(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118369582 A
(43)申请公布日 2024.07.19

(21)申请号 202380015004.4
(22)申请日 2023.01.30
(30)优先权数据
2022-013500 2022.01.31 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.06.06
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2023/002768 2023.01.30
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/145916 JA 2023.08.03
(71)申请人 积水医疗株式会社
地址 日本东京都
(72)发明人 高畑智宏 岩崎真波 藤村建午 吉田万友美
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 王珂
(51)Int.Cl.
G01N 33/68(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)

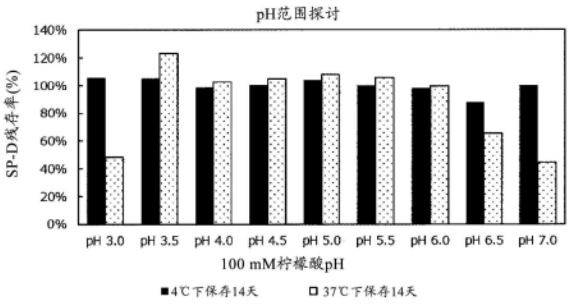
权利要求书2页 说明书18页 附图6页

(54)发明名称

包含肺表面活性蛋白的液态组合物和包含所述液态组合物的免疫测定试剂盒以及肺表面活性蛋白的保存稳定性提高方法

(57)摘要

本发明的目的在于提供保存稳定性较高的、包含SP的液态组合物。本发明提供包含肺表面活性蛋白的液态组合物,其pH为3.5～6.5。此外,也提供进一步包含KL-6的液态组合物。另外,提供肺表面活性蛋白的保存稳定性提高方法,其包含:使肺表面活性蛋白与pH为3.5～6.5的溶液接触。



CN 118369582 A

1.一种包含肺表面活性蛋白的液态组合物,其pH为3.5～6.5。

2.根据权利要求1所述的液态组合物,其中,

肺表面活性蛋白为肺表面活性蛋白D。

3.根据权利要求1或2所述的液态组合物,其为用于测定肺表面活性蛋白的校正用样品溶液或精度管理用样品溶液。

4.根据权利要求1或2所述的液态组合物,其进一步包含缓冲剂。

5.根据权利要求1或2所述的液态组合物,其pH为4.0～6.0。

6.根据权利要求1或2所述的液态组合物,其中,

相对于组合物,肺表面活性蛋白的浓度为10pg/mL～1mg/mL。

7.根据权利要求4所述的液态组合物,其中,

所述缓冲剂为选自柠檬酸、乙酸、丙酸、草酸、苯乙酸、马来酸、琥珀酸、邻苯二甲酸、磷酸、苹果酸、酒石酸、乌头酸、甲酸、3,3-二甲基戊二酸、咪唑、MES(2-(N-吗啉基)乙磺酸)、PIPES(哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸))、ACES(N-(2-乙酰氨基)-2-氨基乙磺酸)、ADA(N-(2-乙酰氨基)亚氨基二乙酸)、Bis-Tris(2,2-双(羟乙基)-(亚氨基三)-(羟甲基)甲烷)、MOPS(3-吗啉丙磺酸)和MOPSO(2-羟基-3-吗啉丙磺酸)中的缓冲剂。

8.根据权利要求4所述的液态组合物,其中,

所述缓冲剂的浓度为10～1000mM。

9.根据权利要求1或2所述的液态组合物,其中,

在37℃下保存SP-D时的、保存14天后的SP-D的残存率相对于初始值为60～140％。

10.根据权利要求1或2所述的液态组合物,其进一步包含KL-6。

11.根据权利要求10所述的液态组合物,其为用于测定肺表面活性蛋白和KL-6的校正用样品溶液或精度管理用样品溶液。

12.一种肺表面活性蛋白的免疫测定试剂盒,其包含权利要求1或2所述的液态组合物。

13.一种KL-6的免疫测定试剂盒,其包含权利要求10所述的液态组合物。

14.一种肺表面活性蛋白的保存稳定性提高方法,其包含:

使肺表面活性蛋白与pH为3.5～6.5的溶液接触。

15.根据权利要求14所述的保存稳定性提高方法,其中,

所述溶液为包含缓冲剂的溶液。

16.根据权利要求14或15所述的保存稳定性提高方法,其中,

所述溶液的pH为4.0～6.0。

17.根据权利要求14或15所述的保存稳定性提高方法,其中,

肺表面活性蛋白的浓度在接触后,相对于溶液变为10pg/mL～1mg/mL。

18.根据权利要求15所述的保存稳定性提高方法,其中,

所述缓冲剂为选自柠檬酸、乙酸、丙酸、草酸、苯乙酸、马来酸、琥珀酸、邻苯二甲酸、磷酸、苹果酸、酒石酸、乌头酸、甲酸、3,3-二甲基戊二酸、咪唑、MES(2-(N-吗啉基)乙磺酸)、PIPES(哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸))、ACES(N-(2-乙酰氨基)-2-氨基乙磺酸)、ADA(N-(2-乙酰氨基)亚氨基二乙酸)、Bis-Tris(2,2-双(羟乙基)-(亚氨基三)-(羟甲基)甲烷)、MOPS(3-吗啉丙磺酸)和MOPSO(2-羟基-3-吗啉丙磺酸)中的缓冲剂。

19.根据权利要求15所述的保存稳定性提高方法,其中,

所述缓冲剂的浓度为10～1000mM。

包含肺表面活性蛋白的液态组合物和包含所述液态组合物的免疫测定试剂盒以及肺表面活性蛋白的保存稳定性提高方法

技术领域

[0001] 本发明涉及包含肺表面活性蛋白的液态组合物和包含所述液态组合物的免疫测定试剂盒。此外本发明也涉及肺表面活性蛋白的保存稳定性提高方法。

背景技术

[0002] 肺表面活性物质是由肺的II型肺胞上皮细胞产生/分泌的液态的物质。肺表面活性物质具有通过减弱肺胞表面的表面张力而使肺胞容易膨胀,帮助呼吸和气体交换的功能。

[0003] 肺表面活性蛋白(下文中,有时简称为SP)是肺表面活性物质的构成成分的一种。作为SP,迄今为止已经报告了肺表面活性蛋白A(SP-A)、肺表面活性蛋白B(SP-B)、肺表面活性蛋白C(SP-C)和肺表面活性蛋白D(SP-D)。

[0004] 认为血清中的SP-D的量反映肺疾病的存在。因此,SP-D作为肺特异性血清标志物而受到关注。特别是,认为SP-D对特发性间质性肺炎(IIP)和胶原病性间质性肺炎(CDIP)的辅助诊断是有用的。

[0005] 进行生物体样品中的测定对象成分的定量时,有必要使用校正用样品。就校正用样品而言,是在内部标准或浓度校正用基准(校准品)等用途中使用的包含测定对象成分的样品。为了得到测定对象成分的准确的定量值,需要对时间经过、温度变化而进行了稳定的校正用样品。校正用样品为了操作简便,优选为有流动性的溶液的状态(下文中,有时称为“液态”)。作为在这种情况下期望校正用样品的事项,可举出测定对象物质的生物学活性(例如,针对特异抗体的抗原性、针对抗体、凝集素等具有的特异性的结合对象的结合活性、肽激素等具有的生理活性、酶活性、作为用于支撑所述各种活性的蛋白质的立体结构等)的保持、防止吸附到测定对象物质的容器和防腐能力的保持等。

[0006] 作为以液态保存SP的校正用样品的方法,公开了向包含SP-D的水溶液中添加氯化钙等2价金属离子的方法(专利文献1)。此外,也公开了向包含SP-D的水溶液中,除了添加氯化钙等2价金属离子,还添加涉及氧化还原的物质(专利文献2)。

[0007] 此外,公开了包含SP-D或其活性片段、缓冲液、糖和钙离子的药学组合物提高SP-D的保存稳定性(专利文献3)。在该文献中,在实施例中,对在对包含SP-D和糖的pH6或7的组合物进行了冷冻干燥的情况下的SP-D的生物学活性的变动、以及在对冷冻干燥品使用各种溶液进行了再构成的情况下的SP-D的生物学活性的变动,进行了具体性验证。

[0008] 现有技术文献

[0009] 专利文献

[0010] 专利文献1:日本特开2001-33450号公报

[0011] 专利文献2:国际公开2006/121064号公报

[0012] 专利文献3:日本特表2021-519757号公报

[0013] 非专利文献

[0014] 非专利文献1:临床化学32:216-226,2003

发明内容

[0015] 发明所解决的技术问题

[0016] 本发明人进行了探讨的结果,明确了背景技术的文献所述的技术中,在液体中保存SP-D的前提下,存在SP-D的稳定化效果不充分的情况。专利文献2所述的技术中,存在除了添加SP-D以外,还有必要向溶液中添加涉及氧化还原的物质,需要考虑对测定体系的影响。专利文献3的实施例中仅对于pH6或7的冷冻干燥品进行了检验,对于溶液中的SP-D的稳定性,没有记载或暗示。

[0017] 本发明的目的在于提供保存稳定性良好的、包含SP-D的液态组合物。

[0018] 解决问题的技术手段

[0019] 本发明人尝试了制备保存稳定性较高的包含SP的液态组合物。并且,发现了通过使液态组合物的pH为3.5～6.5,提高SP的稳定性。本发明基于这样的见解。

