

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
I P C 分類：

A6
B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ，☐有 ☐無主張優先權美國 1999年12月14日 60/170,850 ☒有 ☐無主張優先權

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

五、發明說明(¹)

發明技術範圍

本發明係關於有效穩定多肽和抗原之水溶液組合物。穩定多肽和抗原有效於分析方法如抗原-專一性偵測，以及其它須要穩定水溶液中此成分之醫藥用途。

發明背景

下列為潛在關於本發明之文獻討論。然而，本文討論之參考文獻並非為先前技藝。

穩定水溶液中多肽和抗原通常很困難。例如，該溶液在室溫下貯放長期後會導致水溶液中多肽或抗原之品質惡化。特別証實了細菌、病毒和其它微生物之抗原保存在水溶液基質中會不穩定。一實例是被膜病毒，如正黏液病毒科(Orthomyxovirus family)流行性感冒病毒，其抗原在廣泛保存溫度範圍下超過時間後便在溶液中解降。相關技藝之一般技術也難以穩定溶液中不同細菌抗原，例如，某些毒素。為避免水溶液品質惡化，熟諳此藝者使用冷凍乾燥法和冷凍方法來保存多肽或抗原。果然，廣泛使用冷凍乾燥法和冷凍法証實了在水溶液保存此等成分之缺點和困難。

許多相關技藝文獻揭露重要成果關於增加冷凍乾燥劑穩定性及此部分相關技術之固有困難。例如，美國專利案5,955,448和4,496,537，及全球專利PCT申請案97/04801皆揭露冷凍乾燥法技術之改良。然而，含蛋白質溶液之冷凍乾燥法對製造商和最終使用者而言必須花費較多和不方便，並且會引導增加重建誤差和污染之危險。而且，冷凍

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(2)

溶液須要特殊儀器和重複循環發生時最後導致蛋白質解降。對商業用途而言，水溶液中多肽和抗原品質惡化要付出極大代價，因為該溶液僅在短暫保存期後就須要置換。

本發明關於水溶液穩定劑或稀釋液以增加多肽和其它溶液中非蛋白質化合物之穩定性。抗原如碳水化合物、蛋白質、脂蛋白、脂多醣、多醣、核酸、核蛋白，和碳水化合物複合蛋白質、脂質、和其它化合物為使用本發明穩定抗原之種類實例。因為使用新穎試劑化合物，本發明改良了一般市售稀釋液或相關技藝敘述之稀釋液中多肽和抗原穩定性。本發明特別有效穩定抗原和多肽，以當作診斷性測試之控制組試劑或其它須穩定水溶液中此等成分之用途。本發明穩定稀釋液有效穩定多肽和抗原以長期保存在約2°C - 8°C，室溫和溫度約45°C。

全球專利PCT申請案99/15901揭露用於穩定抗原之稀釋液，特別針對C型肝炎病毒(HCV)抗原。HCV稀釋液包含還原劑以維持HCV抗原在還原狀態。該文獻報告稀釋液包含還原劑可維持HCV抗原免疫活性最多達七天。該報告之稀釋液進一步包含磷酸鈉、pH 6.5(或其它緩衝劑)，EDTA(或其它螯合劑)、DTT(或其它還原劑)、明膠(或其它蛋白阻斷來源)、硫氰酸銨(或其它促溶劑)，三氮化鈉(或其它防腐劑)、和SDS(或其它清潔劑)。然而，在稀釋液中包含還原劑可能無益於甚至會惡化許多來自其它微生物之抗原穩定性。

美國專利案4,956,274關於技術在互補測試以穩定來自貝

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(3)

他-半乳糖苷酶(β -galactosidase)之多肽片斷。揭露於美國專利案4,956,274之溶液包括離子性界面活性劑或衍生自糖類殘餘基之界面活性劑可減緩貝他半乳糖苷酶多肽片斷解降。然而，界面活性劑也會使酵素片斷變性，因此必須移除或中和使得酵素片斷回復其正確結構並恢復酵素活性，所以指出該溶液不能穩定蛋白質之自然型態。於測試前使用環糊精中和界面活性劑。或者，以高濃度血清遮蔽界面活性劑作用。該揭露試劑額外成分包括螯合劑、緩衝劑、殺菌劑、鎂或其它離子、還原劑、穩定劑如溶劑如乙二醇、和非-離子性清潔劑。然而熟暗此技藝者讚賞變性和復性蛋白質或酵素片斷時，有可能損害抗原性決定基而呈現減能。

美國專利案5,459,033敘述溶液有效抑制病毒聚集。據報導該溶液含正代十二醯甲胺基乙酸或其它陰離子性界面活性劑。並聲稱該溶液可增加穩定性是基於假設病毒原顆粒，特別是肝炎和皰疹病毒因斥水性吸引產生聚集導致降低活性。此稀釋液並非改善或保存抗原催化活性或免疫性，而是預防聚集產生。據報導使用溶液前必須培養在2-35°C 15小時至10天以確保一致穩定性，所以給其最終產品之製造可能性增添很大的限制。

美國專利案5,660,978揭露穩定抗原之方法，針對不安定蛋白抗原，特別是酵素，藉合併濃縮抗原(如血清)溶液，抗原-專一性抗體或其蛋白質(特別是Fab)以預防蛋白分解或氧化。對此稀釋液採用血清或非-專一性IgG無法預期提

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(4)

供所需之保護或保護專一性。此外，穩定化是將抗原置於稀釋液來完成。相較之下，本發明藉由稀釋液本身來穩定。因此，本發明從一開始便穩定相關稀釋溶液，而非如上述專利建議之階段性。使用抗體在結構上穩定抗原可能產生問題，特別以一或多個抗原決定位為免疫測試之標的。因此，熟知此項技藝者會遇上困難如果堅持生產如專利案'978所揭露之稀釋液，雖然其在結構上保存抗原，但不會抑制特殊酵素活性。該發明基本上利用抗體部分當作固定試劑，以取代化學固定劑，所以不是真的描述成穩定化稀釋液。

蘭地(Landi)，S和海得(Held)，HR(結核結節(Tubercle) 59 (1978) 121-133)報告添加吐溫(Tween)-80清潔劑至稀釋溶液，並經建議此添加導入清潔劑抗-吸附特質使得結核菌素PPD穩定性增加。結核菌素製備品由柯南特實驗室股份有限公司(Connaught Laboratories, LTD)製作，含結核菌素PPD，0.3%苯酚(報告指出當作防腐劑)，和0.0005%吐溫-80於PBS中。苯酚是具危險性物質在本發明中不被接受而且可能會使一些蛋白質變性。

