

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3930519号
(P3930519)

(45) 発行日 平成19年6月13日(2007.6.13)

(24) 登録日 平成19年3月16日(2007.3.16)

(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 33/576 (2006.01)	GO 1 N 33/576	Z
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531	B
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 8 1 B
	GO 1 N 33/543	5 8 1 J
	GO 1 N 33/543	5 8 3

請求項の数 23 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2005-139663 (P2005-139663)	(73) 特許権者	391008788
(22) 出願日	平成17年5月12日(2005.5.12)		アボット・ラボラトリーズ
(62) 分割の表示	特願平9-500738の分割		ABBOTT LABORATORIES
原出願日	平成8年5月24日(1996.5.24)		アメリカ合衆国、イリノイ州 60064
(65) 公開番号	特開2005-300552 (P2005-300552A)		、アボット・パーク、アボット・パーク・
(43) 公開日	平成17年10月27日(2005.10.27)		ロード 100、エーピー6エー1 0
審査請求日	平成17年5月12日(2005.5.12)		377
(31) 優先権主張番号	08/482,710	(74) 代理人	100062007
(32) 優先日	平成7年6月7日(1995.6.7)		弁理士 川口 義雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100114188
			弁理士 小野 誠
前置審査		(74) 代理人	100140523
			弁理士 渡邊 千尋
		(74) 代理人	100119253
			弁理士 金山 賢教

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イムノアッセイ用試薬の緩衝剤組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

熱ストレス条件下における、ウイルスゲノムのNS3領域のC型肝炎ウイルス抗原に係る免疫応答性の安定化に適切な水性組成物であって、
該組成物は、pHを7.2以下のレベルで維持する少なくとも一種の生物学的緩衝剤；
熱ストレス条件下における、ウイルスゲノムのNS3領域の該C型肝炎ウイルス抗原に係るスルフヒドリル基を保護するジチオトレイトール；
4%～8%（%は、g/100mlを意味する）の範囲の濃度で存在するエチレングリコールを含み、組成物のpHが7.2以下であることを特徴とする該組成物。

【請求項2】

少なくとも一種の生物学的緩衝剤が、10mM～500mMの範囲の濃度で存在する、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

少なくとも一種の生物学的緩衝剤が、
ベンゼン-1,2,4,5-テトラカルボン酸（ピロメリット酸）；
ベンゼン-1,2,3-トリカルボン酸（ヘミメリット酸）；
ジメチルマロン酸；
ヒスチジン；
ヒドロキシルアミン；
炭酸（ $H_2CO_3 + CO_2$ ）；

10

20

- マロン酸；
 2 - (N - モルホリノ) - エタンスルホン酸「 M E S 」；
 グリセロリン酸；
 プロパン - 1 , 2 , 3 - トリカルボン酸 (トリカルバリル酸) ；
 ベンゼンペンタカルボン酸；
 マレイン酸；
 2 , 2 - ジメチルコハク酸；
 エチレンジアミン四酢酸「 E D T A 」；
 3 , 3 - ジメチルグルタル酸；
 ビス (2 - ヒドロキシエチル) イミノ - トリス (ヒドロキシメチル) メタン「 B I S - T R I S 」； 10
 ベンゼンヘキサカルボン酸 (メリット酸) ；
 N - (2 - アセタミド) イミノ - 二酢酸「 A D A 」；
 ブタン - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラカルボン酸；
 ピロリン酸；
 1 , 1 - シクロペンタン二酢酸 (3 , 3 - テトラメチレン - グルタル酸) ；
 1 , 4 - ピペラジンビス - (エタンスルホン酸) 「 P I P E S 」；
 N - (2 - アセタミド) - 2 - アミノエタンスルホン酸「 A C E S 」；
 1 , 1 - シクロヘキサン二酢酸；
 3 , 6 - エンドメチレン - 1 , 2 , 3 , 6 - テトラヒドロフタル酸「 E M T A 」 (「 E N D C A 」) ； 20
 イミダゾール；
 塩化 2 - (アミノエチル) トリメチルアンモニウム「 C H O L A M I N E 」；
 N , N - ビス (2 - ヒドロキシエチル) - 2 - アミノエタンスルホン酸「 B E S 」；
 2 - メチルプロパン - 1 , 2 , 3 - トリスカルボン酸 (- メチルトリカルバリル酸) ；
 2 - (N - モルホリノ) プロパン - スルホン酸「 M O P S 」；
 リン酸；
 N - トリス (ヒドロキシメチル) メチル - 2 - アミノエタンスルホン酸「 T E S 」；および
 N - 2 - ヒドロキシエチルピペラジン - N ' - 2 - エタンスルホン酸「 H E P E S 」 30
 から成る群から選択される酸または塩基である、請求項 1 に記載の組成物。
- 【請求項 4】
 少なくとも 1 種の生物学的緩衝剤の p K a が 5 . 6 ~ 7 . 6 の範囲である、請求項 1 に記載の組成物。
- 【請求項 5】
 ジチオトレイトールが 2 m M ~ 1 0 m M の範囲の濃度で存在する、請求項 1 に記載の組成物。
- 【請求項 6】
 さらに少なくとも 1 種の生物学的洗剤を、非イオンの相互作用により引き起こされる、抗 - H C V 抗体以外の抗体の H C V 抗原に対する非特異的結合を減少させるのに十分な濃度で含む、請求項 1 に記載の組成物。 40
- 【請求項 7】
 少なくとも 1 種の生物学的洗剤が、0 . 0 1 % ~ 1 % (% は、g / 1 0 0 m l を意味する) の範囲の濃度で存在する、請求項 6 に記載の組成物。
- 【請求項 8】
 少なくとも 1 種の生物学的洗剤が、非イオン界面活性剤、陰イオン界面活性剤、両イオン界面活性剤および陽イオン界面活性剤から成る群から選択される、請求項 6 に記載の組成物。
- 【請求項 9】
 少なくとも 1 種の生物学的洗剤が、非イオン界面活性剤である、請求項 8 に記載の組成 50

