

(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  
2024年9月6日(06.09.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/180926 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12N 9/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2024/000683
- (22) 国際出願日: 2024年1月12日(12.01.2024)
- (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 2023-029745 2023年2月28日(28.02.2023) JP
- (71) 出願人: 東洋紡株式会社(Toyobo Co., Ltd.)  
[JP/JP]; 〒5300001 大阪府大阪市北区梅田一丁目13番1号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 川南 裕 (KAWAMINAMI, Hiroshi);  
〒9148550 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡株式会社内 Fukui (JP).
- (74) 代理人: 弁理士法人三枝国際特許事務所  
(SAEGUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府  
大阪府中央区道修町1-7-1 北浜  
コニシビル 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: 3-HYDROXYBUTYRATE DEHYDROGENASE DRY PREPARATION

(54) 発明の名称: 3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤

(57) Abstract: Provided is a formulation of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase dry preparation, the formulation maintaining the function of a protein of interest and being excellent in a powder shape, solubility of the dry preparation, and clarity of a protein solution. The present invention selects a stabilizer for a protein of interest and/or optimizes the added amount thereof, thereby enabling manufacture of a 3-hydroxybutyrate dehydrogenase dry preparation that is excellent in a powder shape, solubility of the dry preparation, and clarity of a protein solution, while maintaining the function of the protein of interest in a powdering step.

(57) 要約: 3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥剤において、目的タンパク質の機能を維持し、粉末形状並びに当該乾燥剤の溶解性及びタンパク質溶液の清澄性に優れた組成を提供する。目的タンパク質に対する安定化剤の選択、及び/又はその添加量を適正化することで、粉末工程における目的タンパク質の機能を維持したまま、粉末形状並びに当該乾燥剤の溶解性及びタンパク質溶液の清澄性に優れた3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥剤の製造を可能とする。



## 明 細 書

発明の名称： 3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤

### 技術分野

[0001] 本発明は3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤に関する。

### 背景技術

[0002] 血中ケトン体は糖尿病患者における、インスリン作用の不足の程度を反映する代謝指標として使用されているため、臨床検査分野では重要なマーカーである。血中ケトン体は主として肝臓で脂肪酸の酸化過程で代謝物として生産されるが、糖質がエネルギー源として適切に利用されているか否かの指標にもなる。ケトン体とはアセト酢酸、3-ヒドロキシ酪酸及びアセトンの総称である。血中ケトン体の殆どはアセト酢酸と3-ヒドロキシ酪酸で占められている。ケトン体の定量において用いられる酵素としては、3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素（以下「HBDH」とも記載する）が産業上有用な酵素である。

[0003] HBDH（E. C 1. 1. 1. 30）はニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）の存在下で、3-ヒドロキシ酪酸を酸化してアセト酢酸と還元型NADを生じる反応を可逆的に触媒する酵素として知られている。微生物由来の酵素としてはロドスピリラム・ルブラム（非特許文献1）やシュードモナス・レミオグネイ（非特許文献2）、リゾビウム・メリオティアルカ（非特許文献3）、リゲネス・フェカリス（特許文献1）、ロドバクター・スフェロイデス（特許文献2）等にも存在することが知られている。

[0004] 血中ケトン体の測定には、主に液状試薬やケトンセンサが用いられている。試薬やセンサに用いられる酵素は、多くの場合、乾燥状態の製品（以下、「乾燥製剤」とも表す。）として流通している。酵素を乾燥状態にする手段は様々である。例えば、酵素を含む溶液を噴霧し熱風を当てて乾燥させるスプレードライ法、酵素を含む溶液を凍結させ、減圧して乾燥するフリーズドライ（凍結乾燥）法などがある。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0005] 特許文献1：特開平8-7085号公報

特許文献2：特開平11-318438号公報

### 非特許文献

[0006] 非特許文献1：J. Biol. Chem. 1962, 237:603-607

非特許文献2：J. Biol. Chem. 1965, 240:4023-4028.

非特許文献3：J. Bacteriol. 1999, 181(3):849-857.

