

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00817003.7

[51] Int. Cl.

C12N 5/00 (2006.01)

A61K 47/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 11 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 1286969C

[22] 申请日 2000.12.7 [21] 申请号 00817003.7

[30] 优先权

[32] 1999.12.14 [33] US [31] 60/170,850

[86] 国际申请 PCT/US2000/033337 2000.12.7

[87] 国际公布 WO2001/044441 英 2001.6.21

[85] 进入国家阶段日期 2002.6.11

[71] 专利权人 热生物之星公司

地址 美国科罗拉多州

共同专利权人 旭化成株式会社

[72] 发明人 J·W·斯蒂费恩斯 L·潘扎雷拉

审查员 马秋娟

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 赵蓉民

权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 1 页

[54] 发明名称

多肽和抗原的稳定稀释剂

[57] 摘要

本发明描述了用于稳定多肽或抗原的组合物。这些组合物用于稳定储存在水溶性配方中的多肽或抗原。这种配方可以用于多种分析或其他方法中。

1. 一种水溶性试剂组合物,其中包括缓冲液,血清,甘油,选自氯化钾、氯化钠、氯化镁、硫酸镁和氯化钙的盐,选自乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸和乙二胺四乙酸的螯合剂,选自3-[(3-胆胺丙基)二甲基氨]-1-丙烷磺酸酯、胆酸、脱氧胆酸、毛地黄皂苷、n-十二烷基-β-D-麦芽糖化合物、甘氨脱氧胆酸、n-月桂酰肌氨酸、十二烷基硫酸、皂草苷、聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯和聚乙二醇 P-1,1,3,3-四甲基丁基苯基醚的去垢剂和防腐剂,其最终 pH 值是 7.5-8.5,其中所述组合物不包括 N-十二烷酰-N-甲基甘氨酸或癸酰基 N-甲基葡萄糖酸酰胺。

2. 如权利要求 1 所述的水溶性试剂组合物,其中所述的血清是胎牛血清。

3. 如权利要求 1 所述的水溶性试剂组合物,其中所述的盐是氯化钠。

4. 如权利要求 1 所述的水溶性试剂组合物,其中所述的螯合剂是乙二胺四乙酸。

5. 如权利要求 1 所述的水溶性试剂组合物,其中所述的去垢剂是聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯。

6. 如权利要求 1 所述的水溶性试剂组合物,其中所述的防腐剂是溴化三甲基十四烷基铵和庆大霉素。

7. 如权利要求 1 所述的水溶性试剂组合物,其中所述的缓冲液是磷酸钠。

8. 如权利要求 1 所述的水溶性试剂组合物,其中所述的缓冲液是磷酸钠,所述的血清是胎牛血清,所述的盐是氯化钠,所述的螯合剂是乙二胺四乙酸,所述的去垢剂是聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯,且所述的防腐剂是溴化三甲基十四烷基铵和庆大霉素。

9. 如权利要求 1 所述的水溶性试剂组合物, 进一步包括一种组织培养基或几种组织培养基。

10. 如权利要求 9 所述的水溶性试剂组合物, 其中所述的组织培养基是 Eagle 氏基本培养基。

11. 如权利要求 1 所述的水溶性试剂组合物, 其中水溶性试剂组合物包括 50mM 到 100mM 的磷酸钠, 2%到 20% v/v 的胎牛血清, 2.5%到 10% v/v 的甘油, 50mM 到 2M 的氯化钠, 10mM 到 15mM 的乙二胺四乙酸, 0.05%到 0.1% v/v 的聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯, 0.01% w/v 的溴化三甲基十四烷基铵和 0.5% w/v 的硫酸庆大霉素, 并且其终 pH 值是 7.5-8.5。

12. 权利要求 1 所述的水溶性试剂组合物在用于稳定抗原或多肽中的用途。

13. 如权利要求 12 所述的用途, 其中所述的血清是胎牛血清。

14. 如权利要求 13 所述的用途, 其中该抗原或多肽来源于一种微生物。

15. 如权利要求 14 所述的用途, 其中所述的微生物是一种病毒。

16. 如权利要求 14 所述的用途, 其中所述的微生物是一种细菌。

17. 如权利要求 15 所述的用途, 其中所述的病毒是流感病毒。

18. 如权利要求 17 所述的用途, 其中所述的流感病毒是 B 型流感病毒。

19. 如权利要求 13 所述的用途, 其中所述的抗原是核蛋白。

多肽和抗原的稳定稀释剂

发明领域

本发明涉及用于稳定多肽和抗原的含水组合物。在分析方法中例如抗原专一性检测中，和其他将多肽和抗原稳定在水溶液中有好处的制药上的用途中，稳定的多肽和抗原是有用的。

背景技术

下面是对此处公开的本发明具有潜在相关性的文献的讨论。但是，此处讨论中的参考文献无一被承认为在先技术。

在水溶液中稳定多肽和抗原通常是困难的。例如，室温下长期存放这种溶液会导致水溶液中的多肽或抗原的变质。特别是，已经记录到当细菌、病毒和其他微生物抗原储存在水溶液介质中时是不稳定的。一个实例是有包膜病毒，例如正粘病毒科的流感病毒含有在溶液中广谱温度下随时间而降解的抗原。本技术领域的一般技术人员明白多种细菌抗原，例如一些毒素在溶液中的稳定也是困难的。为了避免水溶液中的变质，本技术领域的技术人员已经采用了冷冻干燥法和冷冻法作为保存多肽和抗原的方法。实际上，广泛使用冷冻干燥法和冷冻法表明了在水溶液中保存这种成分的缺点和困难。

无数本技术领域的出版物公开了增加冷冻干燥试剂稳定性的方法以及甚至本技术的工艺水平的内在困难。例如，美国专利 5,955,448、4,496,537 和 PCT 申请 WO 97/04801 均公开了冷冻干燥技术上的改进。但是，对生产者和终端使用者而言，冷冻干燥蛋白包括溶液带来了高成本和不便，同时引入了复原错误和污染的新增风险。并且，溶液的冷冻需要特定设备，而且发生重复周期性变化时，最终会导致蛋白降解。就商业用途而言，水溶液中多肽和抗原的变质损失惨重，因为那样的溶液在仅仅很短的储存周期后就需要更换。