物。

【請求項 10】

さらに陰イオン界面活性剤を含む、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

さらに、正および負の対イオン源の少なくとも 1 種を、イオンの相互作用により引き起こされる、抗 - H C V 抗体以外の抗体の H C V 抗原に対する非特異的結合を減少させるのに十分な濃度で含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 12】

少なくとも 1 種の正および負の対イオン源が、0.05 M ~ 0.5 M の範囲の濃度で存在する、請求項 11 に記載の組成物。

10

【請求項 13】

少なくとも 1 種の正および負の対イオン源が塩である、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 14】

塩が、NaCl 及び KCl から成る群から選択される、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

さらに少なくとも 1 種の粘度調節剤を、微粒子が懸濁した溶液の粘度を増加させて、懸濁した該微粒子の沈降を減少させるのに十分な濃度で含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 16】

少なくとも 1 種の粘度調節剤が、5% ~ 25% (% は、g / 100 ml を意味する) の範囲の濃度で存在する、請求項 15 に記載の組成物。

20

【請求項 17】

少なくとも 1 種の粘度調節剤が糖である、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 18】

糖が、ショ糖、グルコース及びマンニトールから成る群から選択される、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

さらに少なくとも 1 種の保存剤を、微生物の増殖を低下させるのに十分な濃度で含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 20】

少なくとも 1 種の保存剤が、0.1% ~ 1.0% (% は、g / 100 ml を意味する) の範囲の濃度で存在する、請求項 19 に記載の組成物。

30

【請求項 21】

少なくとも 1 種の保存剤がアジ化ナトリウムである、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 22】

組成物の pH が 6.4 ~ 6.8 の範囲である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 23】

熱ストレス条件下における、ウイルスゲノムの NS3 領域の C 型肝炎ウイルス抗原に係る免疫応答性の安定化に適切な水性組成物であって、

10 mM ~ 500 mM の少なくとも 1 種の生物学的緩衝剤；

2 mM ~ 10 mM のジチオトレイトール；

40

4% ~ 8% (% は g / 100 ml を意味する。以下同じ) のエチレングリコール；

0.01% ~ 1% の少なくとも 1 種の生物学的洗剤；

0.05 M ~ 0.5 M の少なくとも 1 種の正および負の対イオン源；

5% ~ 25% の少なくとも 1 種の粘度調整剤；および

0.1% ~ 1% の少なくとも 1 種の保存剤を含み、

該組成物の pH は、6.4 ~ 7.2 の範囲の濃度である、熱ストレス条件下における、ウイルスゲノムの NS3 領域の C 型肝炎ウイルス抗原に係る免疫応答性の安定化が可能である、該組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

本発明は、緩衝組成物、特に、抗体および抗原などの免疫学的および免疫化学的アッセイ成分に有用な緩衝組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

多くの種類のイムノアッセイは、米国特許 No.5,358,691 (参考として本明細書に組み入れる。)に記載された型の装置で行うことができる。一般に、イムノアッセイは、大きく二つに分類することができる。すなわち、均質系および不均質系である。均質系および不均質系のイムノアッセイは、結合要素対の第一の結合要素(例えば、抗原)が結合要素対の第二の結合要素(例えば、抗体)に特異的に結合する能力に依存する。該結合要素の一方を検出可能な成分で標識して含むコンジュゲートを使用すると、該結合の程度が測定される。例えば、該結合要素対は、抗原および該抗原に対する抗体であり得る。抗原を含み得るコンジュゲートは、抗体との結合反応に関与し、または関与しない。反応後に検出され、測定される検出可能な成分の量は、試験サンプル中に存在する抗体の量と相関し得る。

