

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3884652号
(P3884652)

(45) 発行日 平成19年2月21日(2007.2.21)

(24) 登録日 平成18年11月24日(2006.11.24)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/531 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/68 (2006.01)
 GO 1 N 33/53 (2006.01)
 GO 1 N 33/566 (2006.01)
 GO 1 N 33/569 (2006.01)

GO 1 N 33/531 B
 C 1 2 Q 1/68 A
 GO 1 N 33/53 D
 GO 1 N 33/566
 GO 1 N 33/569 B

請求項の数 54 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-545519 (P2001-545519)
 (86) (22) 出願日 平成12年12月7日(2000.12.7)
 (65) 公表番号 特表2003-517153 (P2003-517153A)
 (43) 公表日 平成15年5月20日(2003.5.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/033337
 (87) 国際公開番号 W02001/044441
 (87) 国際公開日 平成13年6月21日(2001.6.21)
 審査請求日 平成15年7月11日(2003.7.11)
 (31) 優先権主張番号 60/170,850
 (32) 優先日 平成11年12月14日(1999.12.14)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 592202066
 サーモ エレクトロン コーポレイション
 -ポイント オブ ケア エンド ラピッド
 ダイアグノスティックス
 アメリカ合衆国 80027 コロラド州
 , ルイスビル, サウス 104 ストリー
 ト 331
 (73) 特許権者 000000033
 旭化成株式会社
 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
 (74) 代理人 100105991
 弁理士 田中 玲子
 (74) 代理人 100106840
 弁理士 森田 耕司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリペプチドおよび抗原の安定化希釈液

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

非イオン性リン酸緩衝剤,
 血清であるブロッキング剤,
 グリセロールである可溶化剤,
 塩化カリウム, 塩化ナトリウム, 塩化マグネシウム, 硫酸マグネシウムおよび塩化カルシウムからなる群より選択される塩,
 E G T A および E D T A からなる群より選択されるキレート化剤,
 C H A P S , コール酸, デオキシコール酸, ジギトニン, n - ドデシル - D - マルトシド, グリコデオキシコール酸, n - ラウロイルサルコシン, 硫酸ラウリル, サポニン,
 ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート, およびポリエチレングリコール P - 1 , 1 , 3 , 3 - テトラメチルブチルフェニルエーテルからなる群より選択される界面活性剤,
 および
 臭化トリメチルテトラデシルアンモニウムおよび抗生物質からなる群より選択される保存剤,
 を含む, 抗原またはポリペプチドを安定化するための水性試薬であって, ここで, 前記試薬は, N - ドデカノイル - N - メチルグリシンまたはデカノイル N - メチルグルコンアミドを含まず, 前記試薬は 7 . 5 乃至 8 . 5 の最終 pH である,
 ことを特徴とする水性試薬。

【請求項2】

10

20

前記ブロッキング剤がウシ胎児血清である請求項 1 の水性試薬。

【請求項 3】

前記塩が塩化ナトリウムである請求項 1 の水性試薬。

【請求項 4】

前記キレート化剤が EDTA である請求項 1 の水性試薬。

【請求項 5】

前記界面活性剤がポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートである請求項 1 の水性試薬。

【請求項 6】

前記保存剤が臭化トリメチルテトラデシルアンモニウムおよびゲンタマイシンである請求項 1 の水性試薬。 10

【請求項 7】

前記緩衝剤がリン酸ナトリウムである請求項 1 の水性試薬。

【請求項 8】

前記緩衝剤がリン酸ナトリウムであり、前記ブロッキング剤がウシ胎児血清であり、前記可溶化剤がグリセロールであり、前記塩が塩化ナトリウムであり、前記キレート剤が EDTA であり、前記界面活性剤がポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートであり、前記保存剤が臭化トリメチルテトラデシルアンモニウムおよびゲンタマイシンである請求項 1 の水性試薬。

【請求項 9】

組織培養培地をさらに含む請求項 1 の水性試薬。 20

【請求項 10】

前記組織培養培地がイーグル最小必須培地である請求項 9 の水性試薬。

【請求項 11】

水性試薬が 50 mM と 100 mM の間の非イオン性リン酸緩衝剤と、2% と 20% v/v の間の血清と、2.5% と 10% v/v の間のグリセロールと、50 mM と 2 M の間の塩と、10 mM と 15 mM の間のキレート剤と、0.05% と 0.1% v/v の間の界面活性剤と、0.01% w/v と 0.5% w/v の間の保存剤とを 7.5 乃至 8.5 の最終 pH で含む請求項 1 の水性試薬。

【請求項 12】

水性試薬が 50 mM と 100 mM の間のリン酸ナトリウムと、2% と 20% v/v の間のウシ胎児血清と、2.5% と 10% v/v の間のグリセロールと、50 mM と 2 M の間の塩化ナトリウムと、10 mM と 15 mM の間の EDTA と、0.05% と 0.1% v/v の間のポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートと、0.01% w/v の臭化トリメチルテトラデシルアンモニウムと、0.5% w/v の硫酸ゲンタマイシンとを 7.5 乃至 8.5 の最終 pH で含む請求項 1 の水性試薬。 30

【請求項 13】

溶液中の抗原またはポリペプチドを安定化する方法であって、
非イオン性リン酸緩衝剤、
血清であるブロッキング剤、
グリセロールである可溶化剤、
塩化カリウム、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウムおよび塩化カルシウムからなる群より選択される塩、
EGTA および EDTA からなる群より選択されるキレート化剤、
CHAPS、コール酸、デオキシコール酸、ジギトニン、n - ドデシル - D - マルトシド、グリコデオキシコール酸、n - ラウロイルサルコシン、硫酸ラウリル、サポニン、
ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、およびポリエチレングリコール P - 1、1、3、3 - テトラメチルブチルフェニルエーテルからなる群より選択される界面活性剤、
および
からなる群より選択される臭化トリメチルテトラデシルアンモニウムおよび抗生物質保存 40 50

剤，
を含む水性試薬に抗原またはポリペプチドを配置することを含み，
ここで，前記試薬はN - ドデカノイル - N - メチルグリシンまたはデカノイルN - メチル
グルコンアミドを含まず，前記試薬は7 . 5乃至8 . 5の最終pHである，
ことを特徴とする方法。

【請求項14】

前記ブロッキング剤がウシ胎児血清である請求項13の方法。

【請求項15】

前記抗原またはポリペプチドが微生物由来である請求項13の方法。

【請求項16】

前記微生物がウイルスである請求項15の方法。

【請求項17】

前記微生物が細菌である請求項15の方法。

【請求項18】

前記ウイルスがインフルエンザである請求項16の方法。

【請求項19】

前記インフルエンザがインフルエンザBである請求項18の方法。

【請求項20】

前記抗原がポリペプチドである請求項13の方法。

【請求項21】

前記ポリペプチドが核タンパク質である請求項20の方法。

【請求項22】

前記水性試薬が組織培養培地をさらに含む請求項13の方法。

【請求項23】

前記組織培養培地が最小必須培地である請求項22の方法。

【請求項24】

水性溶液中の安定化した抗原またはポリペプチドを検出する方法であって，

a) 非イオン性リン酸緩衝剤，

血清であるブロッキング剤，

グリセロールである可溶化剤，

塩化カリウム，塩化ナトリウム，塩化マグネシウム，硫酸マグネシウムおよび塩化カルシ
ウムからなる群より選択される塩，

E G T AおよびE D T Aからなる群より選択されるキレート化剤，

C H A P S，コール酸，デオキシコール酸，ジギトニン，n - ドデシル -

シド，グリコデオキシコール酸，n - ラウロイルサルコシン，硫酸ラウリル，サポニン，

ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート，およびポリエチレングリコールP - 1，

1，3，3 - テトラメチルブチルフェニルエーテルからなる群より選択される界面活性剤
，および

臭化トリメチルテトラデシルアンモニウムおよび抗生物質からなる群より選択される保存
剤，

を含む水性試薬に抗原またはポリペプチドを配置し，

ここで，試薬はN - ドデカノイル - N - メチルグリシンまたはデカノイルN - メチルグル
コンアミドを含まず，前記試薬は7 . 5乃至8 . 5の最終pHであり；そして

b) 分析法を用いて前記抗原またはポリペプチドを検出する，

ことを含む方法。

【請求項25】

前記ブロッキング剤がウシ胎児血清である請求項24の方法。

【請求項26】

分析法が免疫測定法である請求項24の方法。

【請求項27】

10

20

30

40

50

免疫測定法が酵素免疫測定法である請求項 26 の方法。

【請求項 28】

免疫測定法が光学的免疫測定法である請求項 26 の方法。

【請求項 29】

分析法が核酸ハイブリダイゼーション法である請求項 24 の方法。

【請求項 30】

その中で抗原またはポリペプチドを安定化するための水性試薬であって、

非イオン性リン酸緩衝剤、

血清であるブロッキング剤、

グリセロールである可溶化剤、

塩化カリウム、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウムおよび塩化カルシウムからなる群より選択される塩、

