

バイオ医薬品開発におけるアルギニンの貢献

荒川 力

Role of Arginine in Development of Biopharmaceuticals

Tsutomu ARAKAWA

Alliance Protein Laboratories, 3957 Corte Cancion, Thousand Oaks, CA 91360, USA

(Received January 18, 2010; Accepted February 25, 2010; Published online March 1, 2010)

Production, formulation and characterization of proteins play a major role in biotechnology industries. We have shown that aqueous arginine solution increases the solubility of proteins in formulation and purification, suppresses aggregation during refolding and storage and improves performance of column chromatography. Acidic arginine solution now finds application for virus inactivation. I will summarize these various effects of arginine on proteins and viruses and describe the current knowledge of the mechanism of the effects of arginine.

Key words—arginine; chromatography; solubilization; formulation; aggregation; weak interaction

1. 緒言

抗体医薬を中心にバイオ医薬品の開発は増大の一途である。バイオ医薬品の開発には高品質のタンパク質を大量に作り、それを活性のある状態でかつ会合しないように保つ必要がある。タンパク質の生産と精製の技術はいわゆる **Process Development** で、タンパク質を安定に保つ技術は **Formulation** 部門が中心となって開発される。この間、精製過程にせよ貯蔵中にせよタンパク質は多様なストレスに晒されることになる。温度、表面変性や吸着などの物理的ストレス、金属イオンや酸化剤などの化学的ストレスなどで、タンパク質は変性したり会合したりすることが多い。したがって、このようなプロセスにおいてタンパク質の構造を安定化する添加物、あるいは会合を抑える添加物を適当に加え、タンパク質をそのようなストレスから守る必要がある。ここ 20 年ほどの研究の発展は、この分野におけるアルギニンの有効性を示してきた。本総説はアルギニンのバイオの分野での活躍ぶりを紹介すると同時に、アルギニンの応用がさらに発展することを望むものである。

2. オスモライトとアルギニン

極めて塩濃度の高い環境でも生存できる一連の生物種が知られている。ほとんど飽和に近い塩溶液中でも生きることができる微生物は、細胞内に塩を蓄えることにより高い塩濃度による浸透圧に対抗している。それゆえそれらの微生物のタンパク質は塩存在下でのみ活性を示すように作られている。それに対して中程度の、しかも変化する塩の濃度に対抗するために生物がとる手段がある。それらの生物は細胞内に塩ではなく、いわゆるオスモライトという化合物を蓄積して浸透圧に対抗する。オスモライトは、ほとんどがイオンではないが水によく溶ける化合物である。一部のオスモライトを Fig. 1 の枠の中に記した。なぜこれを使うのか。一番大きな理由が Fig. 1 に示されている。このデータは 1982 年の *Science* に記載されている。¹⁾ 彼らはいろいろな例を使ってオスモライトが酵素に影響しないこと、そして細胞の活動にも影響を与えないことを示した。すなわちオスモライトは細胞外の浸透圧に対抗する作用のみを持っている。

私は 1982 年当時このようなオスモライトがタンパク質とどのような相互作用をするのかを研究していた。基本的な結論は、オスモライトはタンパク質に結合しないということである。²⁾ これがオスモライトが酵素反応に影響しない理由である。すなわち

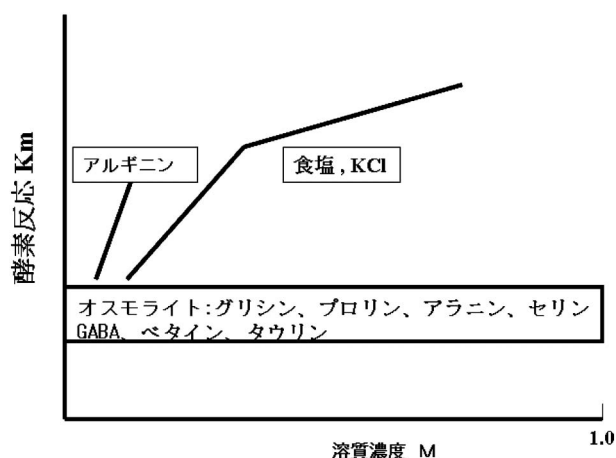


Fig. 1. Relationship between Substrate Affinity and Solute Concentration in Enzyme Reaction

Osmolytes inside the square box have no effects on substrate affinity, K_m , while arginine and salts increase the value of K_m .