10

【0003】

不均質系のアッセイは、競合イムノアッセイ様式またはサンドイッチイムノアッセイ様式で行うことができる。競合イムノアッセイ様式では、抗原を固相物質に固定化することができる。これにより、固相物質に結合した検出可能な成分の量を検出・測定して、試験サンプル中に存在する抗体の量と相関させることができる。固相物質の例としては、ビーズ、粒子、微粒子などが挙げられる。サンドイッチイムノアッセイ様式では、例えば抗体を含む試験サンプルを、抗原などのタンパク質と接触させる。抗原は、固相物質に固定化させる。固相物質の例としては、ビーズ、粒子、微粒子などが挙げられる。固相物質は、典型的には、検出可能な成分で標識してある第二の抗原または抗体で処理する。そのとき、第二の抗原または抗体は、固相物質上の対応する抗原または抗体に結合することになり、1回以上の洗浄工程により未結合物質を除去した後、色素物質などの指示薬を導入して検出可能成分と反応させ、検出可能なシグナル、例えば色の変化を生じさせる。次いで、その色の変化を検出・測定し、試験サンプル中に存在する抗体の量と相関させる。なお、化学反応に関与する、微粒子、抗原、コンジュゲートおよびアッセイの他の成分の作用を最適にするために、種々の希釈剤および緩衝剤も必要である。

20

30

【0004】

米国特許No,5,358,691の装置を使用して、競合またはサンドイッチイムノアッセイ様式で行うことができる不均質系のイムノアッセイは、Clinical Chemistry, Volume 34, No. 9, 1726-1732(1988)に記載されているような、固相物質として微粒子を使用する、微粒子捕獲酵素イムノアッセイである。この文献は、参考として本明細書に組み入れる。

【0005】

微粒子捕獲酵素イムノアッセイ手順の段階的説明は、米国特許No,5,358,691の第35欄第60行～第44欄第22行に記載されている。

【0006】

米国特許No,5,358,691に記載の装置上で行うイムノアッセイで使用するキットの種々の成分は、ある一定の機能的要件を満たさなければならない。微粒子は、抗体との結合のために使用される抗原の支持体として作用する、抗体との結合のための固相を提供しなければならない。これらの粒子は、それ自体が、例えばマトリックス細胞フィルターに固定されて、コンジュゲート/基質結合による結合抗体の検出を可能にするものでなければならない。微粒子希釈剤は、抗原が、患者試料中の相補的抗体によって認識される能力(安定性)を保持し、その認識(シグナル発生)を阻害しない培地を提供しなければならない。コンジュゲートは、微粒子上の抗原に結合した抗体を特異的に認識する手段および微粒子上のコンジュゲートの存在を指示するためのシグナルを発生させる手段を提供しなければならない。コンジュゲート希釈剤は、コンジュゲート上の一つの結合対要素がその相補的結合対要素を認識する能力を保存し、最適化すると同時に、酵素部分(例えば、アルカリ

40

50

ホスファターゼ部分)が基質を検出可能な物質に加水分解する能力を保存し、最適化する培地を提供しなければならない。さらに、コンジュゲート希釈剤は、マトリックスまたは微粒子へのコンジュゲートの非特異的結合を、除去しないならば、最少にする成分を含んで、偽シグナルの発生を防がなければならない。サンプル希釈緩衝剤は、試料中の抗体の微粒子上の抗原への結合能を最適にする一方で、偽シグナルの発生を起こし得る非特異的相互作用を防ぐ培地を提供しなければならない。

【0007】

イムノアッセイで使用されるある種の抗原は、熱に長時間暴露すると不安定になるので、抗原の熱応力に対する安定性を増加させるのが望ましい。抗原は、エピトープによって特徴付けられるので、特徴的なエピトープの安定性を増加させることにより抗原の安定性を高めるのが望ましい。

10

【0008】

(発明の要旨)

本発明は、少なくとも1種の生物学的緩衝剤、ジチオトレイトール(あるいは、「DTT」とも言う)およびエチレングリコールを含む、緩衝剤としての使用に適する水性組成物を提供する。該組成物の媒体は水である。組成物はまた、少なくとも1種の生物学的洗剤、少なくとも1種の正および負の対イオン源(例えば、塩)、ならびに少なくとも1種の粘度調節剤(例えば、糖)を含むこともできる。緩衝剤はまた、少なくとも1種の保存剤(例えば、アジ化ナトリウム)を含むことができる。本発明の組成物のpHは、約6.4~約7.2、好ましくは約6.4~約6.8、より好ましくは約6.5~約6.7の範囲であり得る。最も好ましくは、組成物のpHは約6.6である。

20

【0009】

組成物は、抗原(例えばウイルスゲノムのNS3領域のC型肝炎ウイルス(HCV)抗原)の、熱ストレス条件、特に31~37の範囲の温度下での免疫応答性の安定化に特に有用である。本発明の組成物は、抗原がポリマー微粒子上に受動的に被覆される診断アッセイに対する微粒子の希釈剤として有用であることが分かった。エチレングリコールを使用すると、微粒子の表面上に置かれた抗原に結合する相補的抗体を検出する抗原の長期能力がかなり高められることが分かった。

