

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2025年1月16日(16.01.2025)



(10) 国際公開番号

WO 2025/013783 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 38/00 (2006.01) A61K 47/16 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01) A61K 47/18 (2017.01)
A61K 38/43 (2006.01) A61K 47/26 (2006.01)
A61K 39/35 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/024412

(22) 国際出願日: 2024年7月5日(05.07.2024)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2023-112438 2023年7月7日(07.07.2023) JP

(71) 出願人: ナガセヴィータ株式会社(NAGASE VIITA CO., LTD.) [JP/JP]; 〒7028006 岡山県岡山市中区藤崎675番地1 Okayama (JP).

(72) 発明者: 河野 恵三(KONO, Keizo); 〒7028006 岡山県岡山市中区藤崎675番地1 ナガセヴィータ株式会社内 Okayama (JP). 草野 創(KUSANO, Hajime); 〒7028006 岡山県岡山市中区藤崎675番地1 ナガセヴィータ株式会社内 Okayama (JP). 光川 侑輝(MITSUKAWA, Yuki); 〒7028006 岡山県岡山市中区藤崎675番地1 ナガセヴィータ株式会社内 Okayama (JP). 橋本 孝太郎(HASHIMOTO, Kotaro); 〒7028006 岡山県岡山市中区藤崎675番地1 ナガセヴィータ株式会社内 Okayama (JP). 北條 由紀子(HOJO, Yukiko); 〒7028006 岡山県岡山市中区藤崎675番地1 ナガセヴィータ株式会社内 Okayama (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人 W i s e P l u s (WISEPLUS IP FIRM); 〒5320003 大阪府大阪市淀川区宮原3丁目5番36号 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

(54) Title: COMPOSITION FOR INHIBITING DENATURATION OF PROTEIN

(54) 発明の名称: タンパク質の変性抑制用組成物

(57) Abstract: The present invention provides a composition for inhibiting the denaturation of a protein, with which the denaturation of a wide range of proteins can be inhibited. The present invention relates to a composition for inhibiting the denaturation of a protein, the composition comprising: at least one carbohydrate selected from the group consisting of trehalose, sucrose, maltitol, and isomaltitol; and at least one amine compound selected from the group consisting of glutamic acid, aspartic acid, arginine, proline, serine, choline, and salts thereof.

(57) 要約: 本発明は、幅広いタンパク質の変性を抑制できる、タンパク質の変性抑制用組成物を提供する。本発明は、トレハロース、スクロース、マルチトール、およびイソマルチトールからなる群から選択される1以上の糖質、並びに、グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン、プロリン、セリン、コリン、およびそれらの塩からなる群から選択される1以上のアミン化合物を含む、タンパク質の変性抑制用組成物に関する。

WO 2025/013783 A1

明 細 書

発明の名称：タンパク質の変性抑制用組成物

技術分野

[0001] 本発明は、タンパク質の変性抑制用組成物に関する。

背景技術

[0002] タンパク質は、治療薬、診断薬、ワクチン、食品などの分野で幅広く利用されている。一方、タンパク質は単独では変性しやすく、加熱、長期保存、複数回の凍結融解などを経ると変性して機能が損なわれる。タンパク質の変性を抑制するために、タンパク質を含む組成物の改良が試みられている。

[0003] 従来、炭水化物やアミノ酸がタンパク質の変性を抑制できることが知られている。例えば、特許文献1は炭水化物、カチオン性アミノ酸、アニオン、およびポリソルベートによりFc変異タンパク質を安定化する方法を開示している。特許文献2はポリオール、界面活性剤、およびアルギニンにより抗TNF α 抗体を安定化する方法を開示している。これらの方法では安定化できるタンパク質の種類は限定されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特表2009-525986号公報

特許文献2：特開2022-097600号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明の課題は、幅広いタンパク質の変性を抑制できる、タンパク質の変性抑制用組成物を提供することである。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、特定の糖質とアミン化合物とを組み合わせることで、タンパク質の変性を抑制できることを見出し、本発明を完成した。

[0007] すなわち、本発明は、トレハロース、スクロース、マルチトール、およびイ

ソマルチトールからなる群から選択される 1 以上の糖質、並びに、グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン、プロリン、セリン、コリン、およびそれらの塩からなる群から選択される 1 以上のアミン化合物を含む、タンパク質の変性抑制用組成物に関する。

[0008] タンパク質変性抑制用組成物は、加熱または凍結融解によるタンパク質の変性を抑制することが好ましい。

[0009] タンパク質変性抑制用組成物は、タンパク質の凝集を抑制することが好ましい。

[0010] 前記タンパク質が、抗体、サイトカイン、アレルゲン、および酵素からなる群から選択される 1 以上であることが好ましい。

[0011] 前記タンパク質が、抗 I F N α 抗体、抗 I F N γ 抗体、抗 T N F α 抗体、抗 I L - 1 7 A 抗体、および抗 I L - 1 8 からなる群から選択される 1 以上であることが好ましい。

[0012] 前記タンパク質が、I F N α 、I F N γ 、I L - 1 8、および T N F α からなる群から選択される 1 以上であることが好ましい。

[0013] 前記タンパク質が、スギ花粉アレルゲンであることが好ましい。

[0014] 前記タンパク質が、乳酸脱水素酵素、糖転移酵素、糖分解酵素、リンゴ酸脱水素酵素、およびタンパク質分解酵素からなる群から選択される 1 以上であることが好ましい。

[0015] 前記タンパク質が、ウイルス由来タンパク質または細菌由来タンパク質であることが好ましい。

[0016] 前記タンパク質が、血液凝固因子、またはアルブミンであることが好ましい。

[0017] タンパク質変性抑制用組成物の糖質：アミン化合物の配合モル比が 4 0 : 1 ~ 1 : 4 0 であることが好ましい。

[0018] 液体形態であり、タンパク質変性抑制用組成物の糖質、およびアミン化合物の濃度の合計が 0 . 2 0 モル / L ~ 3 . 5 0 モル / L であることが好ましい。

[0019] タンパク質変性抑制用組成物は、前記糖質によるタンパク質の変性抑制効果、および前記アミン化合物によるタンパク質の変性抑制効果に対し、相乗的にタンパク質の変性を抑制することが好ましい。

[0020] また、本発明は、タンパク質と、前記タンパク質変性抑制用組成物とを共存させることを特徴とする、タンパク質の変性抑制方法に関する。

[0021] また、本発明は、タンパク質と、前記タンパク質変性抑制用組成物とを含む、タンパク質製剤に関する。

[0022] また、本発明は、トレハロース、スクロース、マルチトール、およびイソマルチトールからなる群から選択される1以上の糖質、並びに、グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン、プロリン、セリン、コリン、およびそれらの塩からなる群から選択される1以上のアミン化合物をタンパク質と共存させることを特徴とする、タンパク質の変性抑制方法に関する。

[0023] また、本発明は、トレハロース、スクロース、マルチトール、およびイソマルチトールからなる群から選択される1以上の糖質、グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン、プロリン、セリン、コリン、およびそれらの塩からなる群から選択される1以上のアミン化合物、並びにタンパク質を含む、タンパク質製剤に関する。

発明の効果

[0024] 本発明のタンパク質の変性抑制用組成物は、幅広いタンパク質の変性を抑制することができる。

発明を実施するための形態

[0025] <<タンパク質変性抑制用組成物>>

本発明は、トレハロース、スクロース、マルチトール、およびイソマルチトールからなる群から選択される1以上の糖質、並びに、グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン、プロリン、セリン、コリン、およびそれらの塩からなる群から選択される1以上のアミン化合物を含む、タンパク質の変性抑

制用組成物に関する。前記糖質とアミン化合物との組み合わせにより、幅広いタンパク質の変性を抑制することができる。

[0026] <糖質>

本発明における糖質は、トレハロース、スクロース、マルチトール、およびイソマルチトールからなる群から選択される。これらの糖質は単独で使用してもよく、2以上を併用してもよい。これらの中でも、トレハロース、スクロース、マルチトールが好ましく、トレハロースがより好ましい。また、これらの糖質は、一部の水酸基の水素原子に置換基が導入された誘導体であってもよい。置換基としては、酢酸エステル、安息香酸などのカルボン酸エステル；硫酸エステル；ラウリン酸エステル、ミリスチン酸エステル、パルミチン酸エステル、ステアリン酸エステル、オレイン酸エステル、リノール酸エステル、リノレン酸エステルなどの脂肪酸エステル；メチルエーテル、ベンジルエーテル、トリチルエーテル、メチルシリルエーテル、ドデシルエーテルなどのエーテルが挙げられる。

[0027] タンパク質の変性抑制用組成物中の糖質の濃度は、0.10～3.00モル/Lであることが好ましく、0.40～1.60モル/Lであることがより好ましく、0.60～1.20モル/Lであることがさらに好ましい。

[0028] また、タンパク質変性抑制用組成物とタンパク質とを混合して、タンパク質製剤を得る場合、タンパク質製剤中の糖質の濃度は、0.10～3.00モル/Lであることが好ましく、0.40～1.60モル/Lであることがより好ましく、0.60～1.20モル/Lであることがさらに好ましい。

[0029] 本発明において、糖質は水素結合供与体として、水素結合受容体としてのアミン化合物とNADES (Natural Deep Eutectic Solvent、天然深共晶溶媒) を形成してタンパク質の変性を抑制し、安定化する可能性があるが、本発明はこの機構に限定されない。

[0030] <アミン化合物>

本発明におけるアミン化合物は、グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン、プロリン、セリン、コリン、およびそれらの塩からなる群から選択され

る。アミン化合物を構成する塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、塩酸塩、塩化物などが挙げられる。

[0031] これらのアミン化合物は単独で使用してもよく、2以上を併用してもよい。これらの中でも、グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン、プロリン、セリン、およびそれらの塩が好ましく、グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニンおよびそれらの塩がより好ましい。本発明において、アミン化合物はN A D E Sを形成する際の水素結合受容体として機能する可能性があるが、本発明はこの機構に限定されない。

[0032] 糖質とアミン化合物の組み合わせは特に限定されないが、トレハロースと、アルギニン、アスパラギン酸、セリン、およびグルタミン酸からなる群から選択されるアミン化合物、またはそれらの塩との組み合わせ；スクロースと、コリン、アルギニン、およびグルタミン酸からなる群から選択されるアミン化合物、またはそれらの塩との組み合わせ；マルチトールと、アルギニン、プロリン、およびグルタミン酸からなる群から選択されるアミン化合物、またはそれらの塩との組み合わせ；イソマルチトールとアルギニン、またはその塩との組み合わせが好ましく、マルチトールとグルタミン酸カリウムまたはグルタミン酸ナトリウム、トレハロースとグルタミン酸カリウムまたはグルタミン酸ナトリウム、トレハロースとアスパラギン酸カリウムまたはアスパラギン酸ナトリウム、マルチトールとアルギニン塩酸塩との組み合わせがより好ましく、マルチトールとグルタミン酸ナトリウム、トレハロースとグルタミン酸ナトリウム、トレハロースとアスパラギン酸ナトリウムとの組み合わせがさらに好ましい。これらの組み合わせではタンパク質の変性抑制効果が得られやすい。

[0033] タンパク質の変性抑制用組成物中のアミン化合物の濃度は、0.06～3.30モル/Lであることが好ましく、0.13～2.60モル/Lであることがより好ましく、0.21～1.90モル/Lであることが特に好ましい。

[0034] また、タンパク質変性抑制用組成物とタンパク質とを混合してタンパク質製

剤を得る場合、タンパク質製剤中のアミン化合物の濃度は0.06モル/L～3.30モル/L重量%であることが好ましく、0.13～2.60モル/Lであることがより好ましく、0.21～1.90モル/Lであることが特に好ましい。

[0035] タンパク質変性抑制用組成物において、糖質：アミン化合物の配合モル比は40：1～1：40であることが好ましく、20：1～1：20であることがより好ましく、10：1～1：10であることがさらに好ましい。なお、糖質の量が、糖質：アミン化合物の配合モル比を40：1～1：40としたときよりも多い場合、または少ない場合には、糖質のモル濃度が高すぎる、または低すぎることにより、タンパク質の変性抑制効果が認められない傾向がある。

[0036] タンパク質変性抑制用組成物が液体形態である場合、糖質、およびアミン化合物の濃度の合計が0.20～3.50モル/Lであることが好ましく、0.80～3.00モル/Lであることがより好ましく、1.00～2.50モル/Lであることがさらに好ましい。タンパク質変性抑制用組成物が固体形態である場合、糖質、およびアミン化合物の濃度の合計が0.05～3.50モル/kgであることが好ましく、0.10～2.00モル/kgであることがより好ましく、0.20～1.50モル/kgであることがさらに好ましい。

[0037] <変性抑制用組成物の形態>

タンパク質の変性抑制用組成物の形態は特に限定されず、液体または固体のいずれであってもよい。液体形態としては水溶液、懸濁液、スラリー等が挙げられる。固体形態としては粉末、顆粒、錠剤等が挙げられる。この中でも、製造容易性や保存安定性の観点から液体形態が好ましい。

[0038] タンパク質の変性抑制用組成物が液体形態の場合、そのpHは4～9が好ましく、5～8がより好ましい。これらのpH条件では、析出物が生じる可能性が低く、また、タンパク質の活性への影響も少ない。タンパク質の変性抑制用組成物のpHは、塩酸、硫酸などの酸や、水酸化ナトリウム、水酸化カ

リウム等の塩基により調整できる。

[0039] タンパク質の変性抑制用組成物は、各成分を任意の順序で混合することにより製造できる。各成分を混合した後、多孔質材料との接触や、フィルター透過により濾過や除菌を行ってもよい。

[0040] <任意成分>

タンパク質の変性抑制用組成物は、前記糖質、および前記アミン化合物の他に、任意でpH調整剤、界面活性剤、増粘剤、乳化剤、無機塩類、保存料、溶媒、賦形剤、金属類、濾過助剤などの成分を含んでいてもよい。これらの成分の含有量は特に限定されず、当業者によって任意の量が選択され得るが、例えば、タンパク質の変性抑制用組成物中0.001～90重量%とすることができ、0.01～50重量%が好ましく、0.1～30重量%がより好ましい。

[0041] pH調整剤としては、アスコルビン酸、酢酸、デヒドロ酢酸、乳酸、クエン酸、グルコン酸、コハク酸、酒石酸、フマル酸、リンゴ酸、およびアジピン酸、ならびにこれらの有機酸のナトリウム(Na)塩、カルシウム(Ca)塩、およびカリウム(K)塩、ならびに炭酸、リン酸、およびピロリン酸、ならびにこれらの無機酸のNa塩およびK塩などが挙げられる。

