会議(1993年5月17-19日)の報告—

*Wang, W.T.

MicroCarb Inc., Gaithersburg, MD 20879, USA, FAX: 1- 301-590-0731

Key Words: carbohydrate therapeutics, cell recognition, glyco analysis, glycotechnonology, glycotechnology drug

A. Introduction

What is the real picture of today's glycotechnology? What are the major breakthroughs and products? And how are the glycotechnology companies using the basic research results to produce pharmaceutical products? What are the prospects of glycotechnology industry? The first U.S. Glycotechnology Meeting organized by Cambridge Healthtech Institute was held on May 17-19 in San Francisco and has given positive answers to the above questions.

Among the 300 attendants, 80% represented approximately one hundred companies. The first day's session covered two topics: the "Overview" and "Carbohydrates and the Body". The following two days of the meeting covered the topics of "Glyco Analysis", "Glycosylation", "Carbohydrate Products", and "Carbohydrate Therapeutics".

B. Carbohydrate Recognition Is the Foundation for Developing Glycotechnology-based Drugs

The most active fields in glycoscience are glycosylation, cell adhesion molecules, and carbohydrate function in bacterial infections. During the meeting, these three topics became the major focus of discussion.

B-1. Two Major Aspects of Glycosylation Research

A great number of recombinant proteins are glycoproteins. The sugar chain(s) on the same protein backbone can be composed of different sugars and chain lengths. These sugar chains are transferred to the protein after assembly of sugar units. The assembly is not directly controlled by the expressed genes, however, they are influenced by various internal and external conditions, such as the type of cell line, and culture media. The primary goals of glycosylation research are to analyze the composition of these sugar chains, to investigate the correlation between protein function and sugar chain structure, and to discover means to control glycosylation. Several of the reports at the meeting belong to this category. For example, Dr. Charles Goochee from Stanford University showed that the

A. はじめに

今日の糖質工学の真の姿とはどのようなものであろうか。主要な技術の発展や製品とはどのようなものであろうか。そして糖質工学に携わる企業はどのようにして薬剤の製造に基礎的研究の結果を生かせばよいのであろうか。糖質工学産業の将来はどのようなものであろうか。アメリカにおける最初の糖質工学の会議がケンブリッジ健康技術研究所の主催で5月17日から19日にかけてSan Franciscoで開かれ、上のような疑問に対して明確な回答を与えた。

300人の出席者の中、80%はおおよそ100の企業の代表者であった。1日目のセッションでは「概要」と「糖質と身体」という2つのテーマについて話し合われた。2日目、3日目は「糖鎖分析」、「グリコシル化」、「糖質製品」そして「糖質治療学」といったテーマについて話し合われた。

B. 糖質の認識が糖質工学に基づく医薬品の基礎となる

糖質科学で最も盛んに研究されている領域は、グリコシル化、細胞接着分子、そしてバクテリアの感染における糖鎖機能についてである。会議の間、これらの3つのトピックスを中心に議論が展開された。

B-1. グリコシル化反応についての研究における2つの主要な観点

多くのリコンビナントタンパク質は糖タンパク質である。同一タンパク質上に糖の種類や長さの異なる複数の糖鎖を生やすこともできる。これらの糖鎖は糖鎖部分の組み立てが終わってからタンパク質に転移される。糖鎖の組み立ては発現遺伝子に直接コントロールされているのではないが、細胞系や培養培地といった様々な内外の要因によって影響される。グリコシル化についての研究の最初の目標はこれらの糖鎖組成を分析すること、タンパク質機能と糖鎖構造の相互関係を調べることであり、そしてグリコシル化反応を制御する方法を発見することである。この会議で報告されたレポートのいくつかは、このカテゴリー