除了稀釋液配方和冷凍乾燥法保存技術進步外，仍須針對稀釋液適當改善存放在溶液中多種多肽和抗原之長期穩定性，特別是取自微生物之抗原。

發明簡述

本發明特指試劑用來穩定多肽和抗原。該試劑特別有效穩定分析程序中控制組或參考組之抗原。抗原如碳水化合物

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(5)

物、蛋白質、多肽、多肽片斷、脂蛋白、脂多醣、多醣、核酸、核蛋白，和碳水化合物複合多肽、脂質、和其它化合物為使用本發明來穩定抗原之種類實例。

本揭露試劑針對多肽和抗原穩定性在低溫和高溫上優於先前配方。能將多肽和抗原以溶解狀態存放在試劑中保持長期在不同溫度從約0.5°C至超過約50°C，較佳從約2-8°C，約室溫(一般從約23°C至約28°C，25°C為特別佳)和約42°C至約43°C，特別約45°C。試劑在45°C穩定性能預測試劑穩定性以提供長期抗原穩定性。因此針對穩定多肽和抗原目的，本揭露試劑具有單一水溶液之優點。

首先，本發明特指水溶液試劑組合物以增加多肽或抗原穩定性。在特定較佳實施例中，試劑包含一或多種下列成分：緩衝劑、阻斷劑、溶劑、鹽類、螯合劑、清潔劑、和防腐劑。試劑較佳不含N-十二醯基-N-甲基甘胺酸或癸醯基-N-甲基葡萄糖醯安(N-methylgluconamide)。試劑也可包含成分如組織培養基或市售稀釋液。

本文中專有名詞"緩衝劑"指相關技藝已知之組合物，其作用將溶液pH值變化最小化。較佳緩衝劑pKa提供有效緩衝力在pH值7和9之間。較佳緩衝劑為ACES，ADA，BES，二甘氨酸，雙-三羥甲基氨基甲烷緩衝劑，CAPS，CHES，丙二酸二乙基酯，甘胺醯甘胺酸、甘胺醯胺、鹽酸、HEPES、HEPPS、咪唑、MES、MOPS、PIPES、POPSO、TAPSO、TES、N-三(羥甲基)甲基甘氨酸、三羥甲基氨基甲烷緩衝劑、雙碳酸鹽、和硼酸。特別佳是磷酸緩

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(6)

衝劑。較佳緩衝劑濃度少於2莫耳濃度；最佳濃度是0.2莫耳濃度、0.1莫耳濃度、0.05莫耳濃度、0.02莫耳濃度、0.01莫耳濃度、0.005、0.001、和0.0001莫耳濃度，具pH值7、7.25、7.5、7.75、8、8.25、8.5、8.75、和9。

本文中專有名詞"阻斷劑"指一富含蛋白來源含蛋白質和/或多肽混合物，其也可包含一或多種額外成分如脂質、碳水化合物、鹽類、和共因子如血基質。專有名詞"富含蛋白質"定義在本文中。此阻斷劑可用來穩定本文敘述之組合物和方法中一或多種蛋白質、多肽、和/或抗原。較佳阻斷劑具有pH值約6.5至約8.0之間，和/或溶質度介在約250至約350毫溶質濃度/公斤水。特別佳阻斷劑是血清、如馬血清、新生小牛血清、小牛血清、成牛血清、人血清、兔子血清、羊血清等，和相關技藝已知之血清替代品。最佳阻斷劑是胎牛血清。

本文中專有名詞"富含蛋白質"指溶液中含蛋白質和/或多肽之混合物，具有總蛋白質濃度約1 g%至約50 g%之間，最佳是在約3 g%和約10 g%之間。例如，胎牛血清具總蛋白質含量約3 g%和約4.5 g%之間，而成牛血清具總蛋白含量在4.5 g%和約8.5 g%之間。

本文中專有名詞"溶劑"和"溶解化劑"指液態物質能夠分散其它組合物之成分。較佳溶劑是水、甘油、DMSO、酒精如乙醇、甲醇等、丙酮、甲亞砷、乙腈、和二甲基甲醯胺。

本文中專有名詞"鹽類"指一或多種化合物得自酸類部分

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(7)

或全部酸性氫被金屬或作用像金屬之元素取代。較佳鹽類是氯化鉀、氯化鈉、氯化鎂、硫酸鎂、和氯化鈣。較佳鹽類濃度在4莫耳濃度和0.1毫莫耳濃度之間，最佳在2莫耳濃度和50毫莫耳濃度之間。

本文中專有名詞"螯合劑"指一分子和金屬離子結合，通常藉由分子中二或多個複雜基團結合。螯合劑於相關技藝中熟知，並且包括特定蛋白質和多肽，以及小分子如乙二胺四乙酸(EDTA)和乙二醇基-二(β -胺乙醚)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA)。較佳螯合劑濃度在100毫莫耳濃度和0.01毫莫耳濃度之間，最佳在20毫莫耳濃度和1毫莫耳濃度之間。

本文中專有名詞"清潔劑"指相關技藝已知之化合物，其能夠乳化油類並作用如溼潤劑。較佳清潔劑包括CHAPS、膽汁酸、去氧膽汁酸、地芰皂寧、n-十二基- β -D-麥芽糖苷、去氧甘膽汁酸、n-十二醯基肉胺酸酯、十二基硫酸酯、皂苷、吐溫20、和川酮(triton) X-100。較佳清潔劑濃度在約0.001%至約5%之間。最佳組合物含約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%、和2%。

本文中專有名詞"防腐劑"指熟知此項技藝者已知之化合物，其預防微生物生長。較佳防腐劑包括乙基硫汞水楊酸鈉、花楸酸、丁基羥基苯甲醚(BHA)、2,6-二-第三丁基-對-甲酚(BHT)、殺微生物劑II (Microcide II)(溴化三甲基四癸基銨)和抗生素如正大黴素、青黴素、鏈黴素等。較佳

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(8)

防腐劑濃度在10%和0.001毫莫耳濃度之間，最佳介於1%和0.1%之間。

本文中"多肽"指氨基酸聚合物並非指產物特殊片斷，因此胜肽、寡肽、蛋白質、和其片斷都涵蓋在定義中。專有名詞"多肽"不排除多肽後一轉譯修飾，例如醣化、乙醯化、磷酸化，及其類似反應。