[0042] 界面活性剤としては、ノニオン系界面活性剤、アニオン系界面活性剤、カチオン系界面活性剤が挙げられる。ノニオン系界面活性剤の具体例として、ポリソルベート20、ポリソルベート80、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートなどが挙げられる。アニオン系界面活性剤の具体例として、ジオクタノイルナトリウムサルファート、ラウリル硫酸ナトリウムなどが挙げられる。これらの中でも、ノニオン系界面活性剤が好ましく、ポリソルベート20、ポリソルベート80がより好ましい。界面活性剤の、タンパク質の変性抑制用組成物中の濃度は、0.005～5(w/v)%が好ましく、0.01～3(w/v)%がより好ましく、0.05～1(w/v)

）％がさらに好ましい。

[0043] 増粘・賦形剤としては、ガム類、アルギン酸、アルギン酸誘導体、ペクチン、カラギーナン、カードラン、プルラン、ゼラチン、セルロース誘導体、寒天、タマリンド、サイリウム、グルコマンナン、ポリエチレングリコール、ミネラルオイル、シリコンオイルなどが挙げられる。

[0044] 乳化剤としては、グリセリン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、レシチン、酵素分解レシチン、サポニンなどが挙げられる。

[0045] 無機塩類としては、塩化ナトリウム、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム、塩化カルシウム、重合リン酸塩などが挙げられる。

[0046] 保存料としては、プロピオン酸、プロピオン酸塩、亜硫酸塩、安息香酸塩、ソルビン酸、ソルビン酸塩、ポリリジン、グリシン、酢酸塩などが挙げられる。塩としては、ナトリウム（Na）塩、カルシウム（Ca）塩、およびカリウム（K）塩などが挙げられる。

[0047] 溶媒としては、水、エタノール、メタノール、イソプロパノールなどが挙げられる。溶媒は、リン酸、クエン酸、グリシン、トリスなどのバッファー成分を含んでいてもよい。

[0048] 賦形剤としては、ヒアルロン酸、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、トリグリセリド、グリセリド、プロピレングリコール、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。

[0049] <タンパク質の変性抑制の評価>

タンパク質の変性抑制は次の方法により評価できる。すなわち、本発明のタンパク質の変性抑制用組成物を含むタンパク質製剤を変性処理し、タンパク質活性（A）を測定する。また、比較対照に同じ変性処理を行い、タンパク質活性（B）を測定する。そして、AがBを上回るときに、タンパク質の変性が抑制されたと判断できる。比較対照としては、試験サンプルと同じタン

パク質を含み、変性抑制用組成物を含まない製剤が挙げられる。

[0050] タンパク質の変性抑制を評価するときの、タンパク質製剤の変性処理としては、加熱、凍結融解などが挙げられる。加熱条件としては、30～100℃が好ましく、35～75℃がより好ましく、37℃、40℃、70℃、または73℃がさらに好ましい。加熱時間は、1時間～3日間が好ましく、1～24時間がより好ましく、1～6時間がさらに好ましく、2時間、または5時間がさらに好ましい。凍結融解条件としては、例えば、-80℃での1.5～2時間の凍結と、室温（約20℃）での融解を10回繰り返す条件が挙げられる。

[0051] タンパク質の活性の測定法としては、EIAやELISAなどの抗原-抗体反応を利用した方法、タンパク質凝集アッセイ、タンパク質の酵素活性の測定などが挙げられる。タンパク質の活性の測定法として、競合EIAや競合ELISAを行う場合、タンパク質の活性は競合阻害率（%）として測定される。

[0052] タンパク質活性をEIAやELISAなどの抗原-抗体反応を利用した方法により測定する場合、タンパク質活性（B）に対するタンパク質活性（A）の比 A/B は、1より大きく、1.05以上であることが好ましく、1.1以上であることがより好ましく、1.2以上であることがさらに好ましく、1.5以上であることがさらに好ましく、2以上、5以上、10以上、100以上であることが特に好ましい。

[0053] タンパク質活性をタンパク質凝集アッセイより測定する場合、タンパク質活性（B）に対するタンパク質活性（A）の比 A/B は、1より小さいことが好ましく、0.5以下であることがより好ましく、0.3以下であることがさらに好ましく、0.1以下であることがさらに好ましい。

[0054] タンパク質活性を酵素活性により評価する場合、タンパク質活性（B）に対するタンパク質活性（A）の比 A/B は、1より大きく、1.05以上であることが好ましく、1.1以上であることがより好ましく、1.2以上であることがさらに好ましく、1.5以上であることがさらに好ましく、2

以上、5以上、10以上、100以上であることが特に好ましい。

[0055] タンパク質変性抑制用組成物は、糖質によるタンパク質の変性抑制効果、およびアミン化合物によるタンパク質の変性抑制効果に対し、相乗的にタンパク質の変性を抑制することが好ましい。

[0056] タンパク質の変性抑制が相乗的であるか否かは、次の方法により評価できる。すなわち、本発明のタンパク質の変性抑制用組成物を含むタンパク質製剤を変性処理し、タンパク質活性（A）を測定する。また、比較対照1として、試験サンプルと同じタンパク質と糖質を含むが、アミン化合物を含まない製剤に同じ変性処理を行い、タンパク質活性（ B_1 ）を測定する。比較対照2として、試験サンプルと同じタンパク質とアミン化合物を含むが糖質を含まない製剤に同じ変性処理を行い、タンパク質活性（ B_2 ）を測定する。そして、 $A > B_1$ かつ $A > B_2$ のときに、タンパク質の変性抑制が相乗的であると判断できる。 $A \geq B_1 \times 1.5$ かつ $A \geq B_2 \times 1.5$ であることが好ましく、 $A \geq B_1 \times 2$ かつ $A \geq B_2 \times 2$ であることがより好ましく、 $A \geq B_1 + B_2$ であることがさらに好ましく、 $A \geq (B_1 + B_2) \times 2$ であることがさらに好ましく、 $A \geq (B_1 + B_2) \times 10$ であることが特に好ましい。

[0057] タンパク質変性抑制用組成物は、前述した変性処理を経てもタンパク質の変性を抑制できるため、変性を生じにくい温和な条件では、長期にわたりタンパク質を安定的に保存できる。本発明のタンパク質変性抑制用組成物を含むタンパク質製剤の保存温度は、4～40℃が好ましい。タンパク質製剤の保存時の相対湿度は0～75%が好ましい。また、タンパク質製剤の保存期間は、4℃で1年間以上が好ましく、2年間以上がより好ましい。

[0058] <<タンパク質製剤>>

本発明のタンパク質製剤は、タンパク質と、前記タンパク質変性抑制用組成物とを含むことを特徴とする。

[0059] <タンパク質>

本発明において変性を抑制するタンパク質は特に限定されず、例えば、抗体、サイトカイン、アレルゲン、酵素、血液凝固線溶系因子、ホルモン等とし

て一般的に使用されるタンパク質の変性を抑制できる。

[0060] 抗体は、抗原に特異的に結合できる抗体であれば特に限定されず、IgG、IgA、IgM、IgD、IgEのいずれであってもよい。また、抗体の由来動物は特に限定されず、ヒトの他に、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリなどのヒト以外の動物が挙げられる。抗体は、ヒト以外の動物由来の配列と、ヒト由来の配列を組み合わせたキメラ抗体、ヒト化抗体であってもよいし、完全ヒト抗体であってもよい。また、抗体としては、完全な定常領域と完全な可変領域とを含む抗体の他に、Minibody、Fab、Diabody、Fab'、Triabody、scFv-Fc、scFv、F(ab')₂、Fvなどが挙げられる。抗体は、核酸、標識化合物、低分子医薬などの抗体以外の化合物をコンジュゲートしたものであってもよい。抗体が特異的に結合する抗原は特に限定されず、核酸、タンパク質、糖などが挙げられる。抗原の具体例としてIFN α 、IFN γ 、TNF α 、IL-18、IL-17、白血球表面抗原タンパク質などが挙げられる。

[0061] サイトカインとしては、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、IFN δ 、IFN ω 、IFN λ 、IFN ϵ 、IFN κ などのIFN；TNF α 、TNF β などのTNF；IL1、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、IL18などのインターロイキン（IL）；CSF、EPO、EGF、FGF、PDGFなどが挙げられる。

[0062] アレルゲンは、ヒトやヒト以外の動物でアレルギー源となる物質であれば限定されず、例えば、エビ、カニ、クルミ、小麦、ソバ、卵、乳、落花生、アーモンド、アワビ、イカ、イクラ、オレンジ、カシューナッツ、キウイフルーツ、牛肉、ゴマ、サケ、サバ、大豆、鶏肉、バナナ、豚肉、マツタケ、モモ、ヤマイモ、リンゴ、ゼラチンなどの食物性アレルゲン；スギ、ブタクサ、ススキ、アカマツなどの花粉アレルゲンが挙げられる。

[0063] 酵素は、化学反応を触媒する活性を持つタンパク質であれば特に限定されず、例えば、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、イソアミ

ラーゼ、マルトジェニックアミラーゼ、プルナーゼ、マルトトリオヒドラーゼ、デキストラナーゼ、グルコースイソメラーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼ、ヘミセルラーゼ、マンナーゼ、ペクチナーゼ、ペクチンメチルエステラーゼ、インベルターゼ、ラクターゼ、イヌリナーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ、アルギン酸リアーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼなどの糖分解酵素、サイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ、トランスグルコシダーゼ、6- α -グルカノトランスフェラーゼ、グルコシルトランスフェラーゼ、ガラクトシルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、マンノシルトランスフェラーゼなどの糖転移酵素、プロテアーゼ、ペプチダーゼ、コラゲナーゼなどのタンパク質分解酵素、グルタミナーゼなどのアミノ酸分解酵素、リパーゼ、ホスホリパーゼ、エステラーゼなどの脂質関連酵素、その他、カタラーゼ、ウレアーゼ、タンナーゼ、デアミナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、乳酸脱水素酵素（LDH）、リンゴ酸脱水素酵素、リソソーム、アルカリホスファターゼ、DNA分解酵素、尿酸オキシダーゼなどが挙げられる。

[0064] タンパク質製剤中のタンパク質の濃度は、0.0001~100mg/mLが好ましく、0.001~50mg/mLがより好ましく、0.01~30mg/mLがさらに好ましい。タンパク質の濃度は、例えば1~100mg/mL、10~100mg/mLといった比較的高い濃度とすることもできる。また、例えば0.0001~1mg/mL、0.0001~0.1mg/mLといった比較的低い濃度とすることもできる。

[0065] タンパク質製剤のpHは4~9が好ましく、5~8がより好ましい。これらのpH条件では、析出物が生じる可能性が低く、また、タンパク質の活性への影響も少ない。タンパク質製剤のpHは、塩酸、硫酸などの酸や、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどの塩基により調整できる。

[0066] タンパク質製剤は、タンパク質、およびタンパク質変性抑制用組成物の他に、任意でpH調整剤、増粘剤、乳化剤、無機塩類、保存料、溶媒、賦形剤、

金属類、濾過助剤などの成分を含んでいてもよい。これらの具体例は前述した通りである。これらの任意成分の含有量は特に限定されず、当業者によって任意の量が選択され得るが、例えば、タンパク質製剤中0.001～90重量%とすることができ、0.01～50重量%が好ましく、0.1～30重量%がより好ましい。

[0067] タンパク質製剤は、各成分を任意の順序で混合することにより製造できる。各成分を混合した後、多孔質材料との接触や、フィルター透過により濾過や除菌を行ってもよい。また、液状のタンパク質製剤を凍結乾燥することにより、粉末のタンパク質製剤を得ることもできる。

[0068] <<タンパク質の変性抑制方法>>

本発明のタンパク質の変性抑制方法は、タンパク質と、前記タンパク質変性抑制用組成物とを共存させることを特徴とする。前記タンパク質変性抑制用組成物において糖質とアミン化合物から形成されるNADESの作用により、タンパク質の変性が抑制される可能性があるが、本発明はこの機構に限定されない。

[0069] タンパク質と、タンパク質変性抑制用組成物とを共存させる方法は、タンパク質と糖質およびアミン化合物が共存する限り特に限定されない。液体形態のタンパク質変性抑制用組成物と、タンパク質を含む溶液とを混合してタンパク質製剤を得て、その製剤中で、タンパク質と、タンパク質変性抑制用組成物とを共存させることが好ましい。

[0070] タンパク質と、タンパク質変性抑制用組成物との共存時間は、タンパク質の用途や保存期間に準じて決定すればよいが、30分以上が好ましく、1時間以上がより好ましい。共存時間の上限は特に限定されず、長期にわたってタンパク質の変性が抑制されるが、一般的には2年間以下である。タンパク質と、タンパク質変性抑制用組成物とを共存させた状態におくことで、長期間の保存中でもタンパク質の変性を抑制できる。

[0071] タンパク質と、タンパク質変性抑制用組成物との共存時の温度は特に限定されないが、0～40℃が好ましく、4～30℃がより好ましい。一般的には

タンパク質の変性が生じ得る比較的高い温度でも、タンパク質の変性を抑制できる。タンパク質と、タンパク質変性抑制用組成物とを共存させた後は、任意で、タンパク質の精製や、希釈などを行うことができる。

[0072] 本発明のタンパク質製剤は、含まれるタンパク質の種類に応じて幅広い用途に適用できる。適用用途としては、抗体医薬、ワクチン、診断薬、ホルモン製剤、酵素製剤、体外診断薬などの医療・医薬品；栄養補助食品、調味料などの飲食品；工業用酵素、洗剤、化粧品、医薬部外品、動物飼料、植物成長調整剤、植物用バイオ製剤が挙げられる。

実施例

[0073] 以下、実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明は以下の実施例に限定されない。以下、「部」又は「%」は特記ない限り、それぞれ「重量部」又は「重量%」を意味する。

[0074] (1) 抗ヒトIFN γ モノクローナル抗体の変性抑制試験

表1～13に記載の濃度となるように糖質とアミン化合物を混合し、タンパク質の変性抑制用組成物を作製した。このタンパク質の変性抑制用組成物と、IFN γ に対するマウスモノクローナル抗体(MAb-IFN γ -15、自社調製品、LOT No. 010)を含むリン酸緩衝液とを、9:1の体積比にて、0.5mLエッペンドルフチューブ(エッペンドルフ社製、品番3810X)中で混合して、タンパク質製剤を作製した。タンパク質製剤中の抗体の濃度は70 μ g/mLであった。次に、タンパク質製剤を73℃で5時間加熱した。