* Present address: GlycoTech Corp., 14915 Broschart Road Suite 200 Rockville, MD 20850, USA, FAX: 1-301-738-1077

sialylation of recombinant G-CSF by CHO cells depends upon the extracellular concentration of ammonium ions. He also pointed out that the glycosylation of transferrin secreted by an HepG2 cell line is effected by the condition of the cell culture. Dr. Pamela Stanley of Albert Einstein College of Medicine reported that mutant CHO cell lines missing a particular glycotransferase, as well as lines that have acquired the ability to express developmentally regulated carbohydrates such as Lewis^x and Sialyl Lewis^x may facilitate glycosylation engineering in order to optimize the biological activity of a glycoprotein. The report presented by Dr. Mary Sliwowski of Genentech, "Potential Impact of Cellular Glycosidase on Final Structure of Recombinant Glycoproteins" and "The Influence of Glycosylation on Human IgG Antibody Effector Function" by Dr. Roy Jefferis, University of Birmingham (UK), and "Characterization of Erythropoietin" by Dr. Kevin Rice of Ohio State University are just a few other examples.

The second aspect of glycosylation research is to understand and exploit cell recognition. Several examples are very exciting and instructive. More than ten years ago, ricin was coupled to a monoclonal antibody against a carbohydrate tumor cell antigen. However, the "magic bullet" did not only kill tumor cells, but also killed normal cells with exposed galactose. Dr. Mark Hardy from ImmunoGen described a modification of tri-antennary complex oligosaccharide from bovine fetuin, which was coupled to the B-chain of ricin to block the galactose binding site of the B-chain. Because the oligosaccharides have a very high binding affinity to the lectin, the modified "magic bullet" has minimal side effects caused by any random Gal binding.

Gaucher's disease is characterized by a deficiency of glucocerebrosidase. As early as 1965, Dr. Roscoe Brady proposed enzyme replacement therapy. However, the amount of enzyme that could reach the lysosome was limited. Dr. James Rasmussen reported that after a mannose receptor on macrophages was discovered, the scientists at Genzyme trimmed the sugar chain on glucocerebrosidase to expose a mannose core, or directly conjugate a high mannose oligosaccharide to the enzyme or recombinant enzyme to facilitate uptake by the cells where the enzyme is needed. So far the clinical trials look very promising.

Glycosylation is also involved in the infection process of HIV. As Dr. Gary Jacob from Monsanto showed, the HIV envelope glycoprotein gp160 has to be processed into gp41 plus gp120 before binding to host CD4 receptor. This process can be inhibited by *N*-butyl-1-deoxy nojirimycin (SC-48334), an inhibitor of α -glucosidase I. In combination with AZT, this drug is currently in the phase II clinical trials. In the light of this, it is worthwhile noting that many plant alkaloids are inhibitors of glycosidases, and their action similar to that by the above mentioned nojirimycin may be the therapeutic mecha-

に入るものであった。例えば、スタンフォード大学のCharles Gooch博士はCHO細胞によるリコンビナントG-CSFのシアリル化がアンモニウムイオンの細胞外濃度に依存すると報告した。彼はまた、Hep-G2細胞系が分泌するトランスフェリンのグリコシル化は細胞培養の条件に影響されることも指摘している。Albert Einstein 医科大学のPamela Stanley博士の報告によると、ある特別な糖転移酵素を発現できないCHO細胞系の変異株を利用することで、グリコシル化の工学によって糖タンパクの生理活性をより効率よく活用できるようになるであろうということであった。ちょうど、Le^xやシアリルLe^xといった細胞分化に伴い制御される糖鎖を発現できる細胞系と同じように。Genentech社のMary Sliwowski博士のレポート、「リコンビナント糖タンパク質の末端構造に対する細胞性グリコシダーゼの有効性」、バーミンガム大学(UK)のRoy Jefferis博士の「ヒトIgG抗体のエフェクター機能におけるグリコシル化の影響」、そしてオハイオ州立大学のKevin Rice博士の「エリスロポエチンの同定」もその例である。

グリコシル化についての研究の2番目の観点は細胞認識を理解しそれを利用して開発することである。とても興味深く、教訓的なレポートもいくつかあった。10年以上前にリシンをガン細胞の糖鎖抗原に対するモノクローナル抗体と結合させた。しかし、「魔法の弾丸」はガン細胞だけでなく、むき出しのガラクトースをもった普通の細胞をも殺してしまった。ImmunoGen社のMark Hardy博士は牛のフェツインから取り出した3本鎖の複合型オリゴ糖鎖の修飾について報告した。このオリゴ糖鎖はリシンのB鎖と結合することによって、B鎖のガラクトース結合部位をブロックする。オリゴ糖は非常に高いレクチンへの親和性をもっているため、修飾された「魔法の弾丸」はランダムなGal結合によって生じる最小の副作用しか示さなかった。

