

複数のストレスによる蛋白質の会合に及ぼす安定化剤の作用

荒川 力,^{*,a} Daniel Bernhard DIX,^b Byeong Seon CHANG^c

The Effects of Protein Stabilizers on Aggregation Induced by Multiple-Stresses

Tsutomu ARAKAWA,^{*,a} Daniel B. DIX,^b and Byeong S. CHANG^c

Alliance Protein Laboratories,^a 3957 Corte Cancion, Thousand Oaks, CA 91360, U.S.A., Regeneron Pharmaceuticals,^b 777 Old Saw Mill Road, Tarrytown, NY 10591, U.S.A. and Integrity Biosolution,^c 3537 Old Conejo Road, Newbury Park, CA 91320, U.S.A.

(Received July 14, 2003; Accepted September 2, 2003)

A successful development of therapeutic proteins requires a formulation optimal for long-term storage of the proteins. During storage and shipment, proteins are subjected to multiple stresses. Here we show that ciliary neurotrophic factor (CNTF) readily aggregates upon exposure to mechanical stress such as agitation and elevated temperature at 37°C. Sucrose and lysine or arginine protect CNTF from heat stress, while detergents such as Tween20 and organic solvents such as propylene glycol (PG) are effective against agitation. Combination of the amino acids and PG protected the protein from both stresses. The results suggest the importance of combining additives, against multiple stresses, which may have negative as well as positive influence individually against one particular stress.

Key words—stress; formulation; agitation; storage; detergents; proteins

1. はじめに

現在注目を集めている抗体を含めて蛋白質製剤の発展には目を見張るものがある。蛋白質を薬品として開発するための最大の難関はその不安定性にある。蛋白質の溶液中の安定性は極めて低く、そのため製造過程や貯蔵中で会合や変性を起こす。しかし安定性が低いとはいえ、その使い易さから溶液貯蔵の方が凍結乾燥よりも好まれる。凍結乾燥するにしても、蛋白質の不安定さが障害となる。蛋白質を製剤化するためにまず溶液としての開発を試みるのが通常である。

蛋白質は貯蔵中に様々なストレスを受ける。^{1,2)} 化学的なものとしては pH の変化、酸素などの溶存ガス、溶液中あるいは薬の容器から出てくる金属イオンなどの不純物が挙げられる。物理的なものとしては光、温度の上昇、輸送中のゆれや攪拌、³⁾ ゆれと深く関わっている容器表面や空気界面との接触、偶発的な凍結融解、⁴⁻⁶⁾ ろ過⁷⁾などが挙げられる。こ

れらの要素はすべて蛋白質の化学的安定性にも影響するが、光を除いては蛋白質の構造安定性にも影響を与える。

蛋白質薬品は貯蔵中これらのほとんどのストレスを多かれ少なかれこうむる。問題は1つの方法であるストレスから蛋白質を守ることができても、他のストレスに対して無力な場合があることである。ここでは構造安定性が極めて弱い CNTF (ciliary neurotrophic factor) と KGF (keratinocyte growth factor) を例に用いて蛋白質の安定化法について述べる。⁸⁻¹⁰⁾ 特に CNTF は攪拌、ろ過、凍結融解、温度上昇、各種容器表面や空気界面との接触などあらゆるストレスに対する安定性が弱いので、モデル蛋白質として最適である。

このようなストレスから蛋白質を保護するために安定化剤が用いられる。ここでは複数のストレスによる CNTF の会合を最小限に抑えるための安定化剤の使用について述べる。

2. 温度上昇ストレス

すべての蛋白質は熱変性を起こす。すなわち蛋白質はある温度領域で天然状態 (N) から変性状態 (D) へと構造を変える。理想的にはこの現象は次

^{a)} アライアンス プロテイン ラボラトリーズ、^{b)} リジェネロン ファーマシューティカルズ、^{c)} インテグリティー バイオソリューション
e-mail: tarakawa2@aol.com

のような 2 状態間の平衡反応として表される (Eq. 1).