本发明涉及一种能增加溶液中的多肽和其他非蛋白类化合物稳定性的水溶性稳定试剂或稀释剂。抗原例如碳水化合物、蛋白质、脂蛋

白、脂多糖、多糖、核酸、核蛋白以及与蛋白质、脂类和其他化合物复合的碳水化合物是可用本发明稳定的抗原类型的说明性实例。通过使用新的试剂成分，本发明提高了多肽和抗原在当前商业化的稀释剂或本技术领域所述稀释剂中的稳定性。本发明特别适用于稳定用作诊断或其他用途的对照试剂的抗原和多肽，因为这些用途中需要这些成分的稳定水溶液。本发明所述的稳定稀释剂用于在 2-8°C、室温和约 45°C 下稳定多肽和抗原储存更长的时间。

PCT 申请 WO99/15901 公开了一种用于稳定抗原的的稀释剂，特别是丙型肝炎病毒抗原。该丙型肝炎病毒抗原稀释剂包括一种还原性试剂，使丙型肝炎病毒抗原保持在还原状态。该出版物报道在稀释剂中包含还原性试剂将丙型肝炎病毒抗原的免疫反应性保持长达 7 天。报道的稀释剂还包括磷酸钠，pH6.5（或其他缓冲液），EDTA（或其螯合剂），DTT（或其他还原剂），明胶（或其他蛋白封闭源），硫氰酸铵（或其他离液剂），叠氮化钠（或其他防腐剂）和 SDS（或其他去垢剂）。但是，稀释剂中包含还原剂可能对来自其他微生物的许多的抗原的稳定性无效或有害。

美国专利 4,956,274 涉及对用于互补分析的来自 β -半乳糖苷酶的抗体片段的稳定技术。其中公开的溶液中含有来自糖残基的离子型表面活性剂或表面活性剂，以便减缓 β -半乳糖苷酶的抗体片段的降解。但是，表面活性剂也使酶片段变性，所以不得不除去或使其失效，以便酶片段恢复它们的正确构象、恢复酶活性，这表明该溶液不能稳定蛋白的天然形态。表面活性剂恰在分析前用环化糊精使其失效。表面活性剂的作用也可以高浓度血清掩蔽。公开试剂的附加成分包括螯合剂，缓冲液，杀菌剂，镁或其他离子，还原剂，增溶剂例如溶剂乙二醇，和非离子型去垢剂。正如本技术领域的技术人员所觉察到那样，蛋白或酶片段的变性或复性可能损坏一些抗原决定簇，使它们失活。

美国专利 5,459,033 描述了一种用于防止病毒聚集的溶液。报道的溶液中含有 N-月桂肌氨酸或其他阴离子表面活性剂。据说该溶液加强了稳定性，其基于病毒体粒子，特别是肝炎病毒和疱疹病毒由于疏水吸引发生聚集从而降低了敏感性。未报道该稀释剂改良或保护了抗原的酶活性或免疫源性，但报导该稀释剂阻止了聚集。而且，报道说，

在使用该溶液前，必须在 2-35℃ 中温育 15 小时到 10 天，以确保相容的稳定性，这就对终产品的生产增加了一个重要的限定性。

美国专利 5,660,978 公开了一种通过将其掺入到抗原（例如血清）、抗原专一性抗体或抗体片段（特别是 Fab）的浓缩溶液中来稳定一种抗原以便防止蛋白水解或氧化，特别是一种不稳定蛋白抗原，尤其是一种酶。引入血清或非专一性的 IgG 将不会提供期望的保护或是对这种稀释剂的专一性的保护。而且，稳定是在将抗原置于稀释剂中之前完成的。相反，本发明是由稀释剂本身稳定的。并且，本发明从一开始就对一种相对稀释的溶液进行稳定，而不是象已经获得专利的所述发明那样显示在一定阶段。使用抗体结构化稳定抗原是成问题的，特别在一个或几个抗原位点是免疫分析的靶标时。并且，本技术领域的技术人员将在制备如同 5,660,978 专利所公布的稀释剂方面存在困难，其中这些稀释剂保护抗原构型，但是不抑制专一性酶活性。由于该发明本质上使用抗体部分作为固定剂，而不是化学固定剂，所以，没有真正描述一种稳定稀释剂。

Landi,S 和 Held, HR(Tubercle 59(1978)121-133)报道了将去垢剂土温-80 (Tween-80) 加入到稀释的溶液中，表明结核菌素 PPD 的稳定性由于加入这种去垢剂得以加强，因为去垢剂的抗吸附性能。由 Connaught Laboratories, LTD 生产的结核菌素制备液包括结核菌素 PPD, 0.3%苯酚（报道用作防腐剂）和 0.0005%溶于 PBS 缓冲液中的 Tween-80。苯酚是一种有害物质，本发明将不接受，并且可能使一些蛋白质变性。

尽管在稀释剂配方和冷冻干燥储存技术上取得了进步，但是仍然存在对这种稀释剂的需求，即，充分地提高了储存在溶液中的多种多肽和抗原的长期稳定性，特别是来自微生物的抗原。

发明概述

本发明主要涉及一种稳定多肽和抗原的试剂。该试剂特别适用于稳定分析过程中用到的对照或参考抗原的稳定。抗原例如碳水化合物，蛋白质，多肽，多肽片段，脂蛋白，脂多糖，多糖，核酸，核蛋白和与多肽、脂类或其他化合物复合的碳水化合物是这种类型的抗原的说

明性的实例，它们可以使用本发明稳定。

该公开的试剂在低温或高温下均超过了以前用于多肽和抗原的配方。多肽和抗原在该试剂中以可溶性方式保存，在从约 0.5°C 到高于 50°C 的多种温度情况下均可延长保存期，优选 2-8°C，室温附近（一般是约 23°C 到约 28°C，而 25°C 特别优选）和约 42°C 到约 43°C，特别是 45°C。45°C 的稳定性预示了该试剂能提供长期抗原稳定性。并且，该公开的试剂具有作为用于稳定多肽和抗原的单一水溶液的优势。

首先，本发明涉及一种用于增强多肽或抗原稳定性的水溶性的试剂组合物。在某些优选实施方案中，该试剂包括下述一种或几种成分：缓冲液，溶剂，盐，螯合剂，去污剂和防腐剂。优选地，该试剂不含有 N-十二酰-N-甲基甘氨酸或癸酰基-N-甲基葡萄糖酸酰胺。该试剂也可包括例如组织培养基质或商品化稀释剂成分。