本文中"抗原"包括碳水化合物、蛋白質、多肽、脂蛋白、脂多醣、多醣、核酸和碳水化合物複合多肽、脂質、和其它化合物。抗原能夠對具有功能性免疫系統之動物引出免疫反應。在較佳實施例中，穩定化抗原是多肽抗原。這些多肽抗原可單獨存在或和其它分子聯結。在特別佳實施例中，穩定化多肽是核蛋白抗原。核蛋白抗原可來自數個來源且可單獨存在或和其它分子聯結。

"核蛋白抗原"意指任何多肽聯結或附在核複合物上。

特別佳核蛋白是來自流行性感冒病毒，特別是流行性感冒病毒B型之核蛋白。

"抗原穩定性"意指在設定溫度特定期間試劑在保存後維持一致訊號之能力以用於測試或分析方法中，特別是診斷測試或免疫測試。一般保存溫度是從約2°C-30°C。藉高溫較短期間測量抗原品質惡化也可評估抗原穩定性。針對增進穩定性測試一般溫度是從約30°C至60°C。

"微生物"意指原核生物、真核生物如酵母菌、病毒、朊病毒或其它感染性粒子。

"分析方法"指任何技術允許一或多種抗原之特殊測試。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(9)

分析方法包括任何測試型式之免疫測試和核酸雜交、以及相關技藝已知之數種實例。特別佳光學免疫測試方法已敘述在美國專利案5,550,063；5,955,377；和5,541,057。

第二方面，本發明特指水溶液試劑組合物以增加抗原或多肽穩定性，其中抗原來自微生物。在一較佳實施例中，微生物包含病毒和/或細菌。本發明特別佳用於病毒分析。最特別佳實施例，本發明特指一試劑組合物用於穩定抗原和多肽取自流行性感冒病毒，特別是取自流行性感冒病毒B之多肽和抗原。

第三方面，本發明特指一試劑組合物用於穩定流行性感冒病毒之核蛋白，特別是流行性感冒病毒B之核蛋白。

第四方面，本發明特指水溶液試劑組合物以穩定抗原製劑於分析方法中當作控制組或參考試劑。

一特別佳實施例中，試劑包含緩衝劑、阻斷劑、鹽類、螯合劑、溶解化劑、非-離子性清潔劑、和防腐劑。試劑最佳不含N-十二醯基-N-甲基甘胺酸或癸醯基-N-甲基葡萄糖醯胺。

一更佳實施例中，試劑也包含組織培養基，史塔必寇特®(Stabilcoat®)緩衝劑(BSI股份有限公司)，和含福馬林-滅能病毒細胞培養基。

其它更佳實施例中，試劑包含磷酸鈉緩衝劑、胎牛血清、甘油、氯化鈉、EDTA、吐溫-20®清潔劑(聚氧乙烯花楸糖單月桂酸酯)、殺微生劑II®防腐劑(四級胺化合物；亞雷斯可(Amresco)，E423)、正大黴素硫酸鹽，以及可含蔗

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (10)

糖、組織培養基和史塔必寇特[®]緩衝劑(BSI股份有限公司)。溶液pH值在約7和約9之間，最佳在7.5和8.5之間。熟知此項技藝者知曉類似試劑能取代上述所列者。例如，EDTA可以用EGTA取代，和殺微生物劑II[®]或正大黴素可用其它抗菌劑替代。上述試劑之較佳濃度如下：對磷酸鈉而言，0.1毫莫耳濃度至1000毫莫耳濃度，更佳是1毫莫耳濃度至200毫莫耳濃度，最佳是50毫莫耳濃度至100毫莫耳濃度；對胎牛血清而言，0.1%至40%體積/體積，最佳是2%至20%體積/體積；對甘油而言，0.1%至30%體積/體積，最佳是2.5%至10%體積/體積；對氯化鈉而言，0.1毫莫耳濃度至4毫莫耳濃度，最佳是50毫莫耳濃度至2毫莫耳濃度；對EDTA而言，0.01毫莫耳濃度至100毫莫耳濃度，更佳是1毫莫耳濃度至20毫莫耳濃度，最佳是10毫莫耳濃度至15毫莫耳濃度；對吐溫-20而言，0.001%至1%，更佳是0.01%至0.1%，最佳是0.5%；殺微生物劑II而言，0.001%至1%重量/體積，最佳是0.002%至0.1%重量/體積；對正大黴素硫酸鹽而言，0.01%至10%重量/體積，更佳是0.1%至2.5%，最佳是0.25%至1%；和對蔗糖而言，0.01%至5%重量/體積，最佳是0.1%至0.5%。

特別佳實施例中，稀釋液包含劑量大於或等於約：50毫莫耳濃度磷酸鈉；2%體積/體積胎牛血清；10%體積/體積甘油；50毫莫耳濃度氯化鈉；10毫莫耳濃度EDTA；0.05%體積/體積吐溫-20清潔劑；0.01%重量/體積殺微生物劑II防腐劑；和0.5%重量/體積正大黴素硫酸鹽。來自抗原製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (12)

行並且熟暗此藝者可經常用來預測穩定性。執行意義是在高溫培養試劑並在相當短時間間隔進行測試。例如，培養3至7天在37°C，45°C，或其它高溫，分析時使用阿列紐司氏方程式(Arrhenius equation)去預測試劑是否長期在約2°C - 8°C中將保持穩定。一般相信這方法最能正確預測試劑是否失效。如果試劑無法經得起高溫挑戰，其不可能在長時間正常貯存狀況下保持穩定。當不能正確預測衰退率時，高溫穩定性較無法預測長期穩定性，但可以由確認試劑失效可能時間點而給予穩定性指標。當穩定性喪失在高溫中減少時，就呈現真實失效之希望。

除了加速確效外，也須要實際時間、長期研究去評估試劑穩定多肽和抗原之潛力。熟暗此藝者已知針對實際時間研究狀況。例如，實際時間研究狀況包括將試劑保存在正常保存溫度約2°C - 8°C或室溫(18°C - 30°C)中，直至試劑失效為止。