Gaucher's病の特徴はグルコセブレロシダーゼが欠乏することである。1965年には、Roscoe Brady博士が酵素置換治療を提案した。しかし、リソソームに到達できる酵素の量は限られていた。James Rasmussen博士は、マクロファージ上のマンノースレセプターが発見されたので、Genzyme社の科学者達がグリコセブレロシダーゼ上の糖鎖を切り取ってマンノースコアをさらしたり、酵素やリコンビナント酵素に高マンノース型オリゴ糖鎖を直接結合させたりして、酵素を必要としている細胞に摂取されやすくしたについて報告した。今のところ臨床試験についてもとても有望である。

グリコシル化はHIVの感染過程でも起こる。Monsanto社のGary Jacob博士が示したように、HIVエンベロープの糖タンパク質であるgp160は宿主のCD4レセプターに結合する前にgp41とgp120とに分かれなければならない。この過程は α -グルコシダーゼ I の阻害剤であるN-ブチル-1-デオキシノジリマイシン(SC-48334)によって阻害される。AZTとの組み合わせによって、この薬は今フェーズII臨床試験まで進んでいる。このことを考慮に入れると、多くの植物性アルカロイドがグリコシダーゼの阻害剤であること、そしてそれらの作用は上で述べたノジリマイシンの作用に似ており、HIV感染を防ぐのに効くいくつ

nism of some traditional Chinese medical herbs on HIV infection.

B-2. The Basis of Developing Cell Adhesion Molecule Drugs

When tissue is infected or injured, small molecules such as cytokines or histamine are released, inducing the expression of recognition proteins known as selectins on the neighboring endothelial cells of the venule. These selectins interact with neutrophils in the blood stream and cause white blood cells to slow down their movement and start a process called "rolling" along the endothelial cell surface. In the process of "rolling", another protein, an integrin on neutrophils known as LFA-1 is activated. LFA-1 interacts with an immunoglobulin-like adhesion molecule (ICAM-1) on the endothelial cells. Finally, the shape of neutrophils are changed, and diapedesis occurs. A very striking finding is that the ligand on neutrophils involved in this process has sialyl Lewis^x [NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc-, SLe^x] structure.

Cell Adhesion molecules (CAM) are involved in the inflammation process which normally is a protective response of the body. However, CAMs can also initiate autoimmune disorders like rheumatoid arthritis, asthma, multiple sclerosis, and other diseases, such as ischemia-reperfusion injury, metastasis, and even the common cold. Currently, there are two approaches to developing CAM drugs: making monoclonal antibodies to block CAMs; or using small oligosaccharide analogs to inhibit binding. Combining enzymatic and chemical methods, scientists at Cytel have successfully synthesized SLe^x analogs. Dr. James Paulson showed at the meeting that these compounds actually prevent the inflammatory response. Recently, Dr. John Magnani of GlycoTech reported that compound containing both sialyl Lewis^x and sialyl Lewis^a structures possess even greater ability to inhibit of inflammatory response than SLe^x alone. GlycoTech is collaborating with Ciba Geigy in developing this type of drug.

During the discussion on the basic research of cell recognition, Dr. Hakomori reported a finding that the interaction between carbohydrates is instantaneous, and is the initial step in other types of binding that may occur in the process of metastasis.

