

タンパク質の安定性を ΔG で定量的に評価
バイオ医薬品の凝集性を予測



HUNK

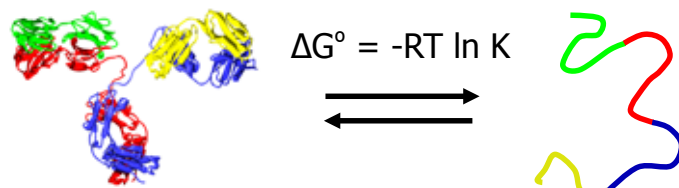
全自動化学変性測定装置



タンパク質の安定性を定量的に評価する

タンパク質の立体構造の安定性は、ギブスの自由エネルギー変化(ΔG)によって量的に表すことができます。

天然状態のタンパク質は、溶液中において変性状態との間のわずかなエネルギーバランスの差によって立体構造が保たれています。つまり、立体構造の安定化は様々な安定化因子(水素結合、静電相互作用、疎水性相互作用など)と不安定化因子(構造のエントロピーなど)が相殺された結果の微妙なバランスの上に成り立っています。

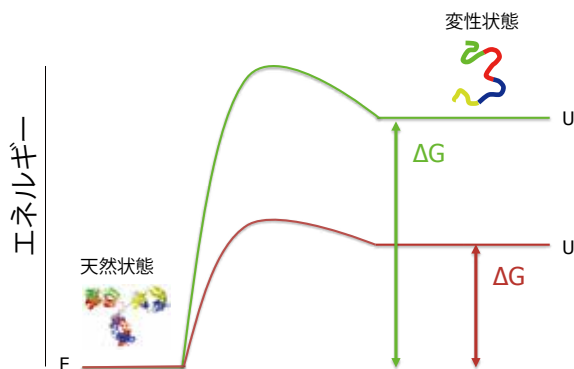


このバランスに基づいてタンパク質が天然状態と変性状態の2状態を取るとき、その状態間の化学平衡は下記のように表されます。

$$\Delta G = -RT \ln K$$

R は気体定数、 K は天然状態と変性状態の平衡定数、 T は温度です。すなわち ΔG は天然状態と変性状態の間の平衡論的安定性(熱力学的安定性)を表す指標となります。

HUNKは変性剤を用いたタンパク質の化学変性測定を全自動で測定することで、この ΔG を実験的に決定することができます。化学変性による ΔG の決定は室温条件下で行うことができますので、DSC(示差走査熱量計)のような昇温による測定に比べ、変性の可逆性が高く、より信頼性の高い ΔG の値を決定できます。



大きな ΔG であれば、変性にはより大きなエネルギーが必要になります。

ΔG から得られる変性タンパク質の割合

ΔG kcal/mol	安定性	変性状態のタンパク質の割合
9.6	変性割合が低い	1/10,000,000
8.2		1/1,000,000
6.8		1/100,000
5.5	中程度の変性割合	1/10,000
4.1		1/1000
2.7	変性割合が高い	1/100
1.3		1/10
0		1/2

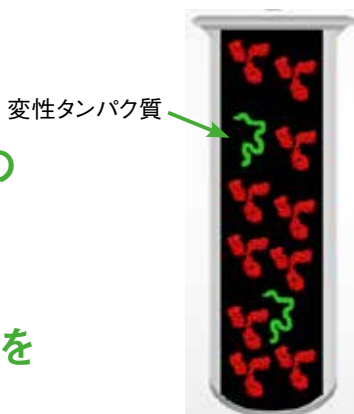
ΔG は、タンパク質の平衡論的安定性を量的に表していますので、その値から溶液中で天然状態と変性状態がどれだけの割合で存在するかを示すことができます。より大きな ΔG の値は、そのタンパク質の変性割合が少ないことを意味します。逆に ΔG が小さい値の場合、タンパク質は不安定で、変性割合が大きいことを意味します。