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0007] いずれの手段においても、酵素を乾燥させた場合、変性による活性の損失や再溶解時の濁質生成等の問題が発生することがある。そのような場合は、酵素タンパク質を単体で乾燥することを避けて、安定化剤が添加されることが多い。HBDHにおいては、従来、ウシ血清アルブミンと共存させて凍結乾燥させる技術が知られていた。しかし、ウシ伝達性海綿状脳症に係る安全性の観点から動物由来原料中でもウシ由来原料を含有しない組成が望ましい。

[0008] 本発明者らは、特にはケトンセンサへの適用という観点から、乾燥製剤組成を検討した。ケトンセンサにおいて、HBDHと安定化剤で構成される乾燥製剤の吸湿性は、センサ性能の劣化につながる。具体的には、セリンやグルタミンといったアミノ酸は、アミノ基やカルボキシル基などの親水基を有し、それらの親水基が水を吸着するため吸湿性があると考えられる。また、塩類についても、塩化カルシウムなどの塩類に潮解性があることが知られている。

[0009] 一方で、ケトンセンサにおいてはセンサチップの表面上に固定化された酵素が、極微量の血液液体によって溶解されることにより酵素反応が開始するため、試料中の僅かな水分でも酵素が溶解できる程度の適度な親水性が要求される。

[0010] 本発明の目的の1つは、ケトンセンサ等に適応した3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤を提供することにある。

### 課題を解決するための手段

[0011] 本発明は、以下の項に記載の態様を包含する。

[0012] 項1.

3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素、親水性ポリマー、及び糖類（1種類以上の糖類）を含んでなる、3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤。

項2.

糖類が二糖類及び／又は糖アルコールである、項1に記載の3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤。

項3.

親水性ポリマーの含有濃度が総タンパク質の含有濃度の1～30%である、又は親水性ポリマーの含有量がタンパク質に対して1～30%である、項1又は2に記載の3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤。

項4.

糖類（2種以上の場合は各々）の含有濃度が総タンパク質の含有濃度の1～60%である、又は糖類の含有量がタンパク質に対して1～60%である、項1～3のいずれかに記載の3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤。

項5.

親水性ポリマーの含有濃度が総タンパク質の含有濃度の1～30%であり、糖類（2種以上の場合は各々）の含有濃度が総タンパク質の含有濃度の1～60%である、又は親水性ポリマーの含有量がタンパク質に対して1～30%、及び糖類の含有量がタンパク質に対して1～60%である、項1～4のいずれかに記載の3

ーヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤。

項 6.

親水性ポリマーの含有濃度が総タンパク質の含有濃度の 1～20%であり、糖類（2種以上の場合は各々）の含有濃度が総タンパク質の含有濃度の 1～40%である、又は

親水性ポリマーの含有量がタンパク質に対して 1～20%、及び糖類の含有量がタンパク質に対して 1～40%である、項 1～5 のいずれかに記載の 3ーヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤。

項 7.

親水性ポリマーの含有濃度が総タンパク質の含有濃度の 1～10%であり、糖類（2種以上の場合は各々）の含有濃度が総タンパク質の含有濃度の 1～20%である、又は

親水性ポリマーの含有量がタンパク質に対して 1～10%、及び糖類の含有量がタンパク質に対して 1～20%である、項 1～6 のいずれかに記載の 3ーヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤。

項 8.

親水性ポリマーが非イオン性ポリマーである、項 1～7 のいずれかに記載の 3ーヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤。

項 9.

親水性ポリマーがポリビニルピロリドンである、項 1～8 のいずれかに記載の 3ーヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤。

項 10.

糖類が二糖類と糖アルコールからなる、項 1～9 のいずれかに記載の 3ーヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤。

項 11.