E G T A および E D T A からなる群より選択されるキレート化剤、

C H A P S , コール酸, デオキシコール酸, ジギトニン, n - ドデシル - D - マルト

シド, グリコデオキシコール酸, n - ラウロイルサルコシン, 硫酸ラウリル, サポニン,

ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート, およびポリエチレングリコール P - 1,

1, 3, 3 - テトラメチルブチルフェニルエーテルからなる群より選択される界面活性剤, および

臭化トリメチルテトラデシルアンモニウムおよび抗生物質からなる群より選択される保存剤,

を含み、ここで、前記試薬は N - ドデカノイル - N - メチルグリシンまたはデカノイル N - メチルグルコンアミドを含まず、前記試薬は 7 . 5 乃至 8 . 5 の最終 pH であることを特徴とする水性試薬。

【請求項 31】

前記ブロッキング剤がウシ胎児血清である請求項 30 の水性試薬。

【請求項 32】

前記抗原またはポリペプチドをさらに含む請求項 30 の水性試薬。

【請求項 33】

抗原またはポリペプチドが微生物由来である請求項 32 の水性試薬。

【請求項 34】

前記微生物がウイルスである請求項 33 の水性試薬。

【請求項 35】

前記微生物が細菌である請求項 33 の水性試薬。

【請求項 36】

前記ウイルスがインフルエンザである請求項 34 の水性試薬。

【請求項 37】

前記インフルエンザがインフルエンザ B である請求項 36 の水性試薬。

【請求項 38】

前記抗原が核タンパク質である請求項 32 の水性試薬。

【請求項 39】

微生物の懸濁液を安定化するための水性試薬であって、前記試薬は、

非イオン性リン酸緩衝剤、

血清であるブロッキング剤、

グリセロールである可溶化剤、

塩化カリウム、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウムおよび塩化カルシウムからなる群より選択される塩、

E G T A および E D T A からなる群より選択されるキレート化剤、

C H A P S , コール酸, デオキシコール酸, ジギトニン, n - ドデシル - D - マルト

シド, グリコデオキシコール酸, n - ラウロイルサルコシン, 硫酸ラウリル, サポニン,

ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート, およびポリエチレングリコール P - 1,

および

10

20

30

40

50

1, 3, 3 - テトラメチルブチルフェニルエーテルからなる群より選択される界面活性剤, および

臭化トリメチルテトラデシルアンモニウムおよび抗生物質からなる群より選択される保存剤,

を含み, ここで, 前記試薬は N - ドデカノイル - N - メチルグリシンまたはデカノイル N - メチルグルコンアミドを含まず, 前記試薬は 7.5 乃至 8.5 の最終 pH であることを特徴とする水性試薬。

【請求項 40】

前記微生物がウイルスである請求項 39 の水性試薬。

【請求項 41】

前記微生物が細菌である請求項 39 の水性試薬。

【請求項 42】

前記ウイルスがインフルエンザである請求項 40 の水性試薬。

【請求項 43】

前記インフルエンザがインフルエンザ B である請求項 42 の水性試薬。

【請求項 44】

前記ブロッキング剤がウシ胎児血清である請求項 39 の水性試薬。

【請求項 45】

前記塩が塩化ナトリウムである請求項 39 の水性試薬。

【請求項 46】

前記キレート化剤が EDTA である請求項 39 の水性試薬。

【請求項 47】

前記界面活性剤がポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートである請求項 39 の水性試薬。

【請求項 48】

前記保存剤が臭化トリメチルテトラデシルアンモニウムおよびゲンタマイシンである請求項 39 の水性試薬。

【請求項 49】

前記緩衝剤がリン酸ナトリウムである請求項 39 の水性試薬。

【請求項 50】

前記緩衝剤がリン酸ナトリウムであり, 前記ブロッキング剤がウシ胎児血清であり, 前記可溶化剤がグリセロールであり, 前記塩が塩化ナトリウムであり, 前記キレート剤が EDTA であり, 前記界面活性剤がポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートであり, 前記保存剤が臭化トリメチルテトラデシルアンモニウムおよびゲンタマイシンである請求項 39 の水性試薬。

【請求項 51】

組織培養培地をさらに含む請求項 39 の水性試薬。

【請求項 52】

前記組織培養培地がイーグル最小必須培地である請求項 51 の水性試薬。

【請求項 53】

水性試薬が 50 mM と 100 mM の間の非イオン性リン酸緩衝剤と, 2% と 20% v/v の間の血清と, 2.5% と 10% v/v の間のグリセロールと, 50 mM と 2 M の間の塩と, 10 mM と 15 mM の間のキレート剤と, 0.05% と 0.1% v/v の間の界面活性剤と, 0.01% w/v と 0.5% w/v の間の保存剤とを 7.5 乃至 8.5 の最終 pH で含む請求項 39 の水性試薬。

【請求項 54】

水性試薬が 50 mM と 100 mM の間のリン酸ナトリウムと, 2% と 20% v/v の間のウシ胎児血清と, 2.5% と 10% v/v の間のグリセロールと, 50 mM と 2 M の間の塩化ナトリウムと, 10 mM と 15 mM の間の EDTA と, 0.05% と 0.1% v/v の間のポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートと, 0.01% w/v の臭化トリメ

10

20

30

40

50

チルテトラデシルアンモニウムと、0.5% w/vの硫酸ゲンタマイシンとを7.5乃至8.5の最終pHで含む請求項39の水性試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、ポリペプチドおよび抗原を安定化するために有用な水性組成物に関する。安定化されたポリペプチドおよび抗原は、抗原特異的検出などの分析法のほか、水溶液中でかかる成分の安定化が望まれる他の薬学用途において有用である。

【0002】

(背景技術)

以下は、本明細書中に開示される発明に潜在的に関連している文献の考察である。しかし、本明細書中で考察される引例を先行技術であると認めるものではない。

【0003】

水溶液中のポリペプチドおよび抗原の安定化は困難である場合が多い。例えば、かかる溶液の長期間にわたる室温での貯蔵の結果として、水溶液中に含まれるポリペプチドおよび抗原が劣化する。特に、細菌、ウイルスおよび他の微生物の抗原は、水性培地中に貯蔵すると不安定であることが明らかにされている。その一例が、広範囲の貯蔵温度で時間の経過とともに分解する抗原を含むオルソミクソウイルス科のインフルエンザウイルスなどの、エンベロープを有するウイルスである。当業者は、さまざまな細菌の抗原、例えばある種の毒素の溶液中の安定化も困難であることを理解している。水溶液中での劣化を回避するために、当業者はポリペプチドまたは抗原を保存するための方法として凍結乾燥および凍結を用いている。実際には、凍結乾燥および凍結の広範な使用は、水溶液中でかかる成分を保存する欠点および困難を示している。

【0004】

当業界の多数の刊行物は、凍結乾燥された試薬の安定性を増大させる手段、および同技術水準内でも固有な困難を開示している。例えば、米国特許第5,955,448号、第4,496,537号、およびPCT出願番号WO97/04801はすべて凍結乾燥法における改善を開示している。しかし、タンパク質を含有する溶液の凍結乾燥は、多大なコストや製造者および最終消費者に不便を課すほか、再構成エラーや汚染のリスク増大をもたらす。また、溶液の凍結は特殊な装置を必要とし、頻繁に繰り返すと最終的にタンパク質の分解につながりうる。商業用途としては、水溶液中のポリペプチドおよび抗原の劣化は、かかる溶液がわずかに短い貯蔵寿命後に交換を必要とするため損失が大きい。

