

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	
Title(English)	Characterization, quantification and minimization of protein aggregates in solution for improvement of protein pharmaceuticals
著者(和文)	井浦貴文
Author(English)	Takafumi Iura
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9479号, 授与年月日:2014年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:有坂 文雄,三原 久和,和地 正明,田口 英樹,林 宣宏
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9479号, Conferred date:2014/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第	号	学位申請者氏名	井浦 貴文
		氏 名	職 名	
	主査	有坂 文雄	教授	林 宣宏
		三原 久和	教授	
		和地 正明	教授	
		田口 英樹	教授	
論文審査 審査員			審査員	

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は英語で書かれ、「Characterization, quantification and minimization of protein aggregates in solution for improvement of protein pharmaceuticals」と題し、5 章から構成されている。

第 1 章「General introduction」では、インスリンの登場に始まる蛋白質医薬品が、遺伝子工学の発展を経て、临床上重要な位置を占めるに至るまでの経緯について説明している。一方、蛋白質医薬品が引き起こしうる免疫反応は安全性や有効性に影響を及ぼす可能性が懸念されると述べている。特に蛋白質医薬品に含まれる二量体～多量体は免疫原性を有すると述べている。本章では、これらの研究の背景や既報の知見について概説し、蛋白質医薬品の重合体生成の最小化の手法の開発と、抗体医薬品に含まれる微量の二量体の詳細な解析、超遠心分析の定量性の問題点の解決を通して、よりよい品質の蛋白質医薬品の開発を目的とすると述べている。

第 2 章「Conformational stability, reversibility and heat-induced aggregation of α -1-acid glycoprotein」では、 α -1-acid glycoprotein (AGP) をモデル蛋白質として、変性温度及び可逆性、並びに 50°C 保存時の重合体の生成量を測定し、重合体の生成を最少化する最適な溶液条件を見出すためには変性温度と可逆性の両方を評価することが重要であると論じている。AGP は分子重量の約半分が糖鎖から成り、临床上非常に重要な蛋白質医薬品の 1 つであるエリスロポエチンと共通の特徴を有しており、pH 3～12 の AGP 溶液について DSC により変性温度及び可逆性を評価した結果、酸性 pH では変性温度が低下し、塩基性 pH では可逆性が低下したと述べている。同試料について 50°C 保存時の重合体生成量を測定した結果、酸性 pH では主に非共有結合で相互作用した非常に大きな重合体が形成され、塩基性 pH では二量体が生じているため、変性温度が低い条件では巨大な重合体が生成しやすく、可逆性が低い条件では二量体が生じやすい可能性が示唆されたことと述べ、変性温度及び可逆性ともに比較的高い値を示した pH 6～7 において、重合体はほとんど生成しなかったことから、重合体生成を最少化する最適な溶液条件を見出す上で、変性温度と可逆性の両方を評価することが重要であることが明らかとなったと結論している。

第 3 章「Intermolecular interactions and conformation of antibody dimers present in IgG1 biopharmaceuticals」では、抗体医薬品シナジスにわずかに含まれる Palivizumab の二量体について詳細に解析し、その分子間相互作用、高次構造及び抗原結合活性を調べ、市販されている抗体医薬品のほとんどが IgG1 型であり、Palivizumab も IgG1 型のヒト化モノクローナル抗体であると述べている。Palivizumab の二量体はその約半分が非共有結合、もう約半分は共有結合から成り、共有結合としてジスルフィド結合とジチロシン構造が関与している可能性を示唆している。また、二量体形成には主に F_{ab} 領域が関与していること、高次構造については、複数の手法により二量体は単量体と同様の高次構造を有することを明らかにしており、また、抗原結合活性についても十分保持されていることが示されたことと述べている。以上の結果を他の IgG1 型抗体の二量体について報告されている結果と比較すると、主な特徴は共通であったが、詳細には違いがあると述べている。また、本研究で初めてジチロシン形成が抗体の二量体形成に関与している可能性が示唆されており、ジチロシン構造の測定も含めて、抗体ごとに二量体の詳細な解析を行うことが重要であると結論している。

第 4 章「Effect of conditions for the measurement on precision of quantification of protein aggregates by analytical ultracentrifugation-sedimentation velocity」では、蛋白質医薬品にわずかに含まれる重合体を定量する方法として注目されている超遠心分析について、その定量精度に影響を及ぼす要因について検討を行っている。この実験では、第 3 章で用いた抗体医薬品を試料として使用し、ローター温度と回転速度、及び測定試料の溶媒成分の影響について評価している。その結果、いずれも重合体の定量精度に影響を及ぼさなかったと述べ、通常用いられているローター温度及び回転速度の設定条件は適切な条件であることが確認されたこと、また、抗体医薬品の溶媒成分をふまえて、高濃度のソルビトールを含む高粘性の試料、界面活性剤であるポリソルベート 80 を含む試料、並びに低イオン強度の試料を調製し、重合体の定量精度を評価した結果、いずれも定量精度に影響を与えないことが示されたことと述べている。

第 5 章「Conclusion」では、第 2 章から第 4 章の内容について総括し、各章で得られた知見の有用性について述べている。これを要するに、本論文では蛋白質医薬品において取り組むべき重合体の最少化のために、変性温度と可逆性が重要であることを指摘し、さらに含まれる重合体を詳細に解析して二量体形成の機構を明らかにしており、工学上ならびに工業上貢献するところが大きい。よって本論文は博士（工学）の学位論文として十分価値があるものと認められる。