



## Stabilization of solution formulation with protein-cosolvent interaction

著者	Yoshizawa Shunsuke
発行年	2018
その他のタイトル	タンパク質-共溶質間の相互作用を利用した溶液製剤の安定化
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2017
報告番号	12102甲第8479号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/00152744">http://hdl.handle.net/2241/00152744</a>

氏名	吉澤 俊祐
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	博甲第 8479 号
学位授与年月日	平成 30年 3月 23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	数理解物質科学研究科
学位論文題目	Stabilization of solution formulation with protein-cosolvent interaction (タンパク質-共溶質間の相互作用を利用した溶液製剤の安定化)

主査	筑波大学教授 博士(理学) 白木賢太郎
副査	筑波大学教授 博士(工学) 長谷宗明
副査	筑波大学教授 博士(農学) 辻村清也
副査	筑波大学教授 博士(理学) 加納英明

## 論 文 の 要 旨

審査対象論文は、タンパク質と共溶質間の相互作用を利用し、溶液製剤を安定化するメカニズムと方法に関して検討を加えたものである。

第一章では、タンパク質の基本的な性質に関して情報を整理し、産業的な応用について述べたものである。タンパク質は水溶液中で機能するにもかかわらず、水溶液中では不安定であり、化学的な劣化や物理的な変性を受けやすいという性質がある。そのため、近年、市場が広がっているタンパク質製剤においても課題になっていることを述べている。この課題を解決するため、水溶液中に共溶質を加える手法が開発されていることを、そのメカニズムにもふれながら整理している。

第二章では、溶液添加剤としてのアルギニンの効果に対し、対イオンの影響について精査した内容を述べている。アルギニンは、一般に、水溶液中でのタンパク質を安定化することが知られているが、対イオンの効果については系統的に精査された例がなく、本論文のなかで調べる価値があるという視点にたって研究を行ったものである。とくにホフマイスター系列を指標にし、対イオンを変化させることでアルギニンの多様な効果をさらに高めるのではないかとする仮説のもと、芳香族との相互作用に着目し、アルギニンと共存する対イオンとして塩化物イオンの他、リン酸イオン、硫化物イオン、酢酸イオン、クエン酸イオン及びギ酸イオンを対象に研究を行っている。2 価のイオンであるリン酸イオンと硫化物イオンを対イオンとして用いたアルギニン塩は、アルギニン塩酸塩を用いた場合よりも芳香族化合物の溶解度が低下すること

を明らかにしている。また、弱い酸として知られている酢酸イオンとギ酸イオンを対イオンとして用いることで、芳香族化合物の溶解度が向上することを明らかにしている。さらに移相自由エネルギーというパラメーターを用いて解析を行うことで、アルギニンの効果は対イオンによらず一定であることを示している。

第三章では、水溶液中での抗体の凝集に対し、アルギニンをはじめとした添加剤の効果を網羅的に調べた内容について述べている。抗体タンパク質はその特異性や生体適合性が高いことから、がんやリウマチをはじめとした難病に対する薬剤として期待されているが、機能の喪失や免疫原性などを回避するために、安定に保存する技術の開発が重要であることを述べている。アルギニンを含む抗体溶液を 75° C で 2 分間加熱した後に溶液クロマトグラフィーや円偏光二色性を用いて詳細に分析したところ、アルギニンは可溶性オリゴマーから不溶性凝集体への会合を抑制することを明らかにしている。さらに他の共溶質に対しても検討を行った結果、トレハロースやグルコース、キシリトールはモノマーの量を増やし、対してグアニジンや尿素といったタンパク質の変性剤はモノマーの量を減らすことを明らかにしている。最終的には抗体の凝集は、(i)熱力学的に不安定な Fab 領域の変性、(ii)モノマー同士の会合によるオリゴマーの形成、(iii)オリゴマー中に存在する比較的安定な Fc 領域の変性、(iv)変性したオリゴマー同士の会合による不溶性凝集体の形成というモデルで描けることを明らかにすることに成功している。

第四章では、防腐剤として利用されるベンジルアルコールに誘起される凝集に対し、添加剤によって安定化が可能かを調べたものである。一般に、マルチドーズバイアル製剤は、一つのバイアルに複数回投与ができる医薬品溶液を入れた製剤形態であり、(1)廃棄量が少なく抑えられる、(2)包装コストが抑えられる利点があるが、保存剤を入れて細菌の増殖を抑制する必要があるという研究の背景を述べている。しかし保存剤がタンパク質凝集を引き起こすために、どのような添加剤がタンパク質変性をふせぐことができるかを調べたものである。抗体のモデルとしてヒト血清ガンマグロブリン(IgG)を、防腐剤のモデルとしてベンジルアルコールを用い、添加剤の効果をスクリーニングした結果、トリメチルアミン N-オキシド(TMAO)に高い効果があることを明らかにしている。そのメカニズムに関して、共溶質とタンパク質間の相互作用及び共溶質とベンジルアルコール間の相互作用という点に着目し、TMAO とベンジルアルコール間の親和性が重要であることを示している。本研究で得られた、疎水性相互作用の抑制と安定化を同時に達成する添加剤が有用であるという事実は、免疫グロブリンのマルチドーズバイアル製剤の共溶質への応用が期待できると述べている。

## 審 査 の 要 旨

〔批評〕

審査対象論文は、タンパク質と共溶質分子間の相互作用を利用して溶液中におけるタンパク質製剤の安定性を高めることに成功したものである。各論としては、アルギニンの対イオンを変えることで、低分子薬剤や芳香族アミノ酸、タンパク質との相互作用が変わること、および、抗体の加熱凝集に対して凝集抑制剤が異なる効果を示すこと、マルチドーズバイアル製剤で頻繁に使用されるベンジルアルコールに対する凝集の抑制法を発見したことがあげられる。これらの研究は、タンパク質と添加剤分子間の相互作用

用を活かしたタンパク質の可能性を広げるもので、学術的に価値の高いものと認められる。

〔最終試験結果〕

平成 30 年 2 月 16 日、数理物質科学研究科学学位論文審査委員会において審査委員の全員出席のもと、著者に論文について説明を求め、関連事項につき質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって、合格と判定された。

〔結論〕

上記の論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士(工学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。