オスモライトは直接酵素に結合しないので基質の結合を阻害しない。Fig. 1で酵素反応の基質結合の K_m が変化しないのもそれによる。しかしオスモライトは何もしないわけではない。後で述べるがこの結合しないという結果が、実はタンパク質の安定性を高めることにつながっている。オスモライトは酵素に影響しないのみか、それを安定化する役割も持っている。

私はオスモライトとタンパク質との相互作用を研究するにあたり、アルギニンを対象化合物として用いた。それはFig. 1を見れば分かるように、オスモライトの多くが中性アミノ酸だからである。塩基性アミノ酸であるアルギニンがオスモライトと違う相互作用を起こすかどうか、興味を持ったのである。その結果は意外なことにアルギニンが弱いながらもタンパク質と結合する傾向を示した。³⁾ もちろんその当時はその発見がもたらすアルギニンの多様な作用について思い及ぶ余地もなかった。しかしアルギニンはオスモライトとして見いだされていない、という事実もあった。それがこの同じScienceの論文の中に記されている。それを抽象化したのがFig. 1である。比較のために塩の影響もプロットしてある。アルギニンは塩以上に K_m に影響する； K_m が上がる、すなわち基質の結合が弱まる訳である。恐らく弱いながらもタンパク質に結合する性質が酵素の基質結合力に悪影響を与えているのであろう。私たちの共同研究でも同じ結果を見い出してい

る。⁴⁾ アルギニンは酵素を殺さないが、酵素活性の著しい低下をもたらす。これがアルギニンをオスモライトとして使えない理由である。

3. タンパク質のリフォールディングの場合での活躍

上記のような弱い結合によるものかどうかの証明は難しいが、アルギニンの効果が最初に見いだされたのは、タンパク質のリフォールディングにおいてである。⁵⁻⁸⁾ タンパク質のリフォールディングとはどのようなものかをFig. 2に示した。タンパク質を大量発現すると細胞内に封入体というタンパク質の会合体が作られることがある。その多くの場合会合したタンパク質を尿素のような変性剤やSDSのような界面活性剤で溶かす必要がある。この操作でタンパク質は完全に変性する。尿素や界面活性剤を除去しないと構造形成は起こらない。その除去の仕方はFig. 2に記したようにいろいろある。希釈が最も一般的であるが、透析や変性剤存在下で担体表面に吸着させ、その後溶媒を置換する方法、などなど様々なやり方がある。しかしそのどれをとっても再びタンパク質が会合体に戻ってしまうことが多い。Fig. 2の左側の矢印で示す結果となってしまう、活性のあるものが得られない。ところが希釈液、透析液、置換液などに適当な量のアルギニンを入れておくとこの会合が防げられる。濃度としてはFig. 2にあるように、0.2 Mから0.5 Mぐらいである。

われわれの最近の研究で、封入体とは呼び難いタンパク質の会合体がとれることがあったことが分かった。まだ例は少ないが、その場合アルギニンで溶かすことができる。Fig. 3にその例を示す。⁹⁾ 緑色蛍光タンパク質(GFP)という緑の蛍光を発するタンパク質を大腸菌で発現すると封入体ができてしまうが、それは蛍光を発する(A)。すなわち会合しているものの構造は作られている。GFPの蛍光には構造形成が必須である。これを単なる緩衝液で溶かしても、蛍光を発するタンパク質は溶けてこない(B)。封入体を6 M グアニジンという強い変性剤で溶かすと、よく溶けるが変性して蛍光を失う(C)。2 M グアニジンでは溶け出すとともに蛍光も維持できる(D)。2 M アルギニンでも同様のことが起こる(E)。ここには記されていないが、2 M アルギニンを使うとリフォールディングの必要がない。アルギニンを透析で除いてもよいし、そのまま残しておい

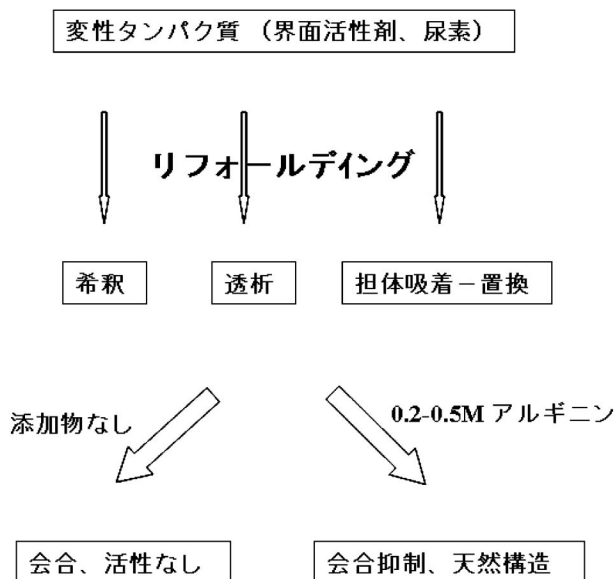


Fig. 2. Methods of Protein Refolding

Arginine reduces aggregation and enhances refolding of proteins independently of the refolding method, as indicated by the right side arrow.