B-3. Adhesion Molecules Remain Unchanged among Variants

Haemophilus influenza b is the cause of many infant infections including meningitis and otitis media. However, polysaccharide vaccines can only protect infants older than 18 months because the polysaccharides are T-cell independent immunogens. The immature immune system of infants cannot make antibodies without the help of T-cells. Conjugate vaccines are a new development in polysaccharide vaccines. By conjugating the polysaccharide to a protein, such as KLH, diphtheria, or tetanus toxoids, infants as young as 2-4 months old

かの中国の伝統的な薬草の治療メカニズムと同じであるかもしれないことは注目しておいた方がよいと思われる。

B-2. 細胞接着分子薬剤の開発の基礎

組織が感染したり、傷ついたりした時、サイトカインやヒスタミンといった小さな分子が放出され、セレクトリンという認識タンパクを近くの細静脈の内皮細胞で発現させる。これらのセレクトリンは血流の中で好中球と相互作用し、白血球の動きを鈍らせ、「ローリング」と呼ばれる過程を内皮細胞の表面沿いに始めさせる。「ローリング」の際に、LFA-1という好中球のインテグリンが活性化される。LFA-1は免疫グロブリン様接着分子(ICAM-1)と内皮細胞上で相互作用する。最終的には好中球は変形して、漏出が起こる。この過程に関係する好中球のリガンドがシアリルLe^x[NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc-, SLe^x]構造をしていることは、とても興味深い発見である。

細胞接着分子(CAM)は通常は身体の防御反応である炎症反応の過程にも関係している。しかし、CAMはリウマチ性関節炎、喘息、いろいろな要素からなる動脈硬化症、そして虚血症からの再灌流に伴う疾患、がん転移、更には普通の風邪など様々な自己免疫疾患をも引き起こす。現在は、CAMに対する薬剤の開発には2つのアプローチがある。1つはCAMをブロックするために単クローン抗体を開発すること、もう1つは結合を抑制するオリゴ糖鎖類似化合物を使うことである。酵素的方法と化学的方法を組み合わせ、Cytel社の科学者達はSLe^xの類似化合物の合成に成功した。James Paulson博士はこの会議でこれらの化合物は実際に炎症反応を阻害することを示した。最近、GlycoTech社のJohn Magnani博士がシアリルLe^xとシアリルLe^aの両方の構造を含んだ化合物がSLe^x単独のものよりも炎症反応をより抑えることを報告した。GlycoTech社はこのタイプの薬剤の開発においてCiba Geigy社と協同研究している。

細胞認識についての基礎研究について議論している中で、箱守仙一郎博士は糖鎖間の相互作用は瞬時に起こり、がん転移などの過程で起こる別のタイプの結合の最初の段階となることを報告した。

B-3. 接着分子は様々な生物の間で保存されている

ヘモフィルスインフルエンザbは髄膜炎や中耳炎などといった様々な幼児感染の原因となる。しかし、多糖はT細胞に依存しない抗原なので、多糖のワクチンは18ヶ月以上の幼児しか守れない。というのは幼児の未熟な免疫システムでは、T細胞の助けがなくては抗体を作れないからである。複合ワクチンは糖鎖ワクチンを新しく発展させたものである。多糖をKLH、ジフテリア、破傷風のトキシノイドといったタンパク質に結合させることによって、2-4ヶ月の幼児も効果的に免疫させることが

can be effectively immunized. Dr. William Egan from the FDA gave a summary of this new vaccine strategy.

One of the most significant problems of current vaccines is the inability to protect against new variants of microorganisms. Research on cell recognition is paving a way to resolve this problem. The critical step in bacterial or viral infections is to adhere to host cells, or mucus. Dr. Howard Krivan of MicroCarb showed identification of human receptors for more than sixty microbial pathogens. Most of these receptors are carbohydrates. For example, the human receptor for the above-mentioned *H. influenza b* is an asialo-ganglioside (aGM1). On the bacteria, there are corresponding proteins known as M-selectin adhesins. The sequence of these outer membrane proteins is highly conserved. Using molecular biology techniques, adhesin proteins can be identified, and cloned in a large scale production for use as "vaccines for the 21st century". The invasion of microbes in the body can be also inhibited by small, rigid oligosaccharides. Dr. David Zopf of Neose Pharmaceuticals reported on their efforts to develop these type of drugs against infectious diseases.

C. Three Categories of Glycotechnology-based Drugs

Most of the earlier carbohydrate drugs are polysaccharides. Heparin is used as anti-coagulant. The hyaluronic acid is used for ophthalmic surgery, osteoarthritis therapy, and cosmetic uses. In 1993 the estimated market for heparin-based products in the U.S. is \$200 million, and by 1996 it will be \$300 million. The U.S. hyaluronic acid market in 1993, is approximately \$90 million, and in 1996 is estimated to reach \$425 million. The increase in the market is attributable to their degradation and modification products.

