202435910

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202435910 A

(43)公開日： 中華民國 113 (2024) 年 09 月 16 日

(21)申請案號：113103067 (22)申請日： 中華民國 113 (2024) 年 01 月 26 日

(51)Int. Cl.： *A61K38/44 (2006.01)* *C12N9/04 (2006.01)*
A61K47/32 (2006.01) *A61K47/26 (2006.01)*
A61K9/14 (2006.01)

(30)優先權：2023/02/28 日本 2023-029745

(71)申請人：日商東洋紡股份有限公司 (日本) TOYOBO CO., LTD. (JP)
日本

(72)發明人：川南裕 KAWAMINAMI, HIROSHI (JP)

(74)代理人：張耀暉；李元戎；莊志強

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：11 項 圖式數：0 共 20 頁

(54)名稱

3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑

(57)摘要

本發明針對3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑，提供一種維持目標蛋白質的功能，且粉末形狀、以及該乾燥製劑的溶解性、及蛋白質溶液的澄清性優異之組成。

本發明藉由選擇針對目標蛋白質之穩定劑以及／或者使前述穩定劑的添加量變得適當，能夠製造在維持粉末步驟中的目標蛋白質的功能之狀態下，粉末形狀、以及該乾燥製劑的溶解性、及蛋白質溶液的澄清性優異之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑。

202439910

【發明摘要】

【中文發明名稱】　3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑

【中文】

本發明針對3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑，提供一種維持目標蛋白質的功能，且粉末形狀、以及該乾燥製劑的溶解性、及蛋白質溶液的澄清性優異之組成。

本發明藉由選擇針對目標蛋白質之穩定劑以及／或者使前述穩定劑的添加量變得適當，能夠製造在維持粉末步驟中的目標蛋白質的功能之狀態下，粉末形狀、以及該乾燥製劑的溶解性、及蛋白質溶液的澄清性優異之 3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑。

【指定代表圖】　無

【發明說明書】

【中文發明名稱】　3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑

【技術領域】

【0001】本發明係關於一種3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑。

【先前技術】

【0002】血中酮體被用作反映糖尿病患者體內胰島素作用不足的程度之代謝指標，因此於臨床檢查領域中係重要的標記。血中酮體主要於肝臟內在脂肪酸的氧化過程中以代謝物之形式產生，但亦成為糖質是否作為能量源被適當地利用之指標。酮體係乙醯乙酸、3-羥丁酸及丙酮之總稱。血中酮體大部分由乙醯乙酸及3-羥丁酸所佔據。作為酮體之定量中所使用之酶，3-羥丁酸脫氫酶(以下亦記載為「HBDH」)為產業上有用的酶。

【0003】HBDH(E.C1.1.1.30)係作為於菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸(NAD；Nicotinamide Adenine Dinucleotide)之存在下可逆地催化下述反應之酶被大眾所知，前述反應係將3-羥丁酸進行氧化而產生乙醯乙酸及還原型NAD。作為來自微生物之酶，已知亦存在於深紅紅螺菌(Rhodospirillum rubrum)(非專利文獻1)、勒氏假單胞菌(Pseudomonas lemoignei)(非專利文獻2)、苜蓿根瘤菌(Rhizobium meliloti)(非專利文獻3)、糞產鹼菌(Alcaligenes faecalis)(專利文獻1)、類球紅細菌(Rhodobacter sphaeroides)(專利文獻2)等。

【0004】血中酮體之測定主要使用液狀試劑或酮感測器。試劑或感測器中所使用之酶多數情況下以乾燥狀態之製品(以下亦表示為「乾燥製劑」)之形式流通。使酶成為乾燥狀態之手段多種多樣。例如有下述手段：將包含酶之溶液進

行噴霧並吹送熱風而使之乾燥之噴霧乾燥法、使包含酶之溶液凍結並減壓而進行乾燥之冷凍乾燥(凍結乾燥)法等。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0005】

[專利文獻1]日本特開平8-7085號公報。

[專利文獻2]日本特開平11-318438號公報。

[非專利文獻]