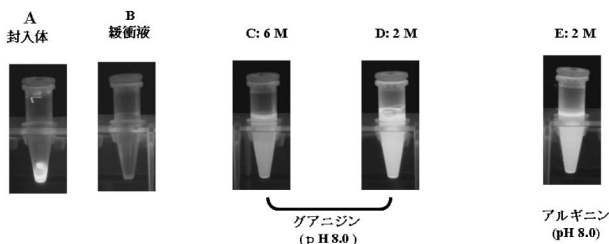


Fig. 3. Solubilization of Protein from Inclusion Bodies

Green fluorescent protein (GFP) expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli* was solubilized by arginine or guanidine.

てもかまわない。

4. 製剤の場での活躍

アルギニンが最も活躍するのは製剤の場であろう。タンパク質医薬製剤の開発にとって製剤技術は必須である。タンパク質溶液を製剤として使う場合、いろいろなことが起こり得る。貯蔵中の温度変化、光の照射、界面への吸着、容器からの漏出物、また輸送中の予期しない凍結、ゆれによる泡の発生などなど、いろいろなことが理由でタンパク質は変性、会合を起こす。また最近発展が目覚ましい抗体医薬では高濃度溶液が必要とされており、濃度を上げることによる会合も起こる。Fig. 4 にその例を示した。Xolair という Genentech が開発した抗体医薬がある。これはまさしく高濃度抗体医薬である。これを注射しようとする場合、単に緩衝液のみである

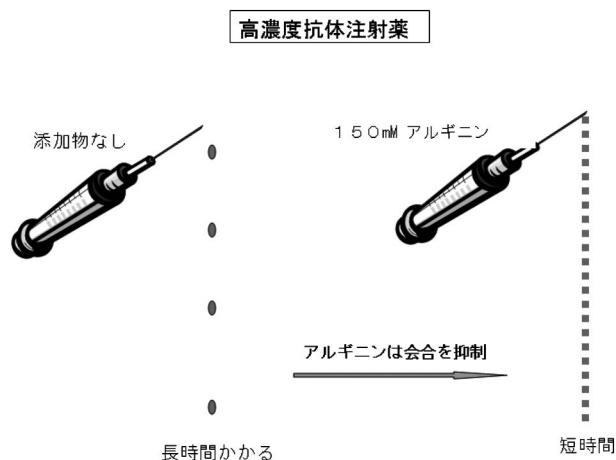


Fig. 4. Influence of Arginine on Viscosity of High Concentration Antibody Formulation

と注射に途方もない時間がかかる。これは抗体が可逆的に会合してゲルのようになっていて、粘性が高くなるためである。この緩衝液に 150 mM 程度のアルギニンを添加すると粘度が下がり、注射時間が短縮できる。¹⁰⁾ このようなアルギニンによる会合抑制効果は多くのタンパク質に認められる。¹¹⁻¹⁴⁾

このような会合抑制効果は当然タンパク質の溶解度の増加にもつながる。タンパク質の溶解度は一般的には高すぎて測り難いが、測定が可能なものもある。FGF-20 という非常に水に溶解しにくいタンパク質がある。pH 7 で溶解度が 0.1 mg/ml 以下である。すなわちこのタンパク質を中性 pH 付近で精製しようとする、その濃度を 0.1 mg/ml 以上に上げられないということになる。精製方法についての論文はないが、推察するとアルギニン存在下での精製技術を開発したようである。その根拠は FGF-20 の溶解度が 0.4 M のアルギニンで 100 倍以上上がることにある。¹⁵⁾ pH 6 では 0.3 M のアルギニンでも 1000 倍の溶解度の上昇がある。すなわち溶解度が 10 mg/ml 以上になるので精製がし易くなるというわけである。しかしアルギニン存在下での精製の困難さは当然ある。例えばタンパク質精製の基本技術であるイオン交換クロマトグラフィーがアルギニンイオンのために働かない。この溶解度の上昇は当然製剤開発にとって必須である。0.1 mg/ml という低い溶解度であると、先に述べた貯蔵、輸送中のトラブルが原因で会合や沈殿が起こる可能性が高くなる。