二糖類がスクロース、糖アルコールがマンニトールである、項 2～10 のいずれかに記載の 3ーヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤。

**発明の効果**

[0013] 本発明により、ケトンセンサ等に適応した3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤を提供することができる。例えば、目的タンパク質に対する安定化剤の種類並びに添加量を適正化することで、粉末工程における目的タンパク質の機能を維持したまま、粉末形状並びに当該乾燥製剤の溶解性及びタンパク質溶液の清澄性に優れた3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤の製造を可能とする。

### 発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明を詳述する。本発明に用いられるHBDHは、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)の存在下で3-ヒドロキシ酪酸に作用し、3-ヒドロキシ酪酸を酸化してアセト酢酸と還元型NADを生じる反応を可逆的に触媒する酵素をいう。本発明に用いられるHBDHの由来は如何なるものであっても特に限定されるものではなく、遺伝子組み換え体によって製造されたものであってもよい。

[0015] 本発明において、乾燥製剤とは、上記HBDHを含む組成物を凍結乾燥や風乾など、当業者が通常用いる乾燥手段を用いて乾燥する工程を経て得られた製剤をいう。乾燥手段は特に限定されないが、凍結乾燥は、酵素活性の損失を極力防止する観点から特に好ましい。

[0016] 本発明の3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤においては、親水性ポリマー並びに糖類(1種類以上の糖類)を共存させることを特徴とする。

[0017] 親水性ポリマーとは、例えば極性又は荷電官能基を含むことで水溶性を示し、水や他の極性物質との相互作用やこれらへの溶解を可能とするポリマーをいう。具体的には、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール、ポリエチレンイミン、ポリビニルアルコールなどの非イオン性ポリマーが挙げられる。特に、ポリビニルピロリドンが好ましい。親水性ポリマーの平均分子量は、好ましくは10,000~40,000であり、より好ましくは15,000~35,000であり、さらに好ましくは20,000~30,000である。平均分子量は、慣用の方法、例えばHPLCにより測定することができる。

[0018] 糖類としては、例えば単糖類、二糖類、多糖類、糖アルコールなどが挙げられる。これらのうち、二糖類及び／又は糖アルコールが好ましい。二糖類としては、例えばスクロース、ラクロース、マルトース、メリビオースなどが挙げられる。一方、糖アルコールとしては、例えばマンニトール、エリスリトール、ラクチトール、マルチトール、ソルビトール、キシリトールなどが挙げられる。二糖類及び糖アルコールは一方だけを用いてもよいし、両方を併用してもよい。特に、スクロース及びマンニトールを併用することが好ましい。

[0019] これらの安定化剤の添加する目的は、凍結乾燥工程におけるHBDHの酵素活性の損失を抑制し、得られた乾燥製剤の粉末形状並びに溶解性、酵素溶解液の清澄性を向上させることであるため、その目的を達成し得る範囲で適宜添加量を設定できる。したがって、特に限定されるものではないが、親水性ポリマーの含有濃度は、例えばHBDHの含有濃度又はHBDH以外のタンパク質を含有する場合は総タンパク質の含有濃度（280nmの吸光度1を1mg/mLとした場合の濃度）の1～35%であり、好ましくは1～30%、より好ましくは1～25%、更に好ましくは1～20%、更により好ましくは1～15%、特に好ましくは1～10%である。糖類（2種以上の場合は各々）の含有濃度は、例えばHBDHの含有濃度又はHBDH以外のタンパク質を含有する場合は総タンパク質の含有濃度（280nmの吸光度1を1mg/mLとした場合の濃度）の1～65%であり、好ましくは1～60%、より好ましくは1～50%、更に好ましくは1～40%、更により好ましくは1～30%、特に好ましくは1～20%である。本明細書中、「含有濃度」は「含有量」や「固形分含量」等と読み替えることができる。一実施形態において、ポリビニルピロリドン、スクロース、及びマンニトールを用いる場合にはHBDHの固形分含量又はHBDH以外のタンパク質を含有する場合は総タンパク質の固形分含量に対してポリビニルピロリドンが1～30%、スクロースが1～60%、マンニトールが1～60%、より好ましくはポリビニルピロリドンが1～20%、スクロースが1～40%、マン