【0005】

本発明は、溶液中のポリペプチドおよび他の非タンパク質性化合物の安定性を増強する水性安定化試薬または希釈液に関する。炭水化物、タンパク質、リポタンパク質、リポ多糖類、多糖類、核酸、核タンパク質のほか、タンパク質、脂質、および他の成分と複合した炭水化物などの抗原は、本発明を用いて安定化されうる種類の抗原の実例である。新規の試薬成分を用いることにより、本発明は現在市販の希釈液または当業界において記載された希釈液におけるポリペプチドおよび抗原の安定性を改善する。本発明は、かかる成分の安定な水溶液を必要とする診断的分析または他の用途における対照試薬として用いられる抗原およびポリペプチドを安定化するために特に有用である。本発明の安定化希釈液は、長時間にわたり約2°~8°、室温および約45°の温度で貯蔵するためのポリペプチドおよび抗原を安定化するために有用である。

【0006】

PCT出願番号WO99/15901は、抗原、特にC型肝炎ウイルス(HCV)抗原の安定化のための希釈液を開示している。このHCV希釈液は、HCV抗原を還元型で維持する還元剤を含む。同出願は、希釈液中に還元剤を含めることにより7日間までHCV抗原の免疫反応性が維持されたことを報告している。報告された希釈液は、pH6.5のリン酸ナトリウム(または他の緩衝剤)、EDTA(または他のキレート剤)、DTT(または他の還元剤)、ゼラチン(または他のタンパク質ブロッキング源)、チオシアン酸ア

10

20

30

40

50

ンモニウム（または他のカオトロピック剤）、アジ化ナトリウム（または他の保存剤）およびSDS（または他の界面活性剤）をさらに含む。しかし、希釈液中の還元剤の包含は、他の微生物由来の多くの抗原の安定性において無効であり、またはこれに対して有害でありうる。

【0007】

米国特許第4,956,274号は、相補性分析において使用するための - ガラクトシダーゼ由来のペプチド断片を安定化するための方法に関する。米国特許第4,956,274号に開示された溶液は、イオン界面活性剤または糖残基由来の界面活性剤を含み、 - ガラクトシダーゼペプチド断片の分解を遅延させた。しかし、これらの界面活性剤は酵素断片も変性させるため、除去または中和して、酵素断片がその正確な高次構造に戻って酵素活性を回復することを可能とする必要があった。このことは、溶液が未変性の形態のタンパク質を安定化しなかったことを示す。これらの界面活性剤は、シクロデキストリンを用いることにより分析の直前に中和される。あるいは、界面活性剤の作用は高濃度の血清でマスクされた。開示された試薬の別の成分にはキレート化剤、緩衝剤、殺菌剤、マグネシウムまたは他のイオン、還元剤、エチレングリコールのような溶媒などの可溶化剤、および非イオン性界面活性剤が含まれていた。当業者には明らかであるように、タンパク質または酵素断片の変性および再生は一部の抗原エピト - プを損傷し、それらを不活性にすることがありうる。

10

【0008】

米国特許第5,459,033号は、ウイルスの凝集を予防するために有用な溶液を開示している。この溶液は、N - ラウリルサルコシンまたは他の陰イオン界面活性剤を含有することが報告された。この溶液は、ウイルス粒子、特に肝炎ウイルスおよびヘルペスウイルスが疎水的誘引により凝集し感度を低下させるといふ仮定に基づき安定性を増強すると述べられた。この希釈液は抗原の触媒活性または免疫原性を改善または保存することは報告されていないが、凝集を阻止することが報告された。また、溶液が使用できる前に、15時間乃至10日間、2~35 でインキュベートし、一貫した安定性を確保する必要があることが報告されており、これは最終産物の製造可能性に対する重要な制限を付加する。

20

【0009】

米国特許第5,660,978号は、抗原の濃縮溶液（血清など）の中に抗原特異的抗体またはその一部（特にFab）を組み入れてタンパク質分解または酸化を阻止することにより、抗原、具体的には変動性タンパク質抗原、特に酵素を安定化する方法を開示している。血清または非特異的IgGの導入は、かかる希釈液の所望の保護または保護の特異性を提供することが期待されない。さらに、安定化は希釈液中に抗原を配置する前に完了した。これに対し、本発明は希釈液そのものにより安定化される。また、本発明は、この特許発明が示す段階ではなく、最初から比較的希薄な溶液を安定化する。抗原を構造的に安定化する抗体の使用は、1つまたはそれ以上の抗原性部位が免疫学的測定法の標的である場合は特に問題となろう。また、当業者は、抗原を高次構造的に保存するが特異的酵素活性を阻害しない、'978号特許に開示されたものなどの希釈液を一貫して製造することは困難であろう。この発明は、本質的に、化学的固定液の代わりに、固定試薬として抗体タンパク質を利用しているため、真に安定化希釈液を記載するものではない。

30

40

【0010】

Landi, SおよびHeld, HR (Tubercle 59 (1978) 121 - 133) は、希釈溶液中へのTween - 80の添加を報告し、ツベルクリンPPDの安定性がこの添加により界面活性剤の抗吸着性のため増強されることを示した。Connaught Laboratories LTDにより製造されたツベルクリン調製物は、ツベルクリンPPD、0.3%のフェノール（保存剤として作用すると報告されている）、およびPBS中0.0005%のTween - 80を含有する。フェノールは本発明においては容認できない有害物質であり、一部のタンパク質を変性させる可能性がある。

【0011】

50

希釈液の処方および凍結乾燥貯蔵法における利点にもかかわらず、溶液中に貯蔵されたさまざまなポリペプチドおよび抗原、特に微生物由来の抗原の長期の安定性を十分に改善する希釈液が依然として必要とされている。

【0012】

(発明の要約)

本発明はポリペプチドおよび抗原を安定化するための試薬を特徴とする。この試薬は分析法において用いられる対照または基準の抗原の安定化のために特に有用である。炭水化物、タンパク質、ポリペプチド、ポリペプチド断片、リポタンパク質、リポ多糖類、多糖類、核酸、核タンパク質のほか、ポリペプチド、脂質、および他の化合物と複合した炭水化物などの抗原は、本発明を用いて安定化される種類の抗原の実例である。

10

【0013】

開示された試薬は、低温および高温の両方でポリペプチドおよび抗原の安定性のための以前の調製物を凌ぐものである。ポリペプチドおよび抗原を可溶性型の試薬中で長時間にわたり、約0.5乃至約50以上、好ましくは約2~8、約室温(一般的には約23乃至約28)であり、25が特に好ましい)および約42乃至約43、特に約45のさまざまな温度で貯蔵することができる。45での安定性は抗原の長期安定性を提供する試薬の能力を予測的に示している。また、開示された試薬は、ポリペプチドおよび抗原を安定化する目的のための単一の水溶液である利点を有する。

【0014】

第1の態様において、本発明はポリペプチドまたは抗原の安定性を増強する水性試薬組成物を特徴とする。ある好ましい実施態様において、試薬は1つまたはそれ以上の以下のものを含む:緩衝剤、ブロッキング剤、溶剤、塩、キレート剤、界面活性剤、および保存剤。試薬はN-ドデカノイル-N-メチルグリシンまたはデカノイル-N-メチルグルコンアミドを含まないことが好ましい。試薬は組織培養培地または市販の希釈液などの成分をも含む。

20

【0015】

本明細書中で用いられる「緩衝剤」という用語は、溶液のpHの変化を最小限に抑えるように作用する当業者には公知の組成物を指す。好ましい緩衝剤は7と9の間のpHで有効な緩衝を提供するpKaを有する。好ましい緩衝剤は、ACES、ADE、BES、ピシン、ピストリス、CAPS、CHES、マロン酸ジエチル、グリシルグリシン、グリシンアミドHCl、HEPES、HEPPS、イミダゾール、MES、MOPS、PIPES、POPSO、TAPSO、TES、トリシン、トリス、炭酸水素塩、およびホウ酸塩である。特に好ましいものはリン酸緩衝剤である。好ましい緩衝剤濃度は2M未満であり、最も好ましい濃度は0.2M、0.1M、0.05M、0.05M、0.02M、0.01M、0.005、0.001、および0.0001Mであり、7、7.25、7.5、7.75、8、8.25、8.5、8.75、および9のpHを有する。