[0020] 具体而言,本发明如下。

[0021] <1>

[0022] 一种包含肺表面活性蛋白的液态组合物,其pH为3.5～6.5。

[0023] <2>

[0024] 根据<1>所述的液态组合物,其中,

[0025] 肺表面活性蛋白为肺表面活性蛋白D。

[0026] <3>

[0027] 根据<1>或<2>所述的液态组合物,其为用于测定肺表面活性蛋白的校正用样品溶液或精度管理用样品溶液。

[0028] <4>

[0029] 根据<1>～<3>中任一项所述的液态组合物,其进一步包含缓冲剂。

[0030] <5>

[0031] 根据<1>～<4>中任一项所述的液态组合物,其pH为4.0～6.0。

[0032] <6>

[0033] 根据<1>～<5>中任一项所述的液态组合物,其中,

[0034] 相对于组合物,肺表面活性蛋白的浓度为10pg/mL～1mg/mL。

[0035] <7>

[0036] 根据<4>～<6>中任一项所述的液态组合物,其中,

[0037] 所述缓冲剂为选自柠檬酸、乙酸、丙酸、草酸、苯乙酸、马来酸、琥珀酸、邻苯二甲酸、磷酸、苹果酸、酒石酸、乌头酸、甲酸、3,3-二甲基戊二酸、咪唑、MES(2-(N-吗啉基)乙磺酸)(2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid)、PIP ES(哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸))(piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid))、AC ES(N-(2-乙酰氨基)-2-氨基乙磺酸)(N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic ac id)、ADA(N-(2-乙酰氨基)亚氨基二乙酸)(N-(2-Acetamido)iminodiacetic acid)、Bis-Tris(2,2-双(羟乙基)-(亚氨基三)-(羟甲基)甲烷)(2,2-Bis(hydroxyethyl)-(imi notris)-(hydroxymethyl)-methane)、MOPS(3-吗啉丙磺酸)(3-Morpholinopropan esulfonic acid)和MOPSO(2-羟基-3-吗啉丙磺酸)

(2-Hydroxy-3-morpholinopro panesulfonic acid)中的缓冲剂。

[0038] <8>

[0039] 根据<4>～<7>中任一项所述的液态组合物,其中,

[0040] 所述缓冲剂的浓度为10～1000mM。

[0041] <9>

[0042] 根据<1>～<8>中任一项所述的液态组合物,其中,

[0043] 在37℃下保存SP-D时的、保存14天后的SP-D的残存率相对于初始值为60～140％。

[0044] <10>

[0045] 根据<1>～<9>中任一项所述的液态组合物,其进一步包含KL-6。

[0046] <11>

[0047] 根据<1>～<10>中任一项所述的液态组合物,其为用于测定肺表面活性蛋白和KL-6的校正用样品溶液或精度管理用样品溶液。

[0048] <12>

[0049] 一种肺表面活性蛋白的免疫测定试剂盒,其包含<1>～<11>中任一项所述的液态组合物。

[0050] <13>

[0051] 一种KL-6的免疫测定试剂盒,其包含<1>～<12>中任一项所述的液态组合物。

[0052] <14>

[0053] 一种肺表面活性蛋白的保存稳定性提高方法,其包含:

[0054] 使肺表面活性蛋白与pH为3.5～6.5的溶液接触。

[0055] <15>

[0056] 根据<14>所述的保存稳定性提高方法,其中,

[0057] 所述溶液为包含缓冲剂的溶液。

[0058] <16>

[0059] 根据<14>或<15>所述的保存稳定性提高方法,其中,

[0060] 所述溶液的pH为4.0～6.0。

[0061] <17>

[0062] 根据<14>～<16>中任一项所述的保存稳定性提高方法,其中,

[0063] 肺表面活性蛋白的浓度在接触后,相对于溶液变为10pg/mL～1mg/mL。

[0064] <18>

[0065] 根据<15>～<17>中任一项所述的保存稳定性提高方法,其中,

[0066] 所述缓冲剂为选自柠檬酸、乙酸、丙酸、草酸、苯乙酸、马来酸、琥珀酸、邻苯二甲酸、磷酸、苹果酸、酒石酸、乌头酸、甲酸、3,3-二甲基戊二酸、咪唑、MES(2-(N-吗啉基)乙磺酸)、PIPES(哌嗪-N,N’-双(2-乙磺酸))、ACES(N-(2-乙酰氨基)-2-氨基乙磺酸)、ADA(N-(2-乙酰氨基)亚氨基二乙酸)、Bis-Tris(2,2-双(羟乙基)-(亚氨基三)-(羟甲基)甲烷)、MOPS(3-吗啉丙磺酸)和MOPSO(2-羟基-3-吗啉丙磺酸)中的缓冲剂。

[0067] <19>

[0068] 根据<15>～<18>中任一项所述的保存稳定性提高方法,其中,

[0069] 所述缓冲剂的浓度为10～1000mM。

[0070] <20>

[0071] 根据<1>～<11>中任一项所述的液态组合物,其进一步包含氯化钙、螯合剂、表面活性剂或糖类中的任一种以上。

[0072] 发明的效果

[0073] 根据本发明,能够提供包含SP的保存稳定性良好的液态组合物。因此,根据本发明,可以对生物体样品中的SP准确地进行定量。

附图说明

[0074] [图1]是表示现有技术的保存溶液中的、SP-D抗原的残存率的图表(4℃或37℃下保存14天)。

[0075] [图2]是表示pH为3.0～7.0的各种保存溶液中的、SP-D抗原的残存率的图表(4℃或37℃下保存14天)。

[0076] [图3]是表示具有各种柠檬酸浓度的各种柠檬酸缓冲液中的、SP-D抗原的残存率的图表(4℃或37℃下保存14天)。

[0077] [图4]是表示添加了氯化钙的保存溶液和未添加氯化钙的保存溶液中的、SP-D抗原的残存率的图表(4℃或37℃下保存14天)。

[0078] [图5]是表示柠檬酸缓冲液和乙酸缓冲液中的、SP-D抗原的残存率的图表(4℃或37℃下保存14天)。

[0079] [图6]是表示使用SP-D单独校准品进行了测定的SP-D的由LTIA试剂得到的测定值与已认证体外用诊断药的测定值的相关性的图表。

[0080] [图7]是表示使用SP-D和KL-6的共存校准品进行了测定的SP-D的由LTIA试剂得到的测定值与已认证体外用诊断药的测定值的相关性的图表。

[0081] [图8]是表示使用SP-D和KL-6的共存校准品进行了测定的SP-D的由LTIA试剂得到的测定值与使用SP-D单独校准品进行了测定的SP-D的由LTI A试剂得到的测定值的相关性的图表。

[0082] [图9]是表示使用SP-D和KL-6的共存校准品进行了测定的KL-6的由LTIA试剂得到的测定值与已认证体外用诊断药的测定值的相关性的图表。

[0083] [图10]是表示SP-D单独样品、以及SP-D和KL-6的共存样品中的、SP-D抗原的残存率的图表(4℃或37℃下保存14天)。

[0084] [图11]是表示SP-D单独样品、以及SP-D和KL-6的共存样品中的、KL-6抗原的残存率的图表(4℃或37℃下保存14天)。

具体实施方式

[0085] (肺表面活性蛋白)

[0086] 在本说明书中“肺表面活性蛋白”(SP)是肺表面活性物质的构成成分的一种。

[0087] 作为SP,已知有SP-A、SP-B、SP-C和SP-D。其中SP-B和SP-C的疏水性较强,与磷脂进行了缔合。另一方面,SP-A和SP-D为亲水性糖蛋白,属于钙离子依赖性地与糖类结合的C型凝集素的胶凝素亚组(非专利文献1)。

[0088] 作为本说明书中的SP,可举出SP-A和SP-D。作为本说明书中的SP,优选为SP-D。SP-

A和SP-D属于相同亚组,因此SP-A和SP-D的保存稳定性可以通过相同的方法而提高。

[0089] SP的测定可以使用公知的方法、例如免疫学方法来进行。作为免疫学方法,可举出酶免疫测定法(EIA、ELISA)、表面等离子共振法、乳胶免疫比浊测定法(LTIA)、化学发光免疫测定法、电化学发光免疫测定法、化学发光酶免疫测定法、荧光抗体法、放射免疫测定法、蛋白质印迹法、免疫层析法和高效液相色谱法(HPLC法)等。

[0090] 本发明的液态组合物中包含的SP可以是市售的,也可以是自己制备或纯化得到的。本发明的液态组合物中包含的SP可以是通过体外来制备得到的(例如,使用基因重组技术来制备得到的),也可以是从生物体中提取得到的。

[0091] (SP的浓度)

[0092] 本发明的液态组合物中包含的SP-A或SP-D的浓度在下文中没有限定,在液态组合物中,优选为10pg/mL～1mg/mL,更优选为100pg/mL～500μg/mL,进一步优选为1ng/mL～100μg/mL,最优选为10ng/mL～10μg/mL。

[0093] (pH)

[0094] 本发明的液态组合物的pH为3.5～6.5,优选为4.0～6.0,更优选为4.0～5.9,最优选为4.5～5.5。

[0095] pH的调节可以使用本领域技术人员所周知的用于pH调节的试剂、例如氢氧化钠、盐酸等来进行。

[0096] (缓冲液)

[0097] 本说明书中,“缓冲液”意指具有pH变化的缓冲作用的溶液。缓冲液可以溶解以下缓冲剂进行制备。

[0098] 作为本发明中使用的缓冲剂,在下文中没有限定,例如,可举出柠檬酸、乙酸、丙酸、草酸、苯乙酸、马来酸、琥珀酸、邻苯二甲酸、磷酸、苹果酸、酒石酸、乌头酸、甲酸、3,3-二甲基戊二酸、咪唑、MES(2-(N-吗啉基)乙磺酸)、PIPES(哌嗪-N,N’-双(2-乙磺酸))、ACES(N-(2-乙酰氨基)-2-氨基乙磺酸)、AD A(N-(2-乙酰氨基)亚氨基二乙酸)、Bis-Tris(2,2-双(羟乙基)-(亚氨基三)-(羟甲基)甲烷)、MOPS(3-吗啉丙磺酸)和MOPSO(2-羟基-3-吗啉丙磺酸)等缓冲剂。

[0099] 本发明中使用的缓冲液可举出溶解上述缓冲剂而制备的缓冲液,优选为柠檬酸缓冲液或乙酸缓冲液,更优选为柠檬酸缓冲液。

[0100] 就缓冲剂的浓度而言,只要得到本发明的效果则没有特别限定,优选为10～1000mM,更优选为50～500mM。作为缓冲液,优选为50～500mM的柠檬酸缓冲液。