ニトールが1～40%、更に好ましくはポリビニルピロリドンが1～10%、スクロースが1～20%、マンニトールが1～20%である。乾燥製剤中のHBDHの含有濃度は、総タンパク質の含有濃度に対して50%以上であり、好ましくは70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、又は99%以上である。一実施形態において、乾燥製剤に含まれるタンパク質は、HBDHのみであってもよい。

[0020] 本発明の3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤には、上記のほかに必要に応じて任意の成分を含有させることができ、その組成は特に限定されない。任意の成分としては、例えば緩衝剤が挙げられる。緩衝剤としてはpH4～9の範囲で緩衝能を有するものを適宜加えてよく、例えばホウ酸、トリス塩酸、リン酸カリウム等の緩衝剤や、ACES、BES、Bis-Tris、CHES、EPPS、HEPES、HEPPSO、MES、MOPS、MOPSO、PIPES、POPSO、TAPS、TAPSO、TES、Tricineといったグッド緩衝剤が挙げられる。また、フタル酸、マレイン酸、グルタル酸などのような、ジカルボン酸をベースとした緩衝剤も挙げることができる。これらの緩衝剤のうち1種のみを適用してもよいし、2種以上を用いてもよい。更には上記以外を含む1種以上の複合組成であってもよい。

[0021] また、必要に応じてEDTA等のキレート剤、及び／又は、ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル(TritonX-100)、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウラート(Tween20)等の界面活性剤を含んでもよい。また、これらの添加濃度としては、緩衝能を持つ範囲であれば特に限定されないが、好ましい上限は20mM以下、より好ましくは10mM以下である。好ましい下限は1mM以上である。本発明の3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤中においては緩衝剤の含有量は、特に限定されるものではないが、好ましくは0.1%(質量比)以上、特に好ましくは0.5～2%(質量比)の範囲で使用される。

[0022] 乾燥工程に供する酵素溶液は、好ましくはタンパク質濃度としてA280



(A280=1を1mg/mLとする)が $25 \pm 8$ 、より好ましくは $25 \pm 4$ 、更に好ましくは $25 \pm 2$ であるように濃度を調整する。乾燥工程に供する酵素の濃度が上記の範囲である場合、乾燥工程で回収率が低下せず、得られた乾燥製品が取り扱いやすい形状となることが多い。また、乾燥にかからない。

[0023] 本発明の好ましい実施形態の一つとしては、ポリビニルピロリドン並びにスクロース及びマンニトールを含有することを特徴とする3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤が挙げられる。該3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤は、上述の方法により製造することができ、例えば乾燥粉末や凍結乾燥製剤のような形態をとることができる。

[0024] 本発明により、3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤の吸湿性を低下させることができる。本発明でいう吸湿性の低さとは、乾燥製剤を湿度70%、25℃で6時間保存した後、スパチュラ等で粉末を混ぜたときに、粉末が粘土状に変化したり、スパチュラに吸着することがないことを意味する。

[0025] 本発明により、3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤の溶解性を向上させることができる。本発明でいう溶解性の高さとは、乾燥製剤を例えばPBSバッファーなどを用いて約1KU/mLの酵素濃度に溶解し、タンパク質が凝集などにより溶解しない状態ではなく、速やかに溶解していることを意味する。

[0026] 本発明により、3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤の清澄性を向上させることができる。本発明でいう清澄性の高さとは、乾燥製剤を例えばPBSバッファーなどを用いて約1KU/mLの酵素濃度に溶解し、溶解液に浮遊物や濁質が発生しないことを意味する。

[0027] 本発明により、3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤の安定性を向上させることができる。本発明でいう安定性の高さとは、乾燥製剤を37℃で1週間保存した後、維持されているHBDH活性の残存率(%)が安定化剤を何も添加しない場合に比して増大するか、少なくとも維持されることを意味する。

[0028] 具体的に、安定性が向上しているかどうかの評価は、次のようにして行うことができる。

後述のHBDH活性の測定方法に記載の活性測定法において、乾燥化を行った後の乾燥品質あたりのHBDH活性値（a）と、一定温度で一定期間保存した後の乾燥品質あたりのHBDH活性値（b）を測定し、測定値（a）を100とした場合に対する測定値（b）の相対値（ $(b) / (a) \times 100$ ）を求める。この算出された相対値を活性残存率とする。そして、該化合物の添加の有無を比較して、添加により活性残存率が増大した場合、安定性が向上したものと判断する。