在此所用，术语“缓冲液”是指技术人员熟知的用于减少溶液 pH 变化的组合物。优选的缓冲液具有在 pH 值 7 到 9 间提供有效缓冲的 pKa。优选缓冲液是 ACES、ADA、BES、N-二(羟乙基)甘氨酸、bis-tris、CAPS、CHES、丙二酸二乙酯、甘氨酸甘氨酸、甘氨酸胺 HCl、HEPES、HEPPS、咪唑、MES、MOPS、PIPES、POPSO、TAPSO、TES、N-[三(羟甲基)甲基]甘氨酸、三(羟甲基)氨基甲烷、碳酸氢盐和硼酸盐。特别优选地是磷酸盐缓冲液。优选的缓冲试剂的浓度小于 2M；最优选的浓度是 0.2M、0.1M、0.05M、0.02M、0.01M、0.005M、0.001M 和 0.0001M，具有的 pH 值是 7、7.25、7.5、7.75、8、8.25、8.5、8.75 和 9。

在此所用，术语“封闭剂”是指一种富含蛋白质的材料，其含有蛋白质和/或多肽的混合物，并且可能含有一种或多种添加成分，例如脂类、碳水化合物、盐和辅因子如血红素。术语“富含蛋白质”在此予以定义。该封闭剂可被用于稳定一种或多种此处所述的组合物和方法中的蛋白质、多肽和/或抗原。优选的封闭剂的 pH 值介于约 6.5 到约 8.0 之间，和/或重量摩尔渗透压浓度在约 250 到约 350mOsm/Kg H₂O 之间。特别优选的封闭剂是血清，例如马血清、新生小牛血清、小牛血清、成体牛血清、人血清、兔血清、绵羊血清等，和技术人员所知的血清取代物。最优选用作封闭剂的是胎牛血清。

在此所用，术语“富含蛋白质”是指含有蛋白质和/或多肽混合物的溶液，其中总蛋白的浓度的质量百分比在约1%到约50%之间，最优选地在3%到10%之间。例如，胎牛血清的总蛋白含量在约3%到约4.5%之间，而成体牛血清的总蛋白含量在约4.5%到约8.5%之间。

在此所用，术语“溶剂”和“增溶剂”是指具有分散该组合物的其他成分的能力的液体物质。优选的溶剂是水，甘油，二甲基亚砷，如乙醇、甲醇等醇类，丙酮，有蛋白质和/或多肽混合物的溶液，二甲基亚砷、乙腈和二甲基甲酰胺。

在此所用，术语“盐”是指用金属或功能象金属的元素代替了酸中的部分或全部酸性氢形成的一种或多种化合物。优选盐是KCl、NaCl、MgCl₂、MgSO₄和CaCl₂。优选的盐浓度在4M到0.1mM之间，最优选是在2M到50mM之间。

在此所用，术语“螯合剂”是指与金属离子结合的分子，通常结合到该分子内的两个或多个配位基上。螯合剂是本技术领域熟知物，包括某些蛋白和多肽，以及小分子物质，例如乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸(EGTA)。优选的螯合剂浓度在100mM到0.01mM之间，最优选是在20mM到1mM之间。

在此所用，术语“去垢剂”是指本领域熟知的、能够乳化油作为湿润剂的化合物。优选的去垢剂包括3-[(3-胆胺丙基)二甲基氨]-1-丙烷磺酸酯(CHAPS)、脱氧胆酸、毛地黄皂苷、n-十二烷基-β-D-麦芽糖化合物、甘氨脱氧胆酸、n-月桂酰肌氨酸、十二烷基硫酸、皂草苷、土温20(Tween 20)和曲通X-100(Triton X-100)。优选的去垢剂浓度在约0.001%到约5%之间，最优选地，组合物中包括约0.01%，0.02%，0.03%，0.04%，0.05%，0.06%，0.07%，0.08%，0.09%，0.1%，0.2%，0.3%，0.4%，0.5% 1.0% 和2%。

在此所用，术语“防腐剂”是指技术人员熟知的、防止微生物生长的化合物。优选的防腐剂包括硫柳汞、山梨酸、BHA、丁基化羟基甲苯、小杀菌素II(溴化三甲基四癸基铵)和庆大霉素、青霉素、链霉素等抗生素。优选的防腐剂浓度在10%到0.001mM之间，最优选是在1%到0.1%之间。

在此所用，术语“多肽”是指氨基酸的多聚物，但不是指特定长度的产品，所以，肽、寡肽、蛋白质及其片段均包含在该定义之内。

术语“多肽”不排除多肽的翻译后修饰，例如，糖基化作用，乙酰基化作用，磷酸化作用和类似作用。

在此所用，术语“抗原”包括碳水化合物，蛋白质，多肽，脂蛋白，脂多糖，核酸和与多肽、脂类和其他化合物复合的碳水化合物。抗原具有在具备功能免疫系统的动物体内诱导免疫反应的能力。在一个优选的实施方案中，稳定的多肽是核蛋白抗原。核蛋白抗原可以有多种来源，可以是单独的或与其他分子缔合的。

“核蛋白抗原”是指任何与核复合体缔合或吸附的多肽。

一种特别优选的核蛋白体是来自流感病毒，特别是流感病毒 B 型的核蛋白体。

“抗原稳定性”是指在试剂在一个给定的温度下储存给定的时间后，在一个分析或分析方法中，特别是诊断分析或免疫分析中，同一种试剂产生的信号保持一致的能力。一般的储存温度是从约 2°C 到约 30°C。抗原稳定性也可以通过在高温下较短时间里测定抗原变质进行评价。用于加速稳定性测试的典型温度是从约 30°C 到 60°C。

“微生物”是指原核生物，真核生物例如酵母，病毒，朊病毒或其他感染粒子。

“分析方法”是指任何允许进行一种或多种抗原检测的技术。分析方法包括任何形式的免疫分析和核酸杂交分析，这在本技术领域存在无数的实例。一种特别优选的光学免疫分析方法在美国专利 5,550,063;5,955,377 和 5,541,057 中进行了描述。

其次，本发明主要涉及一种具有稳定抗原或多肽的水溶性试剂组合物，其中抗原来自一种微生物。在一个优选的实施方案中，微生物包括病毒和/或细菌。本发明特别优选用于病毒分析物。在一个最优选的实施方案中，本发明主要涉及一种稳定来自流感病毒的抗原和多肽，特别是来自流感病毒 B 型的多肽和抗原。