私はアメリカでタンパク質分析に特化した研究所

を運営しているが、自然とさまざまな薬剤開発の現場についての話を耳にする。詳しく触れることはできないが、アルギニン製剤技術の一環として取り入れている会社は多くある。それにより2量体の含量を減らす、あるいは溶解度を上げるなど、いろいろな場でアルギニンが活躍している。

5. クロマトグラフィーの場での活躍

タンパク質の精製や分析にとっての難点は、タンパク質の多様な化学的性質による特異的、あるいは非特異的結合である。タンパク質の多様性がその機能の発現に必須であるが、それゆえに起こる問題である。タンパク質の精製に昔から親和性クロマトグラフィーが使われてきた。抗原の精製あるいは検出に抗体、抗体の精製に Protein-A、低分子リガンドによる結合タンパク質の精製、分析、それを一般化した Dye-クロマトグラフィー、最近では抗体精製用に開発された MEP カラムなど、多くの種類がある。これらのカラムはタンパク質を強く結合する。それは Fig. 5 に示すようにタンパク質とリガンドなどの結合分子が密着に接触すること、それと相互作用する機構の多様性による。実線で電気効果、点線で疎水性の寄与を示した。この2つの作用を弱めないと結合を外せないことになる。一方だけを弱めても、結合は弱まるが外れるとは限らない。そのような一例を Fig. 6 に示した。これは Blue-Dye カラムで NADH に結合する酵素を特異的に結合する。通常食塩が溶出に使われる。すなわちこのリガンド

と酵素の結合が単純に静電気相互作用によるという仮定である。これは LDH という酵素を使った実験である。¹⁶⁾ この仮定が正しくないということはこの図から明白に分かる。パネル A をみると 0.5 M 食塩ではほとんどピークにならない。その後 1 M アルギニンで洗うとシャープなピークが現れる。これは食塩の濃度が低いためではない。B で 2 M 食塩を使っているが若干改善されただけである。C で 0.25 M アルギニンを使うと 2 M 食塩よりピークがシャープである。最後の D では 2 M アルギニンで非常にきれいな溶出ピークが出る。それではなぜ食塩ではダメなのか。最初に書いたようにこの Dye と LDH の結合は決して静電気相互作用だけではない。その

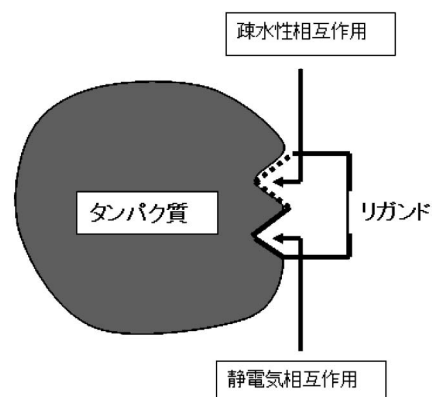


Fig. 5. Non-specific Adsorption of Protein to Column Matrix
Electrostatic (solid line) and hydrophobic (dotted line) interaction contributes to protein binding to the column matrix.

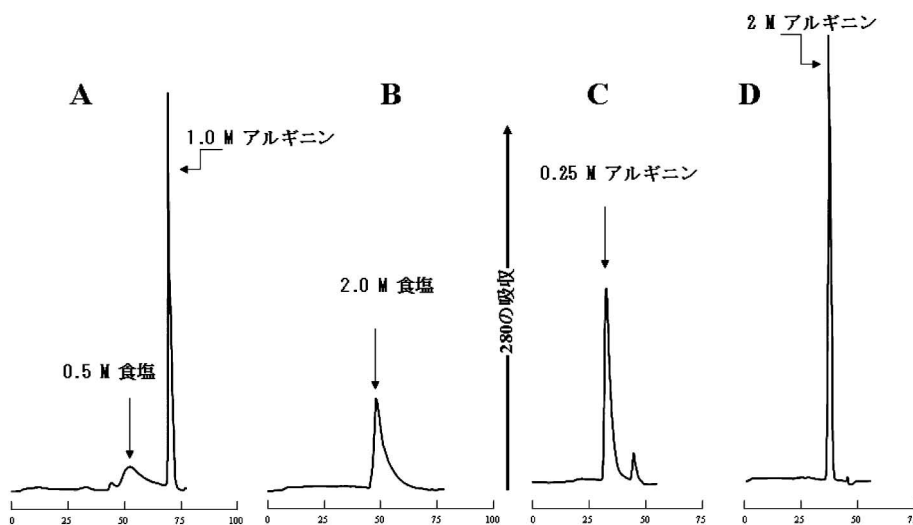


Fig. 6. Elution of Lactate Dehydrogenase (LDH) from Dye-affinity Column

A. Elution of bound LDH using 0.5 M NaCl followed by 1 M arginine. B. C. D. Elution of bound LDH using the indicated solvents.