[0101] 以pH为3.5～6.5的范围内,并且不损害使本发明的SP的保存稳定性提高的效果作为前提,本发明的液态组合物可以包含追加的物质。以在对SP通过免疫测定法进行测定的情况下不损害本发明的效果,并且不妨碍构成抗原抗体反应或酶反应等测定体系的反应的全部或一部分作为前提,本发明的液态组合物可以包含追加的物质。

[0102] 本发明的组合物可以进一步包含钙离子。

[0103] 本发明的液态组合物中的钙离子的浓度可以为例如1～1000mM。

[0104] 本发明的液态组合物可以包含钙离子以外的金属离子、蛋白质、氨基酸、糖类、表面活性剂类、螯合剂、防腐剂、还原性物质、离液物质等通用的成分的1种或多种。

[0105] 作为糖类,可举出例如葡萄糖、果糖这样的单糖类、麦芽糖、蔗糖这样的二糖类、N-

乙酰基葡萄糖胺这样的葡萄糖胺类。其中优选为N-乙酰基葡萄糖胺。

[0106] 作为表面活性剂,可举出阴离子性表面活性剂、阳离子性表面活性剂、两性表面活性剂、非离子性表面活性剂。其中优选为CHAPS(3-[(3-胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐)(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesul fonate)、CHAPSO(3-[(3-胆酰胺丙基)二甲氨基]-2-羟基丙磺酸内盐)(3-[(3-Cho lamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxypropanesulfonate)这样的两性表面活性剂,最优选为CHAPS

[0107] 作为螯合剂,可举出EDTA(乙二胺四乙酸)、DTPA(二乙烯三胺五乙酸)、HEDTA(羟乙基乙二胺三乙酸)这样的氨基羧酸类、柠檬酸、葡糖酸、植酸及其盐。作为螯合剂的盐,可举出钠盐、钾盐、镁盐、钙盐等。作为螯合剂及其盐,优选为氨基羧酸类及其盐,最优选为EDTA及其盐。

[0108] (液态组合物)

[0109] 本发明的液态组合物在SP的测定中,可以作为校正用样品溶液而使用。在本说明书中,校正用样品溶液意指用于对测定对象物质进行准确测定的、以一定的浓度而含有测定对象物质的样品溶液,也称为标准物质或校准品。可以使用对校正用样品溶液测定时的实测值与校正用样品溶液中的SP浓度而制成得到的校准曲线来对SP的测定值进行计算。

[0110] 此外,本发明的液态组合物在SP的测定中,可以作为精度管理用样品溶液来使用。在本说明书中,精度管理用样品溶液意指用于对测定对象物质进行准确测定的、以一定的浓度而含有测定对象物质的样品溶液,也称为对照。可以通过将对精度管理用样品溶液测定时的SP的测定值与精度管理用样品溶液中的SP浓度进行比较,对SP测定体系的测定精度进行检证。

[0111] (保存容器)

[0112] 本发明的液态组合物优选填充在保存容器。保存容器的材质可以得到本发明的效果,并且可以密封的情况下没有特别限定,从校正用样品的制造、输送、保管的观点出发,优选为塑料或玻璃。

[0113] 作为保存容器的方式,可以是硬型或软型中的任一种,可以使用点眼瓶、安瓿、小瓶、软袋(soft bag)、注射型容器、玻璃瓶等。优选使用点眼瓶作为保存容器。

[0114] 在本说明书中SP的“保存稳定性良好”或“保存稳定性为良好”意指,包含SP的溶液中含有的SP的大部分长时间不被分解或保持SP的结构不变化。例如,将包含SP的溶液作为样品来对SP浓度进行测定的情况的值,在初始值和保存后的值中,在没有较大的差异的情况下可以认为SP的保存稳定性为良好。SP的保存稳定性变好,也称为SP的保存稳定性提高。

[0115] SP的值可以通过对期望的SP进行测定或分析的方法中的测定灵敏度、测定值、分析值等通过各种方法得到的结果来表示。此外初始值表示该溶液的保存开始时间点的SP的值。

[0116] 更具体而言,SP的“保存稳定性良好”或“保存稳定性为良好”可意指例如,在将SP的浓度为10pg/mL～1mg/mL的溶液在37℃下保存14天的情况下,保存后的值相对于初始值为60％～140％,优选为70％～130％,更优选为80％～120％。

[0117] 此外,SP的“保存稳定性良好”或“保存稳定性为良好”可意指,例如,在将SP的浓度为10pg/mL～1mg/mL的溶液在4℃下保存14天的情况下,保存后的值相对于初始值为80％～120％。

[0118] 本说明书中“残存率”意指,保存后的SP的值相对于SP的初始值的比例。作为残存率的评价中使用的初始值,可以使用该溶液的保存开始时间点的SP的值,也可以使用评价时对分装该溶液并在例如-70℃以下进行冷冻保存等SP的值不易变动的条件下进行了保存的溶液进行了测定的值。

[0119] 冷冻品和在各温度下保存之后的SP的值可以使用市售的SP测定试剂来测定,也可以通过在实施例所述的测定条件下实施的乳胶免疫比浊测定法(LT IA)来测定。

[0120] (用于进行SP的测定的生物体样品)

[0121] 作为用于进行SP的测定的生物体样品,若能够进行SP的测定则没有特别限定,优选使用血液、血清或血浆,更优选使用血清。生物体样品可以根据需要适宜实施预处理。优选生物体样品为从人采集得到的生物体样品。

[0122] (SP的免疫测定试剂盒)

[0123] 本发明的SP的免疫测定试剂盒可以通过使用本发明的液态组合物,简便地和准确地进行SP的测定。作为SP的测定试剂盒,可举出例如使用了免疫学方法的试剂盒。本发明的SP的测定试剂盒可以包含用于通过免疫学方法而对人体内的SP的浓度进行测定的试剂。作为免疫学方法,可举出酶免疫测定法(EIA、ELISA)、表面等离子共振法、乳胶免疫比浊测定法(LTIA)、化学发光免疫测定法、电化学发光免疫测定法、化学发光酶免疫测定法、荧光抗体法、放射免疫测定法、蛋白质印迹法、免疫层析法和高效液相色谱法(HPLC法)等。

[0124] 本发明的SP的测定试剂盒可以用于特发性间质性肺炎(IIP)或胶原病性间质性肺炎(CDIP)等的辅助诊断。

[0125] 本发明的SP测定试剂盒中还可以包含包装说明书、使用说明书等。SP的免疫测定试剂盒中也可以包含任意的构成要素、例如样本稀释液、pH调节剂、反应容器等。

[0126] (SP的保存稳定性提高方法)

[0127] 本发明的SP的保存稳定性提高方法包含使肺表面活性蛋白与pH为3.5～6.5的溶液接触。可以向已调节pH为3.5～6.5的溶液中添加SP,也可以在向溶液中添加了SP后,将该溶液的pH调节为3.5～6.5。溶液优选为所述的缓冲液中的任一种。

[0128] 本发明的液态组合物可以以液态来保存,也可以冷冻干燥之后保存。本发明的液态组合物优选不冷冻干燥而保存,。

[0129] (KL-6)

[0130] 本发明的液态组合物可以包含KL-6。KL-6为涎液化糖链抗原,参与肺的纤维化(特公平7-31207号,New serumindicator of interstitial pneumoniti s activity.Sialylated carbohydrate antigen KL-6.Kohno N,Kyoizumi S,Aw aya Y,Fukuhara H,Yamakido M,Akiyama M.Chest.1989Jul;96(1):68-73.)。KL-6在间质性肺炎中为高值,反映病情并变动,因此用于间质性肺炎的诊断和治疗方针的决定等而进行了测定(特公平7-31207号)。

[0131] 此外,也公开了通过对血清中MUC-1/KL-6值进行测定而预测由干扰素给药引起的间质性肺炎的发病的方法(日本特开2005-121441号)、通过对KL-6进行测定而检查肺癌患者的预后的方法(日本专利第4083855号)、通过对胰液中的KL-6进行测定而检测胰腺导管内乳头状黏液瘤或胰腺癌的方法(日本特开2006-308576号)等。因此,为了药剂性间质性肺炎和胶原病来源间质性肺炎等间质性肺炎的诊断和治疗方针的决定、肺癌、胰腺癌等癌患

者的诊断方法、以及给药了抗体药物的类风湿关节炎、克罗恩病、全身型幼年特发性关节炎、卡斯尔曼(castleman)病等患者的间质性肺炎的诊断和治疗方针的决定等,KL-6已被广泛测定。

[0132] (KL-6的测定)

[0133] KL-6的测定可以使用公知的方法、例如免疫学方法来进行。作为免疫学方法,可举出酶免疫测定法(EIA、ELISA)、表面等离子共振法、乳胶免疫比浊测定法(LTIA)、化学发光免疫测定法、电化学发光免疫测定法、化学发光酶免疫测定法、荧光抗体法、放射免疫测定法、蛋白质印迹法、免疫层析法和高效液相色谱法(HPLC法)等。

[0134] (同时包含KL-6和SP的液态组合物)

[0135] KL-6和SP-D同时地被认为对特发性间质性肺炎(IIP)和胶原病性间质性肺炎(CDIP)中的辅助诊断是有用的,进行两者的项目的测定是有用的(日本内科学会杂志,96(10),2144-2150,2007。日本呼吸器官学会杂志,39(4),298-302,2001。)。与之相对,迄今为止需要在对KL-6进行测定的情况下分别准备用于KL-6的校正用样品和测定试剂,在对SP进行测定的情况下分别准备用于SP的校正用样品和测定试剂,是较复杂的。与之相对,本发明最先提供不仅包含SP,而且包含SP和KL-6的液态组合物。

[0136] 本发明的包含SP和KL-6的液态组合物可以是预先包含了SP和KL-6的液态组合物,也可以是使用者将包含SP的液态组合物和包含KL-6的液态组合物进行混合而制备得到的液态组合物。本发明的包含SP和KL-6的液态组合物可以在SP和KL-6的测定中,作为校正用样品溶液来使用,也称为多标准物质、多校准品。