[0075] 加熱後のタンパク質製剤を、96ウェルマイクロプレート(Corning社製、Costar3513)のウェルに15 μ L分注し、さらに抗原としてヒトIFN γ (400pg/mL)を135 μ L分注した。12chマルチチャンネルピペット(サーモエレクトロン社製、Finnpipette)にて混合した後、100 μ Lを取り、MAb-IFN γ -15で固相化したイムノモジュールプレート(Thermo Scientific社製、U16 maxisorp Loose Nunc-Immuno Mo

dule 469264)のウェルに添加し、室温で1.5時間抗原-抗体反応を生じさせた。その後、常法に従って洗浄、標識抗体の添加、および波長450nmでの吸光度の測定を行った。

[0076] また、参照試験として、リン酸緩衝液15 μ Lを添加した96ウェルマイクロプレートにヒトIFN γ (400pg/mL)を135 μ L添加し、混合後、100 μ LをMAb-IFN γ -15で固相化したイムノモジュールプレートのウェルに添加したときの吸光度を測定した。

[0077] 下記式により競合阻害率を求めた。結果を表1～13に示す。

競合阻害率(%) = (1 - (各実施例、比較例での吸光度 / 参照試験での吸光度)) $\times$ 100

[0078] [表1]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	糖質とアミン化合物の濃度の合計	競合 阻害率
	種類	濃度	種類	濃度			
比較例1-1-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	—	87%
比較例1-1-2 対照(D-PBS)	—	—	—	—	—	—	5%
比較例1-1-3	トレハロース	1.17M	—	—	—	—	72%
比較例1-1-4	スクロース	1.17M	—	—	—	—	73%
比較例1-1-5	マルチトール	1.17M	—	—	—	—	75%
比較例1-1-6	イソマルチトール	1.17M	—	—	—	—	71%
比較例1-1-7	—	—	塩化コリン	1.17M	—	—	-11%
比較例1-1-8	—	—	アルギニン塩酸塩	1.17M	—	—	-14%
比較例1-1-9	—	—	尿素	1.17M	—	—	3%
比較例1-1-10	—	—	セリン	1.17M	—	—	-5%
比較例1-1-11	スクロース	1.17M	尿素	1.17M	1:1	2.34M	7%
比較例1-1-12	マルチトール	1.17M	尿素	1.17M	1:1	2.34M	-1%
実施例1-1-1	トレハロース	1.17M	アルギニン塩酸塩	1.17M	1:1	2.34M	89%
実施例1-1-2	トレハロース	1.17M	セリン	1.17M	1:1	2.34M	80%
実施例1-1-3	スクロース	1.17M	塩化コリン	1.17M	1:1	2.34M	75%
実施例1-1-4	スクロース	1.17M	アルギニン塩酸塩	1.17M	1:1	2.34M	82%
実施例1-1-5	マルチトール	1.17M	アルギニン塩酸塩	1.17M	1:1	2.34M	88%
実施例1-1-6	イソマルチトール	1.17M	アルギニン塩酸塩	1.17M	1:1	2.34M	90%

[0079] 比較例1-1-1では糖質とアミン化合物を含めない状態で、タンパク質製剤の加熱を行わずに競合阻害率を測定したところ、競合阻害率は87%であった。比較例1-1-2では糖質とアミン化合物を含まない状態でタンパク質製剤の加熱を行った。その結果、競合阻害率は-5%であった。実施例1-1-1～実施例1-1-6では、同じ濃度の糖質またはアミン化合物をそれぞれ単独で使用した比較例よりも、競合阻害率が高かった。アミン化合物

として尿素を用いた比較例 1-1-11～比較例 1-1-12 では、糖質と組み合わせているにもかかわらず競合阻害率が低かった。

[0080] [表2]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	糖質とアミン化合物の濃度の合計	競合阻害率
	種類	濃度	種類	濃度			
比較例1-2-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	—	87%
比較例1-2-2 対照(D-PBS)	—	—	—	—	—	—	-4%
比較例1-2-3	トレハロース	0.91M	—	—	—	—	19%
比較例1-2-4	トレハロース	1.04M	—	—	—	—	47%
比較例1-2-5	トレハロース	1.17M	—	—	—	—	72%
比較例1-2-6	—	—	アルギニン塩酸塩	0.91M	—	—	-13%
比較例1-2-7	—	—	アルギニン塩酸塩	1.04M	—	—	-10%
比較例1-2-8	—	—	アルギニン塩酸塩	1.17M	—	—	-12%
実施例1-2-1	トレハロース	0.91M	アルギニン塩酸塩	0.91M	1:1	1.82M	32%
実施例1-2-2	トレハロース	1.04M	アルギニン塩酸塩	1.04M	1:1	2.08M	74%
実施例1-2-3	トレハロース	1.17M	アルギニン塩酸塩	1.17M	1:1	2.34M	88%

[0081] 実施例 1-2-1～実施例 1-2-3 では、同じ濃度の糖質またはアミン化合物をそれぞれ単独で使用した比較例よりも、競合阻害率が高かった。

[0082] [表3]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	糖質とアミン化合物の濃度の合計	競合阻害率
	種類	濃度	種類	濃度			
比較例1-3-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	—	91%
比較例1-3-2 対照(D-PBS)	—	—	—	—	—	—	-3%
実施例1-3-1	マルチトール	1.46M	アルギニン塩酸塩	0.37M	4:1	1.83M	95%
実施例1-3-2	マルチトール	1.22M	アルギニン塩酸塩	0.61M	2:1	1.83M	88%
実施例1-3-3	マルチトール	0.91M	アルギニン塩酸塩	0.91M	1:1	1.82M	50%
実施例1-3-4	マルチトール	1.87M	アルギニン塩酸塩	0.47M	4:1	2.34M	92%
実施例1-3-5	マルチトール	1.57M	アルギニン塩酸塩	0.79M	2:1	2.36M	94%
実施例1-3-6	マルチトール	1.17M	アルギニン塩酸塩	1.17M	1:1	2.34M	89%
実施例1-3-7	マルチトール	0.77M	アルギニン塩酸塩	1.54M	1:2	2.31M	52%
実施例1-3-8	マルチトール	1.05M	アルギニン塩酸塩	1.05M	1:1	2.10M	81%
実施例1-3-9	マルチトール	1.19M	アルギニン塩酸塩	1.19M	1:1	2.38M	90%
実施例1-3-10	マルチトール	1.35M	アルギニン塩酸塩	1.35M	1:1	2.70M	92%
実施例1-3-11	マルチトール	1.53M	アルギニン塩酸塩	1.53M	1:1	3.06M	88%

[0083] 実施例 1-3-1～実施例 1-3-11 では、表 1 の実施例 1-1-1～実施例 1-1-6 の結果を踏まえ、マルチトールとアルギニン塩酸塩のモル比を変化させたときの競合阻害率を調べた。その結果、表 3 に示すとおり、マルチトールとアルギニン塩酸塩のモル比が 1:1 以外のときにも、モル比が 1:1 のときと同様に、高い競合阻害率が認められた。

[0084]

[表4]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	糖質とアミン化合 物の濃度の合計	競合 阻害率
	種類	濃度	種類	濃度			
比較例1-4-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	—	92%
比較例1-4-2 対照(D-PBS)	—	—	—	—	—	—	-2%
比較例1-4-3	スクロース	1.17M	—	—	—	—	69%
比較例1-4-4	トレハロース	1.17M	—	—	—	—	76%
比較例1-4-5	マルチトール	1.17M	—	—	—	—	70%
比較例1-4-6	—	—	グルタミン酸カリウム	1.17M	—	—	7%
比較例1-4-7	—	—	プロリン	1.17M	—	—	-4%
実施例1-4-1	スクロース	1.17M	グルタミン酸カリウム	1.17M	1:1	2.34M	87%
実施例1-4-2	トレハロース	1.17M	グルタミン酸カリウム	1.17M	1:1	2.34M	88%
実施例1-4-3	マルチトール	1.17M	グルタミン酸カリウム	1.17M	1:1	2.34M	86%
実施例1-4-4	マルチトール	1.17M	プロリン	1.17M	1:1	2.34M	90%

[0085] 実施例1-4-1～実施例1-4-4では、同じ濃度の糖質またはアミン化合物をそれぞれ単独で使用した比較例よりも、競合阻害率が高かった。

[0086] [表5]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	糖質とアミン化合 物の濃度の合計	競合 阻害率
	種類	濃度	種類	濃度			
比較例1-5-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	—	93%
比較例1-5-2 対照(D-PBS)	—	—	—	—	—	—	6%
比較例1-5-3	トレハロース	0.13M	—	—	—	—	11%
比較例1-5-4	トレハロース	0.39M	—	—	—	—	12%
比較例1-5-5	トレハロース	0.65M	—	—	—	—	21%
比較例1-5-6	トレハロース	0.91M	—	—	—	—	67%
比較例1-5-7	—	—	グルタミン酸カリウム	0.13M	—	—	10%
比較例1-5-8	—	—	グルタミン酸カリウム	0.39M	—	—	7%
比較例1-5-9	—	—	グルタミン酸カリウム	0.65M	—	—	6%
比較例1-5-10	—	—	グルタミン酸カリウム	0.91M	—	—	16%
実施例1-5-1	トレハロース	0.13M	グルタミン酸カリウム	0.13M	1:1	0.26M	10%
実施例1-5-2	トレハロース	0.39M	グルタミン酸カリウム	0.39M	1:1	0.78M	60%
実施例1-5-3	トレハロース	0.65M	グルタミン酸カリウム	0.65M	1:1	1.30M	89%
実施例1-5-4	トレハロース	0.91M	グルタミン酸カリウム	0.91M	1:1	1.82M	85%

[0087] 実施例1-5-1～実施例1-5-4では、実施例1-4-2よりもトレハロースとグルタミン酸カリウムの濃度の合計値が低い、実施例1-4-2と同様に、同じ濃度の糖質またはアミン化合物をそれぞれ単独で使用した比較例よりも、競合阻害率が高かった。

[0088]

[表6]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	糖質とアミン化合 物の濃度の合計	競合 阻害率
	種類	濃度	種類	濃度			
比較例1-6-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	—	90%
比較例1-6-2 対照(D-PBS)	—	—	—	—	—	—	2%
比較例1-6-3	スクロース	0.13M	—	—	—	—	0%
比較例1-6-4	スクロース	0.39M	—	—	—	—	2%
比較例1-6-5	スクロース	0.65M	—	—	—	—	4%
比較例1-6-6	スクロース	0.91M	—	—	—	—	43%
比較例1-6-7	—	—	グルタミン酸カリウム	0.13M	—	—	-2%
比較例1-6-8	—	—	グルタミン酸カリウム	0.65M	—	—	-3%
実施例1-6-1	スクロース	0.13M	グルタミン酸カリウム	0.13M	1:1	0.26M	5%
実施例1-6-2	スクロース	0.39M	グルタミン酸カリウム	0.39M	1:1	0.78M	37%
実施例1-6-3	スクロース	0.65M	グルタミン酸カリウム	0.65M	1:1	1.30M	84%
実施例1-6-4	スクロース	0.91M	グルタミン酸カリウム	0.91M	1:1	1.82M	84%

[0089] 実施例1-6-1～実施例1-6-4では、実施例1-4-1よりもスクロースとグルタミン酸カリウムの濃度の合計値が低い、実施例1-4-1と同様に、同じ濃度の糖質またはアミン化合物をそれぞれ単独で使用した比較例よりも、競合阻害率が高かった。また、実施例の中では、糖質とアミン化合物の合計濃度が高い方が、競合阻害率が高い傾向がみられた。

[0090] [表7]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	糖質とアミン化合 物の濃度の合計	競合 阻害率
	種類	濃度	種類	濃度			
比較例1-7-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	—	91%
比較例1-7-2 対照(D-PBS)	—	—	—	—	—	—	-2%
実施例1-7-1	マルチトール	0.83M	グルタミン酸カリウム	0.21M	4:1	1.04M	84%
実施例1-7-2	マルチトール	0.69M	グルタミン酸カリウム	0.35M	2:1	1.04M	84%
実施例1-7-3	マルチトール	0.52M	グルタミン酸カリウム	0.52M	1:1	1.04M	72%
実施例1-7-4	マルチトール	0.35M	グルタミン酸カリウム	0.7M	1:2	1.05M	39%
実施例1-7-5	マルチトール	0.21M	グルタミン酸カリウム	0.84M	1:4	1.05M	18%
実施例1-7-6	マルチトール	1.87M	グルタミン酸カリウム	0.47M	4:1	2.34M	91%
実施例1-7-7	マルチトール	1.56M	グルタミン酸カリウム	0.78M	2:1	2.34M	92%
実施例1-7-8	マルチトール	1.17M	グルタミン酸カリウム	1.17M	1:1	2.34M	86%
実施例1-7-9	マルチトール	0.78M	グルタミン酸カリウム	1.56M	1:2	2.34M	85%
実施例1-7-10	マルチトール	0.47M	グルタミン酸カリウム	1.87M	1:4	2.34M	86%

[0091] 実施例1-7-1～実施例1-7-10では、表4の実施例1-4-1～実施例1-4-3の結果を踏まえ、マルチトールとグルタミン酸カリウムのモル比を変化させたときの競合阻害率を調べた。その結果、表7に示すとおり、マルチトールとグルタミン酸カリウムのモル比が4:1～1:4のときも、モル比が1:1のときと同様に、比較例1-7-2よりも高い競合阻害率

が認められた。糖質とアミン化合物の合計濃度が一定である実施例 1-7-1～実施例 1-7-5 と、実施例 1-7-6～実施例 1-7-10 の中では、糖質の濃度が高い方が、競合阻害率が高い傾向がみられた。

[0092] [表8]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	糖質とアミン化合物の濃度の合計	競合 阻害率
	種類	濃度	種類	濃度			
比較例1-8-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	—	83%
比較例1-8-2 対照(D-PBS)	—	—	—	—	—	—	-10%
実施例1-8-1	マルチトール	0.45M	グルタミン酸カリウム	0.45M	1:1	0.90M	27%
実施例1-8-2	マルチトール	0.45M	グルタミン酸カリウム	0.90M	1:2	1.35M	41%
実施例1-8-3	マルチトール	0.45M	グルタミン酸カリウム	1.80M	1:4	2.25M	80%

[0093] 実施例 1-8-1～実施例 1-8-3 では、実施例 1-7-1～実施例 1-7-10 と同様に、マルチトールとグルタミン酸カリウムのモル比が 1:2～1:4 の場合も、モル比が 1:1 の場合と同様に、比較例 1-8-2 よりも高い競合阻害率が認められた。実施例の中では、アミン化合物の濃度が高い方が、競合阻害率が高い傾向がみられた。