【0006】

[非專利文獻1] J. Biol. Chem. 1962, 237: 603-607。

[非專利文獻2] J. Biol. Chem. 1965, 240: 4023-4028。

[非專利文獻3] J. Bacteriol. 1999, 181 (3): 849-857。

【發明內容】

[發明所欲解決之課題]

【0007】於任一種方法中，於使酶乾燥之情形時，均有時會產生如下問題：因變性導致活性損失或再溶解時生成懸浮物等。此種情形時，多數情況下要添加穩定劑以避免將酶蛋白質以單質乾燥。對於HBDH，先前已知有使之與牛血清白蛋白共存而凍結乾燥之技術。但是，就與牛傳染性海綿樣腦病相關之安全性之觀點而言，即便是來自動物之原料中，理想的亦為不含來自牛之原料之組成。

【0008】本案發明人等尤其是自應用於酮感測器之觀點考慮而研究了乾燥製劑組成。於酮感測器中，由HBDH及穩定劑所構成之乾燥製劑的吸濕性關係

到感測器性能的劣化。具體而言，可認為絲胺酸或麩醯胺酸等胺基酸因具有胺基或羧基等親水基，這些親水基會吸附水而具有吸濕性。另外，關於鹽類，亦已知氯化鈣等鹽類具有潮解性。

【0009】另一方面，為了使酮感測器中固定於感測器晶片的表面上之酶藉由極微量的血液液體溶解而藉此開始酶反應，要求藉由試樣中的一點點水分便能夠將酶溶解之程度的適度的親水性。

【0010】本發明之目的之一在於提供一種適於酮感測器等之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑。

[用以解決課題之手段]

【0011】本發明包含以下之項中所記載之態樣。

【0012】

項1.

一種3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑，係包含3-羥丁酸脫氫酶、親水性聚合物、及醣類(1種以上之醣類)而成。

項2.

如項1所記載之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑，其中醣類為雙醣類以及／或者糖醇。

項3.

如項1或2所記載之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑，其中親水性聚合物的含有濃度為總蛋白質的含有濃度之1%至30%，或者親水性聚合物的含量相對於蛋白質為1%至30%。

項4.

如項1至3中任一項所記載之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑，其中醣類(於2種以上之情形時為各自)的含有濃度為總蛋白質的含有濃度之1%至60%，或者醣類的含量相對於蛋白質為1%至60%。

項5.

如項1至4中任一項所記載之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑，其中親水性聚合物的含有濃度為總蛋白質的含有濃度之1%至30%，醣類(於2種以上之情形時為各自)的含有濃度為總蛋白質的含有濃度之1%至60%；或者親水性聚合物的含量相對於蛋白質為1%至30%，及醣類的含量相對於蛋白質為1%至60%。

項6.

如項1至5中任一項所記載之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑，其中親水性聚合物的含有濃度為總蛋白質的含有濃度之1%至20%，醣類(於2種以上之情形時為各自)的含有濃度為總蛋白質的含有濃度之1%至40%；或者親水性聚合物的含量相對於蛋白質為1%至20%，及醣類的含量相對於蛋白質為1%至40%。

項7.

如項1至6中任一項所記載之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑，其中親水性聚合物的含有濃度為總蛋白質的含有濃度之1%至10%，醣類(於2種以上之情形時為各自)的含有濃度為總蛋白質的含有濃度之1%至20%；或者親水性聚合物的含量相對於蛋白質為1%至10%，及醣類的含量相對於蛋白質為1%至20%。

項8.

如項1至7中任一項所記載之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑，其中親水性聚合物為非離子性聚合物。

項9.

如項1至8中任一項所記載之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑，其中親水性聚合物為聚乙烯吡咯啶酮。

項10.

如項1至9中任一項所記載之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑，其中醣類由雙醣類及糖醇所構成。

項11.