[0137] 此外,本发明的包含SP和KL-6的液态组合物可以在SP和KL-6的测定中,作为精度管理用样品溶液来使用,也称为多对照。

[0138] 本发明的包含SP和KL-6的液态组合物也可以包含多种SP。即,可以是包含SP-A和KL-6的构成,也可以是包含SP-D和KL-6的构成,也可以是包含SP-A、SP-D和KL-6的构成。

[0139] (KL-6的浓度)

[0140] 本发明的包含SP和KL-6的液态组合物中包含的KL-6的浓度在下文中没有限定,相对于液态组合物,优选为0.01U/mL～100000U/mL,更优选为0.1U/mL～50000U/mL,进一步优选为0.5U/mL～20000U/mL,最优选为0.5U/mL～12000U/mL。

[0141] (KL-6的免疫测定试剂盒)

[0142] 本发明的KL-6的免疫测定试剂盒可以通过使用本发明的液态组合物,将KL-6的测定与SP的测定同时简便且准确地进行。作为KL-6的测定试剂盒,可举出例如使用了免疫学方法的试剂盒。本发明的KL-6的测定试剂盒可以包含用于通过免疫学方法对人体内的KL-6的浓度进行测定的试剂。作为免疫学方法,可举出酶免疫测定法(EIA、ELISA)、表面等离子共振法、乳胶免疫比浊测定法(LTIA)、化学发光免疫测定法、电化学发光免疫测定法、化学发光酶免疫测定法、荧光抗体法、放射免疫测定法、蛋白质印迹法、免疫层析法和高效液相色谱法(HPLC法)等。

[0143] 以上,划分发明的方式(aspect)来进行了说明,各种方式所述的事项、语句的定义和实施方式也能够适用于其他方式中。

[0144] 接下来举出实施例对本发明进行具体说明,本发明的范围不限于此。

[0145] 实施例

[0146] 《实施例1:pH3.0～7.0的缓冲液中的SP-D的保存稳定性的探讨》

[0147] 在pH为3.0～7.0的缓冲液中对SP-D的保存稳定性进行了试验。保存溶液组成、测定方法和评价方法如下所示。

[0148] (1)保存溶液组成

[0149] [比较例1]

[0150] • 100mM HEPES-NaOH(pH 7.4)

[0151] • 1质量%BSA

[0152] • 10mM氯化钙

[0153] [比较例2]

[0154] • 100mM HEPES-NaOH(pH 7.4)

[0155] • 1质量%BSA

[0156] • 10mM氯化钙

[0157] • 0.1重量%过氧化氢

[0158] [实施例1]

[0159] • 100mM柠檬酸缓冲液(pH调节为3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5或7.0)

[0160] • 1质量%BSA

[0161] • 10mM氯化钙

[0162] 向以比较例1、2或实施例1的组成来制备得到的保存溶液中,以使得最终浓度为50ng/mL的方式溶解重组SP-D,作为了保存稳定性试验的样品。将样品以每0.5mL分装到点眼瓶中,在4℃或37℃下保存14天后,提供给测定。作为对照,对在-70℃以下保存了14天的样品进行了测定。此外,将不包含SP-D的保存溶液(空白)也同样地进行了保存和测定。

[0163] (2)测定方法

[0164] 使用在下文中表示组成的、将LTIA作为原理的第一试剂和第二试剂,通过日立自动分析装置进行了测定。

[0165] • 第一试剂

[0166] 100mM MES-NaOH(pH6.0)

[0167] 500mM NaCl

[0168] 0.5% BSA

[0169] • 第二试剂

[0170] 抗人SP-D单克隆抗体致敏乳胶

[0171] 5mM MOPS-NaOH(pH7.0)

[0172] 向样品5μL中分别添加第一试剂120μL,在37℃下,加热了5分钟。然后,分别添加第二试剂40μL并进行了搅拌。接着,对5分钟的吸光度变化,在主波长570nm,副波长800nm下进行了测定。此外,对样品的测定灵敏度和空白的测定灵敏度差(mAbs.)进行计算,用于稳定性评价。以下,将该测定灵敏度差简单记载为“测定灵敏度。”

[0173] 需要说明的是,抗人SP-D单克隆抗体可以使用市售的Anti-Human SP-D MAb (Clone 292215),R&D Systems公司制。

[0174] 抗人SP-D单克隆抗体致敏乳胶可以通过本领域技术人员周知的方法进行制备。

[0175] (3)评价方法

[0176] 将在各温度下保存了的样品的测定灵敏度相对于在-70℃以下保存了14天的样本的测定灵敏度(mAbs.)(初始值)的比例,作为了SP-D抗原残存率。在4℃保存中SP-D抗原残存率为80～120%,并且在37℃保存中SP-D抗原残存率为60～140%时,稳定性为良好。

[0177] 需要说明的是,包含本实施例,只要下文中没有特别记载,相对于制备样本的当天的测定灵敏度,在-70℃以下保存了规定天数的样本的测定灵敏度(mAbs.)没有变动。

[0178] (4)评价结果

[0179] 对于向pH7.4的缓冲液中添加了钙离子的比较例1和进一步向比较例1的组成中添加了作为还原剂的过氧化氢的比较例2进行了评价(表1,图1)。比较例1中,在37℃下保存14天的情况下,SP-D抗原残存率为34.1%,显著低下,为不良。与之相对,在添加了还原剂的比较例2中同条件的SP-D抗原残存率提高至66.1%。然而,比较例2中在4℃下保存14天的情况的SP-D抗原残存率为77.6%,较低,为不良,在比较例1和比较例2任一者中,SP-D稳定化效果都不充分。需要说明的是,比较例1为专利文献1所述的条件,比较例2为专利文献2所述的条件。

[0180] 与之相对,向实施例1的、pH3.0～7.0的范围的溶液中添加了SP-D的条件下,在4℃下保存14天的情况下样本中的SP-D抗原残存率为87.9～105.5%,SP-D的保存稳定性良好(表2,图2)。此外在pH3.5～6.5的范围中,在37℃下保存了14天的样本的SP-D抗原残存率变为65.5～123.3%,为良好。其中,在pH4.0～6.0的范围内,在4℃或37℃下保存14天的SP-D抗原残存率为98.2～107.8%,SP-D的保存稳定性极其良好。从以上的结果可知,pH为3.5～6.5的溶液中,显示了与现有的方法相比更高的SP-D的稳定化效果,其中,pH为4.0～6.0的溶液中,显示了与现有的方法相比极其高的SP-D的稳定化效果。

[0181] [表1]

[0182] 比较例评价结果

[0183]

		SP-D抗原残存率	
		比较例1 钙离子	比较例2 钙离子 +过氧化氢
保存温度	4℃	87.8%	77.6%
	37℃	34.1%	66.1%

[0184] [表2]

[0185] pH3.0～7.0下的SP-D抗原残存率(%)

[0186]

		SP-D抗原残存率								
缓冲液的pH		pH3.0	pH3.5	pH4.0	pH4.5	pH5.0	pH5.5	pH6.0	pH6.5	pH7.0
保存温度	4℃	105.5%	105.1%	98.4%	100.5%	104.0%	99.8%	98.2%	87.9%	100.0%
	37℃	48.6%	123.3%	102.5%	104.6%	107.8%	105.5%	99.3%	65.5%	44.4%

[0187] 《实施例2:柠檬酸浓度对SP-D的保存稳定性的影响的探讨》

[0188] 为了明确最适的缓冲液浓度,将柠檬酸缓冲液(pH5.0)调节至10～1000mM的范围

内,对基于该溶液的SP-D的保存稳定性进行了试验。保存溶液组成、测定方法和评价方法如下所示。

[0189] (1)保存溶液组成

[0190] [实施例2]

[0191] • 10、20、50、100、200、500、750和1000mM柠檬酸缓冲液(pH5.0)

[0192] • 1质量%BSA

[0193] • 10mM氯化钙

[0194] 向以所述的组成制备得到的保存溶液中,以使得最终浓度为50ng/mL的方式溶解重组SP-D,作为了保存稳定性试验的样品。样品的保存条件、测定方法、评价方法,与实施例1相同。

[0195] (2)评价结果

[0196] 将柠檬酸缓冲液(pH5.0)的浓度调节为10～1000mM,对SP-D抗原残存率进行了计算的结果为,在全部的条件下SP-D抗原残存率为87.9～116.7%,SP-D的保存稳定性良好(表3,图3)。此外,50mM～750mM的SP-D抗原残存率为96.1～107.9%,特别是显示了较高的SP-D的稳定化效果。由以上的结果可知,在柠檬酸浓度10～1000mM下存在SP-D稳定化效果,特别是在50～750mM下显示了较高的SP-D的稳定化效果。

[0197] [表3]

[0198] 基千柠檬酸浓度的稳定化效果的变化

[0199]

		SP-D抗原残存率							
柠檬酸浓度		10mM	20mM	50mM	100mM	200mM	500mM	750mM	1000mM
保存温度	4℃	89.8%	87.9%	96.1%	104.0%	99.3%	107.8%	107.9%	116.7%
	37℃	109.5%	101.4%	99.6%	107.8%	103.0%	105.8%	99.9%	92.2%

[0200] 《实施例3:基于有无钙的SP-D的保存稳定性比较》

[0201] 实施例1、2中在向包含SP-D的液态组合物中添加了氯化钙的条件下进行了探讨。与之相对,对在确认了SP-D的稳定化效果的pH范围中即使不添加钙的溶液中是否具有SP-D的稳定化效果进行了评价。保存溶液组成、测定方法和评价方法如下所示。

[0202] (1)保存溶液组成

[0203] [参考例1]

[0204] • 100mM柠檬酸缓冲液(pH5.0)

[0205] • 1质量%BSA

[0206] • 10mM氯化钙

[0207] [实施例3]

[0208] • 100mM柠檬酸缓冲液(pH5.0)