【0010】

本発明の組成物は、高められた温度(例えば、37)で比較的長時間(例えば、20日間)、抗原および抗体に対して免疫応答安定性を付与する。

30

【0011】

本発明の別の発明では、該組成物を一成分として含むキットも提供する。

【0012】

(発明の詳細な説明)

本発明は、熱ストレス条件下での抗原および抗体の安定性の改善に特に有用な水性組成物に関する。組成物は、次の成分を含む。すなわち、少なくとも1種の生物学的緩衝剤、ジチオトレイトール $[HSCH_2(CHOH)_2CH_2SH]$ およびエチレングリコール $[HOCH_2CH_2OH]$ である。組成物の媒体は水である。

【0013】

本発明の好ましい態様では、組成物はさらに、少なくとも1種の生物学的洗剤、少なくとも1種の正および負の対イオン源(例えば、塩)、ならびに少なくとも1種の粘度調節剤(例えば、糖)を含む。保存剤(例えば、アジ化ナトリウム)も、微生物の増殖を減少させるために組成物に添加することができる。組成物のpHは、約6.4~約7.2、より好ましくは約6.5~約6.7の範囲である。必要であれば、組成物のpHを酸または塩基で調整することができる。

40

【0014】

生物学的緩衝剤の作用は媒体のpHを一定のレベルに保つことである。緩衝剤のpKaがpH6.6の1.0pH単位以内であるとき、最適の結果が得られることが分かった。換言すれば、緩衝剤のpKaは好ましくは5.6~7.6である。

50

【 0 0 1 5 】

本発明の組成物に適する生物学的緩衝剤としては、それらに限定されないが、次の酸または塩基が挙げられる。

ベンゼン - 1 , 2 , 4 , 5 - テトラカルボン酸 (ピロメリット酸) ;

ベンゼン - 1 , 2 , 3 - トリカルボン酸 (ヘミメリット酸) ;

ジメチルマロン酸 ;

ヒスチジン ;

ヒドロキシルアミン ;

炭酸 ($H_2CO_3 + CO_2$) ;

マロン酸 ;

2 - (N - モルホリノ) - エタンスルホン酸 「 M E S 」 ;

グリセロリン酸 ;

プロパン - 1 , 2 , 3 - トリカルボン酸 (トリカルバリル酸) ;

ベンゼンペンタカルボン酸 ;

マレイン酸 ;

2 , 2 - ジメチルコハク酸 ;

エチレンジアミン四酢酸 「 E D T A 」 ;

3 , 3 - ジメチルグルタル酸 ;

ビス (2 - ヒドロキシエチル) イミノ - トリス (ヒドロキシメチル) メタン 「 B I S - T R I S 」 ;

ベンゼンヘキサカルボン酸 (メリット酸) ;

N - (2 - アセタミド) イミノ - 二酢酸 「 A D A 」 ;

ブタン - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラカルボン酸 ;

ピロリン酸 ;

1 , 1 - シクロペンタン二酢酸 (3 , 3 - テトラメチレン - グルタル酸) ;

1 , 4 - ピペラジンビス - (エタンスルホン酸) 「 P I P E S 」 ;

N - (2 - アセタミド) - 2 - アミノエタンスルホン酸 「 A C E S 」 ;

1 , 1 - シクロヘキサン二酢酸 ;

3 , 6 - エンドメチレン - 1 , 2 , 3 , 6 - テトラヒドロフタル酸 「 E M T A 」 (「 E N D C A 」) ;

イミダゾール ;

塩化 2 - (アミノエチル) トリメチルアンモニウム 「 C H O L A M I N E 」 ;

N , N - ビス (2 - ヒドロキシエチル) - 2 - アミノエタンスルホン酸 「 B E S 」 ;

2 - メチルプロパン - 1 , 2 , 3 - トリスカルボン酸 (- メチルトリカルバリル酸) ;

2 - (N - モルホリノ) プロパン - スルホン酸 「 M O P S 」 ;

リン酸 ;

N - トリス (ヒドロキシメチル) メチル - 2 - アミノエタンスルホン酸 「 T E S 」 ; および

N - 2 - ヒドロキシエチルピペラジン - N ' - 2 - エタンスルホン酸 「 H E P E S 」

上記リストにおいて、括弧内の化合物名は、括弧の化合物名の前にある化合物の一般名である。カギ括弧の頭文字語は、カギ括弧の頭文字語の前にある化合物を指示するとき、一般に使用される化合物名である。

【 0 0 1 6 】

緩衝剤の量は、その意図する機能、すなわち所望の pH の維持を行うのに十分であるべきである。生物学的緩衝剤の有効な濃度は、約 10 ミリモル / l ~ 約 500 ミリモル / l (mM)、より好ましくは約 10mM ~ 約 100mM の範囲である。好ましい緩衝剤は、頭文字語 「 M E S 」 によって機能する緩衝剤である。