如項2至10中任一項所記載之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑，其中雙醣類為蔗糖，糖醇為甘露醇。

[發明功效]

【0013】藉由本發明，能夠提供一種適於酮感測器等之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑。例如，藉由使針對目標蛋白質之穩定劑的種類及添加量進行最佳化，能夠製造在維持粉末步驟中的目標蛋白質的功能之狀態下，粉末形狀、以及該乾燥製劑的溶解性、及蛋白質溶液的澄清性優異之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑。

【實施方式】

【0014】以下，詳細說明本發明。本發明中所使用之HBDH係指於菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)之存在下作用於3-羥丁酸而可逆地催化下述反應之酶，前述反應係將3-羥丁酸氧化而產生乙醯乙酸及還原型NAD。本發明中所使用之HBDH的來源並無特別限定，可為任何物質，亦可為由基因重組體所製造之物質。

【0015】於本發明中，乾燥製劑係指經過下述步驟所獲得之製劑，前述步驟係使用凍結乾燥或風乾等發明所屬技術領域中具有通常知識者通常可使用之

乾燥手段將包含上述HBDH之組成物進行乾燥。乾燥手段並無特別限定，但就儘量防止酶活性損失之觀點而言，尤佳為凍結乾燥。

【0016】 本發明之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑的特徵在於，使親水性聚合物及醣類(1種以上之醣類)共存。

【0017】 親水性聚合物係指例如藉由包含極性官能基或帶電官能基而顯示水溶性，從而能夠與水或其他極性物質相互作用或能夠溶解於水或其他極性物質之聚合物。具體而言，可例舉：聚乙烯吡咯啶酮、聚乙二醇、聚乙烯亞胺、聚乙烯醇等非離子性聚合物。尤佳為聚乙烯吡咯啶酮。親水性聚合物的平均分子量較佳為10,000至40,000，更佳為15,000至35,000，進而較佳為20,000至30,000。平均分子量可藉由慣用的方法(例如HPLC(High Performance Liquid Chromatography；高效液相層析法))進行測定。

【0018】 作為醣類，例如可例舉：單醣類、雙醣類、多醣類、糖醇等。這些醣類中，較佳為雙醣類以及／或者糖醇。作為雙醣類，例如可例舉：蔗糖、乳糖、麥芽糖、蜜二糖等。另一方面，作為糖醇，例如可例舉：甘露醇、赤藻糖醇、乳糖醇、麥芽糖醇、山梨糖醇、木糖醇等。雙醣類及糖醇可僅使用一者，亦可併用兩者。尤佳為併用蔗糖及甘露醇。

【0019】 添加這些穩定劑之目的在於，抑制凍結乾燥步驟中的HBDH的酶活性損失，提升所獲得之乾燥製劑的粉末形狀、以及溶解性、酶溶解液的澄清性，因此可在能夠實現前述目的之範圍內適宜設定添加量。因此，雖無特別限定，但親水性聚合物的含有濃度係例如HBDH的含有濃度或者於含有除HBDH以外之蛋白質之情形時為總蛋白質的含有濃度(將280nm的吸光度1設為1mg/mL之情形時的濃度)之1%至35%，較佳為1%至30%，更佳為1%至25%，進而較佳為1%

至20%，進而更佳為1%至15%，尤佳為1%至10%。醣類(於2種以上之情形時為各自)的含有濃度係例如HBDH的含有濃度或者於含有除HBDH以外之蛋白質之情形時為總蛋白質的含有濃度(將280nm的吸光度1設為1mg/mL之情形時的濃度)之1%至65%，較佳為1%至60%，更佳為1%至50%，進而較佳為1%至40%，進而更佳為1%至30%，尤佳為1%至20%。本說明書中，「含有濃度」可改稱為「含量」或「固形物成分含量」等。於一實施形態中，於使用聚乙烯吡咯啶酮、蔗糖、及甘露醇之情形時，HBDH之固形物成分含量或者於含有除HBDH以外之蛋白質之情形時相對於總蛋白質之固形物成分含量，聚乙烯吡咯啶酮為1%至30%、蔗糖為1%至60%、甘露醇為1%至60%，更佳為聚乙烯吡咯啶酮為1%至20%、蔗糖為1%至40%、甘露醇為1%至40%，進而較佳為聚乙烯吡咯啶酮為1%至10%、蔗糖為1%至20%、甘露醇為1%至20%。乾燥製劑中的HBDH的含有濃度相對於總蛋白質的含有濃度為50%以上，較佳為70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、或99%以上。於一實施形態中，乾燥製劑中所含之蛋白質可僅為HBDH。