30

【0016】

本明細書中で用いられる「ブロッキング剤」という用語は、タンパク質および/またはポリペプチドの混合物を含有し、脂質、炭水化物、塩、およびヘムなどの補助因子などの1つまたはそれ以上の追加の成分を含みうるタンパク質豊富源を指す。「タンパク質豊富」という用語は本明細書中で定義されている。かかるブロッキング剤を用いて、本明細書中に記載された組成物および方法において、1つまたはそれ以上のタンパク質、ポリペプチド、および/または抗原を安定化することができる。好ましいブロッキング剤は、約6.5と約8.5の間のpH、および/または約250と約350mOsm/Kg H₂Oの間の重量オスモル濃度を有する。特に好ましいブロッキング剤は、ウマ血清、ウシ新生児血清、子ウシ血清、成体ウシ血清、ヒト血清、ウサギ血清、ヒツジ血清等などの血清、および当業者には周知の血清代替物である。ブロッキング剤として最も好ましいのは、ウシ胎児血清である。

40

【0017】

本明細書中で用いられる「タンパク質豊富」という用語は、タンパク質および/またはポ

50

リペプチドの混合物を含有し、約1g%と約50g%の間、最も好ましくは約3g%と約10g%の間の総タンパク質濃度を有する溶液を指す。例えば、ウシ胎児血清は約3g%と約4.5g%の間の総タンパク質含量を有するが、成体ウシ血清は約4.5g%と約8.5g%の間の総タンパク質含量を有する。

【0018】

本明細書中で用いられる「溶剤」または「可溶化剤」という用語は、組成物の他の成分を分散することが可能な液体物質を指す。好ましい溶剤は水、グリセロール、DMSO、エタノール、メタノール等などのアルコール、アセトン、ジメチルスルホキシド、アセトニトリル、およびジメチルホルムアミドである。

【0019】

本明細書中で用いられる「塩」という用語は、金属、または金属と同様に作用する要素による酸の一部または全部の酸性水素の置換から生じる1つまたはそれ以上の化合物を指す。好ましい塩は、KCl、NaCl、MgCl₂、MgSO₄、およびCaCl₂である。好ましい塩濃度は4Mと0.1mMの間であり、好ましくは2Mと50mMの間である。

【0020】

本明細書中で用いられる「キレート剤」という用語は、通常、分子内の2つまたはそれ以上の錯形成基に結合することにより金属イオンを結合する分子を指す。キレート剤は当業界において公知であり、一部のタンパク質およびポリペプチドのほか、エチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)およびエチレングリコール-ビス(-アミノエチルエーテル) - N, N, N', N' - テトラ酢酸(EGTA)などの小分子を含む。好ましいキレート剤濃度は100mMと0.01mMの間であり、20mMと1mMの間であることが最も好ましい。

【0021】

本明細書中で用いられる「界面活性剤」という用語は、油を乳化することが可能であり、湿潤剤として作用する当業界において公知の化合物を指す。好ましい界面活性剤としては、CHAPS、コール酸、デオキシコール酸、ジギトニン、n-ドデシル-β-D-マルトシド、グリコデオキシコール酸、n-ラウロイルサルコシン、硫酸ラウリル、サポニン、Tween 20、およびトリトンX-100が挙げられる。好ましい界面活性剤濃度は、約0.001%と約5%の間である。最も好ましいのは、組成物が約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%、および2%を含むことである。

【0022】

本明細書中で用いられる「保存剤」という用語は、当業者には公知である微生物の成長を阻止する化合物を指す。好ましい保存剤としては、チメロサル、ソルビン酸、BHA、BHT、ミクロサイドII(臭化トリメチルテトラデシルアンモニウム)、およびゲンタマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質が挙げられる。好ましい保存剤濃度は10%と0.001mMの間であり、1%と0.1%の間であることが最も好ましい。

【0023】

本明細書中で用いられる「ポリペプチド」はアミノ酸のポリマーを指し、生成物の特異的長さを指すものではない。したがって、ペプチド、オリゴペプチド、タンパク質、およびその断片はこの定義内に含まれる。「ポリペプチド」という用語は、例えばグリコシル化、アセチル化、リン酸化などの、ポリペプチドの翻訳後修飾を除外しない。

【0024】

本明細書中で用いられる「抗原」としては、炭水化物、タンパク質、ポリペプチド、リポタンパク質、リポ多糖類、多糖類、核酸のほか、ポリペプチド、脂質、および他の化合物と複合した炭水化物が挙げられる。抗原は機能的免疫系を有する動物における免疫応答を誘発する能力がありうる。好ましい実施態様において、安定化される抗原はポリペプチド抗原である。これらのポリペプチド抗原は単独でまたは他の分子と結合して見出しうる。

10

20

30

40

50

特に好ましい実施態様において、安定化されるポリペプチドは核タンパク質抗原である。核タンパク質抗原は任意の数の源に由来するものであることができ、単独でまたは他の分子と結合して見出しうる。

【0025】

「核タンパク質抗原」とは、核複合体と結合または付着して見出される任意のポリペプチドを意味する。

【0026】

特に好ましい核タンパク質は、インフルエンザウイルス、特にB型インフルエンザ由来の核タンパク質である。

【0027】

「抗原の安定性」とは、試薬を設定温度で所定の時間にわたり貯蔵した後に、測定法または分析法、特に診断的測定法または免疫測定法において、1つの試薬により発生される一貫した信号を維持する能力を意味する。典型的な貯蔵温度は約2°~30°である。抗原の安定性は高温で短時間、抗原の劣化を測定することによっても評価することができる。加速安定性試験の一般的な温度は約30°乃至60°である。

【0028】

「微生物」とは、原核生物、酵母菌などの真核生物、ウイルス、プリオンまたは他の感染性粒子を意味する。

【0029】

「分析法」とは、1つまたはそれ以上の抗原の特異的な検出を可能にする方法を意味する。分析法としては、すべての検出形式の免疫測定法および核酸ハイブリダイゼーションが挙げられ、その多くの例が当業界において周知である。特に好ましい光学的免疫測定法が米国特許第5,550,063号；第5,955,377号；および第5,541,057号に記載されている。

【0030】

第2の態様において、本発明は、抗原が微生物由来である抗原またはポリペプチドの安定性を増強する水性試薬組成物を特徴とする。好ましい実施態様において、微生物はウイルスおよび/または細菌を含む。本発明はウイルス分析物とともに使用するために特に好ましい。最も特に好ましい実施態様において、本発明はインフルエンザ由来の抗原およびポリペプチド、特にインフルエンザB由来のポリペプチドおよび抗原を安定化するための試薬組成物を特徴とする。

【0031】

第3の態様において、本発明はインフルエンザウイルスの核タンパク質、特にインフルエンザB由来の核タンパク質を安定化するための試薬組成物を特徴とする。

【0032】

第4の態様において、本発明は分析法に関連する対照または基準試薬として使用される抗原調製物を安定化するための水性試薬組成物を特徴とする。

【0033】

特に好ましい実施態様において、試薬組成物は緩衝剤、ブロッキング剤、塩、キレート剤、可溶化剤、非イオン性界面活性剤、および保存剤を含む。試薬はN-ドデカノイル-N-メチルグリシンまたはデカノイル-N-メチルグルコンアミドを含まないことが最も好ましい。

【0034】

さらに別の好ましい実施態様において、試薬は組織培養培地、Stabilcoat（登録商標）緩衝剤（BSI, Inc.）、およびホルマリン不活性化ウイルス含有細胞培養培地をも含むうる。

【0035】

さらに他の好ましい実施態様において、試薬は、リン酸ナトリウム緩衝剤、ウシ胎児血清、グリセロール、塩化ナトリウム、EDTA、Tween-20（登録商標）界面活性剤（モノラウリル酸ポリオキシエチレンソルビタン）、マイクロサイドII（登録商標）保存