針對流行性感感冒病毒，包括福馬林-滅能流行性感感冒病毒A和B型態病毒之免疫測試，正性控制組試劑之發展以評估其在蛋白質基稀釋液中穩定性。在測試中偵測抗原決定基時，以病毒核蛋白、滅能流行性感感冒病毒A比滅能流行性感感冒B病毒在單純稀釋液和市售穩定化稀釋液中明顯更穩定。為確保偵測流行性感感冒病毒A和B之市售新產品商機，意指須要穩定滅能之流行性感感冒病毒B。將稀釋液調配以授與穩定性給予二種滅能流行性感感冒病毒懸浮液。已証實此稀釋液比先前稀釋液配方更具有能力以改善在液

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (13)

體中滅能流行性感冒病毒B穩定性達較長時期。

流行性感冒病毒A顯示能穩定於單純蛋白基稀釋液中。一此種稀釋液含牛血清蛋白(BSA)和吐溫-20[®]清潔劑在磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)別名PBT。第二種調製品是市售產品，史塔必寇特[®]緩衝劑(BSI股份有限公司)，並已証實能穩定流行性感冒病毒A。然而，這些溶液無法穩定流行性感冒病毒B。極像偵測不同株之單株抗體，在測試中執行辨視位在二種核蛋白上不同抗原決定基。這些抗原決定基經滅能和貯存狀況受到不同影響。因此，為測試使用之單株抗體在初始製備時所用免疫原可以不同方式製備，所以傾向產生單株抗體能辨視不同合適之抗原決定基。我們相信本文所述之稀釋液組合物具有類似穩定效果在滅能流行性感冒病毒A核蛋白以及在滅能流行性感冒病毒B核蛋白上。此外，認為對其它病毒或細菌蛋白也穩定良好。

在病毒滅能和稀釋成每個稀釋型式過程中，值得注意的是滅能病毒基本懸浮液成分特質會併入其中。滅能病毒基本懸浮液包含50%福馬林-滅能病毒-包細胞培養基(ICC)和50%史塔必寇特[®]緩衝劑。每個測試之正性控制組合物包含一些此基本懸浮液體積。

B. 新稀釋液之形成

新稀釋液配方始於單純蛋白稀釋液、PBT，包含BSA、吐溫-20、和PBS溶液。當其能維持或增加滅能流行性感冒病毒A之穩定性，對每個單一成分評估其穩定滅能流行性感冒病毒B之能力。抗原製劑穩定性之增加以下列方法來

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (14)

評估。為具有即將上市之控制組試劑的分析測試方法，將滅能病毒物質稀釋成預期之訊號強度。一般來說，根據相關分析方法對控制組試劑選擇低於中央訊號強度。在所選抗原稀釋液中不同試劑組合物立刻以適當分析方法來測試。不同試劑組合物(包含抗原)被置於不同保存條件下然後以分析方法進行周期性再測試。超過貯存條件範圍後試劑組合物保有初始訊號或僅有初始訊號強度之最少量解降以決定是否增加了穩定性。訊號強度可在定性、定量、光學上評估或藉由使用儀器。成分篩選期間，對PBT稀釋液可行數種修飾。首先，不同阻斷劑、如胎牛血清以取代BSA。其次，可添加溶解化劑如甘油和螯合物，如EDTA或EGTA，以增加穩定性。因此，結論認為非-離子性清潔劑，如吐溫-20[®]清潔劑對穩定性是必要的。防腐劑如殺微生物劑II和正大黴素硫酸鹽合併涵蓋在抗微生物劑中。

一特殊較佳實施例中，所發明稀釋液包含大於或等於50毫莫耳濃度磷酸鈉、2%體積/體積胎牛血清、1%體積/體積甘油、50毫莫耳濃度氯化鈉、5毫莫耳濃度EDTA、0.05%體積/體積吐溫-20清潔劑、0.01%重量/體積四級銨化合物、和0.5%重量/體積正大黴素硫酸鹽。來自抗原製劑或由分別添加，試劑也可包含至多15%史塔必寇特[®]緩衝劑和20%組織培養基。溶液較佳pH值約7.5至約8.5之間。也可以取代緩衝劑和/或鹽類而用預配方組織培養基濃縮液(例如，依果最低基本培養基或來自拜歐懷塔克之杜必寇修飾依果培養基)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (15)

並不期望和特殊理論結合，但經由下列機制修飾初始稀釋液可增加多肽或抗原穩定性。胎牛血清比BSA更可提供豐富蛋白質來源，即以總血清產物替代純化蛋白。亦可包含其它穩定化物質。甘油可對抗原經由氫鍵增加水合。螯合劑可經移除陽離子增加穩定性，因為陽離子會負面碰撞多肽或抗原本身，或可能為侵害抗原或多肽之特定解降酵素活性所須，或可能抑制抗原催化位置。當瓦解不重要或解降結構或交互影響時，清潔劑可維持重要二級結構並支持抗原或多肽之聯結。

本發明在上述單純BSA蛋白稀釋液(PBT)中進行首度水準點抗原穩定性評估。一般試劑發展過程，45°C正性保持力至約3天足以評估較低溫長時期穩定性。熟暗此藝者相信高溫中至多約14天之穩定性表示為很穩定之抗原。此外，45°C時試劑長時間保持活性；即可能在較低溫，如約2°C-8°C或室溫時能穩定更久。首先，福馬林-滅能流行性感感冒病毒懸浮基本溶液以相關技藝已知之一般方法製作並在下列實例1加以敘述。接著，將流行性感感冒病毒A和流行性感感冒病毒B滅活基本溶液二者分別以1:2和1:4稀釋比例調製成單純蛋白稀釋液。在這些稀釋溶液中，測試稀釋液分別包含完全溶液、50%稀釋液、25% ICC、和25%史塔必寇特緩衝劑或75%稀釋液、12% ICC和12%史塔必寇特®緩衝劑。這些抗原稀釋溶液選來供給反應測試器之光學檢驗中適當正性訊號。二種反應溶液在4°C測試第0天、第3天和45°C第3天以弗魯歐阿®(FLU OIA®)測試組(生技之星

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (16)

(Biostar)股份有限公司)測試正性反應。將測試當作每包裝插入組來執行。滅能流行性感冒病毒B在45°C第3天失去所有正性活性，而滅能流行性感冒病毒A僅失去部分其正性活性。由於試劑失效所以不進行接續時間點測試。PBT蛋白稀釋劑在預計溫度上無法維持抗原穩定性。