【0020】本發明之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑中，除上述成分以外，可視需要含有任意成分，前述任意成分的組成並無特別限定。作為任意成分，例如可例舉緩衝劑。作為緩衝劑，可適宜添加於pH值4至9之範圍內具有緩衝能力之緩衝劑，例如可例舉：硼酸、三羥甲基胺基甲烷鹽酸鹽(Tris-HCl；tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride)、磷酸鉀等緩衝劑；或ACES(N-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid；N-(2-乙醯胺基)-2-胺基乙磺酸)、BES(N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid；N,N-雙(2-羥乙基)-2-胺基乙磺酸)、

Bis-Tris(bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methane；雙(2-羥乙基)胺基-三(羥甲基)甲烷)、CHES(2-(cyclohexylamino)ethanesulfonic acid；2-(環己胺基)乙磺酸)、EPPS(4-hydroxyethylpiperazine-1-propanesulfonic acid；4-羥乙基哌嗪-1-丙磺酸)、HEPES(4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid；4-(2-羥乙基)哌嗪-1-乙磺酸)、HEPPSO(N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-2-hydroxypropanesulfonic acid sodium salt；N-(2-羥乙基)哌嗪-N'-(2-羥基丙磺酸)鈉鹽)、MES(2-morpholinoethanesulfonic acid；2-嗎啉乙磺酸)、MOPS(3-morpholinopropanesulfoinc acid；3-嗎啉丙磺酸)、MOPSO(3-(N-morpholino)-2-hydroxypropanesulfonic acid；3-(N-嗎啉基)-2-羥基丙磺酸)、PIPES(piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)；哌嗪-N,N'-雙(2-乙磺酸))、POPSO(piperazine-1,4-bis(2-hydroxypropanesulfonic acid)；哌嗪-1,4-雙(2-羥基丙磺酸))、TAPS(N-[tris(hydroxymethyl)methyl]-3-aminopropanesulfonic acid；N-[三(羥甲基)甲基]-3-胺基丙磺酸)、TAPSO(3-[tris(hydroxymethyl)methyl]-3-amino-2-hydroxypropanesulfonic acid；3-[三(羥甲基)甲胺]-3-胺基-2-羥基丙磺酸)、TES(Tris-EDTA-SDS；三羥甲基胺基甲烷-乙二胺四乙酸-十二烷基苯磺酸鈉)、三(羥甲基)甲基甘胺酸(Tricine)等古德氏緩衝劑(Good's buffer)。另外，亦可例舉以如鄰苯二甲酸、順丁烯二酸、戊二酸等之類的二羧酸為基礎之緩衝劑。這些緩衝劑中，可僅應用1種，亦可使用2種以上。進而，亦可為包含除上述緩衝劑以外之成分之1種以上之複合組成。

【0021】另外，亦可視需要包含EDTA(Ethylene Diamine Tetraacetic Acid；乙二胺四乙酸)等螯合劑、以及／或者聚氧乙烯(10)辛基苯基醚(TritonX-100)、聚氧乙烯山梨糖醇酐單月桂酸酯(Tween20)等界面活性劑。另外，作為這些成分的

添加濃度，只要為具有緩衝能力之範圍，則並無特別限定，較佳的上限為20mM以下，更佳為10mM以下。較佳的下限為1mM以上。於本發明之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑中，緩衝劑的含量雖無特別限定，但較佳為0.1%(質量比)以上，尤佳為於0.5%至2%(質量比)之範圍內使用。