[0029] HBDH活性の測定方法

試薬

100mM Tris-HCl緩衝液（pH8.5；25℃）

158mM 3-ヒドロキシ酪酸溶液

27.9mM NAD<sup>+</sup>溶液

上記Tris-HCl緩衝液2.3mL、3-ヒドロキシ酪酸溶液0.5mL、NAD<sup>+</sup>溶液0.2mLを混合して反応試薬とする。

[0030] 測定原理

$D-3-ヒドロキシ酪酸 + NAD^+ \rightarrow アセト酢酸 + NADH + H^+$

上記反応により生ずるNADHの増加を、340nmの吸光度測定により評価する。

[0031] 酵素活性の定義

下記反応条件下、1分間に1μmolのNADH生成を触媒する酵素量を1Uとする

$(U = \mu\text{mol} / \text{min})$ 。

[0032] 測定方法

具体的に、HBDH活性は次のようにして測定することができる。

0.1M Tris-HCl（pH8.5）、25mM DL-3-ヒドロキシ酪酸ナトリウム、1.8mM NAD<sup>+</sup>から成る反応液3mLを光路長

1 cmの石英キュベットに取り、37℃にて5分間予備加温した。ここにサンプル100 μLを添加して緩やかに混和後、37℃に制御された分光光度計で340 nmにおける吸光度を2-3分間記録する。吸光度の直線的な増加を示す部分から1分間あたりの吸光度変化(ΔOD)を求め、式(1)に基づきHBDH活性を算出する。サンプルはHBDH活性が0.15から0.5 U/mLとなるよう、酵素希釈緩衝液(0.1% BSAを含む0.1 M Tris-HCl (pH 8.5))にて適宜希釈する。盲検はサンプルを酵素希釈緩衝液に代えて実施することができる。

[0033] [数1]

$$\begin{aligned} & \text{HBDH(U/mL)} \\ & = (\Delta OD_{\text{test}} - \Delta OD_{\text{blank}}) \times 3.1 \times \text{希釈倍率} / (6.22 \times 1.0 \times 0.1) \quad \dots(1) \end{aligned}$$

[0034] ここで、3.1は反応液の液量(mL)、6.22はNADHの340 nmにおけるミリモル分子吸光係数( $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ )、1.0は吸光度セルの光路長(cm)、0.1は酵素溶液の液量(mL)である。

## 実施例

[0035] 以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明は以下の例に特に限定されるものではない。

### [0036] HBDH生産大腸菌の培養

大腸菌JM109(DE3)株のケミカルコンピテントセルにHBDH遺伝子を含むプラスミドpET-24b(+)-HBDHを添加し、ヒートショック法により形質転換を行った。SOC培地にて回復培養を行った後に0.5%グルコースと100 mg/Lの硫酸カナマイシンを含むLB寒天培地に播種し、37℃にて終夜培養を行い形質転換体のコロニーを得た。得られたコロニーを数個掻き取り、0.5%のグルコース及び100 mg/Lの硫酸カナマイシンを含むLB培地50 mLに植菌し、30℃にて16時間振盪し種培養を行った。次に、10 L容ジャーフェーマンターに張り込んだ7 Lの培地(組成は表1に示す。)に70 mLの種培養液を添加し、30℃にて本培養を行った。OD<sub>660</sub>が7に達した時点(培養開始から約8時間後)

に終濃度0.4 mMのIPTGを添加し、さらに16時間の培養を行った。培養終了時にサンプルを抜き取り、菌体破砕液のHBDH活性を分析した。

[0037] [表1]

成分	濃度 (g/L)
イーストペプトン	14
酵母エキス	18
グリセロール	8
ソルビトール	4
グルコース	5
リン酸2水素カリウム	12.5
リン酸水素2カリウム	2.3
アデカノールLG-126	0.2
硫酸カナマイシン	0.1