[0209] • 1质量%BSA

[0210] 以所述的组成制备得到的保存溶液中,以使得最终浓度为50ng/mL的方式溶解重组SP-D,作为了保存稳定性试验的样品。样品的保管条件、测定方法和评价方法与实施例1相同。

[0211] (2)评价结果

[0212] 在使用了向100mM柠檬酸缓冲液(pH5.0)中添加了10mM氯化钙的液态组合物的参考例1中,在4℃或37℃下保存14天后的SP-D抗原残存率分别为104.0%和107.8%,为良好。此外在使用了不添加氯化钙的液态组合物的实施例3中在4℃或37℃下保存14天后的SP-D抗原残存率分别为93.1%和107.1%(表4,图4)。由以上的结果可知,未添加氯化钙的条件的液态组合物也显示了充分的SP-D的稳定化效果。

[0213] [表4]

[0214] 添加氯化钙对SP-D的稳定化效果的影响

[0215]

		SP-D抗原残存率	
		参考例1 添加氯化钙	实施例3 未添加氯化钙
保存温度	4℃	104.0%	93.1%
	37℃	107.8%	107.1%

[0216] 《实施例4:基于不同的缓冲液种类的稳定化效果的比较》

[0217] 对除了柠檬酸缓冲液以外,调节为pH4.0的缓冲液中是否显示稳定化效果进行了评价。

[0218] 保存溶液组成、测定方法和评价方法如下所示。

[0219] (1)保存溶液组成

[0220] [参考例2]

[0221] • 100mM柠檬酸缓冲液(pH 4.0)

[0222] • 1质量%BSA

[0223] • 10 • BR>高L氯化钙

[0224] • 防腐剂

[0225] [实施例4]

[0226] • 100mM乙酸缓冲液(pH 4.0)

[0227] • 1质量%BSA

[0228] • 10mM氯化钙

[0229] 以所述的组成制备得到的保存溶液中,以使得最终浓度为50ng/mL的方式溶解重组SP-D,作为了保存稳定性试验的样品。样品的保存条件、测定方法、评价方法,与实施例1相同。

[0230] (2)评价结果

[0231] 对基于缓冲液种类的稳定化效果的差异通过柠檬酸缓冲液和乙酸缓冲液进行了评价。在参考例2的使用了柠檬酸缓冲液的条件下,在4℃或37℃下保存了18天的SP-D抗原残存率分别为100.0%、105.5%。另一方面,在实施例4的使用了乙酸缓冲液的条件下的SP-D抗原残存率分别为99.6%、116.1%,为80~120%以内,显示了在使用了乙酸缓冲液的条件下也与柠檬酸缓冲液具有同等SP-D的稳定化效果(表5,图5)。由以上的结果可知,基于液态组合物的pH的SP-D的稳定化效果不依赖于缓冲液的种类。

[0232] [表5]

[0233] 基于缓冲液种类的稳定化效果的差异

[0234]

		SP-D抗原残存率	
		参考例2 柠檬酸(pH4)	实施例4 乙酸(pH4)
保存温度	4℃	100.0%	99.6%
	37℃	105.5%	116.1%

[0235] 《实施例5:KL-6抗原和SP-D抗原的共存对测定值的影响的评价》

[0236] KL-6与SP-D同样地用于间质性肺炎的诊断中,但各自的蛋白质在血中存在量上升的病情是不同的。因此,KL-6和SP-D的同时测定对间质性肺炎的详细的病情掌握是有用的。若在校正样品中包含SP-D抗原和KL-6抗原这两者,则可以不用替换校正样品而制成校准曲线,提高临床上的便利性。因此,对测定SP-D抗原和KL-6抗原共存的样本时对测定值的影响进行了评价。保存液组成、测定方法和评价方法如下所示。

[0237] (1)保存液组成

[0238] • 100mM柠檬酸缓冲液(pH5.0)

[0239] • 1质量%BSA

[0240] • 10mM氯化钙

[0241] • 防腐剂

[0242] 向保存液中,以以下的浓度溶解了SP-D抗原和KL-6抗原。需要说明的是,KL-6抗原参考日本专利第4083855号来进行了制备。

[0243] [参考例3:SP-D单独校准品]

[0244] • 空白:生理盐水(SP-D 0ng/mL)

[0245] • 校正用样品1:SP-D 50ng/mL

[0246] • 校正用样品2:SP-D 200ng/mL

[0247] • 校正用样品3:SP-D 600ng/mL

[0248] • 校正用样品4:SP-D 1000ng/mL

[0249] [实施例5-1:SP-D/KL-6共存校准品]

[0250] • 空白:生理盐水(SP-D 0ng/mL,KL-6 0U/mL)

[0251] • 校正用样品5:SP-D 50ng/mL,KL-6 500U/mL

[0252] • 校正用样品6:SP-D 200ng/mL,KL-6 1000U/mL

[0253] • 校正用样品7:SP-D 600ng/mL,KL-6 3000U/mL

[0254] • 校正用样品8:SP-D 1000ng/mL,KL-6 5000U/mL

[0255] [参考例4]

[0256] 对任意的血清样本48例的SP-D浓度,通过作为已认证体外用诊断药的SP-D试剂盒“YAMASA”EIA II的ELISA法进行了测定。

[0257] [参考例5]

[0258] 对与参考例4相同的血清样本48例的SP-D浓度,使用实施例1记载的LTIA试剂进行

了测定。此时,校准曲线使用[参考例3:SP-D单独校准品]而制成。

[0259] [参考例6]

[0260] 对与参考例4相同的血清样本48例的KL-6浓度,使用作为已认证体外用诊断药的NanopiaKL-6(SEKISUI MEDICAL公司制)进行了测定。此时,校准曲线使用NanopiaKL-6用KL-6校准品(SEKISUI MEDICAL公司制)而制成。

[0261] [实施例5-2]

[0262] 对与参考例4相同的血清样本48例的SP-D浓度,使用实施例1记载的LTIA试剂进行了测定。此时,校准曲线使用[实施例5-1:SP-D/KL-6共存校准品]而制成。

[0263] [实施例5-3]

[0264] 对与参考例4相同的血清样本48例的KL-6浓度,使用NanopiaKL-6(SE KISUI MEDICAL公司制)进行了测定。此时,校准曲线使用[实施例5-1:SP-D/KL-6共存校准品]而制成。

[0265] (2)测定方法

[0266] 参考例4按照SP-D试剂盒"YAMASA"EIA II的附带资料记载的方法进行了测定。

[0267] 参考例5、实施例5-2中,通过实施例1记载的方法进行了测定。

[0268] 参考例6、实施例5-3按照NanopiaKL-6附带资料所述的方法进行了测定。

[0269] (3)评价方法

[0270] 对于比较的两种条件,将对照条件的测定值作为横轴,将探讨条件的测定值作为纵轴而制成散布图。此外,对通过统计学方法进行了计算的相关系数和回归直线的斜率进行比较,对基于各种探讨条件的测定值与基于对照条件的测定值的相关性进行了评价。

[0271] (4)评价结果

[0272] 首先,对于本发明中使用的LTIA试剂的妥当性进行了评价。相对于基于参考例4(ELISA法)的测定值的参考例5(LTIA法试剂,SP-D单独校准品)的测定值由图6所示。回归直线的斜率为0.906,相关系数为0.940,是良好的,显示了本发明中使用的LTIA试剂和SP-D单独校准品可以精度良好地测定SP-D。

[0273] 接着,对SP-D和KL-6共存对SP-D测定值的影响进行了评价。相对于基于参考例4(ELISA法)的测定值的、通过实施例5-2:SP-D/KL-6共存校准品计算得到的SP-D测定值由图7所示。回归直线的斜率为0.931,相关系数为0.932,是良好的。此外,参考例5:将基于SP-D单独校准品的LTIA测定值与基于实施例5-2:SP-D/KL-6共存校准品的LTIA测定值进行比较时(图8),回归直线的斜率为1.03,相关系数为0.998。由该结果可知,SP-D/KL-6共存校准品具有与SP-D单独校准品同等的校正性能,SP-D抗原和KL-6抗原共存对SP-D测定值的影响是极其小的。

[0274] 接下来,对SP-D和KL-6共存对KL-6测定值的影响进行了评价。将使用了参考例6:NanopiaKL-6用KL-6校准品的测定值与使用了实施例5-3:SP-D/KL-6共存校准品的测定值进行比较时(图9),回归直线的斜率为0.997且相关系数为1.000,是极好的。由该结果可知,SP-D抗原和KL-6抗原共存的校准品在KL-6中具有与制品校准品(KL-6单独校准品)同等的性能,SP-D抗原和KL-6抗原共存对KL-6测定值的影响是极其小的。

[0275] 由上可知,本发明的液态组合物对SP-D和KL-6的测定值没有影响,能够使SP-D抗原和KL-6抗原共存。

[0276] 《实施例6:基于KL-6抗原和SP-D抗原的共存的保存稳定性的影响评价》

[0277] 对使KL-6抗原和SP-D抗原共存时的各自的抗原的保存稳定性进行了评价。保存溶液组成、测定方法和评价方法如下所示。

[0278] (1)保存溶液组成

[0279] [参考例7]:SP-D单独样品

[0280] • 100mM柠檬酸缓冲液(pH5.0)

[0281] • 1质量%BSA

[0282] • 10mM氯化钙

[0283] • SP-D 200ng • mL

[0284] [参考例8]:KL-6单独样品

[0285] • 10mM磷酸缓冲液(pH7.2)

[0286] • 1质量%BSA

[0287] • 防腐剂

[0288] • KL-6 1000U • mL

[0289] [实施例6]:SP-D、KL-6共存样品

[0290] • 100mM柠檬酸缓冲液(pH5.0)

[0291] • 1质量%BSA

[0292] • 10mM氯化钙

[0293] 向所述的保存溶液中,以使得SP-D为200ng/mL、KL-6为1000U/mL的方式溶解重组SP-D和KL-6抗原,作为了保存稳定性试验的样品。将样品每0.2mL分装至塑料制样品管,在4℃或37℃下保存14天后,提供给测定。作为对照,对在-70℃以下保存了14天的样品进行了测定。此外,对不包含SP-D抗原和KL-6抗原的保存溶液(空白)也同样地进行了保存和测定。