10

20

30

40

50

剤（四級アンモニウム化合物；Amresco、E423）、硫酸ゲンタマイシンを含み、ショ糖、組織培養培地およびStabilcoat（登録商標）緩衝剤（BSI, Inc.）を含みうる。溶液のpHは約7と約9の間であり、7.5と8.5の間であることが最も好ましい。当業者は、同様の試薬が上記の試薬の代替となりうることを理解している。例えば、EDTAの代わりにEGTAを用いることができ、マイクロサイドII（登録商標）またはゲンタマイシンの代わりに他の抗菌剤を用いることができる。上記試薬の好ましい濃度は以下の通りである：リン酸ナトリウムについては、0.1mM乃至1000mM、さらに好ましくは1mM乃至200mM、最も好ましくは50mM乃至100mMであり；ウシ胎児血清については、0.1%乃至40%v/v、最も好ましくは2%乃至20%v/vであり；グリセロールについては、0.1%乃至30%v/v、最も好ましくは2.5%乃至10%v/vであり；塩化ナトリウムについては、0.1mM乃至4M、最も好ましくは50mM乃至2Mであり；EDTAについては、0.01mM乃至100mM、さらに好ましくは1mM乃至20mM、最も好ましくは10mM乃至15mMであり；Tween-20については、0.001%乃至1%、さらに好ましくは0.01%乃至0.1%、最も好ましくは0.5%であり；マイクロサイドIIについては、0.001%乃至1%w/v、最も好ましくは0.002%乃至0.1%w/vであり；硫酸ゲンタマイシンについては、0.01%乃至10%w/v；さらに好ましくは0.5%乃至2.5%、最も好ましくは0.25%乃至1%であり；ショ糖については、0.01%乃至5%w/v、最も好ましくは0.1%乃至0.5%である。

10

【0036】

20

特に好ましい実施態様において、希釈液は、約50mM以上の量のリン酸ナトリウム；約2%v/v以上の量のウシ胎児血清；約10%v/v以上の量のグリセロール；約50mM以上の量の塩化ナトリウム；約10mM以上の量のEDTA；約0.05%w/v以上の量のTween-20界面活性剤；約0.01%w/v以上の量のマイクロサイドII保存剤；および約0.5%w/v以上の量の硫酸ゲンタマイシンを含む。試薬は0.5%までのショ糖、15%までのStabilcoat（登録商標）緩衝剤および抗原調製物からのまたは個別添加により20%までの組織培養培地をも含みうる。溶液の好ましいpHは約7.5乃至約8.5の間である。緩衝剤および/または塩の代わりにある濃度の予備調製組織培養培地（例えば、BioWhittaker社製のイーグル最小必須培地またはダルベッコ改変イーグル培地）を用いることも可能でありうる。

30

【0037】

第5の態様において、本発明は微生物由来のポリペプチドおよび抗原を安定化するための方法の特徴とする。好ましい実施態様において、前記方法は分析法に関連する対照または基準試薬としての使用のために、または医薬製剤における使用のために、微生物由来の抗原調製物を安定化するために用いられる。

【0038】

（好ましい実施態様の詳細な説明）

A. はじめに

本発明の理解を容易にするために、特定の用途、すなわちインフルエンザ由来抗原の安定化について、試薬組成物の開発を記載する。しかし、試薬組成物を安定化する一般的な有用性は、同様の実験を行うことにより他の抗原またはポリペプチドで示すことができる。

40

【0039】

診断的分析成分または他の使用のための試薬開発中に、試薬の長期安定性の測定が必要である。最初は、実時間の測定が完了する前に試薬の有効期間を評価するために加速安定性の確認を完了する。加速安定性試験は直ちに行うことができ、安定性を予測するために当業者により用いられる場合が多い。これを行う1つの手段は高温で試薬をインキュベートし、比較的短時間の間隔で分析することである。例えば、37、45、および他の高温での3乃至7日間のインキュベーションをアレニウス式を用いて分析して、試薬が約20~80で長時間にわたり安定のままかどうかを予測する。この方法は現在、試薬の欠陥の予測において最も正確であると考えられている。試薬が高温の負荷に耐えることが

50

できない場合は、通常の貯蔵条件下で長期にわたり安定である可能性は低い。高温の安定性は、減衰率を正確に予測することがないため、長期の安定性の予測はあまり良くないが、試薬の欠陥の予想点を識別することにより安定性の指標を示す。高温での安定性の喪失が減少するにつれて、実環境の欠陥の可能性も減少する。

【0040】

加速確認に加えて、試薬がポリペプチドまたは抗原を安定化する潜在能力を評価するために実時間の長期試験も必要である。実時間試験の条件は当業者には周知である。例えば、実時間評価の条件として、試薬の欠陥点に達するまで約2°～8°の通常の貯蔵温度下または室温(18°～30°)下に試薬を貯蔵することが挙げられる。

【0041】

インフルエンザウイルスの免疫測定法のための陽性対照試薬の開発において、A型とB型のホルマリン不活性化インフルエンザウイルスを、タンパク質ベースの希釈液における安定性について評価した。免疫測定法において検出されたエピト-プがウイルスの核タンパク質由来である場合、不活性化インフルエンザAは単純希釈液および市販の安定化希釈液において不活性化インフルエンザBよりも有意に安定である。インフルエンザAとBの検出のための新しい生成物の商業的な実行可能性を保証するには、不活性化インフルエンザBを安定化する方法が必要であった。両方の型の不活性化インフルエンザウイルスの懸濁液に対して安定性を与える希釈液が調製された。この希釈液は、溶液中において、以前の希釈液調製液よりも長時間にわたり、不活性化インフルエンザBの安定性を改善する能力を示した。

【0042】

インフルエンザAは単純タンパク質ベースの希釈液において安定であることが示されている。かかる希釈液はPBTとも称され、リン酸緩衝食塩水(PBS)中のウシ血清アルブミン(BSA)およびTween-20(登録商標)界面活性剤を含む。第2の調製物は市販の製品、Stabilcoat(登録商標)緩衝剤(BSI, Inc.)であり、インフルエンザAを安定化することも示されている。しかし、これらの溶液のうちいずれもインフルエンザBを安定化することはできなかった。実施した測定法において異なる株を検出するモノクローナル抗体は2つの核タンパク質上の異なるエピト-プを認識する可能性がある。これらのエピト-プは不活性化および貯蔵条件により異なるように影響される。また、測定法において用いられるモノクローナル抗体の最初の調製において用いられる免疫原が異なるように調製され、異なるように確認されたエピト-プを認識するモノクローナルの製造に有利であったとみられる。われわれは、本明細書中に記載された希釈液組成物が、不活性化インフルエンザAの核タンパク質に対して、不活性化インフルエンザBの核タンパク質に対するのと同様の安定化効果を有すると考えている。また、他のウイルスおよび細菌のタンパク質も安定化されると考えられる。

【0043】

不活性化ウイルス保存懸濁液の成分をそれぞれの希釈形式に組み込むことは、ウイルス不活性化および希釈の過程に固有であることに注意すべきである。不活性化ウイルス保存懸濁液の成分は、50%のホルマリン不活性化ウイルス含有細胞培養培地(ICC)および50%のStabilcoat(登録商標)緩衝剤から構成されている。試験したそれぞれの陽性対照組成物は若干量のこの保存懸濁液を含む。

【0044】

B. 新しい希釈液の調製

新しい希釈液の調製は、BSA、Tween-20、およびPBS溶液を含む単純タンパク質希釈液であるPBTから開始した。不活性化インフルエンザAウイルスの安定性を維持または増強すると同時に不活性化インフルエンザBウイルスを安定化するその能力についてそれぞれの成分を評価した。抗原調製物の安定性の増大を以下のようにして評価した。その対照試薬を市販する予定の分析試験法のために、信号強度が所望の強さになるよう不活性化ウイルス物質を希釈した。一般に、対照試薬については、対応する分析法において低位乃至中位の信号強さが選択される。選択した抗原希釈でのさまざまな試薬組成物を