しかし熱変性はかならずしも平衡状態を維持するとは限らない。むしろ平衡を保つ方が、すなわち変性状態 (D) が N にならず戻る方がまれである。ほとんどの場合平衡は変性体 (D) の会合によってくずれてしまう。よって変性反応はより一般に Lumry-Eyring の式と知られている Eq. 2 で表される。¹¹⁾ 変性反応は大抵 Eq. 2 のように会合体の形成を伴ってしまう。



このような変性が熱変性の温度領域あるいはそれ以上の温度のみで起こり、その温度以下では起こらないとすれば、低い温度にしておけば十分である。ほとんどの蛋白質の変性温度は 40°C 以上なので、室温にしておけば少なくとも温度のストレスから蛋白質を守れることになる。実際には変性温度以下、例えば 4°C でも Eq. 2 の変性反応は起こっている。¹²⁾ すなわち蛋白質は天然状態と変性状態の間をゆらいでいる。もちろん温度が低いほど天然状態にいる時間が長くなる。

CNTF は 37°C におくと数日間の次元でゆっくりと会合する。その会合過程を 405 nm の濁度で測定したのが Fig. 1 である。CNTF の変性温度は 50°C 付近で 37°C はその熱変性領域よりはかなり低い温度であり、蛋白質はほとんどの時間天然状態として存在しているはずである。にもかかわらずこのように会合体を形成するのはこの蛋白質の変性状態の会合し易さにある。

このように常温でも会合を起こし易いのは KGF でも同様である。この蛋白質は今 Amgen や Human Genome Science が臨床試験を進めているが、大変会合し易い。KGF の熱変性は 42°C 以上で起こるが、37°C でも容易に会合する。0.5 mg/ml の KGF を 37°C で保存すると半日以内に半分以上の蛋白質が沈殿してしまう。¹⁰⁾

それではいかにしてこのような蛋白質の会合を防ぐことができるであろうか。それには Eq. 2 から明らかかなように 2 つの方法がある。1 つは N と D の間の平衡反応を N の方へとずらしてやることである。2 つ目は D から会合への反応を抑えてやることである。

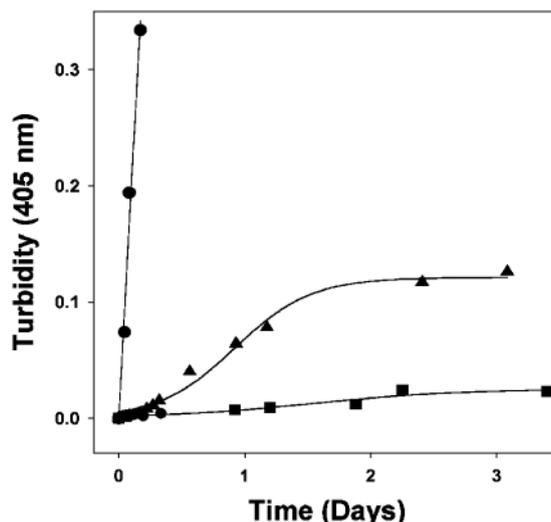


Fig. 1. Time Course of Aggregation during Heat Stress
■: no additive, ●: 0.2% Tween 20, ▲: 25% PG.

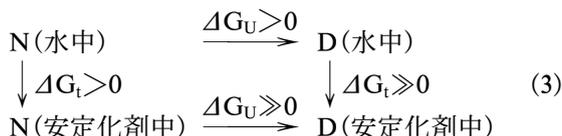
Table 1. Aggregation of CNTF during Heat or Agitation Stress

Additive	OD (405 nm) after 1 day at 37°C	OD (405 nm) after 50 sec voltex
None	0.008	>1.0
0.2% Tween 20	>1.0	0.01
25% PG	0.068	0
8% PEG 3350	0.067	0.08
40% Sucrose	0.002	0.12
10% Ethanol	0.025	0

N と D の平衡定数に影響して蛋白質を安定化するものは数多くある。これらは一般に蛋白質の安定化剤と言われ、糖、ポリオール、塩、アミノ酸、アミン (例えば Trimethylamine N-oxide) などが挙げられる。¹³⁻³⁰⁾ CNTF においては Table 1 に示すように 40% しょ糖は会合を抑制した。2% アルギニンや 5% リジン溶液中では 24 時間後も全く濁度の上昇が見られず、会合は完全に抑えられた。KGF に対してもグリシンが同様の効果を発揮する。^{9,10)} KGF に対しては他にも多くの多価陰イオン塩が安定化効果を示す。⁹⁾

糖やアミノ酸が蛋白質を安定化する機構は、蛋白質とこれらの物質との相互作用から説明される。^{13,21,22)} 天然状態の蛋白質の表面からこれらの物質は排除されている (負の相互作用)。この相互作用は熱力学的には蛋白質を不安定にする。これを摸

式的に表すと Eq. 3 のようになる。天然状態の蛋白質を水中から安定化剤の溶液に移すと、その移行自由エネルギー、 ΔG_t が増大する。変性状態では蛋白質の表面積が増えるので、この負の相互作用がさらに負となり、 ΔG_t は天然状態 (N) よりもさらに増大する。Equation 3 の平衡関係から変性の自由エネルギー、 ΔG_u は安定化剤の存在下では水中のそれよりも大きくならなければならない。すなわち安定化剤の存在下では変性はより起こりにくくなる。