ため食塩を入れると静電気相互作用は切るが、その他の結合は切れない。その他の結合が疎水性相互作用だと、逆に食塩はいわゆる塩斥効果によりそれを強めてしまう。それではなぜアルギニンならよいのか。まずアルギニンはイオンなので食塩と同じ効果がある。問題はアルギニンが疎水相互作用を切れるのか、である。ここでは更なる例を示すだけでこの議論は最後のところで行う。

われわれはこのアルギニンの溶出効果を Protein-A カラムによる抗体精製に応用した。この精製の利点は Protein-A が抗体を特異的に結合することである。それは Fig. 5 に示すように、Protein-A と抗体との補完性がよいこと、結合の多様性によるものである。そのためいったん結合するとなかなか外れない。通常強い酸性条件で抗体を溶出する。酸性であればあるほど回収率は上がる。しかしその分抗体も酸性に晒される。抗体は酸性で部分変性を起こす。変性の詳細についてはよく分かっていないが、その結果は重大である。部分的な変性とはいえ、そのために抗体の構造が完全にもとに戻らず、抗体医薬の開発に重大な影響を与えることがある。それは会合体の形成である。われわれはアルギニンを使うとこの溶出 pH を 0.5 以上上げることができることを示した。¹⁷⁾

アルギニンはまた Protein-A カラムの洗浄にも使われる。Protein-A は抗体に特異的だが、それでも他の不純タンパク質も結合する。このとき中間 pH でアルギニンを含む溶媒を使うと不純物の洗浄が効果的に行える。われわれは pH 5.0 でアルギニンと他の塩とを組み合わせると不純物の洗浄ができることを示した。¹⁸⁾ またアルギニンは Protein-A の代わりとして開発された MEP というカラムにも有効である。MEP は中性 pH で抗体を特異的に結合し、pH 4.5-5.0 で溶出するとされている。しかし実際には MEP は抗体以外にも多くの不純物を結合する。アルギニンは MEP の洗浄にも有効である。実際アルギニン濃度を 0.5 M 以上に上げると抗体も外れてくる。¹⁹⁾ 本来、pH 5 以下にしないと抗体を外せないことになっているが、実際にはアルギニンで中性 pH でも外すことができる。

これまではいわゆる親和性カラムでアルギニンによる溶出効果を示してきたが、アルギニンを使うと非特異的に吸着するタンパク質を減らすこともでき

る。非特異的吸着が一番問題となるのはゲルろ過である。バイオ医薬品の分析でゲルろ過は重要な位置を占める。それは何よりも簡便に会合体の分析ができることにある。いつもこの分析方法で問題にされるのは本当にカラムに注入したすべてのタンパク質が検出器まで流れているのか、ということである。ゲルろ過はカラム担体を使ってタンパク質をふるいにかけている。そのふるいにタンパク質が吸着してしまえば分析結果が信用できなくなる。われわれは最近の総説で詳しくそれについて述べている。²⁰⁾ カラム担体とゲルろ過溶媒を調整しないとタンパク質は多かれ少なかれ吸着する。特に大きな会合体ほど吸着し易い。ゲルろ過分析でいかにも会合体がないように見える場合が多いが、そのかなりの場合、会合体だけが吸着してしまったためである。ここでは例は出さないが、抗体、その他多くのタンパク質で調べた結果はこの吸着の問題を示している。その一つの解決策がアルギニンを含む溶媒である。0.2 M 程度のアルギニンを添加するとタンパク質、特に会合体の非特異的吸着を抑えることができる。²¹⁾

クロマトグラフィーでの応用で最も注意すべきことは可逆的に会合する複合体の精製や分析でのアルギニンの応用である。今までの例から明らかのようにアルギニンは分子間相互佐用を弱める働きがある。よって非共有結合によりできている複合体を解離させる可能性がある。例えば 4 量体のヘモグロビンは 0.2 M アルギニンで 2 量体に解離するので、その分析や精製には使えない。²²⁾ しかし複合体によっては解離しない場合もある。例えば遺伝子転写の制御に関与する CCR4-NOT 複合体は 0.2 M アルギニンの影響を受けない (personal communication, Ito K., Ohsugi M., Yamamoto T., 24 February, 2010)。この違いは恐らく複合体を形成するタンパク質間の会合の強さを反映するものと思われる。