【0022】供於乾燥步驟之酶溶液較佳為以蛋白質濃度計按照A280(將A280=1設為1mg/mL)為25±8、更佳為25±4、進而較佳為25±2之方式調整濃度。於供於乾燥步驟之酶的濃度為上述範圍之情形時，多數情況下乾燥步驟中回收率不會降低，所獲得之乾燥製品成為容易操作之形狀。另外，乾燥不耗費時間。

【0023】作為本發明之較佳實施形態之一，可例舉一種3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑，其特徵在於，含有聚乙烯吡咯啶酮以及蔗糖及甘露醇。該3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑可藉由上述方法進行製造，例如可採取如乾燥粉末或凍結乾燥製劑之類的形態。

【0024】藉由本發明，能夠降低3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑的吸濕性。本發明中所謂的低吸濕性係指將乾燥製劑於濕度70%、25℃之條件下保存6小時後，利用刮勺等將粉末混合時，不存在粉末變化為黏土狀或吸附於刮勺之情況。

【0025】藉由本發明，能夠提升3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑的溶解性。本發明中所謂的高溶解性係指例如使用PBS(Phosphate Buffered Saline；磷酸鹽緩衝生理鹽水)緩衝液等將乾燥製劑溶解成約1KU/mL之酶濃度，蛋白質迅速溶解，而不會因凝集等處於未溶解之狀態。

【0026】藉由本發明，能夠提升3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑的澄清性。本發明中所謂的高澄清性係指例如使用PBS緩衝液等將乾燥製劑溶解成約1KU/mL之酶濃度，於溶解液中未產生浮游物或懸浮物。

【0027】 藉由本發明，能夠提升3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑的穩定性。本發明中所謂的高穩定性係指將乾燥製劑於37℃保存1週後所維持之HBDH活性之殘存率(%)相較於不添加任何穩定劑之情形為增大或至少得以維持。

【0028】 具體而言，可按照下述方式來評價穩定性是否提升。

後述之HBDH活性之測定方法中所記載之活性測定法中，測定進行乾燥化後的乾燥品每單位質量的HBDH活性值(a)、及於固定溫度保存固定時間後的乾燥品每單位質量的HBDH活性值(b)，求出測定值(b)相對於將測定值(a)設為100之情形之相對值((b)/(a)×100)。將前述算出之相對值設為活性殘存率。然後，比較有無添加該化合物，於藉由添加而使活性殘存率增大之情形時，判斷為穩定性提升。

【0029】 HBDH活性之測定方法

試劑

100mM Tris-HCl緩衝液(pH值8.5；25℃)

158mM 3-羥丁酸溶液

27.9mM NAD^+溶液

將上述Tris-HCl緩衝液2.3mL、3-羥丁酸溶液0.5mL、NAD^+溶液0.2mL混合而製成反應試劑。

【0030】 測定原理

D-3-羥丁酸＋NAD^+→乙醯乙酸＋NADH＋H^+

藉由340nm之吸光度測定來評價藉由上述反應而產生之NADH之增加。

【0031】 酶活性的定義

將於下述反應條件下在1分鐘內催化生成1μmol之NADH之酶量設為1U(U=μmol/min)。

【0032】 測定方法

具體而言，HBDH活性可按照下述方式來進行測定。

量取由0.1M Tris-HCl(pH值8.5)、25mM DL-3-羥丁酸鈉、1.8mM NAD^+所構成之反應液3mL置於光程長度1cm之石英比色管中，於37℃進行5分鐘預加熱。向前述石英比色管中添加樣品100μL並緩慢地混合後，利用控制為37℃之分光光度計記錄對於340nm之吸光度2分鐘至3分鐘。根據表示吸光度之線性增加之部分求出每一分鐘的吸光度變化(ΔOD)，基於式(1)算出HBDH活性。樣品係以HBDH活性成為0.15U/mL至0.5U/mL之方式，利用酶稀釋緩衝液(包含0.1%BSA(Bovine Serum Albumin；牛血清白蛋白)之0.1M Tris-HCl(pH值8.5))適宜稀釋。盲檢可將樣品替換為酶稀釋緩衝液來進行實施。