例えば、100 mg/mlの抗体の ΔG が4.1 kcal/mlのとき、変性状態の抗体は100 μ g存在すると考えられます。

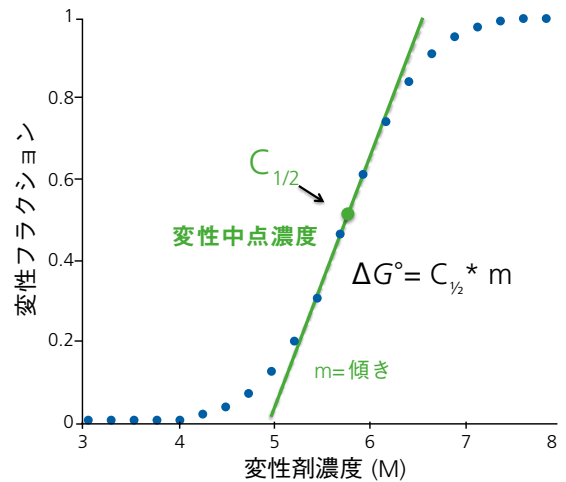
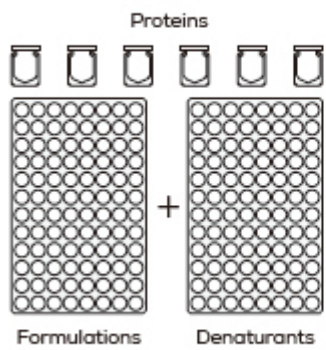
抗体医薬品の製剤開発において、凝集体の生成をできる限り抑えることが非常に重要と考えられています。凝集の発生は薬効の低下のみならず免疫原性等の副作用を引き起こすリスクがあります。凝集発生の経路は様々にありますが、主要な経路のひとつとして、変性した抗体が核となり会合することで、不可逆的な凝集を引き起こす経路が考えられています。

従って天然状態の抗体割合を最大化し、変性状態の割合を最小化することは、凝集を抑制する上で有効な戦略であり、 ΔG はその評価が可能な重要な定量的パラメータになります。

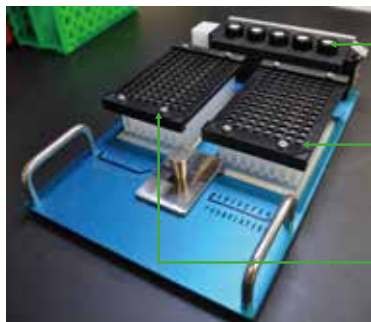
ΔG を最大化
↓
変性タンパク質の割合を最小化
↓
凝集生成のリスクを最小化



変性剤による等温化学変性で正確な ΔG を決定



サンプルトレイ

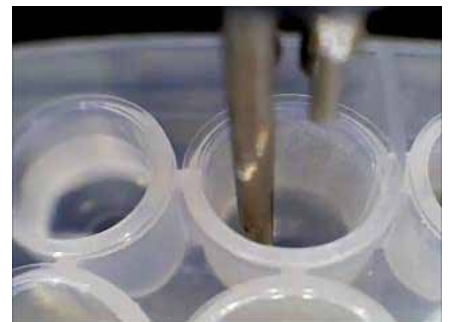


タンパク質と処方条件数の組み合わせに応じて最適な専用のトレイを使用

測定用 96ウェルプレート



測定は全て全自動

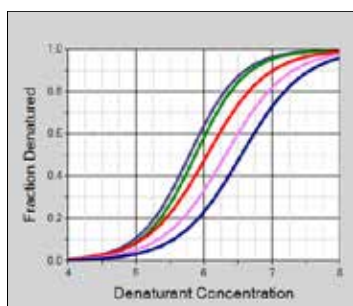


フォーミュレーターにより、変性剤を段階的に希釈して混合したタンパク質溶液を全自動調整

ΔG によるバイオ医薬品の安定性評価

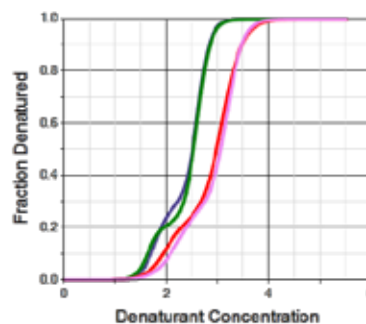
製剤処方スクリーニング

Formulation	ΔG (kcal/mol)
0 mM NaCl	8.19
250 mM NaCl	9.36
500 mM NaCl	8.88
750 mM NaCl	8.18
1 M NaCl	7.91