一方会合を防ぐ物質としては主に界面活性剤や有機溶媒が挙げられる。中でも Tween20 は蛋白質製剤の会合抑制に常用される界面活性剤である。²³⁻²⁶⁾ ところがこれは CNTF の溶液中での会合に全く働かない。それどころか Fig. 1 に示すように会合を促進する。弱い界面活性剤、Polyethylene Glycol (PEG) や有機溶媒の 1 つ、PG (Propylene Glycol) も同様である。なぜこのような会合促進が Tween20 や PG で起こるのか明らかではない。その可能性の 1 つとして Tween20 や PG が $N \rightleftharpoons D$ 反応の変性を促進していることが考えられる。普通 Tween20 のような非イオン性の弱い界面活性剤は蛋白質の安定性に対して影響を与えない。安定化することもなければ不安定化することもない。

3. 攪拌ストレス

CNTF は限外ろ過や攪拌などの機械的なストレスに極めて弱い。室温で数秒間ボルテックスにかけると速やかに沈殿を起こす。Figure 2 にボルテックスの時間に伴う CNTF の会合を濁度の増加として示してある。横軸はここでは秒である (37°C の貯蔵安定性の時間の単位は日数である)。もちろん他の蛋白質でも攪拌を続ければやはり会合を起こすが、CNTF は極めて会合し易い。貯蔵中、輸送中にボルテックスほど激しい攪拌を受けることはないだろうが、それでもゆれなどによって会合を起こす可能性が高い。

攪拌によるストレスには表面吸着とずれ力との 2 つの原因が考えられる。容器・液界面、あるいは空気と溶液との界面に蛋白質が吸着すると構造変化を起こすことがある。^{27,28)} すなわち $N \rightleftharpoons D$ の反応に

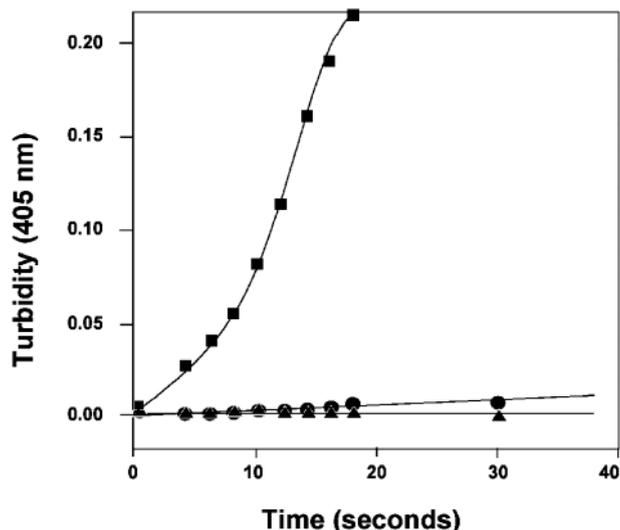


Fig. 2. Time Course of Aggregation during Agitation Stress
 ■: no additive, ●: 0.2% Tween 20, ▲: 25% PG.

において表面吸着は D を増大させる。このような場合界面活性剤が有効であることはよく知られている。^{3,5,6,29)} もう 1 つ攪拌がもたらす影響として溶液内で起こるずれ力がある。それによって蛋白質が変性するような機械的力が働くことが考えられる。³⁰⁻³²⁾ このようなずれに対して知られている有効な安定化剤はないが、一般的な蛋白質の安定化剤がここでも効果目があることは十分考えられる。

Figure 2 に界面活性剤 Tween20, 有機溶媒 PG の結果を示してある。会合が強く抑えられている。エタノールや PEG も強い抑制効果がある (Table 1)。これに対して Table 1 に示すようにしょ糖の効果は極めて弱い。アミノ酸も同様である。この事実は攪拌が CNTF の会合に及ぼす影響には疎水結合が強く関与していることを示唆する。すなわちこの疎水性のゆえに表面吸着を起こしたり、蛋白質間の会合をもたらすものと思われる。

4. 複数のストレスに対する安定化

ここで明らかなことは、CNTF は熱ストレスにも攪拌ストレスにも弱いということである。一般に不安定な蛋白質は様々なストレスに対して弱いと言えるだろう。それではこの両方のストレスから CNTF を守ることができるだろうか。しょ糖は熱に対して効果があったが攪拌にはごく弱い効果しかなかった。アミノ酸も同様である。界面活性剤 Tween20 や有機溶媒 PG は攪拌に対して強い効果