【0033】 [數學式1]

$$HBDH(U/mL) = (\Delta OD_{試驗組} - \Delta OD_{空白組}) \times 3.1 \times 稀釋倍率/(6.22 \times 1.0 \times 0.1) \quad \ldots(1)$$

【0034】 此處，3.1係反應液的液量(mL)，6.22係NADH對於340nm之毫莫耳分子吸光係數($cm^2/\mu mol$)，1.0係吸光度吸收槽的光程長度(cm)，0.1係酶溶液的液量(mL)。

[實施例]

【0035】 以下，藉由實施例更詳細地說明本發明，但本發明並不特別限定於以下例。

【0036】 產生HBDH之大腸桿菌之培養

向大腸桿菌JM109(DE3)株之化學勝任細胞(chemically competent cells)中添加包含HBDH基因之質體pET-24b(+)-HBDH，藉由熱休克法進行轉形。利用SOC(Super Optimal broth with Catabolite repression；具分解代謝物抑制作用之超級優質培養液)培養基進行恢復培養後，接種至包含0.5%葡萄糖及100mg/L之硫酸卡那黴素之LB(Luria-Bertani；盧里亞-貝爾塔尼)瓊脂培養基，於37℃進行整夜培養而獲得轉形體之群落。刮取數個所獲得之群落，接種細菌至包含0.5%之葡萄糖及100mg/L之硫酸卡那黴素之LB培養基50mL，於30℃振盪16小時而進行菌種培養。其次，向鋪埋於10L容積之缸式發酵槽中之7L之培養基(組成如表1所示)中添加70mL之菌種培養液，於30℃進行正式培養。於OD660達到7之時點(自培養開始起約8小時後)添加最終濃度0.4mM之IPTG(Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside；異丙基-β-D-硫代半乳糖苷)，進而進行16小時之培養。於培養結束時抽取樣品，分析菌體破碎液的HBDH活性。

【0037】[表1]

成分	濃度(g/L)
酵母蛋白胨	14
酵母萃取物	18
甘油	8
山梨糖醇	4
葡萄糖	5
磷酸二氫鉀	12.5
磷酸氫二鉀	2.3
ADEKA NOL LG-126	0.2
硫酸卡那黴素	0.1

【0038】HBDH之純化

利用離心分離收集以上述方式獲得之菌體，使前述菌體懸浮於50mM磷酸緩衝溶液(pH值7.5)，以流速160mL/分鐘送液至法式壓碎機(Niro Soavi製造)，以700bar至800bar進行破碎，去核酸處理後，進行離心分離而獲得上清液。以成為

0.6飽和之方式向所得上清液中緩慢地添加硫酸銨(住友化學股份有限公司製造)，於室溫攪拌30分鐘後，使目標蛋白質沈澱，利用離心分離收集沈澱，並使所收集之沈澱再溶解於50mM磷酸緩衝溶液(pH值7.5)。然後，實施利用Sephadex G-25管柱之凝膠過濾、利用DEAE(diethylaminoethyl；二乙胺乙基)-瓊脂糖凝膠管柱之陰離子交換層析法(溶出條件係一同施加0M至1M之氯化鈉濃度梯度而提取峰值組分(peak fraction))及利用苯基-瓊脂糖凝膠管柱之疏水層析法(溶出條件係一同施加25%飽和至0%之硫酸銨濃度梯度而提取峰值組分)，進而藉由利用G-25瓊脂糖凝膠管柱之凝膠過濾去除硫酸銨而獲取HBDH溶液。