再次，本发明主要涉及一种具有稳定流感病毒核蛋白，特别是来自流感病毒 B 的核蛋白的试剂组合物。

再者，本发明主要涉及一种用于稳定分析方法中用作对照或参比试剂的抗原制剂的水溶性试剂组合物。

在一个特别优选的实施方案中，该试剂包括一种缓冲液，一种封

闭剂，一种盐，一种螯合剂，一种增溶剂，一种非离子去污剂，和一种防腐剂。最优选地，本试剂不含有 N-十二酰-N-甲基甘氨酸或癸酰基-N-甲基葡萄糖酸酰胺。

在进一步的优选实施方案中，该试剂也可以包括组织培养基质，Stabilcoat[®]缓冲液 (BSI, Inc.) 和含有福尔马林灭活的含病毒细胞培养基质。

在另外的优选的实施方案中，本试剂包括磷酸钠缓冲液、胎牛血清、甘油、氯化钠、EDTA、Tween-20[®]去垢剂（聚氧乙烯失水山梨糖醇单月桂酸酯）、Microcide II[®]防腐剂（一种四胺化合物，Amresco, E423）、硫酸庆大霉素，也可能含蔗糖、组织培养液和 Stabilcoat[®] 缓冲液 (BSI, Inc)。溶液的 pH 值在 7-9 之间，最优选的是 7.5-8.5。本技术领域的技术人员理解到可用类似试剂替代以上所列的试剂，如可用 EGTA 替代 EDTA，用其它抗菌剂替代 Microcide II[®]或庆大霉素。以上所列试剂的优选浓度如下：磷酸钠：0.1 mM 至 1000 mM，更优选的是 1 mM 至 200 mM，最优选的是 50 mM 至 100 mM；胎牛血清：0.1%到 40% v/v，最优选的是 2%到 20% v/v；甘油：0.1%到 30% v/v，最优选的是 2.5%到 10% v/v；氯化钠：0.1 mM 至 4 M，最优选的是 50 mM 至 2 M；EDTA：0.01 mM 至 100 mM，更优选的是 1 mM 至 20 mM，最优选的是 10 mM 至 15 mM；Tween-20：0.001%到 1%，更优选的是 0.01%到 0.1%，最优选的是 0.5%；Microcide II：0.001%到 1% w/v，最优选的是 0.002%到 0.1% w/v；硫酸庆大霉素：0.01%到 10% w/v，更优选的是 0.002%到 0.1% w/v；蔗糖：0.01%到 5% w/v，最优选的是 0.1%到 0.5% w/v。

在特别优选的实施方案中，该稀释剂含有含量大于或等于：50 mM 磷酸钠；2% v/v 胎牛血清；10% v/v 甘油；50 mM 氯化钠；10 mM EDTA；0.05% v/v Tween-20 去垢剂；0.01% w/v Microcide II 防腐剂；0.5% w/v 硫酸庆大霉素。该试剂也可能含高达 0.5%的蔗糖，15%的 Stabilcoat[®] 缓冲液，和 20%从抗原制备物中得到或另外添加的组织培养液，溶液的优选 pH 值是 7.5-8.5。也可以用一定浓度预先配制的组织培养液[如 BioWhittaker 公司的 Eagle 基本培养基 (EMEM) 或 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基 (DMEM)]来替代缓冲液和/或盐。

最后，本发明主要涉及用于稳定微生物来源的多肽和抗原的方法。在一个优选的实施方案中，所述的方法用来稳定一种来源于微生物的抗原，该抗原在分析方法中用作对照或参照试剂，或在其它药学制备中使用。

附图简述

图 1：显示本发明所述稀释剂在稳定灭活的 B 型流感病毒中的优越性。

图 2：显示组织培养液可进一步加强本发明稀释剂稳定性的能力。

优选实施方案的详细描述

A：引言

为了容易地理解本发明，描述了适用特定应用的本试剂组合物的制备过程，即稳定流感病毒来源的抗原。然而，通过进行类似的实验，可以证实所述稳定性试剂组合物对于其他抗原或多肽具有普通效用。

在研制应用于诊断化验组分或其它应用的试剂中，对试剂长期稳定性的测定是必要的。最初，在测定该试剂的实时稳定性之前，需通过快速稳定性验证来估计该试剂的保存限期。快速稳定性验证可以很快进行，常被本技术领域的技术人员用于预测试剂的稳定性。进行验证的方法之一是将试剂在高温下孵育并在相对短时间间隔内进行测定。例如，在 37°C、45°C 和其它高温条件下孵育 3—7 天进行分析，并通过阿伦尼乌斯方程式预测试剂是否可在约 2°C—8°C 保持长时间的稳定性。该方法是现今被认为是最准确的预测试剂失效的方法。如果某试剂不能接受高温的挑战，就不可能在正常贮存条件下长期保持稳定性。高温稳定性在预测长期稳定性时稍差，这是由于它不能精确预测衰变率，但它确实可通过表明试剂失效期给出了稳定性的一个表征。由于在高温下其稳定性损失降低了，所以真正失效的可能性也是一样的。

除了高温验证之外，有必要对某试剂进行实时、长时间的研究来估计它在稳定多肽或抗原方面的潜能。本技术领域的技术人员熟知实时评估条件。例如，实时评估条件可能包括将该试剂在正常贮存温

度（2℃—8℃）或室温（18℃—30℃）下保存该试剂，直到达到试剂的失效期。

在将流感病毒作为免疫实验中阳性对照试剂的研制中，同时对在以蛋白质为主的稀释液中经福尔马林灭活的 A 型和 B 型流感病毒的稳定性进行了评价。其中分析中检测到的抗原决定基来自病毒核蛋白，灭活的 A 型流感病毒较灭活的 B 型流感病毒在单纯稀释剂及市售的稀释剂中均具更高的稳定性。为确保可用于检测 A 型和 B 型流感病毒的一种新产品的市售存活力，必需有稳定灭活的 B 型流感病毒的方法。配制了一种可保持两种类型灭活的流感病毒悬液的稳定性的稀释剂。这种稀释剂与以前的稀释剂配方相比较，更具增加溶液中灭活的 B 型流感病毒稳定性的能力，其保存期更长。