【 0 0 1 7 】

ジチオトレイトールの機能は、タンパク質のスルフヒドリル基を保護することである。ジチオトレイトールは、タンパク質のスルフヒドリル基を保護することによって、抗原、

10

20

30

40

50

例えばHCVの抗原の特徴的構造を保持することができ、それによって、相補的抗体による抗原の認識が可能になる。ジチオトレイトールは、Calbiochem-Novabiochem Corporation(カリフォルニア州サンジエゴ)発行の「Cleland 試薬」と題するパンフレットに詳細に記載されている。ジチオトレイトールの量は、その意図する機能、すなわちタンパク質のスルフヒドリル基の保護を行うのに十分であるべきである。本明細書で使用する「スルフヒドリル基の保護」とは、タンパク質に既に存在しているジスルフィド基には影響を及ぼさず、タンパク質のスルフヒドリル基がジスルフィド基に酸化されるのを抑制することを意味する。ジチオトレイトールの有効な濃度は、約2ミリモル/l～約10ミリモル/l(mM)、好ましくは約5mM～約10mM、より好ましくは約10mMの範囲である。

【0018】

エチレングリコールの機能は、ジチオトレイトールが酸化剤によって酸化されるのを防ぐことである。例えば、エチレングリコールの不在下では、ジチオトレイトールが酸化され、その結果、ジチオトレイトールはスルフヒドリル基の保護にはあまり有効でなくなる。エチレングリコールは、1,2-ジオールである。エチレングリコールは、抗体(例えば抗-HCV抗体)の抗原(例えば、HCV抗原)に対する結合能を保存する能力に関して、グリセロール、ポリエチレングリコールおよびポリ酢酸ビニルなどの類似の多価アルコールまたはポリマーよりも優れていることが分かった。エチレングリコールの量は、ジチオトレイトールが酸化されるのを防ぐのに十分であるべきである。エチレングリコールの有効な濃度は、単位体積当たりの重量(g/100ml)に対して、約4%～約8%、好ましくは約4%～約5%、より好ましくは約4%の範囲である。

【0019】

効果的な免疫アッセイを行うためには、本発明の組成物に、少なくとも1種の生物学的洗剤、少なくとも1種の正および負の対イオン源(例えば、塩)、ならびに少なくとも1種の粘度調節剤(例えば、糖)を含むと、かなり好ましい。

【0020】

生物学的洗剤(界面活性剤)の一つの機能は、被分析物の抗体(例えば、抗-HCV抗体)以外の抗体の微粒子への非特異的結合を減少させることである。言い換えると、被分析物の抗体以外の抗体が、相補的抗原の特異的認識以外の理由で、免疫アッセイの固相に付着する可能性がある。この非特異的結合は、偽陽性結果を招くので、望ましくない。生物学的洗剤は、非極性または疎水性相互作用によって引き起こされるそのような結合の発生率を低下させる。

【0021】

組成物において有用な生物学的洗剤(界面活性剤)としては、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、両イオン界面活性剤および陽イオン界面活性剤が挙げられる。非イオン洗剤としては、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート(「TWEEN(登録商標)20」)、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート(「TWEEN(登録商標)80」)、ポリオキシエチレンエーテル(「TRITON(登録商標)」「BRIJ(登録商標)」)およびオクチルフェノール-エチレンオキシド(「NONIDET(登録商標)」)が挙げられる。陰イオン性界面活性剤としては、カプリル酸、コール酸、デオキシコール酸、グリココール酸およびドデシル硫酸ナトリウムが挙げられる。両イオン界面活性剤としては、「CHAPS(登録商標)」(3-[3-コラミドプロピル]-ジメチルアンモニオ)-1-プロパンスルホネート)が挙げられる。陽イオン界面活性剤としては、塩化セチルピリジニウムが挙げられる。非イオン界面活性剤は、非特異的結合は低下させるが、同時に特異的結合は阻害しないことが知られているという理由により、使用するのが好ましい。生物学的洗剤の有効な濃度は、洗剤によって変わり得るが、典型的には、単位体積当たりの重量(g/100ml)に対して、約0.01%～約1%の範囲、好ましくは約0.01%である。好ましい洗剤はTriton(登録商標)X-100である。

【0022】

正および負の対イオン(陽イオンおよび陰イオン)源の機能は、被分析物の抗体(例えば、抗-HCV抗体)以外の抗体の微粒子への非特異的結合を減少させることである。言

10

20

30

40

50

い換えると、被分析物の抗体以外の抗体が、相補的抗原の特異的認識以外の理由で、イムノアッセイの固相に付着する可能性がある。この非特異的結合は、偽陽性結果を招くので、望ましくない。正および負の対イオンは、イオン性相互作用により引き起こされるそのような結合の発生率を低下させる。

【 0 0 2 3 】

正および負の適切な対イオン源としては、塩が挙げられる。組成物において有用な塩としては、NaClおよびKClなどの塩が挙げられる。塩の有効な濃度は、約0.05モル/l～約0.5モル/l(M)、好ましくは約0.1M～約0.3M、最も好ましくは約0.15M～約0.25Mの範囲である。