【0039】 乾燥製劑之製備

製備於以上述方式獲取之HBDH溶液中含有各種添加劑之溶液。HBDH溶液的濃度係以成為A280(對於280nm之吸光度)=25之方式來進行調整。各種穩定劑的添加濃度係以相對於酶濃度(將A280=1設為1mg/mL)之比率來進行計算。分子量24,500之聚乙烯吡咯啶酮、蔗糖、甘露醇係以酶濃度之30%濃度(質量比)、60%濃度、60%濃度來進行添加。具體而言，由於酶濃度之A280=25，故而以聚乙烯吡咯啶酮、蔗糖、甘露醇的最終濃度依序成為7.5mg/mL、15mg/mL、15mg/mL之方式添加各種穩定劑。添加後，進行過濾器過濾(孔徑：0.2μm)，將這些濾液準確地每2mL地分取至小玻璃瓶中。另外，對照組係準備未添加任何穩定劑之溶液。將前述溶液進行凍結真空乾燥，使水分完全蒸發後，利用刮勺進行粉碎而粉末化。利用與上述相同之手法製備變更了穩定劑的濃度之多種乾燥製劑(將各水準顯示於表2)，並用於以下之試驗。

【0040】 [表2]

水準	組成(相對於A280之添加量(%))		
	PVP	蔗糖	甘露醇
1	無	無	無
2	30	60	60
3	20	40	40
4	10	20	20

【0041】 FDR(freeze-dried；凍結乾燥)產率

測定凍結乾燥前的總HBDH活性(將此時的活性值設為(a))。繼而，測定凍結乾燥後的總HBDH活性(將此時的活性值設為(b)，作為粉末效價顯示於表3)。活性殘存率係求出測定值(b)相對於將測定值(a)設為100%之情形之相對值((b)/(a)×100)，將該相對值設為活性殘存率(FDR產率)。

【0042】 粉末形狀試驗

準確地稱量粉碎後之約10mg之粉末製劑放入包藥用紙中，按照以下之基準來進行判定。

++：不存在1mm以上之固形物。

+：存在1個以上至未達10個之1mm以上之固形物。

-：存在10個以上之1mm以上之固形物。

【0043】 溶解性試驗

準確地稱量約10mg之粉末製劑放入燒杯中，以濃度成為約0.25KU/mL之方式添加PBS緩衝液。然後，計測直至完全溶解為止的時間，按照以下之基準來進行判定。

++：完全溶解之時間為5秒以下。

+：完全溶解之時間超過5秒至10秒以下。

-：完全溶解之時間超過10秒。

【0044】 澄清性試驗

準確地稱量約10mg之粉末製劑放入燒杯中，以濃度成為約0.25KU/mL之方式添加PBS緩衝液。於室溫緩慢地攪拌約1小時後，利用分光光度計測定OD660，按照以下之基準來進行判定。

++：OD660為10以下。

+：OD660超過10至未達70。

-：OD660超過70。

【0045】 吸濕性試驗

準確地稱量約10mg之粉末製劑放入離心管(spitz roll)中，於濕度70%、25℃之條件下保存7小時後，利用刮勺進行混合，按照以下之基準來進行判定。

++：形狀相較於吸濕前無變化。

+：雖與吸濕前不同，但未成為黏土狀，亦未吸附於刮勺。

-：成為黏土狀或吸附於刮勺。

【0046】 穩定性試驗

測定進行乾燥化後的乾燥品每單位重量的HBDH活性值(a)、及於37℃保存一週後的乾燥品每單位重量的HBDH活性值(b)，求出測定值(b)相對於將測定值(a)設為100之情形之相對值((b)/(a)×100)。將前述算出之相對值設為活性殘存率。然後，比較有無添加該化合物，於藉由添加而使活性殘存率增大之情形時，判斷為穩定性提升。

【0047】 將粉末製劑的凍結乾燥處理後的HBDH活性(粉末效價)及FDR產率的結果顯示於表3。粉末效價於任一水準均超過300U/mg，該值作為實用範圍

而言無問題。關於FDR產率，與未添加任何穩定劑之溶液相比，藉由添加聚乙烯吡咯啶酮、蔗糖、及甘露醇，於任一水準殘存活性率均得到提升。

【0048】 [表3]