6. 低分子製剤の場合での活躍

バイオが進展してきたとはいえ薬の主流は低分子製剤である。低分子製剤の開発にとってその溶解度はタンパク質以上に大きな課題である。溶解度改善のためにいろいろな技術が開発されてきた。アルギニンは難溶性低分子の溶解度を改善する。²³⁾ 例えば Naproxen という抗炎症剤の溶解度はアルギニンにより著しく上がる。²⁴⁾

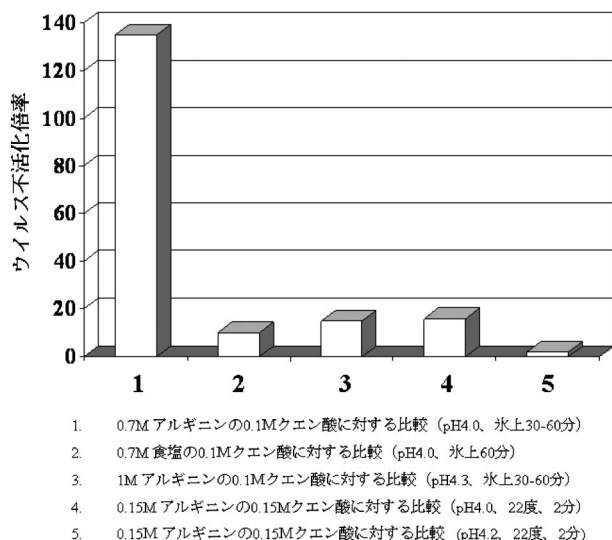


Fig. 7. Influenza Virus Inactivation by Acidic Arginine
Relative effectiveness of acidic arginine against citrate buffer under otherwise identical conditions in inactivating influenza virus.

7. ウイルス感染の場での活躍

医薬用タンパク質を動物細胞培養で生産するとウイルス不活化操作が必要である。これには通常酸性pHが用いられるが、抗体製薬の場合これは会合の原因となる。われわれはアルギニンがウイルス不活化を促進することを見出した。^{25,26}特にヘルペスウイルスに関して効果が強く認められた。Fig. 7はインフルエンザウイルスを使った結果である。溶媒の条件が図の下に記されている。すべて通常用いられる0.1Mクエン酸のウイルス不活化に対する比として表されている。例えば0.7Mのアルギニンは0.1Mのクエン酸よりも140倍ほど大きなウイルス不活化効果がある。これに比べると0.7M食塩は10倍ほどしかない。またアルギニンとクエン酸の違いはpHに依存する。pH 4.3では1Mアルギニンにもかかわらず0.1Mクエン酸に対して15倍ほど強いだけである。同じ0.15Mで比べてもアルギニンの効果の方が強い。ここでも、pHに依存してアルギニンとクエン酸との違いに差が出る。pH 4.2では2-3倍ほどの効果になる。

Figure 7では動物細胞培養でのウイルス不活化を目的としており、設定温度は氷上か22°Cであった。それではこのようなウイルス不活化効果を臨床には使えないだろうか。その目的で行ったのが単純ヘルペスウイルス2型の実験である。この場合臨床応用を仮定して、不活化実験を体温近くでも行った。

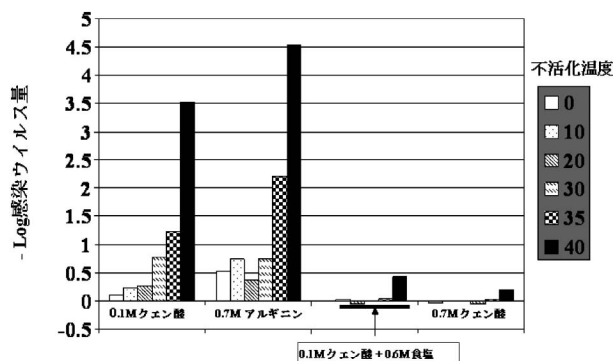


Fig. 8. Inactivation of Herpes Simplex Virus Type-2 by Acidic Arginine

Herpes simplex virus type-2 was inactivated under the indicated condition by various solvents. The surviving virus counts were expressed as logarithmic ratio to the virus counts exposed to phosphate-buffered saline (control).

pHも4.4と若干高い。ここではFig. 8に示す4個の溶媒について調べた。まず0.1Mクエン酸を見ると、20°Cまではウイルス不活化効果は低い。30-35°Cぐらいまで上げるとウイルス量は10分の1ぐらいになる。40°Cまで上げると効果は一気に上がる。ウイルス量は1000分の1以下になる。30°C以下では0.7Mアルギニンもほとんど不活化効果がない。それが35°C、40°Cで大きく上昇する。0.7Mアルギニンは0.1Mクエン酸より10倍ほど効果が強い。これらの溶媒に比べると0.6M食塩、0.7Mクエン酸ともいくら温度を上げててもほとんど不活化効果は変わらない。