[0294] (2)测定方法

[0295] SP-D抗原的测定方法(参考例7、实施例6)与实施例1相同。

[0296] KL-6抗原的测定(参考例8、实施例6)使用NanopiaKL-6测定试剂,按照NanopiaKL-6附带资料记载的方法进行了测定。

[0297] (3)评价方法

[0298] 通过与实施例1相同的方法进行了评价。需要说明的是,SP-D抗原残存率(%)和KL-6抗原残存率(%)基于3次实验的平均值进行了计算。

[0299] (4)评价结果

[0300] (4-1)SP-D抗原

[0301] 参考例7(SP-D单独样品)中,在4℃或37℃下保存了14天的SP-D抗原残存率分别为106.6%和110.4%,是良好的。此外,实施例6(SP-D/KL-6共存样品)中,在4℃或37℃下保存了14天的SP-D抗原残存率分别为106.9%和103.2%,是良好的(表6和图10)。

[0302] [表6]

[0303] SP-D抗原残存率

[0304]

		SP-D抗原活性残存率	
		参考例7 (SP-D单独)	实施例6 (SP-D、KL-6共存)
保存温度	4℃	106.6%	106.9%
	37℃	110.4%	103.2%

[0305] (4-2)KL-6

[0306] 参考例8(KL-6单独样品)中,在4℃或37℃下保存了14天的KL-6抗原残存率分别为98.7%和101.7%,是良好的。此外,实施例6(SP-D/KL-6共存样品)中,在4℃或37℃下保存了14天的KL-6抗原残存率分别为103.9%和110.8%,是良好的(表7和图11)。

[0307] [表7]

[0308] KL-6抗原残存率

[0309]

		KL-6抗原活性残存率	
		参考例8 (KL-6单独)	实施例6 (SP-D、KL-6共存)
保存温度	4℃	98.7%	103.9%
	37℃	101.7%	110.8%

[0310] 由上可知,通过本发明的液态组合物,能够在SP-D抗原和KL-6抗原共存的状态下稳定地保存各自的抗原。

[0311] 《实施例7:其它共存物质对各抗原的保存稳定性的影响的评价》

[0312] 对向包含KL-6抗原和SP-D抗原的溶液中添加了共存物质时的保存稳定性进行了评价。保存溶液组成,试验方法和评价方法如下所示。

[0313] (1)保存溶液组成

[0314] [参考例9]

[0315] • 100mM柠檬酸缓冲液(pH5.0)

[0316] • 1质量%BSA

[0317] [实施例7-1]

[0318] • 100mM柠檬酸缓冲液(pH5.0)

[0319] • 1质量%BSA

[0320] • 0.1mM Ca(II)-EDTA

[0321] [实施例7-2]

[0322] • 100mM柠檬酸缓冲液(pH5.0)

[0323] • 1质量%BSA

[0324] • 10mM氯化钙

[0325] • 0.001% CHAPS

[0326] [实施例7-3]

[0327] • 100mM柠檬酸缓冲液(pH5.0)

[0328] • 1质量%BSA

[0329] • 10mM氯化钙

[0330] • 20mM N-乙酰基葡萄糖胺

[0331] 向所述的保存溶液中,以使得SP-D为200ng/mL、KL-6为1000U/mL的方式溶解重组SP-D和KL-6抗原,作为了保存稳定性试验的样品。将样品每0.2mL分装至塑料制样品管,在4℃或37℃下保存14天后,提供给测定。作为对照,对在-70℃以下保存了14天的样品进行了测定。此外,对不包含SP-D抗原和KL-6抗原的保存溶液(空白)也同样地进行了保存和测定。

[0332] (2)测定方法

[0333] SP-D抗原的测定方法与实施例1相同。

[0334] KL-6抗原的测定方法与实施例6相同。

[0335] (3)评价方法

[0336] 通过与实施例1相同的方法进行了评价。需要说明的是,SP-D抗原残存率(%)和KL-6抗原残存率(%)基于3次实验的平均值进行了计算。

[0337] (4)评价结果

[0338] (4-1)SP-D抗原

[0339] 参考例9中,在4℃或37℃下保存了14天的SP-D抗原残存率分别为99.7%和93.8%,是良好的。此外,实施例7-1、7-2、7-3中,在4℃或37℃下保存14天的SP-D抗原残存率分别为95.3~102.4%,是良好的(表8)。

[0340] [表8]

[0341]

		SP-D抗原活性残存率			
		参考例9	实施例7-1	实施例7-2	实施例7-3
保存温度	4℃	99.7%	101.5%	102.0%	102.4%
	37℃	93.8%	95.3%	95.9%	97.6%

[0342] (4-2)KL-6抗原

[0343] 参考例9中,在4℃或37℃下保存了14天的SP-D抗原残存率分别为101.1%和99.2%,是良好的。此外,实施例7-1、7-2、7-3中,在4℃或37℃下保存了14天的SP-D抗原残存率为100.6~104.8%,是良好的(表9)。

[0344] [表9]

[0345]

		KL-6抗原活性残存率			
		参考例9	实施例7-1	实施例7-2	实施例7-3
保存温度	4℃	101.1%	100.6%	104.2%	102.8%
	37℃	99.2%	101.6%	104.3%	104.8%

[0346] 由上可知,向包含KL-6抗原和SP-D抗原的溶液中添加作为共存物质的螯合剂(Ca(II)-EDTA)、氯化钙、表面活性剂(CHAPS)、糖类(N-乙酰基葡萄糖胺),KL-6抗原和SP-D抗原的保存稳定性也良好地保持。特别是显示了涉及SP-D抗原,存在通过添加螯合剂、表面活性

剂、糖类,而保存稳定性略微升高的可能性。

[0347] 工业实用性

[0348] 根据本发明,能够提供保存稳定性较高的含有SP的液态组合物,特别是,含有SP的校正用样品溶液或精度管理用样品溶液。此外,还能够提供保存稳定性较高的含有SP和KL-6的液态组合物,特别是,含有SP和KL-6的校正用样品溶液或精度管理用样品溶液。

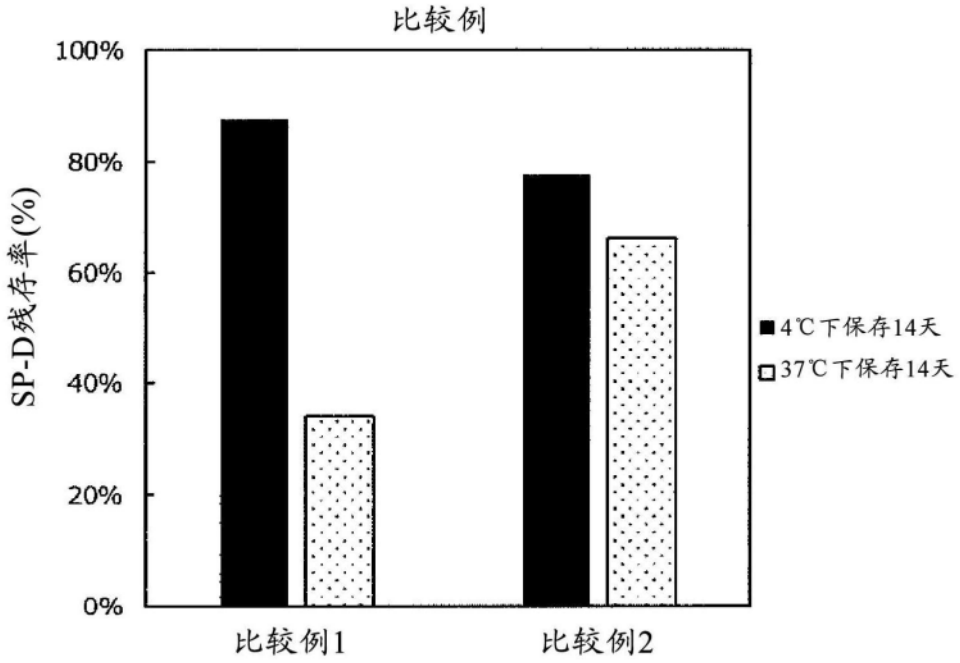

比较例
100%
80%
60%
40%
20%
0%
SP-D残存率(%)
4℃下保存14天
37℃下保存14天
比较例1
比较例2

图1

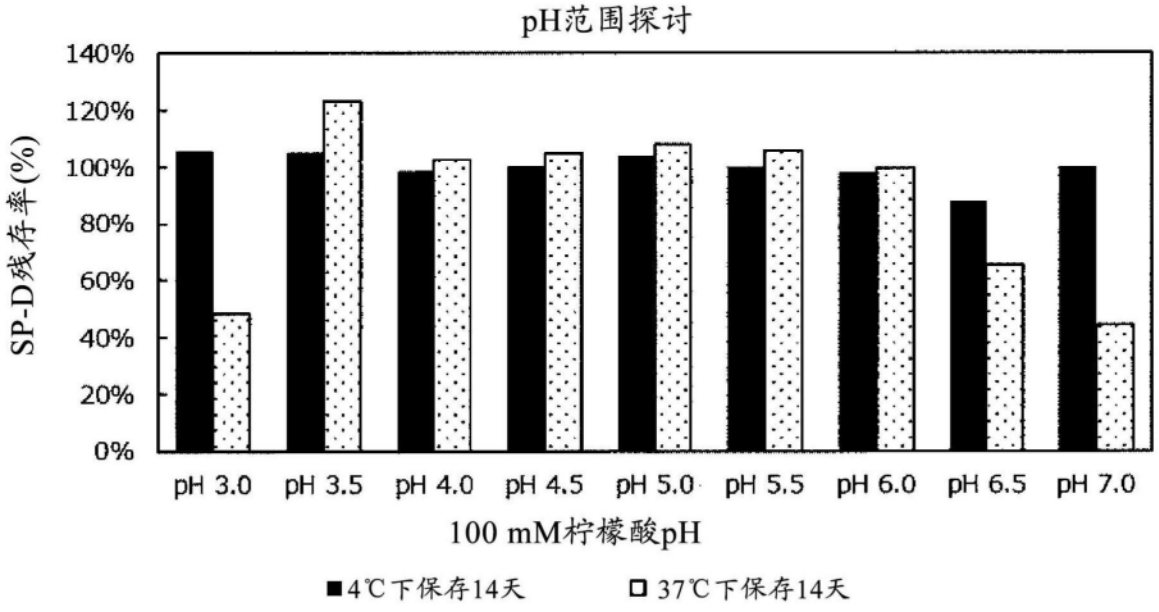

pH范围探讨
140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
SP-D残存率(%)
pH 3.0
pH 3.5
pH 4.0
pH 4.5
pH 5.0
pH 5.5
pH 6.0
pH 6.5
pH 7.0
100 mM柠檬酸pH
4℃下保存14天
37℃下保存14天