水準	粉末效價(U/mg)	FDR產率(%)
1	696	85
2	349	93
3	419	95
4	527	99

【0049】 將粉末形狀試驗的結果顯示於表4。關於粉末形狀，於未添加任何穩定劑之溶液及水準4時未確認到1mm以上之固形物成分。其他水準與未添加任何穩定劑之溶液相比存在較多固形物，但判斷為實用時無問題之程度。

【0050】 [表4]

水準	粉末形狀
1	++
2	+
3	+
4	++

【0051】 將溶解性試驗的結果顯示於表5。關於溶解性，由於水準3及水準4以短時間溶解，故而可見溶解性提升。水準2以與未添加任何穩定劑之溶液同等之時間溶解。

【0052】 [表5]

水準	溶解性
1	-
2	-
3	+
4	++

【0053】 將澄清性試驗的結果顯示於表6。關於澄清性，水準4的OD660值最小，亦未產生浮游物或凝集物。水準2及水準3與未添加任何穩定劑之溶液相比OD660值較小。

【0054】 [表6]

水準	OD660	澄清性
1	85	-
2	63	+
3	18	++
4	5	++

【0055】 將吸濕性試驗的結果顯示於表7。關於吸濕性，水準4為與吸濕前同等之形狀。未添加任何穩定劑之溶液吸附於刮勺，形狀變化為黏土狀。水準2及水準3雖與吸濕前不同，但未成為黏土狀，亦未吸附於刮勺。

【0056】 [表7]

水準	吸濕性
1	-
2	+
3	+
4	++

【0057】 將穩定性試驗的結果顯示於表8。與未添加任何穩定劑之溶液相比，藉由添加聚乙烯吡咯啶酮、蔗糖、及甘露醇，於任一水準穩定性均得到提升。

【0058】 [表8]

水準	穩定性(%)
1	65
2	95
3	93
4	98

[產業可利用性]

【0059】 本發明之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑尤其是對於測定酮體之試劑或感測器而言有用，因此可期待能夠廣泛地用於以臨床檢查領域、診斷醫療領域為代表之生命科學領域之產業中。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑，係包含3-羥丁酸脫氫酶、親水性聚合物、及醣類而成。

【請求項2】 如請求項1所記載之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑，其中醣類為雙醣類以及／或者糖醇。

【請求項3】 如請求項1所記載之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑，其中親水性聚合物的含有濃度為總蛋白質的含有濃度之1%至30%。

【請求項4】 如請求項1所記載之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑，其中醣類的含有濃度為總蛋白質的含有濃度之1%至60%，於前述醣類為2種以上之情形時，前述醣類的含有濃度為2種以上之醣類各自的含有濃度。

【請求項5】 如請求項1所記載之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑，其中親水性聚合物的含有濃度為總蛋白質的含有濃度之1%至30%，醣類的含有濃度為總蛋白質的含有濃度之1%至60%，於前述醣類為2種以上之情形時，前述醣類的含有濃度為2種以上之醣類各自的含有濃度。

【請求項6】 如請求項1所記載之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑，其中親水性聚合物的含有濃度為總蛋白質的含有濃度之1%至20%，醣類的含有濃度為總蛋白質的含有濃度之1%至40%，於前述醣類為2種以上之情形時，前述醣類的含有濃度為2種以上之醣類各自的含有濃度。

【請求項7】 如請求項1所記載之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑，其中親水性聚合物的含有濃度為總蛋白質的含有濃度之1%至10%，醣類的含有濃度為總蛋白質的含有濃度之1%至20%，於前述醣類為2種以上之情形時，前述醣類的含有濃度為2種以上之醣類各自的含有濃度。

【請求項8】 如請求項1所記載之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑，其中親水性聚合物為非離子性聚合物。

【請求項9】 如請求項1所記載之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑，其中親水性聚合物為聚乙烯吡咯啶酮。

【請求項10】 如請求項1所記載之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑，其中醣類由雙醣類及糖醇所構成。

【請求項11】 如請求項2或10所記載之3-羥丁酸脫氫酶乾燥製劑，其中雙醣類為蔗糖，糖醇為甘露醇。