を示したが温度に対しては無効どころか会合を促進した。それではしょ糖と Tween20, またアミノ酸と PG を組み合わせたらどうであろうか。よい面だけができれば, すなわち Tween20 や PG は攪拌のみに, しょ糖やアミノ酸は温度ストレスのみに影響すれば理想的と言えるが, 逆になることも考えられる。しょ糖が攪拌ストレスにほとんど影響せずに, Tween20 が温度ストレスに悪影響を与えてしまうことも考えられる。

実際のところ 2 つの添加剤を加えた場合それぞれの効果がどうか予想がつかない。例えばしょ糖は温度ストレスに効果があるが, Tween20 は逆効果である。両方入ると温度ストレスに対して中間ぐらいにくるのであろうか。しょ糖は攪拌ストレスに若干効き Tween20 は大きな効果を発揮するので, 両方あれば効果は最大になるであろうか。結論としては実験してみなければ分からない。しょ糖やアミノ酸の蛋白質安定化作用はそれらが先にも述べたように蛋白質に結合しないためである。^{13,16,18,33,34} この相互作用しないと言う結果は蛋白質とこれらの物質の間でのことである。もし界面活性剤が蛋白質に結合するとその複合体としょ糖やアミノ酸などの相互作用は分からない。さらにしょ糖やアミノ酸と界面活性剤との成分間の相互作用を考慮に入れなければならない。³⁵ すなわち例えば界面活性剤の有効濃度はしょ糖の添加によって変化することは十分考えられる。異なった 2 種の添加剤を加えた結果をそれぞれの効果から推定することは難しい。

そこで CNTF の熱ストレスには弱い不安定効果を示したが, 攪拌ストレスには強い効果を示した PG と熱ストレスに効果のあったアミノ酸を混合して, 温度, 攪拌ストレス両方に対する効果を調べてみると, この組み合わせは両ストレスに対して大きな安定化効果を示した (Table 2)。PG と同様の影響を示した PEG もまたこれらのアミノ酸と混ぜると攪拌, 温度両ストレスに対して強い効果があった。すなわち PG や PEG は温度ストレスに対して逆効果であったにもかかわらず, アミノ酸存在下ではそのような効果は現れなかった。2 種以上の添加剤を混ぜる場合, 1 つの添加剤があるストレスに不安定化を示しても, もう 1 つの成分がその効果をなくしてしまうこと, あるいは逆のこともあり得ると言うことになる。

Table 2. Aggregation of CNTF during Heat or Agitation Stress

Additive	OD (405 nm) after 1 day at 37°C	OD (405 nm) after 50 sec voltex
None	0.008	>1.0
8% PEG 3350	0.067	0.08
25% PG	0.068	0
8% PEG 3350+2% Arginine+5% Lysine	0.004	0
25% PG+2% Arginine+5% Lysine	0.001	0

蛋白質製剤が貯蔵中に受けるストレスは温度変化や攪拌だけに限らない。前にも述べたように偶発的な凍結, pH 変化, あるいは化学的变化に伴う構造変化などのストレスもある。CNTF のように 1 つの安定化剤ですべてのストレスに対応できなければ, さらに安定化剤を組み合わせる必要がでてくる。ここで述べたように安定化剤のストレスへの個々の影響が加算的に働くとは限らないので, 組み合わせのスクリーニングを広範にする必要があると思われる。

最後にアミノ酸の中でアルギニンの特殊な性質について言及する。最近アルギニンは, その機構は不明であるが, 強い会合抑制効果のあることが分かってきた。^{36,37} アルギニンは蛋白質のリフォルディングを促進したり, 大腸菌でのペリプラズマへの分泌を助けたり, 封入体から蛋白質を活性状態で溶かし出したりする効果が認められているが, これらの効果はその会合抑制効果と密接に関連している。^{36,37} アルギニンの蛋白質の長期保存への効果は今後さらに詳細に研究されるであろう。

5. おわりに

蛋白質製剤を長期保存する方法の開発は, これからの抗体薬品の開発, 発展とともに益々高まるものと思われる。ここでは熱, 攪拌両方のストレスによる会合から CNTF を守るような安定化剤の組み合わせについて検討した。場合によっては, 例えば熱と表面吸着と言うような異なるストレスが蛋白質の不安定化に寄与することもあり得る。ここで述べたように, 1 つの安定化剤がどちらかのストレスにしか効果がない場合, 2 種以上の安定化剤を混ぜ合わせると予期しない結果が得られることに留意する必要がある。