[0094] [表9]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	糖質とアミン化合物の濃度の合計	競合 阻害率
	種類	濃度	種類	濃度			
比較例1-9-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	—	89%
比較例1-9-2 対照(D-PBS)	—	—	—	—	—	—	-1%
比較例1-9-3	マルチトール	1.00 M	—	—	—	—	15%
比較例1-9-4	—	—	グルタミン酸カリウム	0.06 M	—	—	2%
比較例1-9-5	—	—	グルタミン酸カリウム	0.13 M	—	—	-5%
比較例1-9-6	—	—	グルタミン酸カリウム	0.25 M	—	—	-7%
比較例1-9-7	—	—	グルタミン酸カリウム	0.50 M	—	—	4%
比較例1-9-8	—	—	グルタミン酸カリウム	1.00 M	—	—	9%
実施例1-9-1	マルチトール	1.00 M	グルタミン酸カリウム	0.06M	16:1	1.06M	51%
実施例1-9-2	マルチトール	1.00 M	グルタミン酸カリウム	0.13 M	8:1	1.13M	78%
実施例1-9-3	マルチトール	1.00 M	グルタミン酸カリウム	0.25 M	4:1	1.25M	86%
実施例1-9-4	マルチトール	1.00 M	グルタミン酸カリウム	0.50 M	2:1	1.50M	87%
実施例1-9-5	マルチトール	1.00 M	グルタミン酸カリウム	1.00 M	1:1	2.00M	84%

[0095] 実施例 1-9-1～実施例 1-9-5 では、同じ濃度の糖質またはアミン化合物をそれぞれ単独で使用した比較例よりも、競合阻害率が高かった。実施例の中では、アミン化合物の濃度が高い方が、競合阻害率が高い傾向がみられた。

[0096]

[表10]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	糖質とアミン化合 物の濃度の合計	競合 阻害率
	種類	濃度	種類	濃度			
比較例1-10-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	—	91%
比較例1-10-2 対照(D-PBS)	—	—	—	—	—	—	1%
比較例1-10-3	マルチトール	0.80 M	—	—	—	—	7%
比較例1-10-4	—	—	グルタミン酸カリウム	0.06 M	—	—	5%
比較例1-10-5	—	—	グルタミン酸カリウム	0.13 M	—	—	-4%
比較例1-10-6	—	—	グルタミン酸カリウム	0.25 M	—	—	0%
比較例1-10-7	—	—	グルタミン酸カリウム	0.50 M	—	—	0%
比較例1-10-8	—	—	グルタミン酸カリウム	1.00 M	—	—	12%
実施例1-10-1	マルチトール	0.80 M	グルタミン酸カリウム	0.06 M	12.8:1	0.86M	23%
実施例1-10-2	マルチトール	0.80 M	グルタミン酸カリウム	0.13 M	6.4:1	0.93M	44%
実施例1-10-3	マルチトール	0.80 M	グルタミン酸カリウム	0.25 M	3.2:1	1.05M	57%
実施例1-10-4	マルチトール	0.80 M	グルタミン酸カリウム	0.50 M	1.6:1	1.30M	87%
実施例1-10-5	マルチトール	0.80 M	グルタミン酸カリウム	1.00 M	0.8:1	1.80M	81%

[0097] 実施例1-10-1～実施例1-10-5では、同じ濃度の糖質またはアミン化合物をそれぞれ単独で使用した比較例よりも、競合阻害率が高かった。実施例の中では、アミン化合物の濃度が高い方が、競合阻害率が高い傾向がみられた。

[0098] [表11]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	糖質とアミン化合 物の濃度の合計	競合 阻害率
	種類	濃度	種類	濃度			
比較例1-11-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	—	91%
比較例1-11-2 対照(D-PBS)	—	—	—	—	—	—	1%
比較例1-11-3	マルチトール	0.30 M	—	—	—	—	-2%
比較例1-11-4	—	—	グルタミン酸カリウム	0.50 M	—	—	0%
比較例1-11-5	—	—	グルタミン酸カリウム	1.00 M	—	—	12%
実施例1-11-1	マルチトール	0.30 M	グルタミン酸カリウム	0.50 M	1:1.67	0.80M	14%
実施例1-11-2	マルチトール	0.30 M	グルタミン酸カリウム	1.00 M	1:3.3	1.30M	20%

[0099] 実施例1-11-1～実施例1-11-2では、同じ濃度の糖質またはアミン化合物をそれぞれ単独で使用した比較例よりも、競合阻害率が高かった。

[0100]

[表12]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	糖質とアミン化合物の濃度の合計	競合 阻害率
	種類	濃度	種類	濃度			
比較例1-12-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	—	83%
比較例1-12-2 対照(D-PBS)	—	—	—	—	—	—	-2%
比較例1-12-3	トレハロース	0.26M	—	—	—	—	2%
比較例1-12-4	トレハロース	0.52M	—	—	—	—	-3%
比較例1-12-5	トレハロース	0.78M	—	—	—	—	19%
比較例1-12-6	トレハロース	1.04M	—	—	—	—	65%
実施例1-12-1	トレハロース	0.26M	グルタミン酸カリウム	0.26M	1:1	0.52M	6%
実施例1-12-2	トレハロース	0.52M	グルタミン酸カリウム	0.52M	1:1	1.04M	52%
実施例1-12-3	トレハロース	0.78M	グルタミン酸カリウム	0.78M	1:1	1.56M	67%
実施例1-12-4	トレハロース	1.04M	グルタミン酸カリウム	1.04M	1:1	2.08M	75%
実施例1-12-5	トレハロース	0.26M	グルタミン酸ナトリウム	0.26M	1:1	0.52M	16%
実施例1-12-6	トレハロース	0.52M	グルタミン酸ナトリウム	0.52M	1:1	1.04M	52%
実施例1-12-7	トレハロース	0.78M	グルタミン酸ナトリウム	0.78M	1:1	1.56M	75%
実施例1-12-8	トレハロース	1.04M	グルタミン酸ナトリウム	1.04M	1:1	2.08M	78%

[0101] 実施例1-12-1～実施例1-12-8では、同じ濃度の糖質を単独で使用した比較例よりも、競合阻害率が高かった。また、実施例1-12-1から実施例1-12-4におけるグルタミン酸カリウムをグルタミン酸ナトリウムに変えた以外は同一の条件で、実施例1-12-5から実施例1-12-8を実施したところ、実施例1-12-1から実施例1-12-4と同じ傾向を示した。実施例の中では、糖質とアミン化合物の合計濃度が高い方が、競合阻害率が高い傾向がみられた。

[0102] [表13]

	水素結合供与体		水素結合受容体		水素結合供与体:水素 結合受容体のモル比	水素結合供与体と、水素結合受容体の合計濃度	競合 阻害率
	種類	濃度	種類	濃度			
比較例1-13-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	—	91%
比較例1-13-2 対照(D-PBS)	—	—	—	—	—	—	-2%
比較例1-13-3	尿素	1.60 M	塩化コリン	0.80 M	2:1	2.40 M	-11%
比較例1-13-4	尿素	1.80 M	塩化コリン	0.90 M	2:1	2.70 M	-20%
実施例1-13-1	トレハロース	0.89 M	アルギニン塩酸塩	0.89 M	1:1	1.78 M	26%
実施例1-13-2	トレハロース	1.02 M	アルギニン塩酸塩	1.02 M	1:1	2.04 M	75%
実施例1-13-3	トレハロース	1.14 M	アルギニン塩酸塩	1.14 M	1:1	2.28 M	91%

[0103] 尿素は電気陰性度の高い窒素原子に結合した水素原子を有するため、水素結合供与体として機能し得る。尿素と塩化コリンからなる深共晶溶媒はレリン (R e l i n e) とも呼ばれ、ウシ血清アルブミンなどのタンパク質を安定化する作用を有することが報告されている (P h y s. C h e m. C h e m

、Phys. , 2022, 24, 5627–5637)。そこでこのレリンと、トレハロースとアルギニン塩酸塩からなるタンパク質変性抑制用組成物との抗体安定化作用を比較した。その結果、尿素と塩化コリンを組み合わせた組成物を用いた比較例1–13–3、比較例1–13–4では、競合阻害率が低かった。一方、本発明のタンパク質の変性抑制用組成物を用いた実施例1–13–1～実施例1–13–3では高い競合阻害率が観察された。

[0104] (2) 抗ヒトTNF α モノクローナル抗体の変性抑制試験1

表14に記載の濃度となるように糖質とアミン化合物を混合し、タンパク質の変性抑制用組成物を作製した。このタンパク質の変性抑制用組成物と、ヒトTNF α に対するマウスモノクローナル抗体(MAb–TNF α –5、自社製、LOT No. 006)を含むリン酸緩衝液とを、9:1の体積比にて0.5mLEppendorfチューブ中で混合して、タンパク質製剤を作製した。タンパク質製剤中の抗体の濃度は70 μ g/mLであった。次に、タンパク質製剤を73℃で5時間加熱した。

[0105] 加熱後のタンパク質製剤を、96ウェルのウェルに20 μ L分注し、さらに抗原としてヒトTNF α (25pg/mL)を130 μ L分注した。12chマルチチャンネルピペットにて混合した後、100 μ Lを取り、MAb–TNF α –5を固相化したイムノモジュールプレートのウェルを添加し、室温で1.5時間抗原–抗体反応を生じさせた後、常法に従って洗浄、標識抗体の添加、および波長450nmでの吸光度の測定を行った。

[0106] また、参照試験として、リン酸緩衝液20 μ Lを添加した96ウェルマイクロプレートに、抗原としてヒトTNF α (25pg/mL)のみを130 μ L添加し、混合後、100 μ LをMAb–TNF α –5で固相化したイムノモジュールプレートのウェルの添加したときの吸光度を測定した。

[0107] 下記式により競合阻害率を求めた。結果を表14に示す。

競合阻害率(%) = (1 – (各実施例、比較例での吸光度/参照試験での吸光度)) × 100

[0108]

[表14]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	糖質とアミン化合物の濃度の合計	競合 阻害率
	種類	濃度	種類	濃度			
比較例2-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	—	50%
比較例2-2 対照(D-PBS)	—	—	—	—	—	—	-6%
比較例2-3	トレハロース	0.65M	—	—	—	—	15%
比較例2-4	トレハロース	0.91M	—	—	—	—	32%
比較例2-5	トレハロース	1.17M	—	—	—	—	41%
比較例2-6	—	—	グルタミン酸ナトリウム	0.65M	—	—	13%
比較例2-7	—	—	グルタミン酸ナトリウム	0.91M	—	—	10%
比較例2-8	—	—	グルタミン酸ナトリウム	1.17M	—	—	14%
実施例2-1	トレハロース	0.65M	グルタミン酸ナトリウム	0.65M	1:1	1.30M	39%
実施例2-2	トレハロース	0.91M	グルタミン酸ナトリウム	0.91M	1:1	1.82M	42%
実施例2-3	トレハロース	1.17M	グルタミン酸ナトリウム	1.17M	1:1	2.34M	53%

[0109] 実施例2-1～実施例2-3では、同じ濃度の糖質またはアミン化合物をそれぞれ単独で使用した比較例よりも、競合阻害率が高かった。実施例の中では、糖質とアミン化合物の合計濃度が高い方が、競合阻害率が高い傾向がみられた。

[0110] (3) 抗ヒトIFN α モノクローナル抗体の変性抑制試験2

表15に記載の濃度となるように糖質とアミン化合物を混合し、タンパク質の変性抑制用組成物を作製した。このタンパク質の変性抑制用組成物と、ヒトIFN α に対するマウスモノクローナル抗体(MAb-IFN α -43、自社製、LOT No. 003)を含むリン酸緩衝液とを、9:1の体積比にて0.5mLエッペンドルフチューブ中で混合して、タンパク質製剤を作製した。タンパク質製剤中の抗体の濃度は70 μ g/mLであった。次に、タンパク質製剤を73℃で5時間加熱した。

[0111] 加熱後のタンパク質製剤を、96ウェルマイクロプレートのウェルに20 μ L分注し、さらに抗原としてヒトIFN α (2500pg/mL)を130 μ L分注した。12chマルチチャンネルピペットにて混合した後、100 μ Lを取り、MAb-IFN α -43を固相化したイムノモジュールプレートのウェルを添加し、室温で1.5時間抗原-抗体反応を生じさせた後、常法に従って洗浄、標識抗体の添加、および波長450nmでの吸光度の測定を行った。また、参照試験として、リン酸緩衝液20 μ Lを添加した96ウェルマイクロプレートに、抗原としてヒトIFN α (2500pg/mL)

のみを $130\ \mu\text{L}$ 添加し、混合後 $100\ \mu\text{L}$ を同じ $\text{IFN}\alpha$ に対する抗体を固定化したイムノモジュールプレートのウェルに添加したときの吸光度を測定した。下記式により競合阻害率を求めた。結果を表 15 に示す。

$$\text{競合阻害率 (\%)} = (1 - (\text{各実施例、比較例での吸光度} / \text{参照試験での吸光度})) \times 100$$

[0112] [表15]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	糖質とアミン化合物の濃度の合計	競合 阻害率
	種類	濃度	種類	濃度			
比較例3-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	—	91%
比較例3-2 対照(D-PBS)	—	—	—	—	—	—	-4%
比較例3-3	トレハロース	0.39M	—	—	—	—	12%
比較例3-4	トレハロース	0.65M	—	—	—	—	12%
比較例3-5	トレハロース	0.91M	—	—	—	—	58%
比較例3-6	トレハロース	1.17M	—	—	—	—	81%
比較例3-7	—	—	グルタミン酸ナトリウム	0.39M	—	—	9%
比較例3-8	—	—	グルタミン酸ナトリウム	0.65M	—	—	4%
比較例3-9	—	—	グルタミン酸ナトリウム	0.91M	—	—	26%
比較例3-10	—	—	グルタミン酸ナトリウム	1.17M	—	—	47%
実施例3-1	トレハロース	0.39M	グルタミン酸ナトリウム	0.39M	1:1	0.78M	37%
実施例3-2	トレハロース	0.65M	グルタミン酸ナトリウム	0.65M	1:1	1.30M	78%
実施例3-3	トレハロース	0.91M	グルタミン酸ナトリウム	0.91M	1:1	1.82M	85%
実施例3-4	トレハロース	1.17M	グルタミン酸ナトリウム	1.17M	1:1	2.34M	89%