此外，史塔必寇特®緩衝劑(BSI股份有限公司)為一種市售稀釋液可調配以保護和穩定抗體包裹外表，測試使用抗原稀釋液如上述。史塔必寇特®-衍生之控制組試劑穩定性以上述方法評估，但排除第0天和第4天(4°C和45°C保存狀況)測試點。在這些狀況下稀釋液完全組合物是75%史塔必寇特®緩衝劑和25% ICC。甚至在組織培養基存在下，史塔必寇特®緩衝劑仍無法維持滅能流行性感冒病毒B抗原之穩定性超過第4天，指出其缺乏長期保存潛能。

其次，本發明試劑組合物以上述方法測試以評估其效能。在這案例中，稀釋液完全組合物針對滅能流行性感冒病毒A含50%稀釋液、25% ICC、和25%史塔必寇特®緩衝劑，且針對滅能流行性感冒病毒B溶液含75%稀釋液、12.5% ICC、和12.5%史塔必寇特®緩衝劑。在45°C第3天，滅能流行性感冒病毒A和B二者都失去些微正性反應但仍是明顯正性。滅能流行性感冒病毒B試劑在第7天、第14天和第21天進行評估。經21天在45°C，滅能流行性感冒病毒B終於失去所有正性反應。先前研究顯示滅能流行性感冒病毒A也在第21天失去大部分正性反應。在這些特殊測試狀況下並沒有示出滅能流行性感冒病毒A之增進數據，因

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (17)

為沒有測得其失效。然而，減能流行性感冒病毒A之穩定性在這些狀況下可以很高且可延伸超過測試時間點。如果在這些或其它測試狀況下測得失效，本發明稀釋液應該也能增加減能流行性感冒病毒A抗原之穩定性。因此，相較於單純PBT蛋白稀釋液和史塔必寇特[®]，本發明組合物更優於穩定抗原在溶液中保存。

在本發明其它評估中，本發明穩定稀釋液用在更敏感光學測試方法。本方法之正性控制組所使用抗原為福馬林-減能流行性感冒病毒A和福馬林-減能流行性感冒病毒B二者稀釋成1:10之稀釋溶液，以達到此控制組溶液所須之適當訊號。在此評估中選擇使用之抗體是針對使用之表面種類而基於最佳分析執行。製作測試表面反應區域以較佳方法將單株抗-流行性感冒病毒A抗體或單株抗-流行性感冒病毒B分佈至表面成斑紋狀，使得每個測試表面含一個流行性感冒病毒A反應區域和一個流行性感冒病毒B反應區域。在室溫下將表面乾燥並以防腐溶液塗佈。使用熱-打樁儀器使抗體表面熱固定至聚本乙烯環以容許溶液流經或圍繞多孔表面。為了本實驗目的，將測試處理以流經方式。流經意指測試過程中樣品接觸並流過、覆蓋、或圍繞測試面。

本實驗檢測細胞培養基(EMEM，拜歐懷塔克目錄編號#12 136Q)之效能作為本發明穩定稀釋液成分以增加抗原穩定性。四個檢測溶液製做如下：(A) 75%本發明稀釋液、12.5%EMEM和12.5%史塔必寇特緩衝劑，(B)溶液A，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (¹⁸)

其 EMEM 額外含 2% 胎牛血清、1% L- 麩胺酸、和 0.5% 盤史崔普 / 夫巨容 (PenStrep/Fungizone) (抗微生物溶液，拜歐懷塔克目錄編號 #17-745H)，(C) 75% 本發明稀釋液和 25% 史塔必寇特稀釋液，和 (D) 僅具本發明稀釋液。減能流行性感冒病毒 B 基本懸浮液之 1:10 稀釋溶液以四種稀釋液製作，用各別檢測稀釋液先製成 1:4 稀釋溶液，再製作 1:2.5 稀釋溶液。每種溶液在 4°C 第 3 天和在 45°C 第 3 天進行檢測。溶液 A 在 45°C 第 3 天顯示最佳穩定性，接著是溶液 B、D 和 C。結果指出合併細胞培養基 / 史塔必寇特[®]至稀釋液在增加稀釋抗原狀況下會增加抗原穩定性 (比較在溶液 A 和在溶液 D 之穩定性)。以較高濃度史塔必寇特[®]緩衝劑為當作唯一其它組成分 (溶液 C) 則不利於抗原穩定性 (相較於溶液 A)。

所以，結果明顯指出在水溶液中穩定蛋白質抗原之能力上本發明大大地優於本身其它類型稀釋液，特別是流行性感冒病毒。

下例實例提供闡述方式，但不是限制，而是更進一步闡述本發明之不同方面和實施例。實例不在任何方面限定範圍。

實例

實例 1：

測試抗原穩定性在單純蛋白稀釋液 (PBT)，其含 1X 杜必寇 PBS、0.05% 吐溫 - 20 清潔劑、2% BSA、0.01% 殺微生物劑 II 防腐劑、和 0.5% 正大黴素硫酸鹽。首先，如下製備減

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (19)

能流行性感冒病毒懸浮基本溶液。融合 MDCK p83 細胞以流行性感冒病毒 A(1:10,000 稀釋 A/香港 68 每錐形瓶)或流行性感冒病毒 B(1:1000 稀釋 B/巴拿馬 45/90 每錐形瓶)感染且培養在依果 MEM 維持培養基(具有 2% 熱-滅能胎牛血清、1% L-麩胺酸、和 0.5% 盤/史崔普/夫巨容)直至觀察到 90-100% CPE(細胞病變效應)。以劇烈振盪收集病毒接著將細胞懸浮液離心。以添加 37% 甲醛溶液(西格瑪化學(Sigma Chemical), F-1268)將所得懸浮物滅能並達 0.2% 總體積(2 微升/毫升)且在室溫下培養 1 小時。然後,含病毒溶液和等量史塔必寇特[®]緩衝劑(BSI 股份有限公司)混合、分裝、並使用或立即冷凍。

將滅能流行性感冒病毒 A 和流行性感冒病毒 B 病毒懸浮基本溶液以 1:2 和 1:4 分別加至單純 BSA 稀釋液,經添加 1 毫升滅能流行性感冒病毒 A 基本溶液至 1 毫升單純稀釋液,並在不同容器將 0.5 毫升滅能流行性感冒病毒 B 基本溶液添加至 1.5 毫升單純稀釋液中。在這些稀釋溶液中,檢測稀釋液分別包括其完整溶液、50% 稀釋液、25% ICC、和 25% 史塔必寇特[®]緩衝劑或 75% 稀釋液、12.5% ICC、和 12.5% 史塔必寇特[®]緩衝劑。其次,每個所得溶液在第 0 天以弗魯歐阿[®]測試組(生技之星股份有限公司)測試正性反應。將測試當作每包裝插入組來執行,而且訊號品質或正性反應以反應弗魯歐阿檢測器之光學說明評估如下:(0)負性;(1)少許;(2)非常微弱正性;(3)正性界在非常微弱和微弱之間;(4)微正性;(5)正性界在弱和中度之間;(6)中度正