【 0 0 2 4 】

粘度調節剤の機能は、微粒子を含む溶液の濃度を増加させて、微粒子が溶液中でより容易に懸濁状態を保ち、沈降が阻害される得るようにすることである。微粒子用希釈剤において粘度調節剤を使用すると、微粒子の中性密度が達成されることが分かった。中性密度の達成は、微粒子の沈降を取り除くのに最適な粘度調節剤の濃度の決定を伴う。中性密度の達成に必要な粘度調節剤の濃度は、アッセイに特異的であり、微粒子ロットに特異的である。原則的には、粘度調節剤を溶液に溶解し、希釈剤の密度を増加させる。希釈剤および微粒子の密度が等価であれば、微粒子は懸濁状態になる。適する粘度調節剤としては、糖、粘度付与剤および他の物質（例えば、メトリザマイド (metrizamide) およびメトリゾン酸 (metrizoic acid) など) が挙げられる。組成物に有用な糖としては、ショ糖、グルコースおよびマンニトールなどの糖が挙げられる。糖の有効な濃度は、単位体積当たりの重量 (g/100 ml) に対して、約5%～約25%、好ましくは約7%～約20%、最も好ましくは約10%～約15%の範囲である。

【 0 0 2 5 】

保存剤の機能は、組成物中の微生物の増殖を低下させることである。組成物に有用な保存剤としては、アジ化ナトリウムが挙げられる。保存剤の有効な濃度は、単位体積当たりの重量 (g/100ml) に対して、約0.1%～約1%、好ましくは約0.1%～約0.5%、最も好ましくは約0.1%～約0.2%の範囲である。

【 0 0 2 6 】

組成物のpHは、7.2以下、より好ましくは7.0以下、最も好ましくは約6.5～約6.7である。組成物のpHは、実験的証拠から、pHが7.2以上に増加すると、ジスルフィド結合を還元状態で維持する能力が急激に消滅し、抗原の安定性が低下するので、7.2以下であるのが好ましい。

【 0 0 2 7 】

好ましい態様では、本発明の緩衝剤は、下記成分を指示する量で含む (mM、M および% は、先に定義した通りである)。

【 0 0 2 8 】

10

20

30

【表 1】

成分	量
生物学的緩衝剤	10 mM ~ 100 mM
生物学的洗剤	0.01 % ~ 1 %
正および負の対イオン (塩) 源	0.1 M ~ 0.3 M
粘度調節剤 (糖)	7 % ~ 20 %
保存剤	0.1 % ~ 0.5 %
ジチオトレイトール	5 mM ~ 10 mM
エチレングリコール	4 % ~ 5 %

10

【0029】

本発明の組成物は、前記成分を水中でどんな順序でも混合し、組成物のpHが適切なレベルに確実に調整されるよう注意することにより、簡単に調製できる。成分の添加順序は、重要ではない。

20

【0030】

本発明の組成物は、アッセイ成分の希釈剤として有用である。本明細書で使用する「アッセイ成分」とは、抗体捕獲用の抗原を含む固相、例えば、抗原で被覆した微粒子を意味する。さらに、アッセイ成分としては、ポリクローナルおよび/またはモノクローナル抗体、特にIgGまたはIgM群のものおよびその断片；抗原およびその断片；抗原溶解物、組換えタンパク質、合成ペプチドなど、の市販のアッセイ試薬が挙げられる。また、ラテックス粒子、磁気ビーズ、微粒子などの不活性アッセイ物質は、懸濁物で提供する場合は、本発明の組成物に懸濁させることができ、懸濁物でのこれらの物質の希釈を所望する場合は、希釈を本発明の組成物とともに行うことができることも予想される。

【0031】

本発明の組成物は、アッセイ自体を行う前のアッセイ成分の希釈にも使用できる。組成物は、HCVに対して特異的な抗体の有無の決定に使用される抗原の希釈に特に有用である。そのような希釈法の例は、米国特許No.5,358,691の第37欄第20行～第41欄第21行に記載されている。

30

【0032】

本発明の別の発明では、組成物を、キットの成分として提供できる。本明細書で使用する「キット」とは、試薬およびアッセイの遂行に必要な関連物質（例えば希釈剤、緩衝剤）の集まりを意味する。米国特許No.5,358,691に記載の装置では、キットの形態が図4Aおよび4Bに示されている。そのキットは、試薬パックを意味する。本発明の組成物は、試薬パックの容器の一つにパッケージすることができる。

40

【0033】

本発明を以下の実施例によってさらに説明するが、以下の実施例は、本発明を制限するものではない。実施例において、濃度は全て、モル/l(M)、ミリモル/l (mM)または%(g/100 ml)に基づく。

【実施例】

【0034】

(実施例1および比較例A～D)

本実施例は、生物学的緩衝剤、ジチオトレイトールおよびエチレングリコールを含む組成物の、熱ストレス条件下でのC型肝炎ウイルス(HCV)抗原の安定性に対する効果を示す。