A 型流感病毒在以单纯蛋白质为主的稀释剂中很稳定。一种该类稀释剂包括牛血清白蛋白（BSA）和溶于磷酸盐缓冲液（PBS）中的 Tween-20[®]去垢剂，也称为 PBT。第二种配方是一种市售产品，称为 Stabilcoat[®]缓冲液（BSI, Inc），显示也可稳定 A 型流感病毒。然而，这两种溶液均不能稳定 B 型流感病毒。这可能是由于在化验时，单克隆抗体对不同毒株的检测是通过识别两种核蛋白上的不同抗原决定基而实现的。这些抗原决定基可能受不同的灭活和保存条件的影响。另外，对用于制备化验用的单克隆抗体的免疫原的最初制备方法不同，因此可能有利于产生识别不同相容抗原决定基的单克隆抗体。我们相信这里描述的稀释剂配方对灭活的 A 型和 B 型流感病毒的核蛋白具有类似的稳定效果。另外，认为对其它病毒和细菌蛋白具有同样的稳定效果。

应当指出的是，在病毒灭活及稀释于每种不同稀释剂的过程中固有存在灭活病毒贮存悬液成分的掺合过程。灭活病毒贮存悬液由 50% 含福尔马林灭活病毒的细胞培养液（ICC）和 50% Stabilcoat^R 缓冲液组成。每种所检测的阳性对照成分均含一定体积的贮存悬液。

B. 新稀释剂的制成

一种新的稀释剂的配制开始于一种单纯蛋白质稀释剂 PBT，包括 BSA、Tween-20 和 PBS 缓冲液溶液。每种组分在能维持或增强灭活的 A 型流感病毒稳定性的同时，需检测其稳定 B 型流感病毒的能力。由

以下方法评估所制备抗原的稳定性的增加。将灭活的病毒原料稀释成分析检测法中所需的信号强度,即对照试剂出售的信号强度。一般来讲,在相应的分析方法中,对照试剂选用从低到中的信号强度。不同试剂成分在制成所选的抗原稀释度后,即刻用合适的分析方法进行测定。各种试剂成分(含抗原)放置于不同的贮存条件,然后在该分析方法中周期性的重复检测。试剂成分在贮存条件下能保持原有信号或其原有信号强度只有少量降低时,可确定其能提供增强的稳定性。可定性、定量地、视力判定或用仪器估测信号强度。在组分的筛选过程中,对 PBT 稀释剂做了几个修改。首先,用一种不同的封闭剂,如胎牛血清代替 BSA。其次,加入增溶剂如甘油和螯合剂,如 EDTA 或 EGTA,以增强稳定性。另外,证实包含一种非离子型去垢剂,如 Tween-20[®] 去垢剂对稳定性是必需的。防腐剂如 Microcide II[®]和硫酸庆大霉素的联合使用作为抗微生物试剂包含于其中。

在一个特别优选的实施方案中,本发明的稀释剂含有大于或等于: 50 mM 磷酸钠; 2% v/v 胎牛血清; 1% v/v 甘油; 50 mM 氯化钠; 5 mM EDTA; 0.05% v/v 吐温-20 去垢剂; 0.01% w/v 四胺化合物, 0.5% w/v 硫酸庆大霉素。该试剂也可能含高达 15% 的 Stabilcoat 缓冲液,和 20% 从抗原制备物中得到或另外添加的组织培养液。溶液的优选 pH 值是 7.5-8.5。也可以用预先配制的组织培养液(如 BioWhittaker 公司的 EMEM 或 DMEM 培养液)来替代缓冲液和/或盐。

不希望受任何特定理论的限制,对原有稀释剂所作的修改可能通过以下机制增强多肽或抗原的稳定性。胎牛血清可能较 BSA 提供更丰富的蛋白质来源,这是由于胎牛血清是一种全血清产品而不是纯化的蛋白质。它可能含有其它稳定性物质。甘油可能通过氢键结合增加抗原的水化作用。螯合剂可能通过去除阳离子来增加稳定性,阳离子对多肽或抗原本身可能有负面影响,或者,阳离子对于某种能破坏抗原或多肽的降解酶的活性所必需或可能抑制抗原上的催化部位。去垢剂可能维持抗原或多肽的二级结构以及辅助缔合,并破坏不重要的或降解性的结构/相互作用。

本发明用在如上描述的一种单纯 BSA 蛋白质稀释剂(PBT)中的第一标准抗原稳定性进行了评定。一般地,在试剂研制中,如果在 45

℃使阳性保持约3天则足以用来评定其在较低温度时具有长期稳定性。那些本技术领域的技术人员相信，高温下的稳定性长达约14天表明该抗原是一种得到很好稳定的抗原。另外，某抗原在45℃保持活性的时间越长，越有可能在低温如2℃—8℃以及室温时稳定时间越长。首先，将福尔马林灭活的流感病毒贮存悬液以本技术领域公知的方式制备，并在下面的实施例1中进行了描述。然后，A型和B型流感病毒的灭活贮存液分别以1:2和1:4的比例掺入单纯蛋白质稀释剂中。在这种稀释度，在整个测试用稀释剂中，含有50%稀释剂，25% ICC，25% Stabilcoat 缓冲液，或75%稀释剂，12.5% ICC，12.5% Stabilcoat[®]缓冲液。所选的抗原稀释度提供在反应检测仪中可肉眼判定的中等阳性信号强度。两种终溶液用 FLU OLA[®]检测试剂盒 (Biostar, Inc.) 于4℃时在第0天、第3天和45℃时在第3天检测其阳性程度。按照每份包装中的文字说明进行测试。灭活的B型流感病毒于45℃时第3天失去了全部阳性，而灭活的A型流感病毒失去了部分阳性。由于试剂的失活，对以后的时间点未进行检测。PBT 蛋白质稀释剂不能维持所需程度的抗原稳定性。

另外，一种用作保护和稳定抗体包被表面的市售稀释剂，Stabilcoat[®]缓冲液 (BSI, Inc) 也用以上所述的抗原稀释物进行了检测。由 Stabilcoat[®]得到的对照试剂的稳定性按以上方法进行测定，只是检测的时间点是第0天和第4天 (4℃和45℃的保存条件)。在这些条件下，稀释剂的全部组成包括75%的 Stabilcoat[®]缓冲液和25%的 ICC。即使在组织培养液存在时，Stabilcoat[®]缓冲液不能保持灭活的B型流感病毒的稳定性超过4天，显示其缺乏长期保存的潜能。