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (20)

性；(7)正性界在中度和強度之間；(8)強度正性結果。訊號若位在2-8則被視為正性。

稀釋之後每個溶液分成二部分。一存放在4°C，另一在45°C達3天。四種溶液都在第3天以第0天相同方式再檢測。第0天和4°C控制組得到預期之中度正性訊號。滅能流行性感冒病毒B在45°C第3天失去所有正性反應，而滅能流行性感冒病毒A失去部分正性反應。測試沒有在接續時間點進行是由於試劑失效。一般試劑發展上，正性反應保留力在45°C第3天足以評估在較低溫長期穩定性。試劑在45°C保留活性達較長時間；相關於穩定性在較低溫，如2°C-8°C和室溫。因此，此單純PBT配方無法維持抗原穩定性至預期程度。

實例2：

史塔必寇特[®]緩衝劑(BSI股份有限公司)，一種市售稀釋液調配以保護和穩定抗體塗佈面，測試如實例1所述但排除試劑在第0天和第4天(4°C和45°C貯存狀況)測試。注意稀釋液完整組合物是75%史塔必寇特[®]緩衝劑和25% ICC。史塔必寇特不能維持滅能流行性感冒病毒B抗原穩定性超過第4天，即指出其缺乏長期貯存潛能。

實例3：

接著，本發明試劑組合物以實例1所述之類似實驗來測試。稀釋液如下製備20毫升。2毫升1莫耳濃度磷酸鈉緩衝劑和8毫升去離子水(100毫莫耳濃度)加至一圓錐管中，混合，並調整pH值至7.5。然後將0.175氯化鈉(150毫莫耳)加

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (21)

入並混合。接著將0.1毫升10%吐溫-20溶液(0.05%)加入並混合。其次，將0.2毫升1%殺微生物劑[®]II防腐劑(0.01%)基本溶液和0.1毫升正大黴素硫酸鹽(0.5%)加到管中並混合均勻。然後，2毫升甘油(10%)和1毫升胎牛血清(5%)加入並混合。最後將0.4毫升500毫莫耳濃度EDTA/去離子水(10毫米)混合物之基本溶液加入混合並調整pH值至7.5。加去離子水至總體積20毫升。

製作病毒檢驗試劑以5毫升稀釋劑加至5毫升減能流行性感冒病毒A基本溶液(1:2稀釋液)或7.5毫升稀釋液加至2.5毫升減能流行性感冒病毒B基本溶液(1:4稀釋液)並混合均勻。在此例中，稀釋液完全組合物針對減能流行性感冒病毒A溶液包含50%稀釋液、25% ICC、和25%史塔必寇特[®]緩衝劑，且針對減能流行性感冒病毒B溶液包含75%稀釋液、12.5% ICC、和12.5%史塔必寇特[®]緩衝劑。在研究過程中針對每個檢測試劑每次進行弗魯歐阿[®]測試當作每包裝插入組來執行。此實驗進行21天因為能增加抗原穩定性。在45°C第3天，減能流行性感冒病毒A和B二者失去一些正性反應但仍是顯著正性。減能流行性感冒病毒B試劑提高至第7天、第14天和第21天。事實上，在45°C第21天減能流行性感冒病毒B失去所有正性反應。減能流行性感冒病毒A於其它研究顯示經此段時間量之後會失去大部分活性。光學上解析測試結果基於主觀上0-8等級如下：(0)負性；(1)少許；(2)非常微弱正性；(3)正性界在非常微弱和微弱之間；(4)微正性；(5)正性界在弱和中度之間；(6)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(22)

中度正性；(7)正性界在中度和強度之間；(8)強度正性結果。訊號若位在2-8則被視為正性。流行性感冒病毒B在本發明稀釋液中增加之穩定性以圖1表示。

實例4：

在其它本發明評估中，穩定化稀釋液用在不同測試中，其正性控制組使用抗原稀釋至福馬林-滅能流行性感冒病毒A和福馬林-滅能流行性感冒病毒B之1:10稀釋溶液以達到此控制組溶液所須之適度訊號。滅能病毒懸浮基本溶液製備如實例1且穩定稀釋液如實例3所述。選擇抗體以光學塗佈製作多孔性表面，該表面為軌跡-蝕刻聚碳酸酯膜塗上一矽酮可見層以提供反射率，一抗反射四氮化三矽層和一依全球專利案WO/98/18962近似鑽石之碳接觸層。在此評估中選擇使用之抗體針對使用之表面種類而基於最佳分析執行。在測試表面，反應區域以較佳方法製作將單株抗-流行性感冒病毒A抗體(40微克/毫升在0.1莫耳濃度HEPES、pH 8.0、1%蔗糖)或單株抗-流行性感冒病毒B抗體(40微克/毫升在0.1莫耳濃度HEPES、pH 8.0、1%蔗糖、150毫莫耳濃度氯化鈉)條紋分佈至表面，使得每個測試面含一個流行性感冒病毒A反應區和一個流行性感冒病毒B反應區。反應面條紋化使用拜歐皆史塔®(BioJet®)儀器(拜歐達特(BioDot)股份有限公司)，在室溫下乾燥且外層塗佈防腐劑溶液。使用熱-打樁儀器使抗體表面熱固定至聚碳酸酯以容許溶液流經或圍繞多孔表面。塑膠環提供支撐以幫助操作和放置多孔面至真空來源以協助移除液體並乾燥

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (²³)