[0038] HBDHの精製

このようにして得られた菌体を遠心分離で集菌し、50 mMリン酸緩衝溶液 (pH 7.5) に懸濁し、フレンチプレス (Niro Soavi製) に流速160 mL/分で送液し、700~800 barで破砕し、除核酸処理後、遠心分離して上清を得た。これに硫酸アンモニウム (住友化学 (株) 製) を0.6飽和になるように徐々に添加し、室温で30分間攪拌した後、目的タンパク質を沈殿させ、遠心分離で集めた沈殿を50 mMリン酸緩衝溶液 (pH 7.5) に再溶解させた。そしてSephadex G-25カラムによるゲルろ過、DEAE-セファロースカラムによる陰イオン交換クロマトグラフィー (溶出条件は共に0~1 Mの塩化ナトリウム濃度勾配をかけてピークフラクションを抽出) 及びPhenyl-セファロースカラムによる疎水クロマトグラフィー (溶出条件は共に25%飽和~0%の硫酸アンモニウム濃度勾配をかけてピークフラクションを抽出) を実施し、さらにG-25セファロースカラムによるゲルろ過で硫酸アンモニウムを除去しHBDH溶液を取得した。

[0039] 乾燥製剤の調製

このようにして取得したHBDH溶液に各種添加剤を含有する溶液を調製した。HBDH溶液の濃度はA280（280nmにおける吸光度）=25になるように調整した。各種安定化剤の添加濃度は酵素濃度（A280=1を1mg/mLとする）に対する割合で計算した。分子量24,500のポリビニルピロリドン、スクロース、マンニトールは酵素濃度の30%濃度（質量比）、60%濃度、60%濃度で添加した。具体的には、酵素濃度のA280=25なので、ポリビニルピロリドン、スクロース、マンニトールは順に終濃度7.5mg/mL、15mg/mL、15mg/mLになるように各種安定化剤を添加した。添加後、フィルターろ過（ポアサイズ；0.2μm）し、これらを正確に2mLずつ、バイアルに分取した。また、コントロールには安定化剤を何も加えていないものを用意した。これを凍結真空乾燥して、水分を完全に蒸発させた後、スパチュラで粉砕して粉末化した。上記と同様の手法で安定化剤の濃度を変更した複数の乾燥製剤を調製し（各水準を表2に示す。）、以下の試験に用いた。

[0040] [表2]

水準	組成（対A280に対する添加量%）		
	PVP	スクロース	マンニトール
1	なし	なし	なし
2	30	60	60
3	20	40	40
4	10	20	20

[0041] FDR収率

凍結乾燥前の総HBDH活性を測定した（このときの活性値を（a）とする。）。続いて凍結乾燥後の総HBDH活性を測定した（このときの活性値を（b）とし、粉末力価として表3に示した。）。活性残存率は、測定値（a）を100%とした場合に対する測定値（b）の相対値（（b）／（a）×100）を求め、この相対値を活性残存率（FDR収率）とした。

**[0042] 粉末形状試験**

粉碎した約 10 mg の粉末製剤を葉包紙に正確に計量して入れ、以下の基準で判定した。

- ++ ; 1 mm 以上の固形物が存在しない
- + ; 1 mm 以上の固形物が 1 個以上 10 個未満存在する
- ; 1 mm 以上の固形物が 10 個以上存在する

**[0043] 溶解性試験**

約 10 mg の粉末製剤をビーカーに正確に計量して入れ、約 0.25 KU / mL の濃度になるように PBS バッファーで添加した。その後、完全に溶解するまでの時間を計測し、以下の基準で判定した。

- ++ ; 完全に溶解した時間が 5 秒以下
- + ; 完全に溶解した時間が 5 秒超 10 秒以下
- ; 完全に溶解した時間が 10 秒超

**[0044] 清澄性試験**

約 10 mg の粉末製剤をビーカーに正確に計量して入れ、約 0.25 KU / mL の濃度になるように PBS バッファーで添加した。室温で約 1 時間緩やかに攪拌した後、分光光度計で OD 660 を測定し、以下の基準で判定した。