REFERENCES

- 1) Manning M. C., Patel K., Borchardt R. T., *Pharm. Res.*, **6**, 903–917 (1989).
- 2) Wang W., *Int. J. Pharmaceut.*, **185**, 129–188 (1999).
- 3) Henson A. F., Mitchell J. R., Mussellwhite P. R., *J. Colloid Interface Sci.*, **32**, 162–165 (1970).
- 4) Carpenter J. F., Crowe J. H., *Cryobiology*, **25**, 244–255 (1988).
- 5) Chang B. S., Kendrick B. S., Carpenter J. F., *J. Pharm. Sci.*, **85**, 1325–1330 (1996).
- 6) Nema S., Avis K. E., *J. Parent. Sci. Technol.*, **47**, 76–83 (1993).
- 7) Nema S., Avis K. E., *J. Parent. Sci. Technol.*, **47**, 16–21 (1993).
- 8) Sendtner M., Carroll P., Holtmann B., Hughes R. A., Thoenen H., *J. Neurobiol.*, **25**, 1436–1453 (1994).
- 9) Chen B. L., Arakawa T., *J. Pharm. Sci.*, **85**, 419–422 (1996).
- 10) Chen B. L., Arakawa T., Hsu E., Narhi L. O., Tressel T. J., Chien S. L., *J. Pharm. Sci.*, **83**, 1657–1661 (1994).
- 11) Lumry R., Wyring S. H., *J. Phys. Chem.*, **58**, 110–120 (1954).
- 12) Dathe M., Gast K., Zirwer D., Welfle H., Mehlis B., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **36**, 344–349 (1990).
- 13) Arakawa T., Timasheff S. N., *Arch. Biochem. Biophys.*, **224**, 169–177 (1983).
- 14) Kita Y., Arakawa T., Lin T. Y., Timasheff S. N., *Biochemistry*, **33**, 15178–15189 (1994).
- 15) Arakawa T., Kita Y., Carpenter J. F., *Pharm. Res.*, **8**, 285–291 (1991).
- 16) Arakawa T., Timasheff S. N., *Biophys. J.*, **47**, 411–414 (1985).
- 17) Arakawa T., Timasheff S. N., *Biochemistry*, **21**, 6536–6544 (1982).
- 18) Arakawa T., Timasheff S. N., *Biochemistry*, **21**, 6545–6552 (1982).
- 19) Arakawa T., Timasheff S. N., *J. Biol. Chem.*, **259**, 4979–4986 (1984).
- 20) Arakawa T., Timasheff S. N., *Biochemistry*, **23**, 5912–5923 (1984).
- 21) Lee J. C., Timasheff S. N., *J. Biol. Chem.*, **256**, 7193–7201 (1981).
- 22) Gekko K., Timasheff S. N., *Biochemistry*, **20**, 4667–4676 (1981).
- 23) Bam N. B., Cleland J. L., Yang J., Manning M. C., Carpenter J. F., Kelley R. F., Randolph T. W., *J. Pharm. Sci.*, **87**, 1554–1559 (1998).
- 24) Maa Y. F., Hsu C. C., *Biotechnol. Bioeng.*, **54**, 503–512 (1997).
- 25) Bam N. B., Cleland J. L., Randolph T. W., *Biotechnol. Prog.*, **12**, 801–809 (1996).
- 26) Ip A. Y., Arakawa T., Silvers H., Ransone C. M., Niven R. W., *J. Pharm. Sci.*, **84**, 1210–1214 (1995).
- 27) Thomas C. R., “Chemical Engineering Problems in Biotechnology,” ed. by Winkler M. A., Elsevier Applied Science, New York, 1990, pp. 47–57.
- 28) MacRitchie F., *Colloid Surfaces*, **41**, 25–34 (1989).
- 29) Levine H. L., Ransohoff T. C., Kawahata R. T., McGregor W. C., *J. Parent. Sci. Technol.*, **45**, 160–165 (1991).
- 30) Charm S. E., Wong B. L., *Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 1103–1109 (1970).
- 31) Elias C. B., Joshi J. B., *Adv. Biochem. Eng.*, **59**, 48–71 (1998).
- 32) Tirrell M., Middleman S., *Biorheology*, **74**, 102–107 (1978).
- 33) Gekko K., Timasheff S. N., *Biochemistry*, **20**, 4667–4767 (1981).
- 34) Lee J. C., Lee L. L. Y., *Biochemistry*, **26**, 7813–7819 (1987).
- 35) Casass E., Eisenberg H., *Adv. Protein Chem.*, **19**, 287–395 (1964).
- 36) Shiraki K., Kudou M., Fujiwara S., Imanaka T., Takagi M., *J. Biochem.*, **132**, 591–595 (2002).
- 37) Arakawa T., Tsumoto K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **304**, 148–152 (2003).