C-1. Drugs from Polysaccharides by Degradation and Modification

Polysaccharide drugs are macromolecules that may have multiple therapeutic functions. Some individual functions are actually located on a defined oligosaccharide structure. For example, the anti-coagulation activity of heparin is based on the pentasacchride sequence:

It is quite difficult to prepare a stable, efficient, and

できる。FDAのWilliam Egan博士がこの新しいワクチン合成の計画について概要を説明した。

現在のワクチンの最も重大な問題点のひとつに、微生物の新しい異形に対しては無効であるということがある。細胞認識についての研究がこの問題の解決の道に一筋の光を照らした。宿主細胞や粘液と接着することは、バクテリアやウイルスの感染において重要な段階である。MicroCarb社のHoward Krivan博士は60以上の病原性微生物に対するヒトのレセプターを同定した。これらのレセプターの多くは糖鎖である。例えば、上で述べたヘモフィルスインフルエンザbに対するヒトのレセプターはアシアロガングリオシド(aGM1)である。バクテリアにはM-セレクトイン接着分子というタンパク質がある。これらの膜外タンパク質の配列はよく保存されている。分子生物学の技術を使えば接着タンパク質を同定し、「21世紀のためのワクチン」として大スケールで生産することができる。微生物の体内への侵入は小さくて堅いオリゴ糖鎖によっても阻害される。Neose Pharmaceuticals社のDavid Zopf博士は伝染病に対するこれらのタイプの薬剤開発に向けた彼らの研究について報告した。

C. 糖質工学に基づいた薬剤の3つのカテゴリー

以前の糖質薬剤の多くは多糖であった。ヘパリンは抗凝固剤として使われている。ヒアルロン酸は眼の外科手術や骨関節炎の治療、化粧品に使われている。ヘパリンを使った製品のアメリカにおける市場は1993年では2億ドル、1996年には3億ドルになるであろうと見積もられている。また、ヒアルロン酸のアメリカにおける市場は1993年はおよそ9,000万ドルだが、1996年には4億2,500万ドルに達すると見積もられている。市場の拡大は多糖分解や修飾産物のためである。

C-1. 多糖の分解と修飾によって作られる薬剤

多糖薬剤はいろいろな治療機能を示す高分子である。独立した機能の中には既に分かっているどのオリゴ糖鎖構造によるものが分かったものもある。例えば、ヘパリンの抗凝固活性は次の5糖残基の配列に基づいている。

安定で、効果があって、なおかつ水溶性の薬剤を多糖に全

soluble drug with only intact polysaccharides. Current methods to develop polysaccharide drugs are: i) to lower molecule weight of the polysaccharide in order to enhance a specific function, ii) to identify, and synthesize the functional oligosaccharide, and iii) chemical modification of polysaccharides. As Dr. Neil Ackerman of Glycomed reported that they adopted the third method. By chemical modification, the anti-coagulant activity of heparin is minimized, while retaining the antiproliferative function against smooth muscle cells, thus creating a new restenosis therapeutic drug, Astenose. Other modification of polysaccharides are listed on Table I. This type of carbohydrate therapeutic is based upon the existing functions of a polysaccharide. It is less risky to develop, and easier to market.

C-2. Oligosaccharide Inhibitors and Low Molecular Weight Sugar Analog

Because of the high cost and susceptibility of proteolytic degradation during administration of recombinant protein drugs, there is a trend in biotechnology to synthesize small molecules that meet the specific stereo chemical requirement of the receptor. Oligosaccharides and sugar analogs reported in this meeting are listed in Table II. These molecules should allow for low cost, large-scale syntheses, potentially creating huge revenues. It was estimated that the CAM drugs for cardiovascular disease have a market of \$550 million a year in the U.S.; while the market of anti-inflammatory drugs is approximately \$10 billion in the U.S.

C-3. Carbohydrate-related Protein Drugs

As listed in Table III, the carbohydrate-related proteins reported in the meeting include monoclonal antibodies, vaccines, and enzymes. Special attentions are being paid to the understanding of the interaction between sugar ligands and adhesion proteins.