[0113] 実施例 3-1 ～実施例 3-4 では、同じ濃度の糖質またはアミン化合物をそれぞれ単独で使用した比較例よりも、競合阻害率が高かった。実施例の中では、糖質とアミン化合物の合計濃度が高い方が、競合阻害率が高い傾向がみられた。

[0114] (4) LDHの変性抑制試験

表 16 に記載の濃度となるように糖質とアミン化合物を混合し、タンパク質の変性抑制用組成物を作製した。このタンパク質の変性抑制用組成物と、乳酸脱水素酵素 (LDH) (オリエンタル酵母社製、品番 46776003) を含むリン酸カリウム緩衝液とを、9:1 の体積比にて $0.5\ \text{mL}$ エッペンドルフチューブ中で混合して、タンパク質製剤を作製した。タンパク質製剤中の乳酸脱水素酵素の濃度は $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。次に、タンパク質製剤を 70°C で 2 時間加熱した。加熱後のタンパク質製剤中の酵素活性を、キット (Roche 社製、品番 11644793001) により測定した。結

果を表 1 6 に示す。

[0115] [表16]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	糖質とアミン化合 物の濃度の合計	残存酵素活性 (%)
	種類	濃度	種類	濃度			
比較例4-1-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	—	100
比較例4-1-2 対照(加熱)	—	—	—	—	—	—	0
比較例4-1-3	トレハロース	1.17M	—	—	—	—	5.1
比較例4-1-4	マルチトール	1.17M	—	—	—	—	5.1
比較例4-1-5	スクロース	1.17M	—	—	—	—	1.5
比較例4-1-6	—	—	グルタミン酸カリウム	1.17M	—	—	8.9
実施例4-1-1	トレハロース	0.78M	グルタミン酸カリウム	0.78M	1:1	1.56M	70.2
実施例4-1-2	トレハロース	0.91M	グルタミン酸カリウム	0.91M	1:1	1.82M	71.8
実施例4-1-3	トレハロース	1.04 M	グルタミン酸カリウム	1.04 M	1:1	2.08M	72.9
実施例4-1-4	トレハロース	1.17M	グルタミン酸カリウム	1.17M	1:1	2.34M	95.7
実施例4-1-5	マルチトール	1.17M	グルタミン酸カリウム	1.17M	1:1	2.34M	83.5
実施例4-1-6	スクロース	1.17M	グルタミン酸カリウム	1.17M	1:1	2.34M	82.9

[0116] 実施例4-1-1～実施例4-1-6では、同じ濃度の糖質またはアミン化合物をそれぞれ単独で使用した比較例よりも、残存酵素活性が高かった。

[0117] 表 1 7 に記載の濃度となるように糖質とアミン化合物を混合し、タンパク質の変性抑制用組成物を作製した。このタンパク質の変性抑制用組成物と、乳酸脱水素酵素（LDH）（オリエンタル酵母社製、品番46776003）を含むリン酸カリウム緩衝液とを、9：1の体積比にて0.5mLエッペンドルフチューブ中で混合して、タンパク質製剤を作製した。タンパク質製剤中の乳酸脱水素酵素の濃度は20mg/mLであった。次に、タンパク質製剤を70℃で2時間加熱した。加熱後のタンパク質製剤中の酵素活性を、キット（Roche社製、品番11644793001）により測定した。結果を表 1 7 に示す。

[0118]

[表17]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物	糖質とアミン化合物の濃度	残存酵素活性
	種類	濃度	種類	濃度			
比較例4-2-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	—	100
比較例4-2-2 対照(加熱)	—	—	—	—	—	—	2.2
比較例4-2-3	トレハロース	0.91M	—	—	—	—	2.9
比較例4-2-4	トレハロース	1.17M	—	—	—	—	4.7
比較例4-2-5	—	—	グルタミン酸ナトリウム	0.91M	—	—	2.5
比較例4-2-6	—	—	グルタミン酸ナトリウム	1.17M	—	—	3.2
実施例4-2-1	トレハロース	0.91M	グルタミン酸ナトリウム	0.91M	1:1	1.82M	89.8
実施例4-2-2	トレハロース	1.17M	グルタミン酸ナトリウム	1.17M	1:1	2.34M	108

[0119] 実施例4-2-1～実施例4-2-2では、同じ濃度の糖質またはアミン化合物をそれぞれ単独で使用した比較例よりも、残存酵素活性が高かった。本発明のタンパク質の変性抑制用組成物は、高濃度（20mg/mL）の乳酸脱水素酵素に対しても、熱処理による変性・凝集による活性低下を抑制する作用を発揮することが確かめられた。

[0120] （5）スギ花粉アレルゲンの変性抑制試験1

表18に記載の濃度となるように糖質とアミン化合物を混合し、タンパク質の変性抑制用組成物を作製した。このタンパク質の変性抑制用組成物と、スギ花粉アレルゲンタンパク質（Cry j 1）（自社製、LOT No. 180301）を含むリン酸緩衝液とを、9：1の体積比にて0.5mLエッペンドルフチューブ中で混合して、タンパク質製剤を作製した。タンパク質製剤中のスギ花粉アレルゲンタンパク質の濃度は8μg/mLであった。次に、タンパク質製剤を40℃で23時間加熱した。加熱後のタンパク質製剤中の非凝集タンパク質の量（ng/mL）を、Cry j 1 ELISA（自社製）により測定した。結果を表18に示す。

[0121]

[表18]

	糖質		アミン化合物		糖質：アミン化合物 のモル比	糖質とアミン化合物の濃度の合計	非凝集 タンパク質の 量(ng/ml)
	種類	濃度	種類	濃度			
比較例5-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	—	2100
比較例5-2 対照(加熱)	—	—	—	—	—	—	540
比較例5-3	イソマルチトール	1.17M	—	—	—	—	1350
比較例5-4	—	—	アルギニン塩酸塩	1.17M	—	—	0
実施例5-1	イソマルチトール	1.17M	アルギニン塩酸塩	1.17M	1:1	2.34M	2800

[0122] 実施例5－1では、同じ濃度の糖質またはアミン化合物をそれぞれ単独で使用した比較例よりも、非凝集タンパク質が多かった。

[0123] (6) スギ花粉アレルゲンの変性抑制試験2

表19に記載の濃度となるように糖質とアミン化合物を混合し、タンパク質の変性抑制用組成物を作製した。このタンパク質の変性抑制用組成物と、スギ花粉アレルゲンタンパク質(Cry j 2)(自社製、LOT No. 180301)を含むリン酸緩衝液とを、9:1の体積比にて0.5mLエッペンドルフチューブ中で混合して、タンパク質製剤を作製した。タンパク質製剤中のスギ花粉アレルゲンタンパク質の濃度は2μg/mLであった。次に、タンパク質製剤を40℃で4時間加熱した。加熱後のタンパク質製剤中の非凝集タンパク質の量(ng/mL)を、Cry j 2 ELISA(自社製)により測定した。結果を表19に示す。

[0124] [表19]

	糖質		アミン化合物		糖質：アミン化合物 のモル比	糖質とアミン化合物の濃度の合計	非凝集 タンパク質の 量(ng/ml)
	種類	濃度	種類	濃度			
比較例6-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	—	470
比較例6-2 対照(加熱)	—	—	—	—	—	—	30
比較例6-3	イソマルチトール	1.17M	—	—	—	—	390
比較例6-4	—	—	アルギニン塩酸塩	1.17M	—	—	30
実施例6-1	イソマルチトール	1.17M	アルギニン塩酸塩	1.17M	1:1	2.34M	480

[0125] 実施例6－1では、同じ濃度の糖質またはアミン化合物をそれぞれ単独で使用した比較例よりも、非凝集タンパク質が多かった。

[0126] (7) スギ花粉アレルゲンの変性抑制試験3

表20に記載の濃度となるように糖質とアミン化合物を混合し、タンパク質

の変性抑制用組成物を作製した。このタンパク質の変性抑制用組成物と、スギ花粉アレルゲンタンパク質SBP（自社製、Lot No. 180301、 $900\mu\text{g/mL}$ ）を含むリン酸緩衝液とを、9：1の体積比にて1.5 mLエッペンドルフチューブ中で混合して、タンパク質製剤を作製した。

[0127] このタンパク質製剤を96-well black plateに $98\mu\text{L}$ ／well添加し、凝集したタンパク質と結合して蛍光を発する試薬であるPROTEOSTAT (R) Protein Aggregation Assay Reagent (Enzo社製)を $2\mu\text{L}$ ／well添加して、緩やかに混合した。その後、アルミホイルで遮光して 37°C のインキュベーター中で保温した。経時的にプレートを取り出し、 $\text{Ex } 550\text{ nm} / \text{Em } 600\text{ nm}$ の蛍光強度を測定した。1時間保温後の蛍光強度を100%とし、経時的な蛍光強度の増加を測定した。結果を3点の平均値 $\pm$ 標準偏差（%）として表20に示す。

[0128] [表20]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物のモル比	糖質とアミン化合物の濃度の合	37°Cでの各熟成処理時間におけるタンパク質凝集物の量				
	種類	濃度	種類	濃度			1 hr	24 hr	48 hr	72 hr	144 hr
比較例7-1	—	—	—	—	—	—	$100 \pm 3\%$	$519 \pm 25.7\%$	$818 \pm 52\%$	$1023 \pm 54\%$	$1758 \pm 85\%$
比較例7-2	トレハロース	0.39M	—	—	—	—	$100 \pm 3.3\%$	$184 \pm 6.4\%$	$208 \pm 8.0\%$	$232 \pm 9.0\%$	$367 \pm 7.0\%$
比較例7-3	トレハロース	0.91M	—	—	—	—	$100 \pm 3.3\%$	$148 \pm 4.9\%$	$163 \pm 6.0\%$	$176 \pm 6.1\%$	$239 \pm 7.0\%$
比較例7-4	—	—	グルタミン酸ナトリウム	0.39M	—	—	$100 \pm 8.6\%$	$213 \pm 15.7\%$	$246 \pm 14\%$	$287 \pm 14\%$	$396 \pm 20\%$
比較例7-5	—	—	グルタミン酸ナトリウム	0.91M	—	—	$100 \pm 8.7\%$	$170 \pm 24\%$	$202 \pm 24\%$	$217 \pm 23\%$	$254 \pm 26\%$
実施例7-1	トレハロース	0.39M	グルタミン酸ナトリウム	0.39M	1:1	0.78M	$100 \pm 1.9\%$	$98.2 \pm 3.8\%$	$111 \pm 4.0\%$	$118 \pm 1.5\%$	$123 \pm 1.0\%$
実施例7-2	トレハロース	0.91M	グルタミン酸ナトリウム	0.91M	1:1	1.82M	$100 \pm 4.4\%$	$78.3 \pm 1.6\%$	$81.3 \pm 2.0\%$	$84.3 \pm 1.5\%$	$111 \pm 16\%$

[0129] 比較例7-1では、D-PBS中でスギ花粉アレルゲンタンパク質を 37°C で保温することにより、経時的に蛍光強度が増加していることから、タンパク質の凝集が徐々に起きていることが確認された。糖質、またはアミン化合物をそれぞれ単独で使用した比較例7-2～比較例7-5では、タンパク質の凝集を抑制する一定の作用がみられたが、実施例7-1～実施例7-2では、蛍光強度が比較例7-2～比較例7-5の50%程度に抑えられており、タンパク質の凝集を抑制する強い作用が確認された。

[0130] (8) ヒトIFN γ の変性抑制試験

表21に記載の濃度となるように糖質とアミン化合物を混合し、タンパク質の変性抑制用組成物を作製した。このタンパク質の変性抑制用組成物と、ヒ

トIFN- γ （自社製、LOT No. 109025）を含むリン酸緩衝液とを、99：1の体積比にて0.5mLエッペンドルフチューブ中で混合して、タンパク質製剤を作製した。タンパク質製剤中のIFN- γ の濃度は80ng/mLであった。次に、タンパク質製剤を40℃で7時間加熱した。加熱後のタンパク質製剤中の、活性をもつIFN- γ の量（pg/mL）を、ヒトIFN- γ ELISA（自社製）により測定した。結果を表21に示す。

[0131] [表21]

	糖質		アミン化合物		糖質：アミン化合物 のモル比	糖質とアミン化合物の濃度の合計	活性タンパク質の 量(pg/ml)
	種類	濃度	種類	濃度			
比較例8-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	—	2300
比較例8-2 対照(加熱)	—	—	—	—	—	—	170
比較例8-3	イソマルチトール	1.17M	—	—	—	—	610
比較例8-4	—	—	アルギニン塩酸塩	1.17M	—	—	0
実施例8-1	イソマルチトール	1.17M	アルギニン塩酸塩	1.17M	1:1	2.34M	4100

[0132] 実施例8-1では、同じ濃度の糖質またはアミン化合物をそれぞれ単独で使用した比較例よりも、活性をもつIFN- γ が多かった。

[0133] (9) ヒトTNF α の変性抑制試験2

表22に記載の濃度となるように糖質とアミン化合物を混合し、タンパク質の変性抑制用組成物を作製した。このタンパク質の変性抑制用組成物と、ヒトTNF- α （自社製、LOT No. 960506）を含むリン酸緩衝液とを、99：1の体積にて0.5mLエッペンドルフチューブ中で混合して、タンパク質製剤を作製した。タンパク質製剤中のヒトTNF- α の濃度は10 μ g/mLであった。次に、タンパク質製剤を-80℃で凍結し、その後室温で融解させる凍結融解工程を10回繰り返した。加熱後のタンパク質製剤中の、活性をもつTNF- α の量（ng/mL）を、ヒトTNF- α ELISA（自社製）により測定した。結果を表22に示す。

[0134]

[表22]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	糖質とアミン化合物の 濃度の合計	活性タンパク質の量(ng/ml)	
	種類	濃度	種類	濃度			凍結保存 前	凍結融解 後
比較例9-1 対照(D-PBS)	—	—	—	—	—	—	2700	14
比較例9-2	イソマルチトール	1.17M					3900	1100
比較例9-3	—	—	アルギニン塩酸塩	1.17M	—	—	2300	0
実施例9-1	イソマルチトール	1.17M	アルギニン塩酸塩	1.17M	1:1	2.34M	4300	3400