8. 溶媒効果の機構

添加物のタンパク質への影響を説明する場合によく言われるのが、直接に結合する場合と、水への影響を介する場合である。低濃度で直接結合によってのみタンパク質へ影響するものは特異的リガンドである。例えば酵素阻害剤がそれにあたる。Fig. 9にそれを模式的に示した。非常に低い濃度でタンパク質の活性や構造、安定性に影響する。Fig. 9に示すようにそれらはタンパク質に結合する。それらが水を介して影響することはあり得ない。濃度が低いので、水の量が圧倒的に多い。そのような条件ではたとえリガンドが水の構造に影響してもタンパク質に影響が出るほどの量にはなり得ない。それに対してアルギニンなどの添加物は0.1M以上の濃度がないと効果ははっきり現れないことが多い。0.5Mぐらいの濃度があることも普通である。このような結合

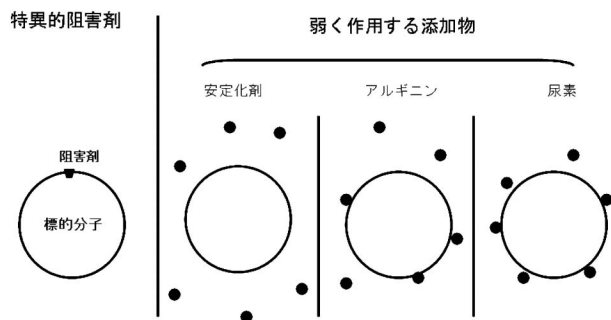


Fig. 9. Interaction between Arginine and Protein

Far left panel shows strong binding of specific ligand to the protein. Next three columns show weak binding of protein stabilizing solute (left panel), of arginine (middle panel) and of protein denaturant (right panel).

を弱い相互作用という。結合が弱いので濃度がある程度ないとタンパク質に結合できない。しかし濃度が高いことは結合量が多くなり得ることに対応している。このような添加物は結合は弱い、結合量は多い。この結合はまたタンパク質への直接結合とは限らない。その結合の意味をわかり易くしたのが Fig. 9 の右の 3 ケースである。一番左がタンパク質の安定化剤である。オスマイトがこのグループに入る。それ以外にも糖や多価アルコールなどが該当する。

オスマイトのようなタンパク質安定化剤はタンパク分子から離れようとする。²⁾ 実際には離れようとするのか、水との親和性が強いためにそう見えるのかは議論のあるところである。オスマイトなどは水との相互作用を最大にしようとするため、タンパク分子との接触を避けようとする。またタンパク分子も水を結合して安定化している。その結果いかにもタンパク分子から離れているように見える可能性がある。いずれにしてもこの離れているという状態がタンパク質の安定化につながっている。この状態を維持しようというわけである。タンパク質の変性はこの状態を壊すことになる。一方右端は尿素のような変性剤の相互作用に相当する。変性剤はタンパク分子に弱いながらも多く結合する。この場合尿素の結合を増やす方向に反応が進むので、タンパク質は変性の方向に進む。アルギニンがちょうどこの中間に位置する。³⁾ 多少タンパク質にも、また水にも結合する。安定化方向にも行かない、変性方向にも行かない、この中間の結合状態がその多様な溶媒効果と関連していることは明白であるが、詳細につ

いてはまだまだ分からないことが多い。

それではどのような相互作用でアルギニンはタンパク質に結合するのであろうか。アルギニンと芳香環化合物,²⁷⁾あるいは芳香族アミノ酸との結合は知られている。²⁸⁾脂質との相互作用も報告があるように、^{29,30)}アルギニンは疎水的相互作用もできるものである。ここでは触れなかったがアルギニンは核酸の疎水的性質を抑えることが報告されており、合致している。³¹⁾これに相応してアルギニンは核酸の構造、安定性に強く影響する。³²⁾

それではアルギニンはウイルスをどのような機構で不活化するのであろうか。上に述べたすべての可能性が考えられる。まずウイルスタンパク質であるが、その変性を促進することは考え難い。それよりもタンパク質分子間の相互作用、タンパク分子・脂質間相互作用、そして核酸への影響などいろんな可能性が考えられる。これからアルギニンの応用を拡大するためにも、このような相互作用に基づくアルギニンの作用機構に関する研究の発展がいつそう望まれる。