D. Synthesis of Oligosaccharides Is an Important Strategy

く手を加えないで調製するのは難しい。現在の多糖薬剤の開発の方法は、i)特異的な機能を強調するために多糖の分子量を下げる、ii)機能するオリゴ糖鎖を同定し合成すること、iii)多糖の化学修飾、の3つである。Glycomed社のNeil Ackerman博士は彼らが採用した3番目の方法について報告した。化学修飾によってヘパリンの抗凝血活性は最小まで抑えられ、一方、平滑筋細胞に対する抗増殖機能は維持された。このようにして再狭窄症の治療薬、Astenoseが作られた。多糖のその他の修飾については表Iに載せてある。このタイプの糖鎖治療は多糖の現在知られている機能に依存している。これは開発の際のリスクが少なく、商品化しやすいからである。

C-2. オリゴ糖を使った阻害剤と低分子量の糖類似化合物

リコンビナントタンパク質薬剤はタンパク質分解によって傷つきやすく、またコストも高いという理由から、レセプターの立体特異性に適合した小さな分子をバイオテクノロジーの技術を使って合成しようとする傾向がある。この会議で報告されたオリゴ糖や糖の類似化合物は表IIに載せてある。これらの分子は低コストで、大スケールでの合成が可能で、巨額の利益をもたらす可能性を秘めている。心臓血管系の疾患に対するCAM薬剤のアメリカでの市場の見積もりは年間億5千5万ドルであるが、これに対して、抗炎症剤の市場は約100億ドルと見積もられている。

C-3. タンパク質薬剤と結合した糖鎖

表IIIに示すように、この会議で報告された糖鎖が結合したタンパク質には、単クローン抗体やワクチン、酵素があった。糖鎖のリガンドと接着タンパク質との相互作用の解明が特に重要視されている。

D. オリゴ糖の合成は糖質工学に基づく新薬剤の開発における

Table I. Drugs derived from polysaccharides and their modification products

Product name	Composition	Function	Manufacturer
Betafectin	Water soluble $\beta(1-3)$ Glucan(contain minor $\beta(1-6)$ branch)	Activate macrophage	Alpha-Beta Technology Inc.
Acemannan	Polydispersed $\beta(1-4)$ acetylated mannan	Wound dressing, induce cytokines(INF, TNF $_{\alpha}$, GM-CSF, IL-1 $_{\beta}$, IL-2, and IL-6)	Carrington Laboratories Inc.
ADCON-L	Proteoglycan	Prevent of scarring and surgical adhesion	Gliatech, Inc.
Astenose	Chemically modified heparin	anti-restenotic	Glycomed, Inc.

Table II. Oligosaccharide inhibitors and small molecule sugar analogs

Product name	Composition	Function	Manufacturer
SC-48334	<i>N</i> -Butyl-1-deoxy-nojirimycin (NBDNJ)	Anti-HIV infection (Inhibitor of α -glucosidase I)	Monsanto, Co.
SC-49955	<i>N</i> -Butyl-1-deoxy-nojirimycin-6-phosphate (NBDNJ6P)	Same as SC-48334, but is devoid of intestinal side effects of SC-48334	Monsanto, Co.
---	Sialyl-Lewis ^x analog	Anti-inflammatory disease (CAM inhibitor)	Cytel, Corp.
---	Compound with SLe ^x plus SLe ^a structure	Anti-inflammatory disease (CAM inhibitor)	Glycotect, Inc.
NE0080	Oligosaccharide	Anti ulcer (<i>H. pylori</i>)	Neose Pharma., Inc.
NE1530	Oligosaccharide	Anti-bacterial pneumonia	Neose Pharma., Inc.
NE1340	Oligosaccharide infections	Anti-respiratory	Neose Pharma., Inc.
NE1640	Oligosaccharide tract infections	Anti-urinary	Neose Pharma., Inc.
HP β CD	2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin	Solubilizing and stabilizing agent for lipophilic drugs	Pharmos, Corp.