[0135] 実施例9-1では、同じ濃度の糖質またはアミン化合物をそれぞれ単独で使用した比較例よりも、活性をもつTNF- α が多かった。

[0136] (10) 抗ヒトIFN γ モノクローナル抗体の変性抑制試験

表23～26に記載の濃度となるように糖質とアミン化合物を混合し、タンパク質変性抑制用組成物を作製した。このタンパク質変性抑制用組成物と、IFN γ に対するマウスモノクローナル抗体(MAb-IFN γ -15、自社調製品、LOT No. 010)を含むリン酸緩衝液とを、9:1の体積比にて、0.5mLエッペンドルフチューブ(エッペンドルフ社製、品番3810X)中で混合して、タンパク質製剤を作製した。タンパク質製剤中の抗体の濃度は70 μ g/mLであった。表23～24の試験では、0.01%～0.5%(w/v)のポリソルベート80、またはポリソルベート20(いずれも富士フイルム和光純薬社製)を添加した。次に、タンパク質製剤を73℃で5時間加熱した。

[0137] 加熱後のタンパク質製剤を、96ウェルマイクロプレート(Corning社製、Costar3513)のウェルに15 μ L分注し、さらに抗原としてヒトIFN γ (400pg/mL)を135 μ L分注した。12chマルチチャンネルピペット(サーモエレクトロン社製、Finnpipette)にて混合した後、100 μ Lを取り、MAb-IFN γ -15で固相化したイムノモジュールプレート(Thermo Scientific社製、U16 maxisorp Loose Nunc-Immuno Module 469264)のウェルに添加し、室温で1.5時間抗原-抗体反応を生じさせた。その後、常法に従って洗浄、標識抗体の添加、および波長450nmでの吸光度の測定を行った。

[0138] また、参照試験として、リン酸緩衝液 15 μL を添加した 96 ウェルマイクロプレートにヒト IFN γ (400 pg/mL) を 135 μL 添加し、混合後、100 μL を MA b-IFN γ -15 で固相化したイムノモジュールプレートのウェルに添加したときの吸光度を測定した。下記式により競合阻害率を求めた。結果を表 23～26 に示す。

$$\text{競合阻害率 (\%)} = (1 - (\text{各実施例、比較例での吸光度} / \text{参照試験での吸光度})) \times 100$$

[0139] [表23]

	糖質		アミン化合物		界面活性剤		糖質:アミン化合物 のモノ比	競合阻 害率
	種類	濃度	種類	濃度	種類	濃度		
比較例10-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	—	—	93%
比較例10-2 対照(D-PBS)	—	—	—	—	—	—	—	0%
比較例10-3	トレハロース	0.5 M	—	—	—	—	—	1%
比較例10-4	—	—	グルタミン酸ナトリウム	0.5 M	—	—	—	3%
比較例10-5	—	—	—	—	ポリソルベート80	0.05% (w/v)	—	7%
比較例10-6	—	—	—	—	ポリソルベート80	0.1% (w/v)	—	12%
比較例10-7	—	—	—	—	ポリソルベート80	0.2% (w/v)	—	1%
比較例10-8	—	—	—	—	ポリソルベート80	0.5% (w/v)	—	3%
実施例10-1	トレハロース	0.5 M	グルタミン酸ナトリウム	0.5 M	—	—	1:1	39%
実施例10-2	トレハロース	0.5 M	グルタミン酸ナトリウム	0.5 M	ポリソルベート80	0.05% (w/v)	1:1	69%
実施例10-3	トレハロース	0.5 M	グルタミン酸ナトリウム	0.5 M	ポリソルベート80	0.1% (w/v)	1:1	65%
実施例10-4	トレハロース	0.5 M	グルタミン酸ナトリウム	0.5 M	ポリソルベート80	0.2% (w/v)	1:1	61%
実施例10-5	トレハロース	0.5 M	グルタミン酸ナトリウム	0.5 M	ポリソルベート80	0.5% (w/v)	1:1	59%

[0140] 表 23 に示すように、0.5 Mトレハロース単独（比較例 10-3）、および0.5 Mグルタミン酸ナトリウム単独（比較例 10-4）ではそれぞれ1%、3%の競合阻害率であったが、両者からなる0.5 Mタンパク質変性抑制用組成物（実施例 10-1）では39%と競合阻害率が高く、相乗効果が認められた。またポリソルベート80単独では競合阻害率が1%～12%であった（比較例 10-5～比較例 10-8）のに対して、0.5 Mタンパク質変性抑制用組成物と併用すると競合阻害率（すなわち抗体安定化作用）は相乗的に向上した（実施例 10-2～実施例 10-5）。

[0141] なお、タンパク質の変性抑制効果の相乗性は、4 Stepsエクセル統計（第4版）（柳井久江、オーエムエス出版）に付録されたソフト「Statcel 4」を使用し、「繰り返しのある二元配置分散分析法」により検定を行った。

[0142] [表24]

	糖質		アミン化合物		界面活性剤		糖質:アミン化合物 のモル比	競合阻 害率
	種類	濃度	種類	濃度	種類	濃度		
比較例11-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	—	—	92%
比較例11-2 対照(D-PBS)	—	—	—	—	—	—	—	1%
比較例11-3	トレハロース	0.5 M	—	—	—	—	—	-7%
比較例11-4	—	—	グルタミン酸ナトリウム	0.5 M	—	—	—	3%
比較例11-5	—	—	—	—	ポリソルベート20	0.01% (w/v)	—	6%
比較例11-6	—	—	—	—	ポリソルベート20	0.02% (w/v)	—	7%
比較例11-7	—	—	—	—	ポリソルベート20	0.05% (w/v)	—	-1%
比較例11-8	—	—	—	—	ポリソルベート20	0.1% (w/v)	—	9%
比較例11-9	—	—	—	—	ポリソルベート20	0.2% (w/v)	—	10%
実施例11-1	トレハロース	0.5 M	グルタミン酸ナトリウム	0.5 M	—	—	1:1	38%
実施例11-2	トレハロース	0.5 M	グルタミン酸ナトリウム	0.5 M	ポリソルベート20	0.01% (w/v)	1:1	59%
実施例11-3	トレハロース	0.5 M	グルタミン酸ナトリウム	0.5 M	ポリソルベート20	0.02% (w/v)	1:1	55%
実施例11-4	トレハロース	0.5 M	グルタミン酸ナトリウム	0.5 M	ポリソルベート20	0.05% (w/v)	1:1	54%
実施例11-5	トレハロース	0.5 M	グルタミン酸ナトリウム	0.5 M	ポリソルベート20	0.1% (w/v)	1:1	57%
実施例11-6	トレハロース	0.5 M	グルタミン酸ナトリウム	0.5 M	ポリソルベート20	0.2% (w/v)	1:1	52%

[0143] 表24に示すように、ポリソルベート20を含むタンパク質変性抑制用組成物（実施例11-2～実施例11-6）は、ポリソルベート20を含まないタンパク質変性抑制用組成物（実施例11-1）よりも、競合阻害率（すなわち抗体安定化作用）が向上していた。

[0144] [表25]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	競合阻 害率
	種類	濃度	種類	濃度		
比較例12-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	93%
比較例12-2 対照(D-PBS)	—	—	—	—	—	1%
比較例12-3	トレハロース	1M	—	—	—	64%
比較例12-4	—	—	グルタミン酸ナトリウム	0.0625 M	—	0%
比較例12-5	—	—	グルタミン酸ナトリウム	0.125 M	—	-10%
比較例12-6	—	—	グルタミン酸ナトリウム	0.25 M	—	-1%
比較例12-7	—	—	グルタミン酸ナトリウム	0.5 M	—	-2%
比較例12-8	—	—	グルタミン酸ナトリウム	1 M	—	7%
実施例12-1	トレハロース	1M	グルタミン酸ナトリウム	0.0625 M	16:1	81%
実施例12-2	トレハロース	1M	グルタミン酸ナトリウム	0.125 M	8:1	83%
実施例12-3	トレハロース	1M	グルタミン酸ナトリウム	0.25 M	4:1	87%
実施例12-4	トレハロース	1M	グルタミン酸ナトリウム	0.5 M	2:1	88%
実施例12-5	トレハロース	1M	グルタミン酸ナトリウム	1 M	1:1	89%

[0145] 表25に示すように、トレハロース単独（比較例12-3）、およびグルタミン酸ナトリウム単独（比較例12-4～比較例12-8）を使用したとき

と比較して、両者からなるタンパク質変性抑制用組成物を使用したとき（実施例 12-1～実施例 12-5）の競合阻害率は高く、相乗効果が認められた。

[0146] [表26]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	競合阻 害率
	種類	濃度	種類	濃度		
比較例13-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	91%
比較例13-2 対照(D-PBS)	—	—	—	—	—	2%
比較例13-3	トレハロース	0.52M	—	—	—	10%
比較例13-4	トレハロース	0.78M	—	—	—	24%
比較例13-5	トレハロース	1.04M	—	—	—	81%
比較例13-6	—	—	アスパラギン酸ナトリウム	0.52M	—	3%
比較例13-7	—	—	アスパラギン酸ナトリウム	0.78M	—	-5%
比較例13-8	—	—	アスパラギン酸ナトリウム	1.04M	—	10%
実施例13-1	トレハロース	0.52M	アスパラギン酸ナトリウム	0.52M	1:1	53%
実施例13-2	トレハロース	0.78M	アスパラギン酸ナトリウム	0.78M	1:1	85%
実施例13-3	トレハロース	1.04M	アスパラギン酸ナトリウム	1.04M	1:1	87%
実施例13-4	トレハロース	0.52M	グルタミン酸ナトリウム	0.52M	1:1	38%
実施例13-5	トレハロース	0.78M	グルタミン酸ナトリウム	0.78M	1:1	86%
実施例13-6	トレハロース	1.04M	グルタミン酸ナトリウム	1.04M	1:1	87%

[0147] 表 26 に示すように、トレハロース単独（比較例 13-3～比較例 13-5）、およびアスパラギン酸ナトリウム単独（比較例 13-6～比較例 13-8）を使用したときと比較して、両者からなるタンパク質変性抑制用組成物を使用したとき（実施例 13-1～実施例 13-3）の競合阻害率は高く、相乗効果が認められた。アミン化合物として、アスパラギン酸ナトリウムはグルタミン酸ナトリウムと同様の効果を示した。

[0148] (11) リンゴ酸脱水素酵素の変性抑制試験

表 27 に記載の濃度となるように糖質とアミン化合物を混合し、タンパク質の変性抑制用組成物を作製した。このタンパク質の変性抑制用組成物と、微生物由来組換え型リンゴ酸脱水素酵素（rMDH、オリエンタル酵母社製）を $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で含む水を、 90°C で 2.5 時間加熱処理した。加熱処理後の溶液に含まれるリンゴ酸脱水素酵素の活性を、MDH 酵素活性測定キット（バイオアッセイシステムズ社製）を用いて測定した。測定された

、経時的な酵素反応生成物の吸光度を表 2 7 に示す。

[0149] [表27]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	酵素反応生成物の吸光度			
	種類	濃度	種類	濃度		5分	10分	30分	120分
比較例13-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	0.21	0.355	1.008	2.401
比較例13-2 対照(蒸留水)	—	—	—	—	—	0.09	0.117	0.261	0.831
比較例13-3	トレハロース	0.91M	—	—	—	0.078	0.104	0.248	0.788
比較例13-4	トレハロース	1.04M	—	—	—	0.085	0.119	0.283	0.876
比較例13-5	トレハロース	1.17M	—	—	—	0.095	0.128	0.293	0.855
比較例13-6	—	—	グルタミン酸ナトリウム	0.91M	—	0.069	0.076	0.119	0.331
比較例13-7	—	—	グルタミン酸ナトリウム	1.04M	—	0.067	0.075	0.119	0.324
比較例13-8	—	—	グルタミン酸ナトリウム	1.17M	—	0.067	0.075	0.121	0.328
実施例13-1	トレハロース	0.91M	グルタミン酸ナトリウム	0.91M	1:1	0.228	0.286	0.529	1.2
実施例13-2	トレハロース	1.04M	グルタミン酸ナトリウム	1.04M	1:1	0.293	0.357	0.607	1.35
実施例13-3	トレハロース	1.17M	グルタミン酸ナトリウム	1.17M	1:1	0.4	0.486	0.832	1.899

[0150] 加熱後の酵素（比較例 1 3 - 2）は、非加熱の酵素（比較例 1 3 - 1）と比較して明らかに吸光度が低下していた。酵素にグルタミン酸ナトリウム塩を単独で添加して加熱処理したとき（比較例 1 3 - 6～比較例 1 3 - 8）ではさらに吸光度の低下が認められた。またトレハロースを単独で添加したとき（比較例 1 3 - 3～比較例 1 3 - 5）も、比較例 1 3 - 2と吸光度にはほとんど差が認められないことから、トレハロース単独では保護作用が十分ではなかった。一方、トレハロースとグルタミン酸ナトリウムからなるタンパク質変性抑制用組成物を使用した実施例 1 3 - 1～実施例 1 3 - 3では、吸光度の経時変化が非加熱の比較例 1 3 - 1と同定度であり、相乗的な安定化作用が認められた。

[0151] （1 2）抗ヒト I L - 1 7 A 抗体の変性抑制試験 1

表 2 8 に記載の濃度となるように糖質とアミン化合物を混合し、タンパク質の変性抑制用組成物を作製した。このタンパク質の変性抑制用組成物と、1 m g / m L の濃度でヒト化抗ヒト I L - 1 7 A 抗体を含む水溶液を、7 3 °C で5時間加熱処理した。加熱処理後のタンパク質変性凝集による白濁の程度を 6 6 0 n m の吸光度で評価した。その結果を表 2 8 に示す。

[0152] さらに、加熱処理した後の抗体の、抗原（ヒト I L - 1 7 A）に対する反応性を、競合的 E L I S A 法により測定した。測定された競合阻害率（%）を

表 28 に示す。

[0153] [表28]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	濁度 (OD660 nm)	競合阻害 率(%)
	種類	濃度	種類	濃度			
比較例14-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	0.037	88
比較例14-2 対照(蒸留水)	—	—	—	—	—	0.122	18
比較例14-3	トレハロース	1M	—	—	—	0.243	42
比較例14-4	—	—	グルタミン酸ナトリウム	0.25 M	—	0.193	16
比較例14-5	—	—	グルタミン酸ナトリウム	0.5 M	—	0.338	5
比較例14-6	—	—	グルタミン酸ナトリウム	1 M	—	0.411	24
実施例14-1	トレハロース	1M	グルタミン酸ナトリウム	0.25 M	4:1	0.03	84
実施例14-2	トレハロース	1M	グルタミン酸ナトリウム	0.5 M	2:1	0.04	82
実施例14-3	トレハロース	1M	グルタミン酸ナトリウム	1 M	1:1	0.066	78