50

【 0 0 3 5 】

生物学的緩衝剤を含むストック組成物は、下記成分を配合して指示した濃度に達するよう
に調製した。

【 0 0 3 6 】

【表 2】

成分	濃度
生物学的緩衝剤 (「MES」)	10 mM
生物学的洗剤 (「TRITON(登録商標) X-100」)	0.01 %
塩 (NaCl)	0.2 M
糖 (ショ糖)	11.5 %
保存剤 (アジ化ナトリウム)	0.1 %
ジチオトレイトール	10 mM

10

【 0 0 3 7 】

下記添加物の各々を別々のストック組成物に添加して、4種類の変形ストック溶液を作
った。各添加物およびその濃度を以下に示す。

20

【 0 0 3 8 】

【表 3】

実施例	添加物	濃度
1	エチレングリコール	5 %
比較例A	ポリエチレングリコール	1 %
比較例B	ポリビニルアルコール	1 %
比較例C	グリセロール	5 %
比較例D	なし	0 %

30

【 0 0 3 9 】

微粒子 (ポリスチレン、平均直径0.8 μ m、Seradyn製) をHCV抗原で被覆した。抗原
は、HC43/c100、c200およびNS5であった。33c抗原は、HC34抗原
およびc200抗原の両方に存在した。一組の微粒子をHC43/c100抗原で被覆し
た。第二の組の微粒子はc200抗原で被覆した。第三の組の微粒子は、NS5抗原で被
覆した。微粒子の被覆は、受動吸着によって行った。3組全ての被覆微粒子をともに混合
し、得られた混合物の一部を4種類の変形ストック溶液 (実施例1ならびに比較例A、B
およびC) の各々ならびに対照としての未変形ストック溶液 (比較例D) に入れた。

40

【 0 0 4 0 】

微粒子を使用して、アッセイの進展において使用した単一マーカー試料、特に、ウイル
スコア、c100または33c抗原に対する抗-HCV抗体を含むパネルならびに負の対
照における抗体を検出した。負の対照は、抗体を含まなかった。試験は全、三回行って平
均をとった。

【 0 0 4 1 】

被覆微粒子を含む各溶液を、各々下記温度で、約12日間インキュベートした。

【 0 0 4 2 】

2 ~ 8

50

3 1

3 7

グリセロールを含む溶液は、アッセイでのシグナル発生を激しく減少させた。従って、この溶液は、4日以上は評価を行わなかった。ポリ酢酸ビニルを含む溶液も、アッセイでのシグナル発生を減少させた。従って、この溶液は、4日以上は評価を行わなかった。グリコールおよびポリエチレングリコールを含む溶液ならびに対照は、その各々の温度で維持され、12日目の試験を行った。

【0043】

添加物の効果を試験するために使用したアッセイは、微粒子捕獲酵素イムノアッセイであった。これは、酵素がアルカリホスファターゼであり、酵素基質がリン酸4-メチルウ
ムベリフェリルである、米国特許No.5,358,691に記載のものと同様であった。しかし、このアッセイでは、抗原が微粒子上に被覆され、試験サンプル中の被分析物は抗-HCV抗体であり、酵素は、抗-HIT IgG抗体に結合させてコンジュゲートを形成した。アッセイ様式は、抗原が抗-HCV抗体に結合し、それが次いでコンジュゲートに結合する、サンドイッチアッセイであった。

10

【0044】

図1は、最も極端な熱ストレス条件(37℃、12日間)下で行った実験結果を示す。図1は、c100抗原、33c抗原および負の対照に対する抗体の結果を示す。

【0045】

エチレングリコールを含む組成物は、極端な熱ストレス条件にかけた後の33c活性の
検出の維持に関して、対照およびポリエチレングリコールを含む組成物に対して優位性を示した。

20

【0046】

アッセイで使用した抗原を下記に記載する。個々の血液もしくは血漿ドナーまたは患者(臨床評価に基づく)のHCVに対する抗体を試験することができる。これらの抗体の存在は、個々(のドナーまたは患者)がHCV感染を受けており、感染性HCVを含む可能性があり、非A非B肝炎(NANBH)を媒介し得る可能性がある。

【0047】

HC43

大腸菌で発現される組換えHCVタンパク質HC43は、推定上のHCVコア構造タン
パク質およびHCV非構造タンパク質NS3の配列を含む。HC43は、HCVポリタン
パク質のアミノ酸1~150および1192~1457から成る融合タンパク質である。HCVポリ
タンパク質のアミノ酸1192~1457は、33c抗原を構成する。

30

【0048】

c100-3

サッカロミセス・セレビジエ(*Saccharomyces cerevisiae*) (酵母)で発現される組換え
HCVタンパク質c100-3は、推定上のHCV非構造タンパク質NS3およびNS4
の配列を含む。c100-3は、ヒトスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)の154個
のアミノ酸、5個のリンカーアミノ酸、HCVポリタンパク質のアミノ酸1569~1931およ
びカルボキシ末端の付加的な5個のリンカーアミノ酸のキメラ融合領域である。