- ++ ; OD 660 が 10 以下
- + ; OD 660 が 10 超 70 未満
- ; OD 660 が 70 超

**[0045] 吸湿性試験**

約 10 mg の粉末製剤をスピッツロールに正確に計量して入れ、湿度 70 %、25 °C、7 時間保存した後、スパチュラで混ぜ、以下の基準で判定した。

- ++ ; 吸湿前と変わらない形状
- + ; 吸湿前と同じではないが、粘土状にならず、スパチュラにも吸着しない
- ; 粘土状になる、又は、スパチュラに吸着する

## [0046] 安定性試験

乾燥化を行った後の乾燥品重量あたりのHBDH活性値（a）と、37℃で一週間保存した後の乾燥品重量あたりのHBDH活性値（b）を測定し、測定値（a）を100とした場合に対する測定値（b）の相対値（ $(b) / (a) \times 100$ ）を求めた。この算出された相対値を活性残存率とした。そして、該化合物の添加の有無を比較して、添加により活性残存率が増大した場合、安定性が向上したものと判断した。

[0047] 粉末製剤の凍結乾燥処理後のHBDH活性（粉末力価）及びFDR収率の結果を表3に示す。粉末力価は、いずれの水準でも300U/mgを上回っており、実用範囲としては問題のない値であった。FDR収率に関しては、何も添加しないものに比べて、ポリビニルピロリドン、スクロース、及びマンニトールを添加することで、いずれの水準でも残存活性率が向上した。

## [0048] [表3]

水準	粉末力価 (U/mg)	FDR収率 (%)
1	696	85
2	349	93
3	419	95
4	527	99

[0049] 粉末形状試験の結果を表4に示す。粉末形状に関しては、何も添加しないものと水準4で1mm以上の固形分が認められなかった。他の水準は何も添加しないものと比較して固形物が多く存在したものの、実用時には問題ない程度であると判断された。

## [0050] [表4]

水準	粉末形状
1	++
2	+
3	+
4	++

[0051] 溶解性試験の結果を表5に示す。溶解性に関しては、水準3と水準4が短

時間に溶解したことから、溶解性の向上が見られた。水準2は何も添加しないものと同等の時間で溶解した。

[0052] [表5]

水準	溶解性
1	-
2	-
3	+
4	++

[0053] 清澄性試験の結果を表6に示す。清澄性に関しては、水準4のOD660値が最も小さく、浮遊物や凝集物も発生しなかった。水準2と水準3は何も添加しないものと比較してOD660値は小さかった。

[0054] [表6]

水準	OD660	清澄性
1	85	-
2	63	+
3	18	++
4	5	++

[0055] 吸湿性試験の結果を表7に示す。吸湿性に関しては、水準4が吸湿前と同等の形状であった。何も添加しないものはスパチュラに吸着し、形状が粘土状に変化した。水準2と水準3は吸湿前と同じではないが、粘土状にならず、スパチュラにも吸着しなかった。

[0056] [表7]

水準	吸湿性
1	-
2	+
3	+
4	++

[0057] 安定性試験の結果を表8に示す。何も添加しないものに比べて、ポリビニルピロリドン、スクロース、及びマンニトールを添加することで、いずれの



水準でも安定性が向上した。

[0058] [表8]

水準	安定性 (%)
1	65
2	95
3	93
4	98

### 産業上の利用可能性

[0059] 本発明の3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤は、特にケトン体を測定する試薬やセンサにおいて有用であることから、臨床検査分野、診断医療分野をはじめ、生命科学分野の産業に広く利用することができるものと期待される。