10

20

30

40

50

適切な分析法で直ちに試験する。さまざまな試薬組成物（抗原含有）をさまざまな貯蔵条件で配置し、次に分析法で定期的に再試験する。最初の信号を保持し、または貯蔵条件の範囲にわたり最初の信号強さの最小の劣化のみを有する試薬組成物は、安定性の増強を提供すると判定される。信号強さは定性的に、定量的に、視覚的に、または計測手段により評価しうる。成分の選択過程中、P B T希釈液にはいくつかの変更が行われた。まず、ウシ胎児血清などの異なるブロッキング剤をB S Aの代わりに用いた。次に、グリセロールなどの可溶化剤およびE D T AまたはE G T Aなどのキレート剤を添加して安定性を増強した。さらに、T w e e n - 2 0（登録商標）界面活性剤などの非イオン性界面活性剤を包含することは安定性には必須であると判定された。マイクロサイドI Iと硫酸ゲンタマイシンの併用などの保存剤を抗菌剤として包含した。

10

【0045】

特に好ましい実施態様において、本発明の希釈液は、50 mM以上の量のリン酸ナトリウム、2 % v / v以上の量のウシ胎児血清、1 % v / v以上の量のグリセロール、50 mM以上の量の塩化ナトリウム、5 mM以上の量のE D T A、0 . 0 5 % w / v以上の量のT w e e n - 2 0界面活性剤、0 . 0 1 % w / v以上の量の四級アンモニウム化合物、および0 . 5 % w / v以上の量の硫酸ゲンタマイシンを含む。試薬は15 %までのS t a b i l c o a t緩衝剤および抗原調製物からのまたは個別添加により20 %までの組織培養培地をも含む。溶液の好ましいp Hは約7 . 5乃至約8 . 5の間である。緩衝剤および/または塩の代わりに、ある濃度の予備調製組織培養培地（例えば、B i o W h i t t a k e r社製のイーグル最小必須培地またはダルベッコ改変イーグル培地）を用いることも可能でありうる。

20

【0046】

特定の理論に縛られることを望まないが、最初の希釈液に対する変更は以下の機序によりポリペプチドまたは抗原の安定性を増強しうる。ウシ胎児血清は、それが精製タンパク質ではなく総血清生成物であるため、B S Aよりも豊富なタンパク質源を提供しうる。これは他の安定化物質を含みうる。グリセロールは水素結合により抗原の水和を増加させうる。キレート剤は陽イオンを除去することにより安定性を増大しうるが、これはポリペプチドまたは抗原そのものに負に影響するかもしれない、または抗原やポリペプチドを損傷し、または抗原上の触媒部位を阻害しうるある種の分解酵素の活性に必要であるかもしれない。界面活性剤は抗原またはポリペプチドの重要な二次構造および支持結合を維持するかも

30

【0047】

本発明は、最初に、上述した単純B S Aタンパク質希釈液（P B T）における抗原の安定性を基準とすることにより評価した。典型的には、試薬の開発において、45 で約3日までの陽性の保持が低温における長期の安定性を評価するのに十分である。当業者は、高温での約14日までの安定性が十分に安定化した抗原を示すと考えている。さらに、試薬が45 で活性を保持する時間が長いほど、約2 ° ~ 8 下および室温などの低温で安定である時間が長くなる可能性が高い。まず、ホルマリン不活性化インフルエンザ懸濁液の保存液を、当業界において一般に周知であり、以下の実施例1に記載された方法で作成した。次に、インフルエンザAとインフルエンザBの不活性化保存液をそれぞれ、1 : 2と1 : 4の希釈で単純タンパク質希釈液に加えた。これらの希釈では、試験希釈液は、その全体において、それぞれ50 %の希釈液、25 %のI C C、および25 %のS t a b i l c o a t緩衝剤、または75 %の希釈液、12 . 5 %のI C C、および12 . 5 %のS a t b i l c o a t（登録商標）緩衝剤を含んでいた。これらの抗原希釈液は、反応試験器具の目視検査で中等度の陽性信号を供給するために選択した。結果として生じる2つの溶液の陽性について、F L U O I A（登録商標）試験キット（B i o s t a r , I n c .）により0日目、4 で3日目、および45 で3日目に試験した。試験は添付文書のとおり行った。不活性化インフルエンザBは45 で3日目にすべての陽性を失い、不活性化インフルエンザAはその陽性の一部を失った。試験は試薬の欠陥のためその後の時点では行われなかった。P B Tタンパク質希釈液は所望の程度まで抗原の安定性を維持しな

40

50

った。

【0048】

さらに、抗原被覆表面を保護し安定化するように調製されている市販の希釈液である *Stabilcoat* (登録商標) 緩衝剤 (*BSI, Inc.*) を、上記の抗原希釈を用いて試験した。*Stabilcoat* (登録商標) 由来の対照試薬の安定性は、試験点が0日目および4日目(4 および45 の貯蔵条件)であったことを除き上記のとおり評価した。これらの条件下で、希釈液の完全な組成は、75%の*Stabilcoat* (登録商標) 緩衝剤および25%のICCであった。組織培養培地の存在下でも、*Stabilcoat* (登録商標) は4日を超えて不活性化インフルエンザB抗原の安定性を維持することができず、その長期貯蔵能力の欠如を示した。

10

【0049】

次に、本発明の試薬組成物を上記のとおり試験し、その性能を評価した。この場合には、希釈液の完全な組成は、不活性化インフルエンザA溶液については50%の希釈液、25%のICC、および25%の*Stabilcoat* (登録商標) 緩衝剤を含み、不活性化インフルエンザB溶液については75%の希釈液、12.5%のICC、および12.5%の*Stabilcoat* (登録商標) 緩衝剤を含んでいた。45 での3日目に、不活性化インフルエンザAとBは一部の陽性を失ったが、依然として明らかに陽性であった。不活性化インフルエンザB試薬を7日目、14日目、および21日目に評価した。最終的に、45 での21日後に、不活性化インフルエンザBはすべての陽性を失った。以前の試験でも、不活性化インフルエンザAはその陽性の大部分を21日までに失うことが示された。これらの特定の分析条件下における不活性化インフルエンザAの増強は、欠陥まで試験されなかったためデータには示されていない。しかし、これらの条件下の不活性化インフルエンザAの安定性はきわめて高い可能性があり、試験した時点を超えて拡張しうる。これらのまたは他の分析条件下に欠陥まで試験すれば、本発明の希釈液はインフルエンザA抗原の安定性も増強するはずである。したがって、単純PBTタンパク質希釈液および*Stabilcoat* (登録商標) に比べ、本発明の組成物は貯蔵用の溶液中において抗原をはるかに良く安定化することができる。

20

【0050】

本発明の別の評価において、本発明の安定化希釈液を用いてさらに感受性の光学的分析を行った。この方法に対する陽性対照では、ホルマリン不活性化インフルエンザAおよびホルマリン不活性化インフルエンザBのいずれについても1:10の希釈に希釈した抗原を用いて、かかる対照溶液に必要な中等度の信号を達成する。この評価において用いられる抗体は、用いられる表面の種類に対する最適な分析性能に基づき選択された。分析表面での反応性部位は、それぞれの分析表面が1つのインフルエンザA反応性部位と1つのインフルエンザB反応性部位を含むように、モノクローナル抗インフルエンザA抗体またはモノクローナル抗インフルエンザB抗体を表面上にストリッピングすることにより好ましい方法で作成した。それぞれの表面を乾燥させ、室温下に保存剤でオーバーコーティングした。抗体表面は熱ステーキング装置を用いて、多孔性表面の中または周りを溶液が流れることを可能にするポリスチレンリングに熱シールした。プラスチックリングは、取り扱いを容易にする支持および多孔性表面を真空源に取り付ける手段を供給し、多孔性表面からの流体の除去および多孔性表面の乾燥を補助する。この実験の目的のために、貫流様式で分析を行った。貫流とは、試料が分析表面に接触し、分析処置時に分析表面の中、上、または周りを流れたことを示す。

30

40

【0051】

この実験では、本発明の安定化希釈液の成分として、抗原の安定性を増強する細胞培養培地 (*EMEM, Bio Whittaker, Cat. # 12 136Q*) の能力を試験した。4つの試験溶液を作成した：(A) 75%の本発明の希釈液、12.5%のEMEMおよび12.5%の*Stabilcoat* 緩衝剤、(B) EMEMが追加的に2%のFCS、1%のL-グルタミン、および0.5%のペニシリン/ストレプトマイシン/フングゾン (抗菌溶液、*Bio Whittaker, Cat. # 17-745H*) を含有す