接着，对本发明的试剂组合物按如上所述方法进行了检测，以便确定其性能。这种情况下，用于灭活的A型流感病毒时，稀释剂的全部成分包括50%稀释剂，25% ICC，和25% Stabilcoat[®]缓冲液；用于灭活的B型流感病毒时，包括75%稀释剂，12.5% ICC 和12.5% Stabilcoat[®]缓冲液。在45℃的第3天，A型和B型的灭活流感病毒均失去部分阳性，但仍明显呈阳性。灭活的B型流感病毒试剂在第7、14和21天进行了测定。最终，在45℃保存21天后，灭活的B型流感病毒失去全部阳性。以前的研究表明，灭活的A型流感病毒到第21天，也失去了

相当大比例的阳性。灭活的 A 型流感病毒在这种特定条件下增强的数据未显示，是因为其已失效而没有检测。然而，灭活的 A 型流感病毒在这种条件下的稳定性可能非常高，而且时间超过了检测的时间点。如果检测出在这种或其它分析条件下的失效，本发明的稀释剂应该也能增加 A 型流感病毒抗原的稳定性。因此，与单纯的 PBT 蛋白稀释剂和 Stabilcoat[®]比较，本发明的组合物用于保存时，具有更好的稳定溶液中抗原的能力。

在对本发明进行的另一个测定中，本发明的稳定稀释剂用于一个更敏感的光学分析方法中。该方法中的阳性对照使用福尔马林灭活的 A 型和 B 型流感病毒抗原 1:10 稀释后的稀释液，以达到这种对照溶液所需的中等信号。该检测中所用抗体的选择是根据所用包被表面类型的最适分析性能而定。检测表面的反应区域用一种优选的方法制备，即将抗 A 型和 B 型流感病毒的单克隆抗体在表面上划条纹，以使每个测试表面含一个 A 型流感病毒和一个 B 型流感病毒的反应区域。将反应表面干燥并在室温用一种防腐剂溶液再包被。抗体表面用一种热桩设备进行热封，以形成一个聚苯乙烯环，可使溶液透过或围绕渗水性表面。这种塑料环为方便操作提供一种支撑，并可提供一种将渗水性表面装到真空源上以帮助去除液体并干燥渗水性表面的方法。为达到本实验的目的，检测以直通型方式进行。直通型是指在检测过程中，样品与分析表面接触并可流过、保持在其上或周围。

该实验检测了作为本发明的稳定稀释剂的一种成分的细胞培养液 (EMEM, BioWhittaker, CAT, #12 136Q) 增加抗原稳定性的能力。制备了四种检测溶液：(A) 75%发明稀释剂，12.5% EMEM 和 12.5%Stabilcoat 缓冲液，(B) 溶液 A，其中 EMEM 另外含有 2%FCS，1% L-谷氨酰胺和 0.5%PenStrep/Fungizone (一种抗微生物溶液，BioWhittaker Cat.#17-745H)，(C) 75%发明稀释剂和 25% Stabilcoat 缓冲液，(D)单纯的发明稀释剂。分别用四种稀释剂对灭活的 B 型流感病毒贮存悬液进行了 1:10 的稀释。这是通过首先用各种检测稀释剂进行 1:4 稀释，然后再进行 1:2.5 稀释而得到的。每种溶液在 4°C 和 45°C 于第 3 天进行测定。在 45°C 的第 3 天，溶液 A 具最佳稳定性，其次是溶液 B、D 和 C。结果表明在增加抗原稀释度的条件下，在稀释剂中渗入细胞

培养液/ Stabilcoat[®]可增加抗原的稳定性（比较溶液 A 和 D 中的稳定性）。用高浓度的 Stabilcoat[®]缓冲液作为唯一的其它组成成分（溶液 C），证实不利于抗原的稳定性（相对于溶液 A）。

因此，这些结果清楚地表明，本发明在水溶液介质中稳定蛋白质抗原的能力方面明显超过其它同类型的稀释剂，特别是针对流感病毒。

以下的实施例是为了说明而不是为了限定而提供的，用于进一步说明本发明的各个方面和各种实施方案。实施例决不限定本发明的范围。

实施例

实施例 1

测定抗原稳定性是在一种单纯蛋白质稀释剂（PBT）中进行的，该稀释剂含 1X Dulbecco 氏 PBS，0.05%吐温-20 去垢剂，2%BSA，0.01%小杀菌素 II 防腐剂，和 0.5%硫酸庆大霉素。首先，由以下方法制备灭活的流感病毒贮存悬液。用 A 型流感病毒（每瓶以 1:10000 稀释 A/Hong Kong 68）或 B 型流感病毒（每瓶以 1:1000 稀释 B/Panama 45/90）感染铺满的 MDCK p83 细胞，并培养于 Eagle 氏 MEM 维持培养基中（含 2% 热灭活的 FCS，1% L-谷氨酰胺和 0.5%Pen/Strep/Fungizone），直到观察到 90—100%的 CPE（致细胞病变效应）。通过震荡并对细胞悬液离心来收集病毒。所得的上清液通过加入 37%福尔马林溶液（Sigma Chemical 生产,F-1268）至总体积的 0.2%（2 μ l/ml），并在室温孵育 1 小时而灭活。然后，将含病毒溶液与等体积的 Stabilcoat[®]缓冲液（BSI, INC）混匀、分装，使用或立即冷冻。

将灭活的 A 型和 B 型流感病毒贮存悬液分别以 1: 2 和 1: 4 的比例掺入到单纯 BSA 稀释剂中，即将 1ml 灭活的 A 型流感病毒贮存液加到 1ml 单纯稀释剂，以及在另一个容器中将 0.5ml 灭活的 B 型流感病毒贮存液加到 1.5ml 单纯稀释剂中。在这些稀释度，在整个测试稀释剂中分别含有 50% 稀释剂，25% ICC 和 25% Stabilcoat[®]缓冲液，或含有 75% 稀释剂，12.5% ICC 和 12.5% Stabilcoat[®]缓冲液。然后，每种配制好溶液用 FLU OIA[®]检测试剂盒（Biostar, Inc.）在第 0 天测定其阳性程度。检测按照每个包装内的说明进行，信号质量或阳性程度通过如下所

述分类对 FLU OLA 反应检测仪以肉眼判定：(0)阴性；(1)模糊；(2)极弱阳性；(3)极弱和弱之间阳性；(4)弱阳性；(5)弱和中等之间阳性；(6)中等阳性；(7)中等和强之间阳性；(8)强阳性结果。信号在 2—8 之间，被认为是阳性。