[0154] 表 28 に示すように、比較例 14-1 に対して比較例 14-2 では濁度は約 3.3 倍に上昇した。これは、加熱処理により抗体が凝集して白濁していることを示す。トレハロース単独（比較例 14-3）、またはグルタミン酸ナトリウム塩単独（比較例 14-4～比較例 14-6）を添加すると、さらに白濁が増し、吸光度は高くなった。しかし、1 Mトレハロースと種々の濃度のグルタミン酸ナトリウム塩からなるタンパク質変性抑制用組成物の存在下では、その濃度に応じて、濁度は非加熱の比較例 14-1 と同程度から約 1.8 倍までに抑えられており、抗体タンパク質の凝集が抑制された（実施例 14-1～実施例 14-3）。

[0155] 表 28 に示すように、抗体の加熱処理により競合阻害率は 18%に低下していた（比較例 14-2）。1 Mトレハロースの存在下では、抗原結合性は約 50%低下しており（比較例 14-3）、グルタミン酸ナトリウム塩単独の添加ではさらに抗原結合性は低下しており（比較例 14-4～比較例 14-6）、白濁の増加と相関していた。しかし、トレハロースとグルタミン酸ナトリウム塩からなるタンパク質変性抑制用組成物の存在下（実施例 14-1～実施例 14-3）では、抗原結合性は非加熱の抗体と同定度であり、タンパク質変性抑制用組成物には、糖質、またはアミン化合物をそれぞれ単独で使用した場合に対して相乗的な抗体の保護作用があることが明らかとなった。この試験で使用した抗体は臨床で用いられている抗体製剤の一例であり、

この結果はタンパク質変性抑制用組成物が臨床応用されている抗体製剤に対しても保護作用を奏することを示している。

[0156] (13) 抗ヒトIL-17A抗体の変性抑制試験2

アミン化合物として、グルタミン酸ナトリウム塩に代えてアスパラギン酸ナトリウム塩を使用した以外は、比較例14-1～比較例14-6、実施例14-1～実施例14-3と同様の操作を行い、加熱処理後のタンパク質変性凝集による白濁の程度を660nmの吸光度で評価した。その結果を表29に示す。さらに、加熱処理した後の抗体の、抗原（ヒトIL-17A）に対する反応性を、競合的ELISA法により測定した結果を表29に示す。

[0157] [表29]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	濁度 (OD660 nm)	競合阻害 率(%)
	種類	濃度	種類	濃度			
比較例15-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	0.04	84
比較例15-2 対照(蒸留水)	—	—	—	—	—	0.171	9
比較例15-3	トレハロース	1M	—	—	—	0.185	47
比較例15-4	—	—	アスパラギン酸ナトリウム塩	0.25 M	—	0.211	22
比較例15-5	—	—	アスパラギン酸ナトリウム塩	0.5 M	—	0.252	10
比較例15-6	—	—	アスパラギン酸ナトリウム塩	1 M	—	0.277	23
実施例15-1	トレハロース	1M	アスパラギン酸ナトリウム塩	0.25 M	4:1	0.034	84
実施例15-2	トレハロース	1M	アスパラギン酸ナトリウム塩	0.5 M	2:1	0.041	83
実施例15-3	トレハロース	1M	アスパラギン酸ナトリウム塩	1 M	1:1	0.059	78

[0158] 表29に示すように、比較例15-1に対して比較例15-3では濁度は約4.3倍に上昇した。これは、加熱処理により抗体が凝集して白濁していることを示す。トレハロース単独（比較例15-3）、またはアスパラギン酸ナトリウム塩単独（比較例15-4～比較例15-6）を添加すると、比較例15-2よりも白濁が増した。しかし、トレハロースと種々の濃度のアスパラギン酸ナトリウム塩からなるタンパク質変性抑制用組成物の存在下では、その濃度に応じて、濁度は非加熱の比較例15-1と同程度から約1.5倍までに抑えられており、抗体タンパク質の凝集が抑制された（実施例15-1～実施例15-3）。

[0159] 表29に示すように、抗体の加熱処理により抗原結合性は9%に低下した（比較例15-2）。1Mトレハロースの存在下では、抗原結合性は47%に

低下し（比較例 15-3）、グルタミン酸ナトリウム塩単独の添加ではさらに抗原結合性は低下しており（比較例 15-4～比較例 15-6）、白濁の増加と相関していた。しかし、1 Mトレハロース単独とアスパラギン酸ナトリウム塩からなるタンパク質変性抑制用組成物の存在下（実施例 15-1～実施例 15-3）では、抗原結合性は非加熱の抗体と同定度であり、タンパク質変性抑制用組成物には、糖質、またはアミン化合物をそれぞれ単独で使用的した場合に対して相乗的な抗体の保護作用があることが明らかとなった。

[0160] (14) ラクターゼの変性抑制試験

表 30 に記載の濃度となるように糖質とアミン化合物を混合し、タンパク質の変性抑制用組成物を作製した。このタンパク質の変性抑制用組成物と、約 6 mg/mL の濃度で *Kluyveromyces* 属由来ラクターゼを含む水溶液を、50℃または60℃で2時間加熱処理した。加熱処理後のタンパク質変性凝集による白濁の程度を660 nmの吸光度で評価した。その結果を表 30 に示す。

[0161] さらに、非加熱のラクターゼ活性に対する、加熱処理した後のラクターゼ活性（残存活性（%））を測定した。その結果を表 30 に示す。

[0162] [表30]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	加熱後の濁度 (OD660nm)		加熱後の 残存活性(%)	
	種類	濃度	種類	濃度		50℃	60℃	50℃	60℃
比較例16-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	0.02	0.02	100	100
比較例16-2 対照(バッ ファー)	—	—	—	—	—	1.9	1.3	2	2
実施例16	トレハロース	1.17M	グルタミン酸ナトリウム	1.17M	1:1	0.03	0.21	99	95

(バッファー: 0.005% 塩化マンガン、0.02M リン酸カリウム緩衝液)

[0163] 表 30 に示すように、比較例 16-2 では白濁がみられ、加熱後の残存活性は比較例 16-1 と比較して大幅に低下した。これに対し、実施例 16 では白濁が抑制され、残存活性は向上した。

[0164] (15) 6- α -グルカノトランスフェラーゼの変性抑制試験 1

表 31 に記載の濃度となるように糖質とアミン化合物を混合し、タンパク質

の変性抑制用組成物を作製した。このタンパク質の変性抑制用組成物と、約 25 mg/mL 濃度で *Geobacillus* 属由来 6- α -グルカノトランスフェラーゼを含む水溶液を、70°C で 2 時間加熱処理した。加熱処理後のタンパク質変性凝集による白濁の程度を 660 nm の吸光度で評価した。その結果を表 31 に示す。

[0165] さらに、非加熱の 6- α -グルカノトランスフェラーゼ活性に対する、加熱処理した後の 6- α -グルカノトランスフェラーゼ活性（残存活性（%））を測定した。その結果を表 31 に示す。

[0166] [表31]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	加熱後の 濁度 (OD660nm)	加熱後の 残存活性 (%)
	種類	濃度	種類	濃度		70°C	70°C
比較例17-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	1.4	100
比較例17-2 対照(バッ ファー)	—	—	—	—	—	8.3	2
実施例17	トレハロース	1.17M	グルタミン酸ナトリウム	1.17M	1:1	5.3	76

（バッファー: 0.05% トリトン、0.01M リン酸カリウム緩衝液）

[0167] 表 31 に示すように、比較例 17-2 では白濁がみられ、加熱後の残存活性は比較例 17-1 と比較して大幅に低下した。これに対し、実施例 17 では白濁が抑制され、残存活性は向上した。

[0168] (16) 6- α -グルカノトランスフェラーゼの変性抑制試験 2

糖質とアミン化合物を混合し、タンパク質の変性抑制用組成物を作製した。このタンパク質の変性抑制用組成物と、約 25 mg/mL の濃度で *Geobacillus* 属由来 6- α -グルカノトランスフェラーゼを含む水溶液を凍結乾燥し、表 32 に記載の含量となるように粉末を作製した。凍結乾燥後の粉末を、恒温器中で 70°C で 2 日間保温した。保管後も粉末の状態が保たれており、吸湿による外観の変化は生じていなかった。その後、非加熱の 6- α -グルカノトランスフェラーゼ活性に対する、保温後の 6- α -グルカノトランスフェラーゼ活性（残存活性（%））を測定した。その結果を表 32 に示す。

[0169] [表32]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	加熱後の 残存活性(%)
	種類	含量 (粉体 1kg中)	種類	含量 (粉体 1kg中)		
比較例18-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	100
比較例18-2 対照 (変性抑制用 組成物の添 加無し)	—	—	—	—	—	53
実施例18-1	トレハロース	1.64mol	グルタミン酸ナトリウム	1.64mol	1:1	98
実施例18-2	トレハロース	1.58mol	グルタミン酸ナトリウム	1.58mol	1:1	83
実施例18-3	トレハロース	1.39mol	グルタミン酸ナトリウム	1.39mol	1:1	86

[0170] 表32に示すように、比較例18-2の加熱後の残存活性は、比較例18-1と比較して大幅に低下した。これに対し、実施例18-1～実施例18-3では残存活性は向上し、比較例18-1と同程度に回復した。

[0171] (17) 6- α -グルカノトランスフェラーゼの変性抑制試験3

糖質とアミン化合物を混合し、タンパク質の変性抑制用組成物を作製した。このタンパク質の変性抑制用組成物と、約45mg/mLの濃度でGeobacillus属由来6- α -グルカノトランスフェラーゼを含む水溶液を凍結乾燥し、表33に記載の含量となるように粉末を作製した。凍結乾燥後の粉末を、恒温器中で40℃、相対湿度75%の条件で3か月間保管した。保管後も粉末の状態が保たれており、吸湿による外観の変化は生じていなかった。その後、保温前の6- α -グルカノトランスフェラーゼ活性に対する、保温後の6- α -グルカノトランスフェラーゼ活性（残存活性(%)）を測定した。その結果を表33に示す。

[0172]

[表33]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	3か月保存後の 残存活性(%)
	種類	含量 (粉体 1kg中)	種類	含量 (粉体 1kg中)		
比較例19 対照 (変性抑制用 組成物の添 加無し)						45
実施例19-1	トレハロース	0.6mol	グルタミン酸ナトリウム	0.6mol	1:1	98
実施例19-2	トレハロース	0.31mol	グルタミン酸ナトリウム	0.31mol	1:1	91
実施例19-3	トレハロース	0.11mol	グルタミン酸ナトリウム	0.11mol	1:1	84

[0173] 表 3 3 に示すように、比較例 1 9 の 3 か月保存後の残存活性は大幅に低下した。これに対し、実施例 1 9 - 1 ~ 実施例 1 9 - 3 では残存活性は向上した。

[0174] (1 8) セリンプロテアーゼの変性抑制試験

表 3 4 ~ 3 5 に記載の濃度となるように糖質とアミン化合物を混合し、タンパク質の変性抑制用組成物を作製した。このタンパク質の変性抑制用組成物と、約 1 m g / m L の濃度で B a c i l l u s 属由来セリンプロテアーゼ (ナガセヴィータ株式会社製「ビオプラーゼ (R) 」) を含む水溶液を、 7 0 ° C で 2 時間加熱処理した。加熱処理後の酵素活性に対する、加熱処理後の酵素活性 (残存活性 (%)) を測定した。その結果を表 3 4 ~ 3 5 に示す。

[0175] 酵素活性は、A A T B i o q u e s t 社製 A m p l i t e プロテアーゼ活性測定キットに含まれる蛍光標識カゼインを用いて測定した。具体的には、熱処理したサンプルを精製水にて 6 0 倍希釈したものを、コーニング社製 9 6 穴ブラックプレート (3 6 0 3) に 5 0 μ L / ウェル添加した。次に蛍光標識カゼインを 8 0 m M リン酸緩衝液 (p H 7 . 5) にて 1 0 0 倍希釈したものを、上記のブラックプレートに 5 0 μ L / ウェル添加し、 3 7 ° C で 1 5 分間インキュベーション後に、蛍光強度 (E x / E m : 4 9 0 n m / 5 2 5 n m) にて測定した。また非加熱タンパク質分解酵素原末を 5 0 μ g / m L から精製水で 2 倍段階希釈したものを調製し、スタンダードとして添加した。

[0176] [表34]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	残存酵素 活性(%)
	種類	濃度	種類	濃度		
比較例20-1 対照(非加熱)	—	—	—	—	—	100
比較例20-2 対照(蒸留水)	—	—	—	—	—	4
比較例20-3	トレハロース	1M	—	—	—	14
比較例20-4	—	—	グルタミン酸ナトリウム	0.25M	1:1	19
比較例20-5	—	—	グルタミン酸ナトリウム	0.5M	—	39
比較例20-6	—	—	グルタミン酸ナトリウム	1M	—	55
実施例20-1	トレハロース	1M	グルタミン酸ナトリウム	0.25M	4:1	59
実施例20-2	トレハロース	1M	グルタミン酸ナトリウム	0.5M	2:1	72
実施例20-3	トレハロース	1M	グルタミン酸ナトリウム	1M	1:1	72

[0177] 表34に示すように、比較例20-2の残存活性は大幅に低下した。これに対し、実施例20-1～実施例20-3では残存活性は向上した。実施例20-1、実施例20-2では統計的に有意な相乗作用が認められた。

[0178] [表35]

	糖質		アミン化合物		糖質:アミン化合物 のモル比	残存酵素 活性(%)
	種類	濃度	種類	濃度		
比較例21-1 対照(非加熱)						100
比較例21-2 対照(蒸留水)	—	—	—	—	—	5
比較例21-3	トレハロース	1M	—	—	—	3
比較例21-4	—	—	アスパラギン酸ナトリウム	0.25M	1:1	13
比較例21-5	—	—	アスパラギン酸ナトリウム	0.5M	—	6
比較例21-6	—	—	アスパラギン酸ナトリウム	1M	—	9
実施例21-1	トレハロース	1M	アスパラギン酸ナトリウム	0.25M	4:1	37
実施例21-2	トレハロース	1M	アスパラギン酸ナトリウム	0.5M	2:1	49
実施例21-3	トレハロース	1M	アスパラギン酸ナトリウム	1M	1:1	66

[0179] 表35に示すように、比較例21-2の残存活性は大幅に低下した。これに

対し、実施例 2 1 - 1 ~ 実施例 2 1 - 3 では残存活性は向上した。実施例 2 1 - 1、実施例 2 1 - 2、実施例 2 1 - 3 では統計的に有意な相乗作用が認められた。セリンプロテアーゼ（ナガセヴィータ株式会社製「ビオプラーゼ（R）」）は化粧品分野で、老化した角質を分解・剥離するためのパック剤として利用されている他、工業用途として洗剤製造や各種洗浄剤にも利用されている。表 3 4 ~ 3 5 の結果は、タンパク質の変性抑制用組成物を、化粧品パック剤や洗浄剤に適用できることを示唆している。