## 請求の範囲

- [請求項1] 3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素、親水性ポリマー、及び糖類を含んでなる、3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤。
- [請求項2] 糖類が二糖類及び／又は糖アルコールである、請求項1に記載の3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤。
- [請求項3] 親水性ポリマーの含有濃度が総タンパク質の含有濃度の1～30%である、請求項1に記載の3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤。
- [請求項4] 糖類（2種以上の場合は各々）の含有濃度が総タンパク質の含有濃度の1～60%である、請求項1に記載の3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤。
- [請求項5] 親水性ポリマーの含有濃度が総タンパク質の含有濃度の1～30%であり、糖類（2種以上の場合は各々）の含有濃度が総タンパク質の含有濃度の1～60%である、請求項1に記載の3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤。
- [請求項6] 親水性ポリマーの含有濃度が総タンパク質の含有濃度の1～20%であり、糖類（2種以上の場合は各々）の含有濃度が総タンパク質の含有濃度の1～40%である、請求項1に記載の3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤。
- [請求項7] 親水性ポリマーの含有濃度が総タンパク質の含有濃度の1～10%であり、糖類（2種以上の場合は各々）の含有濃度が総タンパク質の含有濃度の1～20%である、請求項1に記載の3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤。
- [請求項8] 親水性ポリマーが非イオン性ポリマーである、請求項1に記載の3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤。
- [請求項9] 親水性ポリマーがポリビニルピロリドンである、請求項1に記載の3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤。
- [請求項10] 糖類が二糖類と糖アルコールからなる、請求項1に記載の3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤。

[請求項11] 二糖類がスクロース、糖アルコールがマンニトールである、請求項2  
又は10に記載の3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素乾燥製剤。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/000683

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C12N 9/02(2006.01)i FI: C12N9/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N9/02		
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)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 49-27717 B1 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 19 July 1974 (1974-07-19) claims 1, 2, example 1	1-11
Y	JP 11-318438 A (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH) 24 November 1999 (1999-11-24) claim 1, paragraphs [0002], [0003]	1-11
Y	JP 2000-83660 A (TOYO BOSEKI KABUSHIKI KAISHA) 28 March 2000 (2000-03-28) claim 1, paragraph [0009]	1-11
Y	JP 2009-518306 A (NOVARTIS AG) 07 May 2009 (2009-05-07) claims 1, 12, paragraphs [0086]-[0090], table 2	1-11
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 <b>15 March 2024</b>		Date of mailing of the international search report <b>26 March 2024</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No. <b>PCT/JP2024/000683</b>
---

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 49-27717 B1	19 July 1974	US 3764478 A claims 1, 2, example 1 DE 1930059 A1	
JP 11-318438 A	24 November 1999	US 6255093 B1 column 1, lines 14-20, table 1 EP 957171 A2	
JP 2000-83660 A	28 March 2000	(Family: none)	
JP 2009-518306 A	07 May 2009	US 2010/0285135 A1 claims 1, 12, paragraphs [0088]-[0092], table 2 WO 2008/051245 A2	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 9/02(2006.01)i FI: C12N9/02		
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）） C12N9/02 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
Y	JP 49-27717 B1 (ベーリンガー・マンハイム・ゲゼルシャフト・ミット・ベシユレンクテル・ハフツング) 19.07.1974 (1974 - 07 - 19) 請求項1, 2, 例1	1-11
Y	JP 11-318438 A (ロシュ ダイアグノスティックス ゲーエムベーハー) 24.11.1999 (1999 - 11 - 24) 請求項1, [0002], [0003]	1-11
Y	JP 2000-83660 A (東洋紡績株式会社) 28.03.2000 (2000 - 03 - 28) 請求項1, [0009]	1-11
Y	JP 2009-518306 A (ノバルティス アーゲー) 07.05.2009 (2009 - 05 - 07) 請求項1, 12, [0086]-[0090], 表2	1-11
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> 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 15. 03. 2024	国際調査報告の発送日 26. 03. 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） 松村 真里 4N 5375 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

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/JP2024/000683

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 49-27717 B1	19.07.1974	US 3764478 A 請求項1, 2, 例1	
		DE 1930059 A1	
JP 11-318438 A	24.11.1999	US 6255093 B1 1欄14-20行, TABLE 1	
		EP 957171 A2	
JP 2000-83660 A	28.03.2000	(ファミリーなし)	
JP 2009-518306 A	07.05.2009	US 2010/0285135 A1 請求項1, 12, [0088]-[0092], 表2	
		WO 2008/051245 A2	