謝辞 未発表の結果を使わせて頂いた東大医科学研究所伊藤健太郎氏、大杉美穂博士、山本雅博士に感謝する。

REFERENCES

- 1) Yancey P. H., Clark M. E., Hand S. C., Bowlus R. D., Somero G. N., *Science*, **217**, 1214-1222 (1982).
- 2) Arakawa T., Timasheff S. N., *Biophys. J.*, **47**, 411-414 (1985).
- 3) Kita Y., Arakawa T., Lin T. Y., Timasheff S. N., *Biochemistry*, **33**, 15178-15189 (1994).
- 4) Ishibashi M., Tsumoto K., Ejima D., Arakawa T., Tokunaga M., *Protein Pept. Lett.*, **12**, 649-653 (2005).
- 5) Buchner J., Rudolph R., *Biotechnology*, **9**, 157-162 (1991).
- 6) Ahn J. H., Lee Y. P., Rhee J. S., *J. Biotechnol.*, **54**, 151-160 (1997).
- 7) Buchner J., Pastan I., Brinkmann U., *Anal. Biochem.*, **205**, 263-270 (1992).
- 8) Arora J., Khanna N., *J. Biotechnol.*, **52**, 127-133 (1996).
- 9) Tsumoto K., Umetsu M., Kumagai I., Ejima

- D., Arakawa T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **312**, 1383–1386 (2003).
- 10) Shire S. J., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **20**, 708–714 (2009).
- 11) Shiraki K., Kudou M., Fujiwara S., Imanaka T., Takagi T., *J. Biochem.*, **132**, 591–595 (2002).
- 12) Horowitz P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10449–10453 (1992).
- 13) Ho J. G. S., Middleberg A. P. J., Ramage P., Kocher H. P., *Protein Sci.*, **12**, 708–716 (2003).
- 14) Blasig I. E., Winkler L., Lassowski B., Mueller S. L., Zuleger N., Krause E., Krause G., Kolbe M., Piontek L., *Cell Mol. Life Sci.*, **63**, 505–514 (2006).
- 15) Maity H., Karkaria C., Davagnino J., *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **10**, 609–625 (2009).
- 16) Arakawa T., Ejima D., Tsumoto K., Ishibashi M., Tokunaga M., *Protein Expr. Purif.*, **52**, 410–414 (2007).
- 17) Arakawa T., Philo J. S., Tsumoto K., Yumioka R., Ejima D., *Protein Expr. Purif.*, **36**, 244–248 (2004).
- 18) Yumioka R., Tsumoto K., Arakawa T., Ejima D., *Protein Expr. Purif.*, **70**, 218–223 (2010).
- 19) Arakawa T., Kita Y., Sato H., Ejima D., *Protein Expr. Purif.*, **63**, 158–163 (2009).
- 20) Arakawa T., Ejima D., Li T., Philo J. S., *J. Pharm. Sci.*, **99**, 1674–1692 (2010).
- 21) Ejima D., Yumioka R., Arakawa T., Tsumoto K., *J. Chromatogr. A*, **1094**, 49–55 (2005).
- 22) Arakawa T., unpublished observation.
- 23) Arakawa T., Kita Y., Koyama A. H., *Int. J. Pharm.*, **355**, 220–223 (2008).
- 24) Mura P., Maestrelli F., Cirri M., *Int. J. Pharm.*, **260**, 293–302 (2003).
- 25) Yamasaki H., Tsujimoto K., Koyama A. H., Ejima D., Arakawa T., *J. Pharm. Sci.*, **97**, 3067–3073 (2008).
- 26) Katsuyama Y., Yamasaki H., Tsujimoto K., Koyama A. H., Ejima D., Arakawa T., *Int. J. Pharm.*, **361**, 92–98 (2008).
- 27) Pellequer J. L., Zhao B., Kao H. I., Bell C. W., Li K., Li Q. L., Karu A. E., Roberts V. A., *J. Mol. Biol.*, **302**, 691–699 (2000).
- 28) Arakawa T., Ejima D., Tsumoto K., Obeyama Y., Tanaka Y., Kita Y., Timasheff S. N., *Biophys. Chem.*, **127**, 1–8 (2007).
- 29) Futaki S., *Int. J. Pharm.*, **245**, 1–7 (2002).
- 30) Hirai A., Kawasaki H., Tanaka S., Nemoto H., Suzuki M., Maeda H., *Colloid Polymer Sci.*, **284**, 520–528 (2006).
- 31) Yamamoto S., Yoshimoto N., Tarmann C., Jungbauer A., *J. Chromatogr. A*, **1216**, 2616–2620 (2009).
- 32) Arakawa T., Hirano A., Shiraki K., Kita Y., Koyama A. H., *Int. J. Biol. Macromol.*, **46**, 217–222 (2010).