多孔面。塗佈面可在使用前貯放在2-8°C。爲了本實驗目的，測試採用流過方式。流過意指在測試期間樣品和測試面接觸並流過、覆蓋、或環繞之。

此實驗檢測細胞培養基(EMEM)能力以當作本發明穩定稀釋成分增加抗原穩定性。四個檢測溶液製做如下：(A) 75%本發明稀釋液、12.5% EMEM和12.5%史塔必寇特緩衝劑，(B)溶液A，其EMEM額外含2%胎牛血清、1%L-麩胺酸、和0.5%盤史崔普/夫巨容，(C) 75%本發明稀釋液和25%史塔必寇特稀釋液，和(D)僅具本發明稀釋液。滅能流行性感冒病毒B基本懸浮液之1:10稀釋溶液以四種稀釋液製作，用各別檢測稀釋液先製成1:4稀釋溶液，再製作1:2.5稀釋溶液。四種溶液(30微升)分別加到含165微升萃取試劑之各別試管並培養1分鐘。每個樣品全液移至上述反應面上並培養3分鐘。接著，100微升共軛物(抗-流行性感冒病毒A抗體共軛結合HRP混合抗-流行性感冒病毒B抗體共軛結合HRP)移至反應面培養額外3分鐘。其次，在反應底部抽真空以吸引樣品/共軛物混合經過並離開表面。施以沖洗水溶液至表面將表面沖洗3次並在真空壓力下允許其流經表面直至乾燥爲止。關掉真空和將75微升沉澱TMB基質置於測試面並培養6分鐘。將基質拉引通過表面並如上述將表面沖洗一次和乾燥。然後測試訊號如實例3解析。

每種溶液在4°C第3天和在45°C第3天測試。溶液A在45°C第3天顯示最佳穩定性，接著是溶液B、D、和C。結果指

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (24)

出合併細胞培養基/史塔必寇特[®]緩衝劑至稀釋液在增加稀釋抗原狀況下可增加抗原穩定性(相較溶液A和溶液D之穩定性)。使用高濃度史塔必寇特[®]緩衝劑當作唯一其它成分(溶液C)會不利抗原穩定性。圖2顯示上述實驗所得結果。

這些結果明顯指出本發明極優於其它稀釋液在其穩定水溶液中蛋白抗原之能力上，特別是流行性感冒病毒。上述參考之每篇參考文獻、專利、或專利申請書以參考之方式併入文中。

敘述本發明較佳實施例後，熟知此項技藝者應該知道其中經不同改變、改造和修飾而不會偏離本發明之精神和申請專利範圍。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

四、中文發明摘要（發明之名稱： 用於多肽及抗原之穩定稀釋液)

本發明敘述用於穩定多肽或抗原之組合物。此組合物有效穩定保存在水溶液配方中之多肽或抗原。此配方可用於多種分析或其它方法。

英文發明摘要（發明之名稱： "STABILIZING DILUENT FOR POLYPEPTIDES AND ANTIGENS")

Compositions for stabilizing polypeptides or antigens are described. These compositions are useful for stabilizing polypeptides or antigens stored in aqueous formulations. Such formulations can be used for various analytical or other methods.

修正
補充
91年4月4日

公告本

I257953

申請日期	90.3.7
案 號	089126738
類 別	C12N 5/00, A61K 47/00, 39/12, 39/00, G01N 33/53

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

中文說明書修正頁(91年4月)

發 明 專 利 說 明 書 新 型		
一、發明 名稱	中 文	用於多肽及抗原之穩定稀釋液
	英 文	"STABILIZING DILUENT FOR POLYPEPTIDES AND ANTIGENS"
二、發明 創作人	姓 名	1.傑佛瑞 W. 史帝芬斯 JEFFREY W. STEAFFENS 2.羅拉 本札瑞拉 LAURA PANZARELLA
	國 籍	均美國
三、申請人	住、居所	1.美國柯羅拉多州菲特市瓦納卡湖路1603號 2.美國柯羅拉多州隆曼市日落大道2526號
	姓 名 (名 稱)	1.美商泰摩拜歐史塔股份有限公司 THERMO BIOSTAR, INC. 2.日商旭化成股份有限公司 ASAHI KASEI KABUSHIKI KAISHA
	國 籍	1.美國 2.日本
	住、居所 (事務所)	1.美國柯羅拉多州包德市陸克奧特路6655號 2.日本國大阪府大阪市北區堂島浜1丁目2-6
	代 表 人 姓 名	1.諾爾 多海尼 NOEL DOHENY 2.山田高見 TAKAMI YAMADA

五、發明說明(11)

劑或經分別添加，試劑也可包含至多0.5%蔗糖、15%史塔必寇特[®]緩衝劑和20%組織培養基。較佳溶液pH值約7.5至約8.5之間。也可以取代緩衝劑和/或鹽類而用預配方組織培養基濃縮液(例如，依果(Eagle)最低基本培養基或杜必寇(Dulbecco)修飾依果培養基來自拜歐懷塔克(Bio Whittaker))。

第四方面，本發明特指方法以穩定來自微生物之多肽和抗原。在較佳實施例中，該方法用來穩定取自微生物之抗原製劑，其在相關分析方法當作控制組或參考組或用在醫藥製劑上。

圖式簡述

圖1：流行性感冒病毒B控制組之穩定性。顯示本發明稀釋液在穩定減能流行性感冒病毒B之優點。

圖2：細胞培養基對穩定性之增進。顯示細胞培養基之能力以進一步增加本發明稀釋液之穩定特質。

較佳實施例之詳述

A. 前言

為幫助瞭解本發明，描述試劑組合物為特殊應用之發展，並命名為穩定流行性感冒病毒之抗原。然而，對其它抗原或多肽穩定試劑組合物之一般性應用可引導類似實驗來証驗。

針對診斷測試或其它用途，試劑發展期間須要決定試劑長期穩定性。一開始完成加速穩定性確效以評估試劑半衰期再完成實際時間穩定性測試。加速穩定性研究可快速執

六、申請專利範圍

公告本

1. 一種水溶液試劑組合物，其包含緩衝劑、血清、甘油、選自由氯化鉀、氯化鈉、氯化鎂、硫酸鎂及氯化鈣組成之群之鹽類、選自由EGTA及EDTA組成之群之螯合劑、選自由CHAPS、膽汁酸、去氧膽汁酸、地芰皂寧、n-十二基- β -D-麥芽糖苷、去氧甘膽汁酸、n-十二醯基肉胺酸酯、十二基硫酸酯、皂苷、聚環氧乙烷山梨糖醇酐單油酸酯及聚乙二醇P-1,1,3,3-四甲基丁基苯基醚組成之群之清潔劑、和防腐劑，且具最終pH值為7.5至8.5，其中該組合物不包含N-十二醯基-N-甲基甘胺酸或癸醯基N-甲基葡萄糖醯胺。
2. 根據申請專利範圍第1項之水溶液試劑組合物，其中該血清是胎牛血清。
3. 根據申請專利範圍第1項之水溶液試劑組合物，其中該鹽類是氯化鈉。
4. 根據申請專利範圍第1項之水溶液試劑組合物，其中該螯合劑是EDTA。
5. 根據申請專利範圍第1項之水溶液試劑組合物，其中該清潔劑是聚環氧乙烷山梨糖醇酐單油酸酯。
6. 根據申請專利範圍第1項之水溶液試劑組合物，其中該防腐劑是溴化三甲基四癸基銨和正大黴素(gentamycin)。
7. 根據申請專利範圍第1項之水溶液試劑組合物，其中該緩衝劑是磷酸鈉。
8. 根據申請專利範圍第1項之水溶液試劑組合物，其中該緩衝劑是磷酸鈉，該血清是胎牛血清，該鹽類是氯化