稀释后每种溶液被分为两部分，一部分在 4℃、另一部分在 45℃ 保存 3 天。所有四种溶液均在第 3 天以与第 0 天同样的方式进行重复检测。4℃的第 0 天对照结果是预料的中等阳性信号。灭活的 B 型流感病毒在 45℃的第 3 天失去全部阳性,而灭活的 A 型流感病毒失去一部分阳性。由于试剂已失效，因此对以后的时间点未进行测定。典型地，在试剂研制中，在 45℃阳性能保持到第 3 天足以估计较低温度下具有长期稳定性。一种试剂在 45℃活性保持越久，与在低温如 2-8℃和室温下的稳定性相关。因此，这种单纯 PBT 配方不能将抗原的稳定性维持在所需的程度。

实施例 2

Stabilcoat[®]缓冲液(BSI,Inc)，一种市售的用于保护和稳定抗体包被表面的稀释剂，用如实施例 1 中所述方法进行检测，不同的是试剂的测定是在第 0 天和第 4 天（4℃和 45℃的贮存条件）进行。注意稀释剂的完全成分是 75%Stabilcoat[®]缓冲液和 25%ICC。Stabilcoat 也不能将灭活的 B 型流感病毒抗原的稳定性保持 4 天以上，表明它缺乏长期保存的潜力。

实施例 3

接着，对本发明的试剂组合物按实施例 1 中所描述的类似实验进行检测，稀释剂总体积 20ml，配制如下：在一个圆锥管中，加入 2ml 1M 磷酸钠缓冲液和 8ml 水（100mM），混匀，调 PH 值为 7.5。然后加入 0.175g 氯化钠(150mM),混匀。接着加入 0.1ml 10% 吐温-20 溶液（0.05%）并混匀。然后，在管中加入 0.2ml 1% Microcide II[®]防腐剂贮存液（0.01%）和 0.1ml 硫酸庆大霉素（0.5%）并混匀。接着，加入 2ml 甘油（10%）和 1ml 胎牛血清（5%），混匀。再加入 0.4 ml 500mM 的 EDTA/H₂O(10mm)贮存液，混匀，调 PH 值为 7.5。加水使总体积为 20ml。

病毒检测试剂的制备是在 5ml 灭活的 A 型流感病毒贮存液中加入 5ml 稀释剂 (1:2 稀释), 或在 2.5ml 灭活的 B 型流感病毒贮存液中加入 7.5ml 稀释剂 (1:4 稀释) 并混匀。在这种情况下时, A 型流感病毒稀释液的完全成分包括 50% 稀释剂, 25%ICC, 和 25%Stabilcoat[®]缓冲液, B 型流感病毒的完全成分包括 75% 稀释剂, 12.5% ICC, 和 12.5% Stabilcoat[®]缓冲液。在每个实验的全过程中, FLU OIA[®] 检测按照每个包装中的说明进行。由于抗原稳定性的增加, 这个实验一直做到第 21 天。在 45°C 的第 3 天, A、B 两型灭活的流感病毒均失去了部分阳性, 但仍清晰地呈现阳性。灭活的 B 型流感病毒试剂在第 7、14 和 21 天进行了检测。最后, 在 45°C 的第 21 天, 灭活的 B 型流感病毒失去了全部阳性。其它研究显示, 灭活的 A 型流感病毒在同样长的时间后, 也失去了相当比例的阳性。检测结果经肉眼判断, 根据下述的 0-8 级主观分级标准: (0) 阴性; (1) 模糊; (2) 极弱阳性; (3) 极弱和弱之间的阳性; (4) 弱阳性; (5) 弱和中等之间的阳性; (6) 中等阳性; (7) 中等和强之间的阳性; (8) 强阳性结果。信号在 2-8 之间被认为是阳性。B 型流感病毒在本发明的稀释剂中稳定性的提高如图 1 所示。

实施例 4

对本发明做的另一个检测中, 稳定性稀释剂用于一个不同的分析中, 其中阳性对照采用将福尔马林灭活的 A、B 两型流感病毒抗原以 1:10 的比例稀释于稀释剂中, 以达到对这种对照溶液所要求的中等信号。灭活的流感病毒贮存悬液的制备如实施例 1, 稳定性稀释剂的制备如实施例 3。抗体被选择用于包被由光学法制备的可渗水性表面, 其中该表面是包被一层提供反射性的光学硅胶层、一层抗反射性的 Si₃N₄ 层和一层依据 WO/98/18962 的类钻石碳附着层的轨迹蚀刻聚碳酸酯膜。这项检测所用抗体的选择是基于对其所用表面类型具有最佳的分析效果。分析用表面上反应区域的制备采用一种优选的方法, 即在表面上用抗 A 型流感病毒的单克隆抗体 (40 μg/ml 溶解在 0.1M HEPES, pH8.0, 1% 蔗糖中) 或抗 B 型流感病毒的单克隆抗体 (40 μg/ml 溶解在 0.1M HEPES, pH8.0, 1% 蔗糖, 150mM 氯化钠中) 划条纹, 使每个分析表面也因此包含了一个 A 型流感病毒的反应区和一个 B 型流感

病毒的反应区。表面划线采用一种 BioJet[®] (BioDot, Inc.) 仪器, 在室温下将反应表面干燥并用一种防腐剂溶液再包被。抗体表面用一种热桩设备进行热封, 以形成一个聚碳酸酯环, 可使溶液透过或围绕渗水性表面。这种塑料环为方便操作提供一种支撑, 并可提供一种将渗水性表面装到真空源上以帮助去除液体并干燥渗水性表面的方法。使用前, 包被的表面储存在 2-8°C 的条件下。为达到本实验的目的, 检测以直通型方式进行。直通型是指在检测过程中, 样品与分析表面接触并可流过、保持在其上或周围。