50

る溶液A、(C)75%の本発明の希釈液および25%のStabilcoat希釈液、および(D)本発明の希釈液のみ。4つの希釈液のそれぞれについて、それぞれの試験希釈液で最初に1:4の希釈を作成し、その後1:2.5の希釈を作成することにより不活性化インフルエンザB保存懸濁液の1:10の希釈を作成した。各溶液を4で3日目および45で3日目に試験した。溶液Aは45で3日目に最良の安定性を示し、溶液B、DおよびCがそれに続いた。それぞれの結果は、抗原の希釈を増加させる条件下で細胞培養培地/Stabilcoat(登録商標)を希釈液の中に組み込むことにより抗原の安定性が増強(溶液Aの安定性を溶液Dの安定性と比較)することを示す。唯一の他の成分として高濃度のStabilcoat(登録商標)緩衝剤を利用すること(溶液C)は、(溶液Aに比べて)抗原の安定性に対して有害であることがわかった。

10

【0052】

したがって、これらの結果は、本発明が水性培地、特にインフルエンザの培地においてタンパク質抗原を安定化する能力がその種類の他の希釈液を大きく凌ぐことを明らかに示している。

【0053】

以下の実施例は、限定としてではなく例示として提供され、本発明のさまざまな態様および実施態様をさらに説明するためのものである。実施例により特許請求の範囲の限定が意図されるものではない。

【0054】

(実施例)

20

実施例1:

1XダルベッコのPBS、0.05%のTween-20界面活性剤、2%のBSA、0.01%のマイクロサイドII保存剤、および0.5%の硫酸ゲンタマイシンを含む単純タンパク質希釈液(PBT)中の抗原の安定性を評価した。まず、不活性化インフルエンザウイルス懸濁保存液を以下のとおり調製した。コンフルエントのMDCK p83細胞をインフルエンザA(フラスコ当りA/香港68の1:10,000希釈)またはインフルエンザB(フラスコ当りB/パナマ45/90の1:1000希釈)に感染させ、90~100%のCPE(細胞変性効果)が確認されるまでイーグルMEM維持培地(2%の熱不活性化FCS、1%のL-グルタミン、および0.5%のペニシリン/ストレプトマイシン/フングゾンを含む)中で増殖させた。細胞懸濁液をボルテックスで攪拌して遠心分離することによりウイルスを収集した。得られた上清を、37%のホルムアルデヒド溶液(Sigma Chemical、F-1268)を総量の0.2%まで(2 μ l/ml)添加し、室温で1時間インキュベートすることにより不活性化した。次に、ウイルス含有溶液を同量のStabilcoat(登録商標)緩衝剤(BSI, Inc.)と混合し、分割し、使用するかまたは直ちに凍結した。

30

【0055】

1mlの不活性化インフルエンザA保存液を1mlの単純希釈液に添加し、別の容器中で0.5mlの不活性化インフルエンザB保存液を1.5mlの単純希釈液に添加することにより、不活性化インフルエンザAおよびインフルエンザBのウイルス懸濁保存液をそれぞれ1:2および1:4で単純BSA希釈液に加えた。これらの希釈では、試験希釈液は、その全体において、それぞれ50%の希釈液、25%のICC、および25%のStabilcoat緩衝剤、または75%の希釈液、12.5%のICC、および12.5%のStabilcoat(登録商標)緩衝剤を含んでいた。次に、それぞれ得られた溶液の陽性について、FLU OIA(登録商標)試験キット(Biostar, Inc.)を用いて0日目に試験した。試験は添付文書のとおり行い、反応したFLU OIA試験装置の視覚解釈により信号の質または陽性を以下のとおり評価した:(0)負;(1)陰;(2)きわめて弱い陽性;(3)きわめて弱いと弱い間の陽性;(4)弱い陽性;(5)弱いと中等度の間の陽性;(6)中等度の陽性;(7)中等度と強い間の陽性;(8)強い陽性の結果。2~8に評価された場合は信号を陽性と判断した。

40

【0056】

50

希釈後、各溶液を2つの部分に分けた。1つは4 で、もう1つは4 5 で3日間貯蔵した。4つの溶液をすべて3日目に0日目と同じ方法で再試験した。0日目と4 の対照は予想された中等度の陽性信号を示した。不活性化インフルエンザBは4 5 で3日目にすべての陽性を失い、不活性化インフルエンザAはその陽性の一部を失った。試薬の欠陥のため、これ以降の時点での試験は行わなかった。典型的には、試薬の開発において、4 5 で3日までの陽性の保持が低温での長期の安定性を評価するのに十分である。試薬が4 5 で活性を保持する時間が長いほど、約2 ° ~ 8 および室温などの低温での安定性と相関する。したがって、この単純P B T調製物は所望の程度まで抗原の安定性を維持することができなかった。

【0057】

10

実施例2：

抗原被覆表面を保護し安定化するように調製されている市販の希釈液であるS t a b i l c o a t (登録商標)緩衝剤(B S I , I n c .)について、試薬を0日目および4日目(4 および4 5 の貯蔵条件)に試験したことを除き、実施例1に記載したとおりに試験した。希釈液の完全な組成は、75%のS t a b i l c o a t緩衝剤および25%のI C Cであったことに注意されたい。S t a b i l c o a tも4日を超えて不活性化インフルエンザB抗原の安定性を維持することができず、その長期貯蔵能力の欠如を示した。

【0058】

実施例3：

次に、実施例1に記載したものと同様の実験において本発明の試薬組成物を試験した。希釈液を以下のとおり20mlの量で作成した。円錐形の管に、2mlの1Mリン酸ナトリウム緩衝剤および8mlのd H₂Oを添加し(100mM)、混合し、pHを7.5に調節した。次に、0.175gのN a C l (150mM)を添加し混合した。次に、0.1mlの10%T w e e n - 2 0溶液(0.05%)を添加し混合した。次に、ミクロサイド(登録商標)I I保存剤の1%保存液0.2ml(0.01%)および0.1mlの硫酸ゲンタマイシン(0.5%)を管に添加し混合した。次に、2mlのグリセロール(10%)および1mlのウシ胎児血清(5%)を添加し混合した。次に、E D T Aの500mM保存液0.4ml / d H₂O(10mm)の混合物を添加し混合し、pHを7.5に調節した。d H₂Oで総量を20mlとした。

20

【0059】

30

5mlの希釈液を5mlの不活性化インフルエンザAウイルス保存液(1:2希釈)に、または7.5mlの希釈液を2.5mlの不活性化インフルエンザBウイルス保存液(1:4希釈)に添加し十分に混合することによりウイルス試験試薬を作成した。この場合には、希釈液の完全な組成は、不活性化インフルエンザA溶液については50%の希釈液、25%のI C C、および25%のS t a b l i c o a t (登録商標)緩衝剤を含み、不活性化インフルエンザB溶液については75%の希釈液、12.5%のI C C、および12.5%のS t a b i l c o a t (登録商標)緩衝剤を含んでいた。それぞれ実験の全体を通じて各試験試薬についてF L U O I A試験を添付文書のとおり行った。この実験は抗原の安定性の増強のため21日まで行った。4 5 での3日目に、不活性化インフルエンザAとBはいずれも若干の陽性を失ったが依然として明らかに陽性であった。7日目、14日目、および21日目に不活性化インフルエンザB試薬を評価した。最終的に、4 5 での21日目に、不活性化インフルエンザBはすべての陽性を失った。不活性化インフルエンザAも他の試験においてこの時間後にその活性の大部分を失うことが示されている。0~8の主観的尺度に基づき、分析結果を以下のとおり視覚的に解釈した：(0)負；(1)陰；(2)きわめて弱い陽性；(3)きわめて弱いと弱い間の陽性；(4)弱い陽性；(5)弱いと中等度の間の陽性；(6)中等度の陽性；(7)中等度と強い間の陽性；(8)強い陽性の結果。2~8に評価された場合は信号を陽性と判断した。本発明の希釈液におけるインフルエンザBの増強された安定性が図1に示されている。