六、申請專利範圍

鈉，該螯合劑是EDTA，該清潔劑是聚環氧乙烷山梨糖醇酐單油酸酯和該防腐劑是溴化三甲基四癸基銨和正大黴素。

9. 根據申請專利範圍第1項之水溶液試劑組合物，其進一步包含一或多種組織培養基。
10. 根據申請專利範圍第9項之水溶液試劑組合物，其中該組織培養基是依果最低基本培養基。
11. 根據申請專利範圍第1項之水溶液試劑組合物，其中水溶液試劑包含在50毫莫耳濃度和100毫莫耳濃度間之磷酸鈉，在2%和20%體積/體積間之胎牛血清，在2.5%和10%體積/體積間之甘油，在50毫莫耳濃度和2莫耳濃度間之氯化鈉，在10毫莫耳濃度和15毫莫耳濃度間之EDTA，在0.05%和0.1%體積/體積間之聚環氧乙烷山梨糖醇酐單油酸酯清潔劑，0.01%重量/體積溴化三甲基四癸基銨，和0.5%重量/體積正大黴素硫酸鹽且最終pH值是7.5至8.5。
12. 一種用來穩定當中之抗原或多肽之水溶液試劑組合物，其包含緩衝劑、血清、甘油、選自由氯化鉀、氯化鈉、氯化鎂、硫酸鎂及氯化鈣組成之群之鹽類、選自由EGTA及EDTA組成之群之螯合劑、選自由CHAPS、膽汁酸、去氧膽汁酸、地芰皂寧、n-十二基- β -D-麥芽糖苷、去氧甘膽汁酸、n-十二醯基肉胺酸酯、十二基硫酸酯、皂苷、聚環氧乙烷山梨糖醇酐單油酸酯及聚乙二醇P-1,1,3,3-四甲基丁基苯基醚組成之群之清潔劑、和防

六、申請專利範圍

腐劑，且最終pH值是7.5至8.5，其中該組合物不包含N-十二醯基-N-甲基甘胺酸或癸醯基N-甲基葡萄糖醯胺。

13. 根據申請專利範圍第12項之水溶液試劑組合物，其中該血清是胎牛血清。
14. 根據申請專利範圍第12項之水溶液試劑組合物，其進一步包含該抗原或多肽。
15. 根據申請專利範圍第14項之水溶液試劑組合物，其中抗原或多肽來自微生物。
16. 根據申請專利範圍第15項之水溶液試劑組合物，其中該微生物是病毒。
17. 根據申請專利範圍第15項之水溶液試劑組合物，其中該微生物是細菌。
18. 根據申請專利範圍第16項之水溶液試劑組合物，其中該病毒是流行性感冒病毒。
19. 根據申請專利範圍第18項之水溶液試劑組合物，其中該流行性感冒病毒是流行性感冒病毒B。
20. 根據申請專利範圍第14項之水溶液試劑組合物，其中該抗原是核蛋白。

95. 4. 04 修正
年 月 日 補充

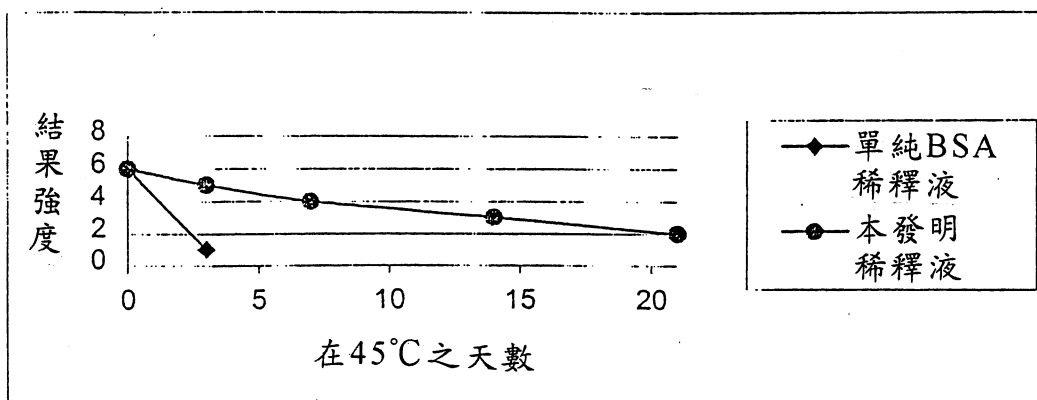


圖 1

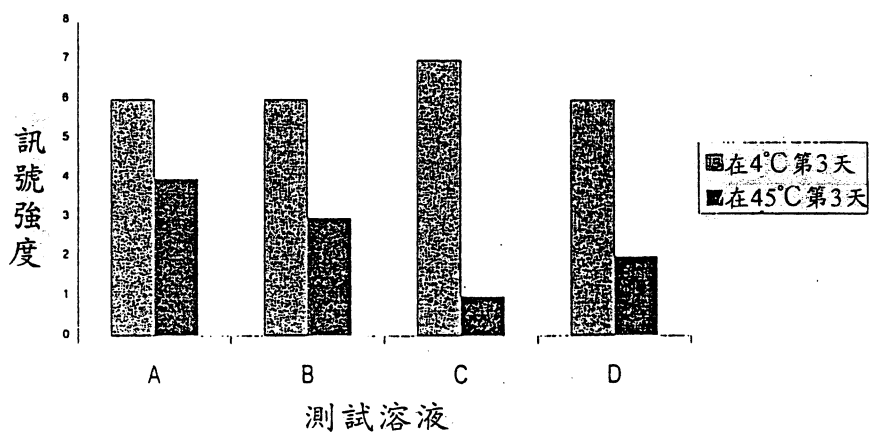


圖 2