請求の範囲

- [請求項1] トレハロース、スクロース、マルチトール、およびイソマルチトールからなる群から選択される1以上の糖質、並びに、
グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン、プロリン、セリン、コリン、およびそれらの塩からなる群から選択される1以上のアミン化合物
を含む、タンパク質の変性抑制用組成物。
- [請求項2] 加熱または凍結融解によるタンパク質の変性を抑制する、請求項1に記載のタンパク質変性抑制用組成物。
- [請求項3] タンパク質の凝集を抑制する、請求項1または2に記載のタンパク質変性抑制用組成物。
- [請求項4] 前記タンパク質が、抗体、サイトカイン、アレルゲン、および酵素からなる群から選択される1以上である、請求項1または2に記載のタンパク質変性抑制用組成物。
- [請求項5] 前記タンパク質が、抗IFN α 抗体、抗IFN γ 抗体、抗TNF α 抗体、抗IL-17A抗体、および抗IL-18抗体からなる群から選択される1以上である、請求項1または2に記載のタンパク質変性抑制用組成物。
- [請求項6] 前記タンパク質が、IFN α 、IFN γ 、IL-18、およびTNF α からなる群から選択される1以上である、請求項1または2に記載のタンパク質変性抑制用組成物。
- [請求項7] 前記タンパク質が、スギ花粉アレルゲンである、請求項1または2に記載のタンパク質変性抑制用組成物。
- [請求項8] 前記タンパク質が、乳酸脱水素酵素、糖転移酵素、糖分解酵素、リンゴ酸脱水素酵素、およびタンパク質分解酵素からなる群から選択される1以上である、請求項1または2に記載のタンパク質変性抑制用組成物。
- [請求項9] 前記タンパク質が、ウイルス由来タンパク質または細菌由来タンパク

- 質である、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質変性抑制用組成物。
- [請求項10] 前記タンパク質が、血液凝固因子、またはアルブミンである、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質変性抑制用組成物。
- [請求項11] 糖質：アミン化合物の配合モル比が 40 : 1 ~ 1 : 40 である、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質変性抑制用組成物。
- [請求項12] 液体形態であり、糖質、およびアミン化合物の濃度の合計が 0.20 モル/L ~ 3.50 モル/L である、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質変性抑制用組成物。
- [請求項13] 前記糖質によるタンパク質の変性抑制効果、および前記アミン化合物によるタンパク質の変性抑制効果に対し、相乗的にタンパク質の変性を抑制する、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質変性抑制用組成物。
- [請求項14] タンパク質と、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質変性抑制用組成物とを共存させることを特徴とする、タンパク質の変性抑制方法。
- [請求項15] タンパク質と、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質変性抑制用組成物とを含む、タンパク質製剤。
- [請求項16] トレハロース、スクロース、マルチトール、およびイソマルチトールからなる群から選択される 1 以上の糖質、並びに、
グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン、プロリン、セリン、コリン、およびそれらの塩からなる群から選択される 1 以上のアミン化合物
をタンパク質と共存させることを特徴とする、タンパク質の変性抑制方法。
- [請求項17] トレハロース、スクロース、マルチトール、およびイソマルチトールからなる群から選択される 1 以上の糖質、
グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン、プロリン、セリン、コリン、およびそれらの塩からなる群から選択される 1 以上のアミン化合物、

並びに
タンパク質
を含む、タンパク質製剤。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/024412

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/00(2006.01)i; **A61K 38/19**(2006.01)i; **A61K 38/43**(2006.01)i; **A61K 39/35**(2006.01)i; **A61K 39/395**(2006.01)i; **A61K 47/16**(2006.01)i; **A61K 47/18**(2017.01)i; **A61K 47/26**(2006.01)i; **A61P 43/00**(2006.01)i
FI: A61K38/00; A61K47/26; A61K47/18; A61K47/16; A61P43/00 105; A61K39/395 Y; A61K38/19; A61K38/43; A61K39/35

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K38/00; A61K38/19; A61K38/43; A61K39/35; A61K39/395; A61K47/16; A61K47/18; A61K47/26; A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2020-506955 A (JOINT STOCK COMPANY "BIOCAD") 05 March 2020 (2020-03-05) claims, examples	1-5, 11-17
Y		1-17
X	WO 2023/006055 A1 (SHANGHAI JUNSHI BIOSCIENCES CO., LTD.) 02 February 2023 (2023-02-02) claims, examples	1-4, 11-17
Y		1-17
X	WO 2015/166885 A1 (EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD.) 05 November 2015 (2015-11-05) claims, examples	1-3, 11-17
Y		1-17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 September 2024

Date of mailing of the international search report

24 September 2024

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/024412

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FORNEY-STEVENSON, KM. et al. Addition of Amino Acids to Further Stabilize Lyophilized Sucrose-Based Protein Formulations: I. Screening of 15 Amino Acids in Two Model Proteins. J. Pharm. Sci. 2016, vol. 105, issue 2, pp. 697-704	1-4, 8, 10-17
Y	particularly, abstract, p. 699, stability studies, p. 700, fig. 1.	1-17
X	JP 2005-516998 A (MERCK PATENT GMBH) 09 June 2005 (2005-06-09)	1, 4, 11-17
Y	claims, examples, tables 1-3	1-17
X	JP 8-333277 A (HOECHST JAPAN LTD.) 17 December 1996 (1996-12-17)	1, 2, 4, 10-17
Y	claims, examples, tables 3, 4	1-17
X	JP 11-130682 A (NIHON PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 18 May 1999 (1999-05-18)	1-4, 10-17
Y	claims, paragraph [0004], examples, tables 1, 2	1-17
X	JP 2016-535065 A (GEORGIA TECH RESEARCH CORPORATION) 10 November 2016 (2016-11-10)	1, 2, 9, 11-17
Y	claims, examples, fig. 4, 10	1-17
X	CHEN, S. et al. Development of a simple assay system for protein-stabilizing efficiency based on hemoglobin protection against denaturation and measurement of the cooperative effect of mixing protein stabilizers. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2016, vol. 80, no. 10, pp. 1874-1878	1, 11-17
Y	particularly, abstract, p. 1874, right column, second paragraph, materials and methods, fig. 3., 4.	1-17
Y	JP 2021-521231 A (MERCK PATENT GMBH) 26 August 2021 (2021-08-26)	1-17
	claims, examples, paragraphs [0153]-[0166], fig. 10	
Y	JP 2017-519777 A (AMGEN INC.) 20 July 2017 (2017-07-20)	1-17
	claims	
Y	中島滋ほか, グルタミン酸ナトリウムによる血漿中乳酸脱水素酵素の冷凍貯蔵中失活の抑制, 日本化学会誌, 1990, vol. 1990, no. 3, pp. 331-333, (NAKAJIMA, Shigeru et al. Prevention of Freeze Inactivation of Plasma Lactate Dehydrogenase with Sodium Glutamate. NIPPON KAGAKU KAISHI.)	1-17
	in particular, results, discussion	
Y	阿久澤良造ほか, 凍結および凍結乾燥によるStreptococcus lactis菌体内低温性プロテイナーゼの変性と変性抑止剤, 日本獣医畜産大学研究報告, 1983, vol. 32, pp. 139-142, (AKUZAWA, Ryoze et al. Denaturation and Preservatives of Low-Temperature-Active Intracellular Proteinase from Streptococcus lactis by Freezing and Freeze-Drying. The bulletin of the Nippon Veterinary and Zootechnical College.)	1-17
	particularly, p. 140, right column, second paragraph to p. 141, left column, third paragraph, table 2.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2024/024412

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
JP	2020-506955	A	05 March 2020	WO	2015/034924	A1	
				claims, examples			
				US	2016/0220483	A1	
				EP	3041504	A1	
WO	2023/006055	A1	02 February 2023	JP	2024-528724	A	
				EP	4376809	A1	
WO	2015/166885	A1	05 November 2015	US	2017/0189487	A1	
				claims, examples			
				EP	3138575	A1	
JP	2005-516998	A	09 June 2005	US	2005/0220758	A1	
				claims, examples, tables 1-3			
				WO	2003/066102	A1	
				EP	1471942	A1	
JP	8-333277	A	17 December 1996	US	6084074	A	
				claims, examples, tables 3, 4			
				EP	754463	A2	
JP	11-130682	A	18 May 1999	(Family: none)			
JP	2016-535065	A	10 November 2016	WO	2015/034924	A1	
				claims, examples, fig. 4, 10			
				US	2016/0220483	A1	
				EP	3041504	A1	
JP	2021-521231	A	26 August 2021	WO	2019/201894	A1	
				claims, examples, pp. 41-44, fig. 10			
				US	2021/0379186	A1	
				EP	3781192	A1	
JP	2017-519777	A	20 July 2017	WO	2015/200027	A1	
				claims			
				US	2017/0209582	A1	
				EP	3160511	A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

A61K 38/00(2006.01)i; A61K 38/19(2006.01)i; A61K 38/43(2006.01)i; A61K 39/35(2006.01)i;
A61K 39/395(2006.01)i; A61K 47/16(2006.01)i; A61K 47/18(2017.01)i; A61K 47/26(2006.01)i;
A61P 43/00(2006.01)i
FI: A61K38/00; A61K47/26; A61K47/18; A61K47/16; A61P43/00 105; A61K39/395 Y; A61K38/19; A61K38/43;
A61K39/35

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

A61K38/00; A61K38/19; A61K38/43; A61K39/35; A61K39/395; A61K47/16; A61K47/18; A61K47/26; A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報1922-1996年
日本国公開実用新案公報1971-2024年
日本国実用新案登録公報1996-2024年
日本国登録実用新案公報1994-2024年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2020-506955 A（ジョイント・ストック・カンパニー “バイオキャド”） 05.03.2020（2020 - 03 - 05） 特許請求の範囲，実施例	1-5, 11-17
Y		1-17
X	WO 2023/006055 A1（SHANGHAI JUNSHI BIOSCIENCES CO., LTD.）02.02.2023（2023 - 02 - 02） 特許請求の範囲，実施例	1-4, 11-17
Y		1-17
X	WO 2015/166885 A1（エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジメント株式会社） 05.11.2015（2015 - 11 - 05） 特許請求の範囲，実施例	1-3, 11-17
Y		1-17

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
10.09.2024

国際調査報告の発送日
24.09.2024

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）

池上 文緒 4U 3765

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	FORNEY-STEVENS, KM., et al., Addition of Amino Acids to Further Stabilize Lyophilized Sucrose-Based Protein Formulations: I. Screening of 15 Amino Acids in Two Model Proteins, J. Pharm. Sci., 2016, vol.105, issue 2, p.697-704 特にABSTRACT, p.699;Stability Studies, p.700, Figure 1.	1-4,8,10-17
Y		1-17
X	JP 2005-516998 A (メルク パテント ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング) 09.06.2005 (2005 - 06 - 09) 特許請求の範囲, 実施例, 表 1 - 3	1,4,11-17
Y		1-17
X	JP 8-333277 A (ヘキストジャパン株式会社) 17.12.1996 (1996 - 12 - 17) 特許請求の範囲, 実施例, 表 3, 表 4	1,2,4,10-17
Y		1-17
X	JP 11-130682 A (日本製薬株式会社) 18.05.1999 (1999 - 05 - 18) 特許請求の範囲, 段落[0004], 実施例, 表 1, 表 2	1-4,10-17
Y		1-17
X	JP 2016-535065 A (ジョージア テック リサーチ コーポレイション) 10.11.2016 (2016 - 11 - 10) 特許請求の範囲, 実施例, 図 4, 図 10	1,2,9,11-17
Y		1-17
X	CHEN, S., et al., Development of a simple assay system for protein-stabilizing efficiency based on hemoglobin protection against denaturation and measurement of the cooperative effect of mixing protein stabilizers, Biosci. Biotechnol. Biochem., 2016, vol.80, no.10, p.1874-1878 特にAbstract, p.1874右欄第2段落, Materials and methods, Fig. 3., Fig. 4.	1,11-17
Y		1-17
Y	JP 2021-521231 A (メルク パテント ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング) 26.08.2021 (2021 - 08 - 26) 特許請求の範囲, 実施例, 段落[0153]-[0166], 図 10	1-17
Y	JP 2017-519777 A (アムジェン インコーポレイテッド) 20.07.2017 (2017 - 07 - 20) 特許請求の範囲	1-17
Y	中島滋ほか, グルタミン酸ナトリウムによる結晶中乳酸脱水素酵素の冷凍貯蔵中失活の抑制, 日本化学会誌, 1990, vol.1990, no.3, p.331-333 特に結果, 考察	1-17
Y	阿久澤良造ほか, 凍結および凍結乾燥によるStreptococcus lactis菌体内低温性プロテイナーゼの変性と変性抑止剤, 日本獣医畜産大学研究報告, 1983, vol.32, p.139-142 特にp.140右欄第2段落-p.141左欄第3段落, Table 2.	1-17

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/024412

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2020-506955	A	05.03.2020	WO	2015/034924	A1	
				特許請求の範囲, 実施例			
				US	2016/0220483	A1	
				EP	3041504	A1	
WO	2023/006055	A1	02.02.2023	JP	2024-528724	A	
				EP	4376809	A1	
WO	2015/166885	A1	05.11.2015	US	2017/0189487	A1	
				特許請求の範囲, 実施例			
				EP	3138575	A1	
JP	2005-516998	A	09.06.2005	US	2005/0220758	A1	
				特許請求の範囲, 実施例, 表 1 - 3			
				WO	2003/066102	A1	
				EP	1471942	A1	
JP	8-333277	A	17.12.1996	US	6084074	A	
				特許請求の範囲, 実施例, 表 3, 表 4			
				EP	754463	A2	
JP	11-130682	A	18.05.1999	(ファミリーなし)			
JP	2016-535065	A	10.11.2016	WO	2015/034924	A1	
				特許請求の範囲, 実施例, 図 4, 図 10			
				US	2016/0220483	A1	
				EP	3041504	A1	
JP	2021-521231	A	26.08.2021	WO	2019/201894	A1	
				特許請求の範囲, 実施例, p.41-44, 図 10			
				US	2021/0379186	A1	
				EP	3781192	A1	
JP	2017-519777	A	20.07.2017	WO	2015/200027	A1	
				特許請求の範囲			
				US	2017/0209582	A1	
				EP	3160511	A1	