40

【0060】

実施例4：

50

本発明の別の評価において、陽性対照としてホルマリン不活性化インフルエンザAおよびホルマリン不活性化インフルエンザBの1：10の希釈に希釈した抗原を用いて、かかる対照溶液に必要な中等度の信号を達成した異なる分析において安定化希釈液を用いた。不活性化ウイルス懸濁保存液を実施例1におけるように調製し、安定化希釈液を実施例3に記載したとおり調製した。表面が反射性を与えるシリコンの光学層、Si₃N₄の抗反射層、および国際特許公開番号WO/98/18962によるダイヤモンド状の炭素の付着層で被覆されたトラックエッチングしたポリカーボネート膜である、光学的に調製された多孔性表面を被覆するように抗体を選択した。この評価において用いた抗体は、用いられる表面の種類に対する最適な分析性能に基づき選択された。分析表面の反応性部位は、それぞれの分析表面が1つのインフルエンザA反応性部位と1つのインフルエンザB反応性部位を含むように、モノクローナル抗インフルエンザA抗体(0.1M HEPES、pH 8.0、1%ショ糖中40 μg/ml)またはモノクローナル抗インフルエンザB抗体(0.1M HEPES、pH 8.0、1%ショ糖、150 mMのNaCl中40 μg/ml)を表面上にストリッピングすることにより好ましい方法で作成した。表面はBioJet(登録商標)器具でストリッピングし、乾燥させ、室温下に保存溶液でオーバーコーティングした。抗体表面は熱ステーキング装置を用いて、多孔性表面の中または周りを溶液が流れることを可能にするポリカーボネートリングに熱シールした。プラスチックリングは、取り扱いを容易にする支持および多孔性表面を真空源に取り付ける手段を供給し、多孔性表面からの流体の除去および多孔性表面の乾燥を補助する。被覆表面を使用前に2～8 で貯蔵した。この実験の目的のために、貫流様式で分析を行った。貫流とは、試料が分析表面に接触し、分析処置時に分析表面の中、上、または周りを流れたことを示す。

10

20

【0061】

この実験では、細胞培養培地(EMEM)が本発明の安定化希釈液の成分として抗原の安定性を増強する能力を試験した。4つの試験溶液を作成した：(A)75%の本発明の希釈液、12.5%のEMEMおよび12.5%のStabilcoat緩衝剤、(B)EMEMが追加的に2%のFCS、1%のL-グルタミン、および0.5%のペニシリン/ストレプトマイシン/フンギゾンを含む溶液A、(C)75%の本発明の希釈液および25%のStabilcoat希釈液、および(D)本発明の希釈液のみ。4つの希釈液のそれぞれについて、それぞれの試験希釈液で最初に1：4の希釈を作成し、その後1：2.5の希釈を作成することにより不活性化インフルエンザB保存懸濁液の1：10の希釈を作成した。4つの溶液のそれぞれ(30 μl)を165 μlの抽出試薬を含む個別の管に添加し、1分間インキュベートした。各試料の全体を上記の表面上に移し、3分間インキュベートした。次に、100 μlのコンジュゲート(HRPにコンジュゲートさせた抗インフルエンザA抗体とHRPにコンジュゲートさせた抗インフルエンザB抗体を混合)をさらに3分間、表面上に配置した。次に、表面の下部に減圧をかけ、表面から試料/コンジュゲートの混合物を除去した。表面上に水性洗浄溶液を配置し、減圧下で表面が乾燥するまで溶液が表面を流れるようにすることにより、表面を3回洗浄した。減圧を止め、75 μlの沈殿TMB基質を分析表面上に配置し、6分間インキュベートした。基質を表面から剥がし、表面を1回洗浄し、上記のとおり乾燥させた。次に分析信号を実施例3におけるように解釈した。

30

40

【0062】

各溶液を4 で3日目および45 で3日目に試験した。溶液Aは45 で3日目に最良の安定性を示し、続いて溶液B、DおよびCであった。それぞれの結果は、抗原の希釈を強める条件下に細胞培養培地/Stabilcoat(登録商標)を希釈液の中に組み込むと抗原の安定性が増強(溶液Aの安定性を溶液Dの安定性と比較)することを示す。唯一の他の成分として高濃度のStabilcoat(登録商標)緩衝剤を利用すること(溶液C)は、抗原の安定性に対して有害であることがわかった。図2は前述の実験について得られた結果を示す。

【0063】

50

これらの結果は、本発明が水溶液中のタンパク質抗原、特にインフルエンザのタンパク質抗原を安定化するその能力において他の希釈液を大きく凌ぐことを明らかに示している。上記の各文献、特許、または特許出願はその全体が本明細書中において参考として援用される。

【0064】

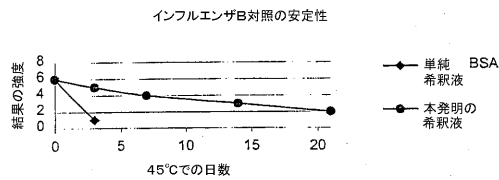
本発明の好ましい実施態様を記載してきたが、当業者であれば、発明の精神および添付の特許請求の範囲から逸脱することなく、さまざまな変更、改変および改造がなされうること理解するであろう。

【図面の簡単な説明】

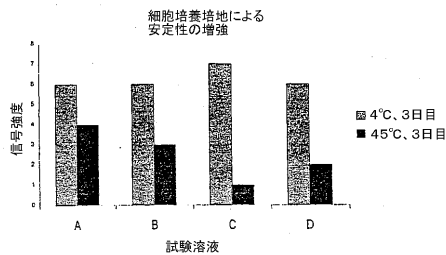
【図1】 不活性化インフルエンザBの安定性に対する本発明の希釈液の利点を示す図である。 10

【図2】 細胞培養培地が本発明の希釈液の安定化特性をさらに増強する能力を示す図である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/569 L

(72)発明者 スティーフェンズ, ジェフェリー・ダブリュ
アメリカ合衆国コロラド州80026 ラファイエット, ワネカ レイク トレイル 1603

(72)発明者 バンザレーラ, ローラ
アメリカ合衆国コロラド州80501 ロングモント , 211, サンセット ドライブ 252
6

審査官 加々美 一恵

(56)参考文献 特開平10-191972(JP, A)
特表平10-506912(JP, A)
国際公開第99/015901(WO, A1)

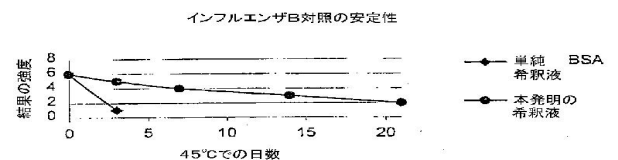
(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48-33/98
C12Q 1/68

专利名称(译)	多肽和抗原的稳定稀释液		
公开(公告)号	JP3884652B2	公开(公告)日	2007-02-21
申请号	JP2001545519	申请日	2000-12-07
[标]申请(专利权)人(译)	赛生物公司星 旭化成工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	热生物星公司 旭化成株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	热电公司 - 点护理结束快速诊断 旭化成株式会社		
[标]发明人	スティーフェンズジェフェリーダブリュ パンザレーラローラ		
发明人	スティーフェンズ,ジェフェリー・ダブリュ パンザレーラ,ローラ		
IPC分类号	G01N33/531 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/569 A61K39/145 A61K47/00 A61K47/02 A61K47/10 A61K47/18 A61K47/26 A61K47/42 C12N5/02		
CPC分类号	A61K39/00 A61K47/02 A61K47/10 A61K47/183 A61K47/186 A61K47/26 A61K47/42 A61K2039/555 G01N33/53 Y10S424/81 Y10S435/811 Y10S436/826 Y10S530/868 Y10T436/10 Y10T436/106664 Y10T436/108331 Y10T436/2525		
FI分类号	G01N33/531.B C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/566 G01N33/569.B G01N33/569.L		
代理人(译)	田中玲子 森田浩二		
优先权	60/170850 1999-12-14 US		
其他公开文献	JP2003517153A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了用于稳定多肽或抗原的组合物。这些组合物可用于稳定储存在含水制剂中的多肽或抗原。此类制剂可用于各种分析或其他方法。

【 図 1 】



【 図 2 】