異なる塩濃度における ΔG の測定例

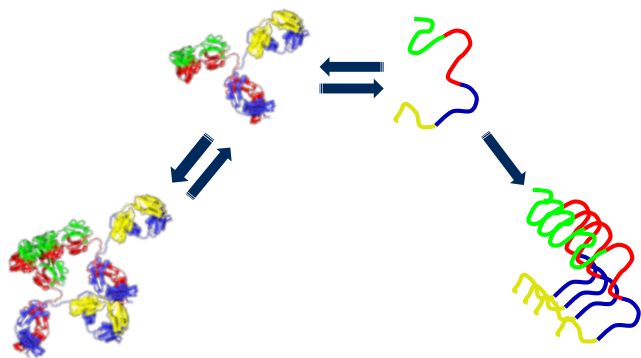
コンストラクト・スクリーニング



mAb	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	ΔG_1 (kcal/mol)	ΔG_2 (kcal/mol)
1	68	7.9	12.6
2	69	8.5	12.0
3	71	6.5	9.3
4	72	6.1	12.2

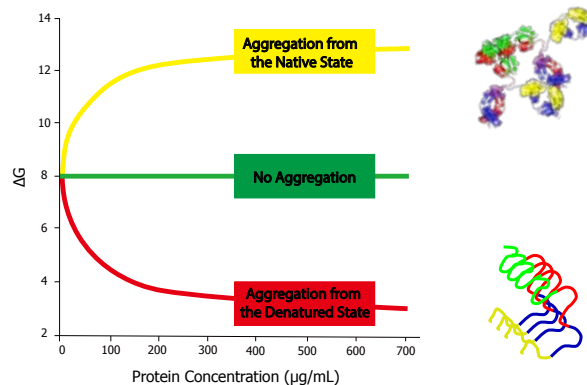
4つのコンストラクトの ΔG を比較した例。 T_m の結果とは異なる傾向が得られた。 ΔG は T_m によるスクリーニング結果を補完する室温での構造安定性の情報であり、 T_m と組み合わせることで、より精度の高い安定性のランキング評価が可能になります。

バイオ医薬品の凝集性を予測 ΔG_{trend}



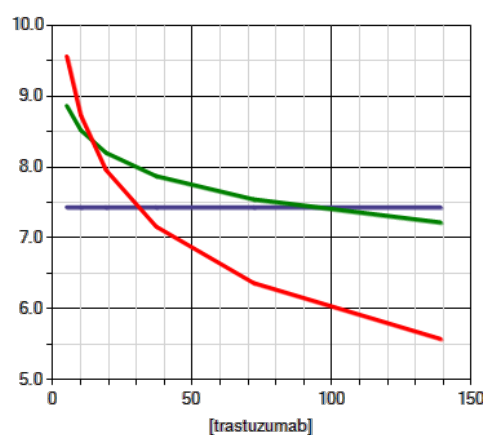
タンパク質の凝集のモデル

ΔG のタンパク質濃度依存性を評価することで、タンパク質の凝集性を予測することが可能です。凝集が存在しない場合、タンパク質の濃度によらず ΔG は一定になります。もし ΔG がタンパク質濃度に依存する場合、凝集が存在すると考えられます。天然状態の凝集(自己会合)が存在する場合、天然状態のタンパク質が安定化され ΔG は大きくなります。一方、変性状態のタンパク質が凝集する場合、変性状態がより安定化されることにより、平衡を凝集の方向に引っ張ることで、天然状態のタンパク質の量を減少させ、 ΔG は小さくなります。HUNKはタンパク質濃度依存的な ΔG の変化を ΔG_{trend} として、簡単に決定することが可能です。HUNKは変性タンパク質の割合(ΔG)と凝集の起こりやすさ(ΔG_{trend})を、室温で迅速に決定することができる唯一の手法になります。



ΔG のタンパク質濃度依存性 ΔG_{trend} から凝集の起こりやすさを予測

Schön et al., *Analytical Biochem.*, **2015**, 488: 45–50



ハーセプチンの ΔG_{trend} の測定。市販の製剤処方(青)トレハロースを除いた処方(緑) Tween20を除いた処方(赤)

HUNK仕様

最小サンプル濃度	25 ug/ml IgG (タンパク質による)
各 ΔG 当りの必要サンプル量	1 mL
各 ΔG 当りの測定時間	約 1 時間
1ラン当りの最大 ΔG 測定数	96
測定温度範囲	室温 + 2 °C ~ 30 °C
タンパク質保存温度	4 °C ~ 室温
蛍光励起/発光レンジ	190 ~ 890 nm ex, 200 ~ 900 nm em
光源	キセノンランプ
蛍光検出ダイナミックレンジ	5 桁
環境温度	18 ~ 28°C
電源環境	100 ~ 240 VAC, 50/60 Hz
寸法(D×W×H)、重量	710 × 560 × 870 mm, 91 kg