图2

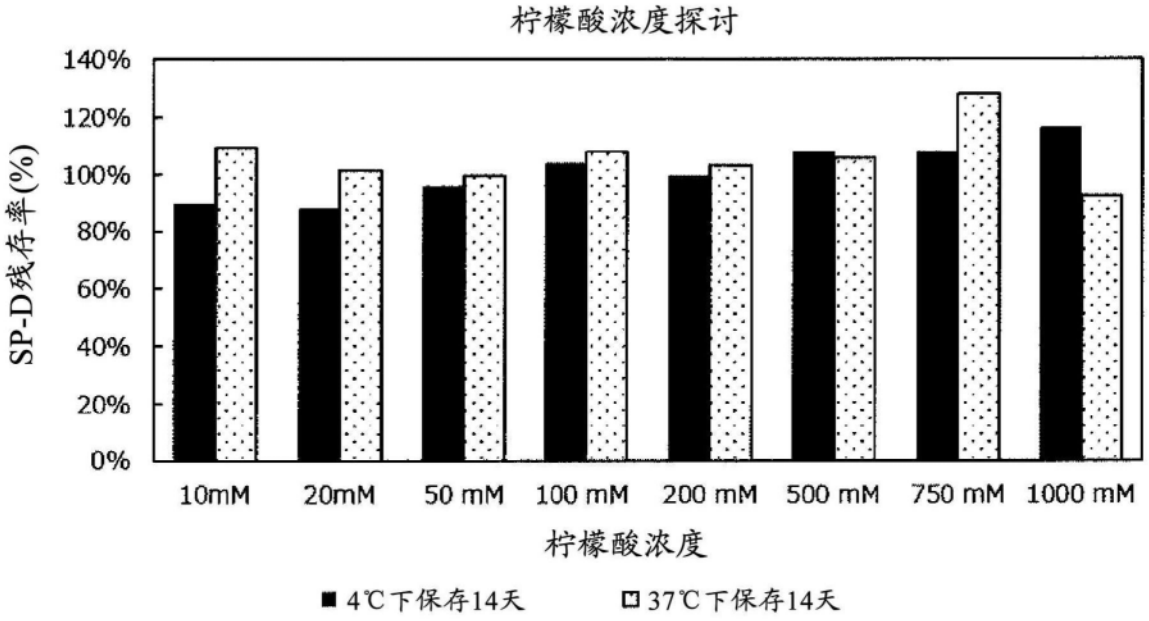

柠檬酸浓度探讨
140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
SP-D残存率(%)
10mM
20mM
50 mM
100 mM
200 mM
500 mM
750 mM
1000 mM
柠檬酸浓度
4℃下保存14天
37℃下保存14天

图3

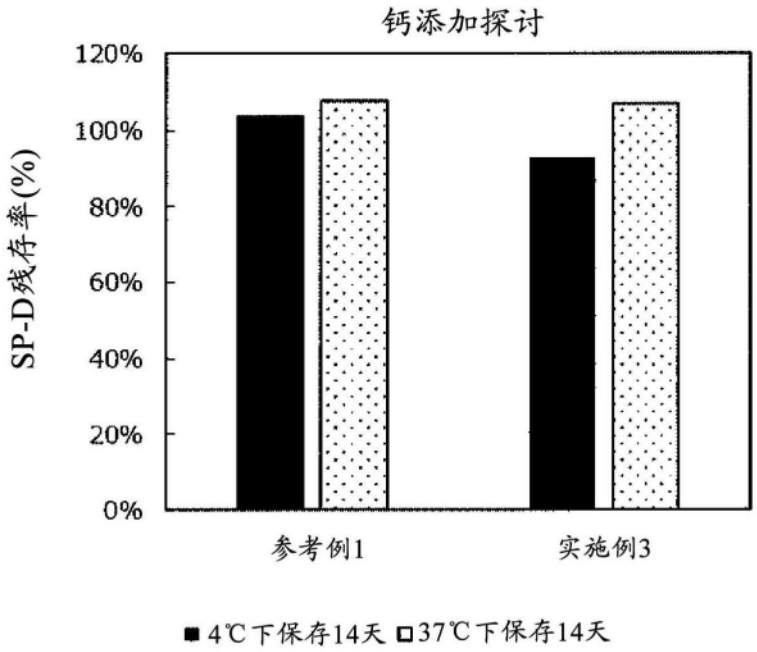

钙添加探讨
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
SP-D残存率(%)
参考例1
实施例3
4℃下保存14天
37℃下保存14天

图4

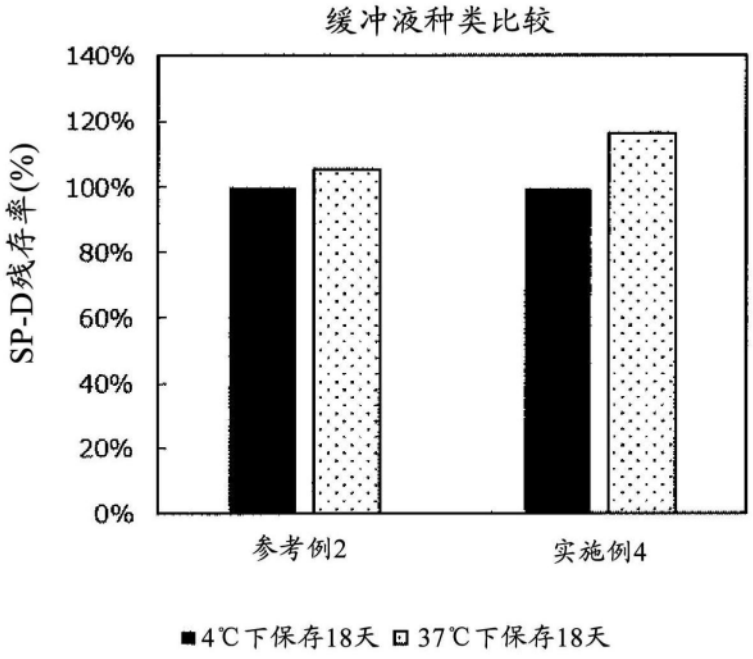

缓冲液种类比较
SP-D残存率(%)
140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
参考例2
实施例4
■4℃下保存18天 ⊡37℃下保存18天

图5

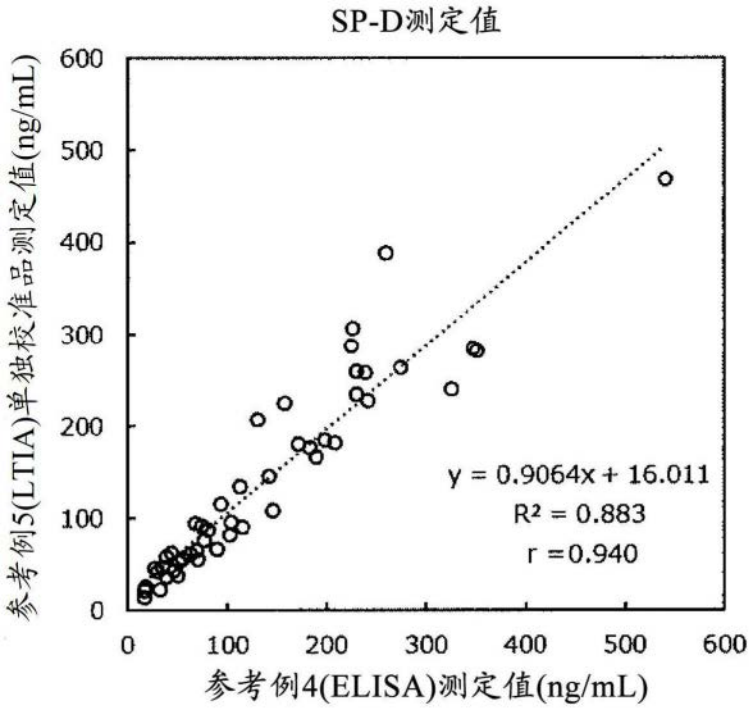

SP-D测定值
参考例5(LTIA)单独校准品测定值(ng/mL)
600
500
400
300
200
100
0
0
100
200
300
400
500
600
参考例4(ELISA)测定值(ng/mL)
y = 0.9064x + 16.011
R² = 0.883
r =0.940