Table III. Carbohydrate-related protein products

Product	Composition and function	manufacturer
Ricin-M _{ab} conjugate drug	Anti-cancer drug with minimal side effect	ImmunoGen, Inc.
Antibodies against selectins and integrins	Anti-inflammatory disease	Cytel, Corp.
Adhesin vaccine	Vaccines for otitis media, gastrointestinal disorders, sexually transmitted diseases	MicroCarb, Inc.
r-GCR (r-glucocerebrosidase)	Therapeutics for Gaucher's disease	Genzyme, Corp.
Tumor vaccine	Tumor immunogen (TF antigen coupled to proteins by a hexafluoroglutaric acid arm)	Biomira, Inc.

in Developing New Glycotechnology-based Drugs

As monoclonal antibodies and genetic engineering are the major methods for manufacturing the protein drugs, technology of oligosaccharide synthesis is of strategical importance for developing new glycotechnology-based drugs. Compared with peptide and DNA synthesis, chemical synthesis of oligosaccharides is much more difficult because of existence of anomers and positional isomers, which require intricate protection and deprotection. Production of low cost oligosaccharide at kilogram-level is a major challenge for chemists and biochemists. Dr. Daniel Kahne of Princeton University reported using a new sulfoxide glycosyl donor, which allows the glycosylation reaction to occur at temperature as low as -78°C . Dr. Robert Ippolito of Alberta Research Council demonstrated their scale up synthesis of trisaccharide haptens of blood group A and B without using chromatographic separation. Dr. Ole Hindsgaul, University of Alberta described syntheses of novel sugar nucleotides and their application in mapping the active site of an oligosaccharide-binding protein. Dr. Stephen Roth of Neose Pharmaceuticals gave an introduction to the potential value of immobilized glycotransferases in large scale synthesis of oligosaccharides. The utilization of abundant glycosidases in the oligosaccharide synthesis, as reported by Dr. Kurt Nilsson of Glycorex, is inexpensive and highly efficient.

E. Instrument Development for Glycoanalysis

There are two types of glycoanalysis instruments. One type is for research and development purpose, emphasis being placed on the cleavage and the mapping of sugar chains from glycoproteins. The GlycoPrepTM 1000 (Hydrazinolysis of N- and O-linked glycoproteins), and the GlycoMapTM 1000 (Combination of glycosidases and HPLC separation) from Oxford GlycoSystem (UK), and GlycoTagTM GT-100 (2-aminopyridine labeled oligosaccharides and HPLC separation) from Takara Shuzo Co. Ltd. (Japan) are products in this category.

The second type of instrument directly targets the hospital market for use in clinical tests. These instruments must be low cost, easy to operate, and highly efficient. The Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis (FACE) technology presented by Glyko, Inc. meet the above requirements. An oligosaccharide is coupled to 1-amino-4-naphthalene sulfonic acid and followed by a high density polyacrylamide gel electrophoresis in combination with enzyme digestion. The separation patterns of labelled oligosaccharides are analyzed by a computer. Diagnosis of inherited metabolic disorders is the major area of application of FACE. Analysis of 200 fmol to 2 nmol sample takes only one day and cost \$10/sample; while with conventional instrument, it could take a month and cost five thousand dollars. A new instrument that optimally combines available techniques to meet the market need will generate a huge profits. It was estimated that Glyko would have a \$

る最も重要な戦略である

主に単クローン抗体や遺伝子工学を利用してタンパク質薬剤が作られるように、オリゴ糖合成の技術は糖鎖工学に基づいた新しい薬剤の開発にとって戦略的に重要である。タンパク質やDNAの合成に比べてオリゴ糖の化学合成はとても難しい。というのは、アノマーや位置異性体が存在するし、複雑な保護、脱保護が必要だからである。キログラムレベルでの低コストオリゴ糖の生産には多くの化学者や生化学者が挑戦している。プリンストン大学のDaniel Kahne博士は -78°C という低温でグリコシル化できるスルホキシドグリコシル供与体を使ったことについて報告した。Alberta Research Council社のRobert Ippolito博士はクロマトグラフィーによる分離を使わずにA型とB型の血液型の3糖のハプテンを大スケールで合成したことについて説明した。アルバータ大学のOle Hindsgaul博士は今までにない糖ヌクレオチドを合成し、これを使ってオリゴ糖結合性タンパク質の活性部位を詳細に分析したことについて述べた。Neose PharmaceuticalsのStephen Roth博士は大スケールでのオリゴ糖合成において有用な固定化された糖転移酵素について紹介した。オリゴ糖の合成において多量のグリコシダーゼを利用することは、Glycorex社のKurt Nilsson博士が報告したように、低コストでとても能率的なことである。