40

【0049】

c200

酵母で発現される組換えHCVタンパク質c200は、HCVゲノムのNS3およびNS
4領域をコードすると思われるHCVアミノ酸1192~1931を含む。c200は、スー
パーオキシドジスムターゼ(SOD)の154個のアミノ酸を有するキメラ融合タンパク質
である。

【0050】

NS5

酵母で発現される組換えHCVタンパク質NS5は、推定上のHCV非構造タンパク質
NS5の配列を含む。NS5は、SODの154個のアミノ酸およびHCVポリタンパク質

50

のアミノ酸2054～2995のキメラ融合領域である。

【0051】

C型肝炎ウイルスゲノムのより詳細な説明は、Selbyら、「C型肝炎ウイルスゲノムによってコードされるタンパク質の発現、同定および細胞下の局在」、Journal of General Virology (1993), 74, 1103-1113 (参考として本明細書に組み入れる)。に見ることができる。

【0052】

本発明の種々の修正および変形は、本発明の範囲および精神を逸脱することなく、当業者には明らかであり、理解されるように、本発明は、本明細書に述べた例示的態様に不当に限定されるものではない。

【図面の簡単な説明】

【0053】

【図1】図1は、33c抗原が被覆された微粒子への抗-HCV抗体の結合を検出する能力によって示される、33c抗原の安定性に対するエチレンジグリコールの有利な効果を示すグラフである。33c抗原は、組換えHCVタンパク質HC43のセグメントである。

10

【図1】

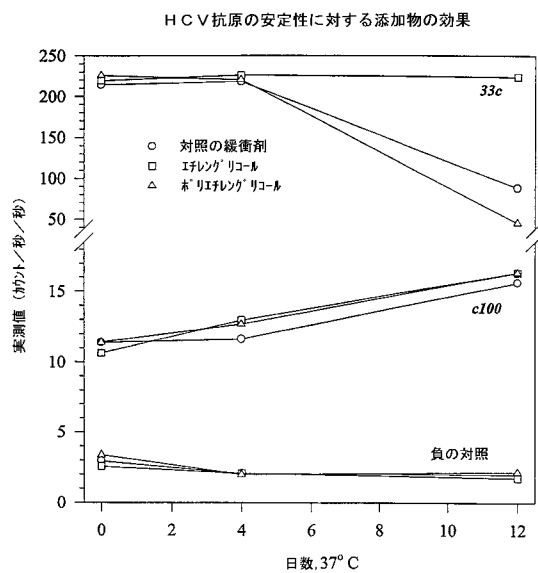


FIG. 1

フロントページの続き

(74)代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 ステイーブ・デイ・ファイガード

アメリカ合衆国、イリノイ・60099、ジオン、ウエスト・ルート・173・15206

審査官 宮澤 浩

(56)参考文献 特開昭64 - 85081 (JP, A)

特開昭63 - 39582 (JP, A)

特開昭59 - 198999 (JP, A)

特開平 2 - 229861 (JP, A)

特表平 6 - 510861 (JP, A)

The Journal of Biological Chemistry, 1988年, vol.263, p.5277-5286

专利名称(译)	用于免疫测定的试剂的缓冲液组合物		
公开(公告)号	JP3930519B2	公开(公告)日	2007-06-13
申请号	JP2005139663	申请日	2005-05-12
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药		
当前申请(专利权)人(译)	雅培制药		
[标]发明人	ステイブ・デイ・ファイガード		
发明人	ステイブ・デイ・ファイガード		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/531 G01N33/54393 G01N33/5767 Y10S436/82 Y10S436/826		
FI分类号	G01N33/576.Z G01N33/531.B G01N33/543.581.B G01N33/543.581.J G01N33/543.583		
代理人(译)	小野 诚 金山 贤教 Masarushin大崎		
审查员(译)	宫泽浩		
优先权	08/482710 1995-06-07 US		
其他公开文献	JP2005300552A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种组合物，在相对长的时间内在升高的温度下对抗原和抗体提供免疫应答稳定性。ZSOLUTION：适用于进行免疫程序的水性组合物。该组合物包括至少一种生物缓冲液，二硫苏糖醇（在本文中也称为“DTT”）和乙二醇。该组合物还可包含至少一种生物洗涤剂，至少一种正和负反离子源，例如盐，和至少一种粘度调节剂，例如糖。缓冲剂还可包含至少一种防腐剂，例如叠氮化钠。组合物的pH优选为约6.4至7.2。还公开了含有该组合物的试剂盒。Z

成分	量
生物学的緩衝剤	10 mM ~ 100 mM
生物学的洗剤	0.01 % ~ 1 %
正および負の対イオン (塩) 源	0.1 M ~ 0.3 M
粘度調節剤 (糖)	7 % ~ 20 %
保存剤	0.1 % ~ 0.5 %
ジチオトレイトール	5 mM ~ 10 mM
エチレングリコール	4 % ~ 5 %