该实验检测了细胞培养液 (EMEM) 作为本发明的稳定稀释剂的一种成分, 增加抗原稳定性的能力。制备了四种检测溶液: (A) 75% 发明稀释剂, 12.5% EMEM 和 12.5% Stabilcoat 缓冲液, (B) 溶液 A, 其中 EMEM 另外含有 2% FCS, 1% L-谷氨酸盐和 0.5% PenStrep/Fungizone, (C) 75% 发明稀释剂和 25% Stabilcoat[®] 缓冲液, (D) 单纯的发明稀释剂。分别用四种稀释剂对灭活的 B 型流感病毒贮存悬液进行了 1:10 的稀释, 即先进行 1:4 稀释, 然后再进行 1:2.5 的稀释。以上四种溶液各取 30 μ l 分别加入到含有 165 μ l 提取试剂的试管中, 孵育 1 分钟。然后, 将全部样本转移到上述的表面上, 孵育 3 分钟。接着, 将 100 μ l 偶联物(偶合辣根过氧化物酶 (HRP) 的抗 A 型流感病毒抗体与偶合辣根过氧化物酶的抗 B 型流感病毒抗体混合)加到表面上再放 3 分钟。下一步, 将真空泵加到表面底部, 从表面上将样本/偶联物的混合物吸过或吸走。之后, 在真空压力下, 将含水洗涤溶液加到表面上并使溶液渗过表面流走, 直至表面干燥, 这样洗涤三次。关掉真空泵后, 将 75 μ l 沉淀 TMB 的底物放在分析表面上并孵育 6 分钟。底物被吸过表面, 再采用以上所述的方法将表面冲洗一次并晾干。然后对这种分析信号用实施例 3 所述方法进行解释。

每种溶液在 4°C 和 45°C 于第 3 天进行测定。在 45°C 的第 3 天, 溶液 A 具最佳稳定性, 其次是溶液 B、D 和 C。结果表明在增加抗原稀释度的条件下, 在稀释剂中渗入细胞培养液/Stabilcoat[®] 可增加抗原的稳定性 (比较溶液 A 和 D 中的稳定性)。用高浓度的 Stabilcoat[®] 缓冲液作为唯一的其它组成成分 (溶液 C), 经证实不利于抗原的稳定性。图 2 显示前述实验结果。

这些结果清楚地提示，本发明在稳定水溶液中蛋白质抗原的能力上明显超过其它的稀释剂，特别是针对流感病毒的蛋白质抗原。以上所参考的各种参考文献、专利或专利申请书在此汇编，以其整体进行参考。

虽然已经描述了本发明的一个优选实施方案，但是本技术领域的技术人员应该理解由此所做的多种可能的变动、改编和修正并不背离本发明的精神和所附权利要求的范围。

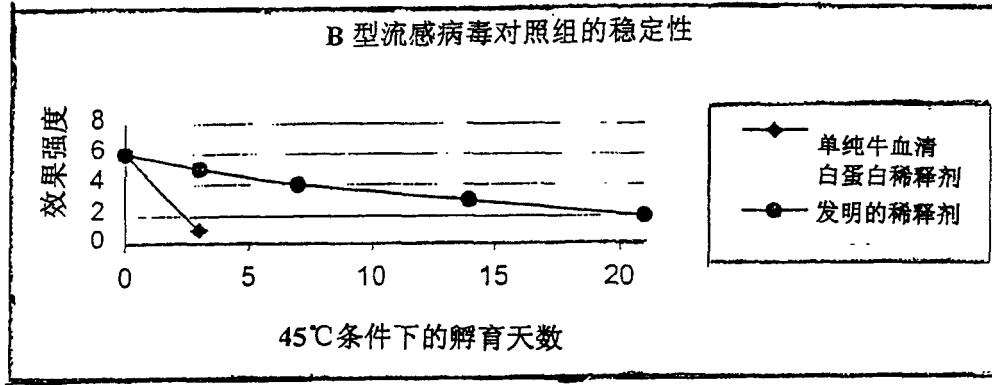


图 1

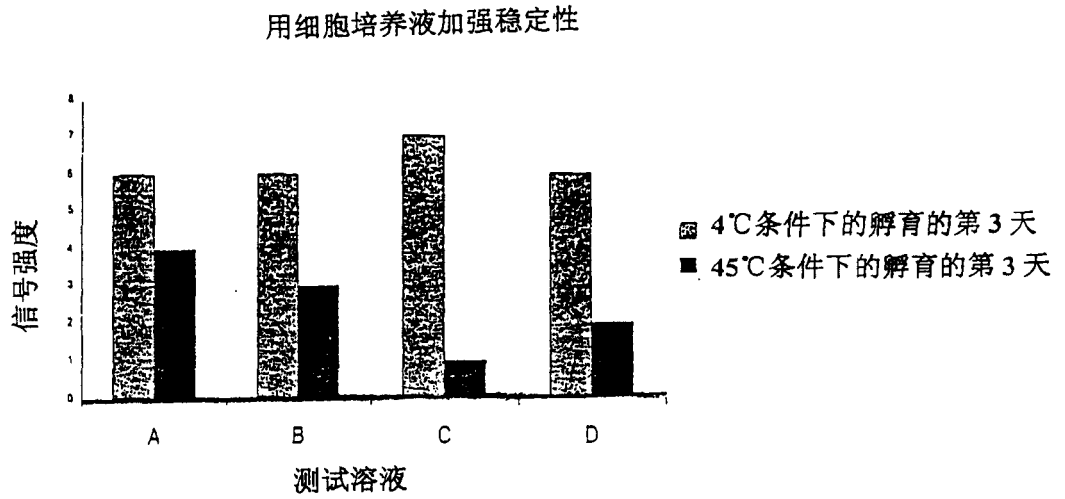


图 2

专利名称(译)	多肽和抗原的稳定稀释剂		
公开(公告)号	CN1286969C	公开(公告)日	2006-11-29
申请号	CN00817003.7	申请日	2000-12-07
[标]申请(专利权)人(译)	旭化成工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	旭化成株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	旭化成株式会社		
[标]发明人	JW斯蒂费恩斯 L潘扎雷拉		
发明人	J·W·斯蒂费恩斯 L·潘扎雷拉		
IPC分类号	C12N5/00 A61K47/00 A61K39/12 A61K39/00 G01N33/531 A61K39/145 A61K47/02 A61K47/10 A61K47/18 A61K47/26 A61K47/42 C12N5/02 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/53 Y10S435/811 A61K47/26 A61K47/186 A61K47/42 Y10S530/868 Y10S424/81 A61K39/145 A61K2039/555 A61K47/10 A61K47/02 A61K47/183 Y10S436/826 A61K39/00 Y10T436/10 Y10T436/106664 Y10T436/108331 Y10T436/2525		
优先权	60/170850 1999-12-14 US		
其他公开文献	CN1409758A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明描述了用于稳定多肽或抗原的组合物。这些组合物用于稳定储存在水溶性配方中的多肽或抗原。这种配方可以用于多种分析或其他方法中。