E. 糖鎖分析のための機器の開発

糖鎖分析のための機器には2つのタイプがある。1つは研究と開発のためのもので、糖タンパク質の糖鎖の切り出しと詳細な分析を重要視したものである。Oxford GlycoSystem社(UK)のGlycoPrepTM 1000(糖タンパク質のN-結合型とO-結合型糖鎖のヒドラジン分解)とGlycoMapTM 1000(グリコシダーゼとHPLC分離の組み合わせ)、そして宝酒造株式会社(日本)のGlycoTagTM GT-100(2-アミノピリジンでラベルしたオリゴ糖とHPLC分離)がこのカテゴリーに入る。

2つ目のタイプの機器は臨床試験での使用を目的としており直接病院市場を狙ったものである。これらの機器は低コストであり、使いやすく、非常に能率的でなければならない。Glyko社のFluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis (FACE)技術は上に挙げた要求を達成している。オリゴ糖を1-アミノ-4-ナフタレンスルホン酸と結合させ、酵素分解と組み合わせた高密度ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、ラベルされたオリゴ糖の分離パターンをコンピューターで処理する。先天的な代謝異常の診断に主に使われる。200 fmolから2 nmolの分析をたった1日で、しかも1サンプルにつき10ドルでできる。一方、一般の機器を使うと、1ヵ月もの時間と5,000ドルもの費用がかかる。有益な技術を最も適した形で組み合わせ、市場のニーズに答えた新しい機器は大きな利益をもたらすであろう。Glyko社は1996年にはこの製品で2,000万ドルの市場を獲得するであろうと

20 million market on this product by 1996.

F. Others

At the meeting there was an instrument exhibition, and thirty posters. The patent issue in glycotechnology was addressed by Dr. Gregory Giotta of Glycomed. According to him, the glycotechnology patent may use a functional claiming language, which is similar to those in biotechnology, or may claim a specific structural formula similar to patents in pharmaceutical industry.

Based on the understanding of carbohydrate function on cell recognition, a new glycotechnology pharmaceutical industry is emerging. The Chairman, Dr. Gerald Hart said: "Glycobiology, the last great frontier of biochemistry, is rapidly coming of age!"

Acknowledgement

The author would like to thank Dr. Y.C. Lee, Dr. John Pace and Mr. Steven Frey for their critical reading of this manuscript.

見積もられている。

F. その他

この会合では機器の展示会と30枚のポスター展示が催された。糖質工学の特許問題はGlycomed社のGregory Giotta博士によって論じられた。彼によると、糖質工学の特許はバイオテクノロジーのように機能を請求したり、薬剤産業の特許のように特異的構造式を請求したりできるということだ。

細胞認識における糖鎖の機能を理解することで、糖質工学の新しい薬剤産業が現れてきている。座長を務めたGerald Hart博士は「生化学の最後の大きな未開の分野である糖鎖生物学の時代が、もうそこまでやってきている!」と言っている。

東京工業大学・生命理工学部・生体分子工学科・生体材料設計講座
太田 稔久記

Second International Glycobiology Symposium

Current Analytical Methods

February 13-17, 1994

Sheraton Palace, San Francisco

Organizing Committee

Co-Chairs: R. Reid Townsend, University of California, San Francisco

Michael W. Spellman, Genentech, South San Francisco, USA

Conference Manager: Paddy Batchelder, California Separation Science Society, Pleasanton, USA

Registration

Advance registration: \$450

After December 15: \$500

Student registration: \$250

Information

Please direct inquiries to Paddy Batchelder, Conference Manager, International Glycobiology Symposium

Post Office Box 370

Pleasanton, CA 94566,

USA

Phone: 510-426-9601

FAX: 510-846-2242