图6

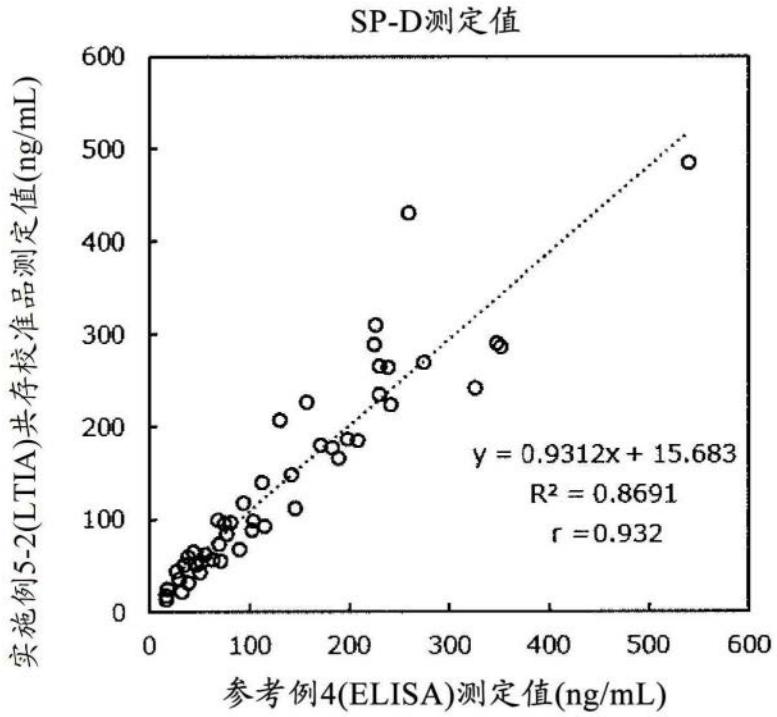

SP-D测定值
实施例5-2(LTIA)共存校准品测定值(ng/mL)
参考例4(ELISA)测定值(ng/mL)
y = 0.9312x + 15.683
R² = 0.8691
r =0.932
0
100
200
300
400
500
600

图7

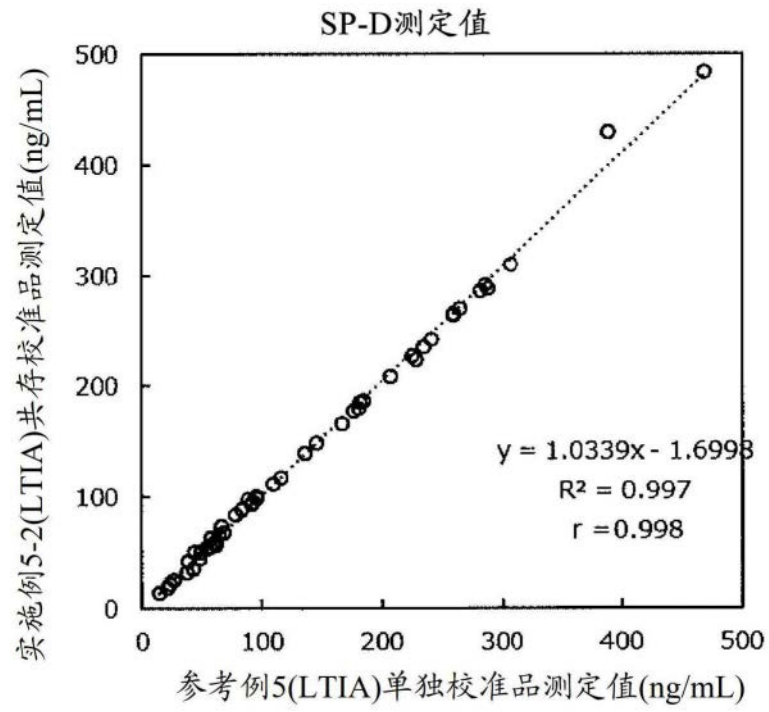

SP-D测定值
实施例5-2(LTIA)共存校准品测定值(ng/mL)
参考例5(LTIA)单独校准品测定值(ng/mL)
y = 1.0339x - 1.6998
R² = 0.997
r =0.998
0
100
200
300
400
500

图8

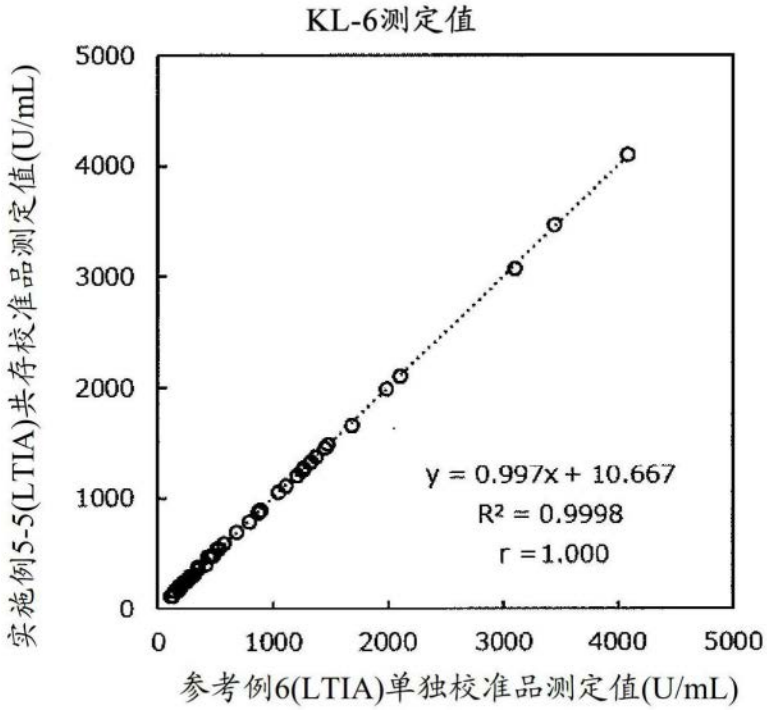

KL-6测定值
实施例5-5(LTIA)共存校准品测定值(U/mL)
参考例6(LTIA)单独校准品测定值(U/mL)
y = 0.997x + 10.667
R² = 0.9998
r = 1.000
0
1000
2000
3000
4000
5000

图9

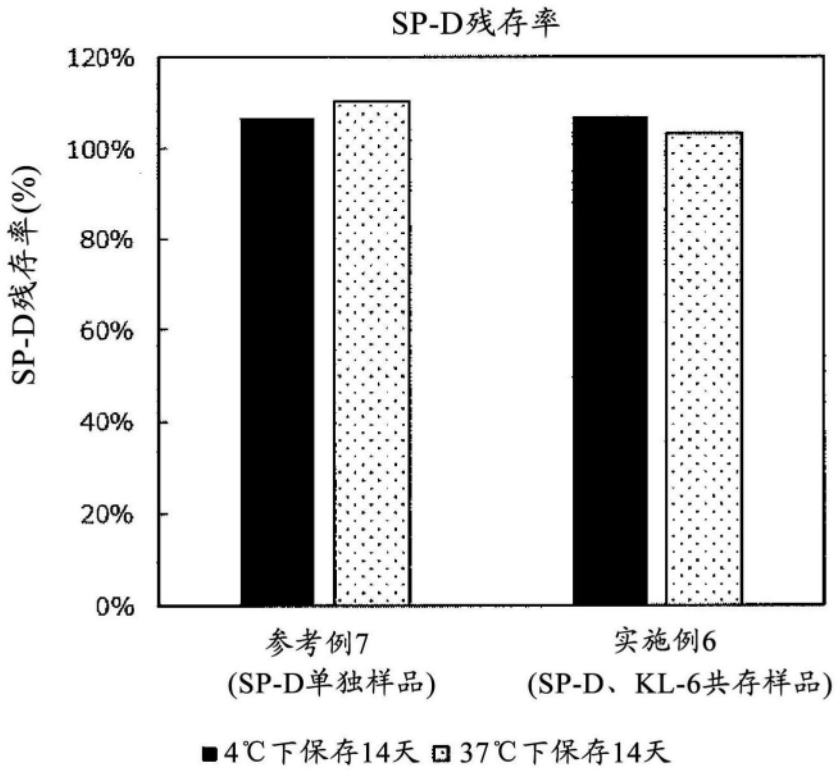

SP-D残存率
SP-D残存率(%)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
参考例7
(SP-D单独样品)
实施例6
(SP-D、KL-6共存样品)
■4℃下保存14天 ◘37℃下保存14天

图10

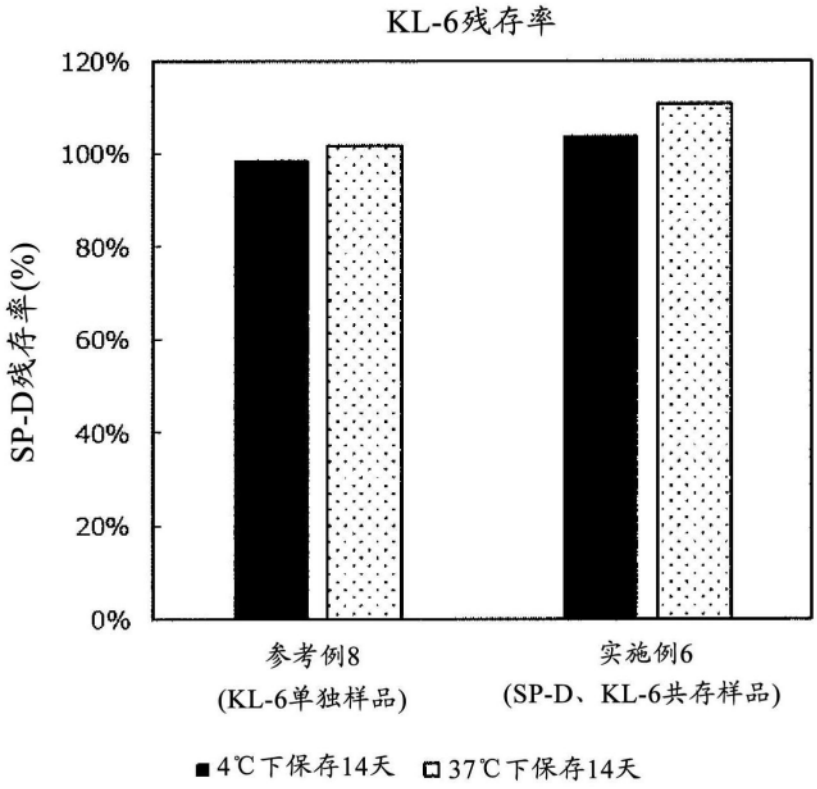

KL-6残存率
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
SP-D残存率(%)
参考例8
(KL-6单独样品)
实施例6
(SP-D、KL-6共存样品)
4℃下保存14天
37℃下保存14天

图11