年 月 日 修正補充
88. 2. 26

公告本

386878

申請日期	83.01.21
案號	82108937
類別	A61K 38/36, 38/49

（以上各欄由本局填註）

386878 A4 C4

中文說明書修正頁(88年2月)

發明 新型 專利說明書

一、發明新型名稱	中文	新穎糖型式之可溶性補體受體1
	英文	NOVEL GLYCOFORMS OF SOLUBLE COMPLEMENT RECEPTOR 1
二、發明創作人	姓名	1.亨利・希・馬西二世　4.約翰・利夫特 2.理查・艾・基・史密斯　5.安・瑪利・福曼 3.章一吉・葛利斯・葉　6.麥可・勞・葛斯林
	國籍	1. 3. 4. 6. 美國　2. 5. 英國
	住、居所	1.美國麻薩諸塞州瑞汀市高街218號 2.英國艾普森色瑞郡耶樹底路大伯區史密斯克林貝克曼公司 3.美國麻薩諸塞州紐頓市亞當街298號 4.美國麻薩諸塞州威斯萊市比萊爾路23號 5.英國艾普森色瑞郡耶樹底路大伯區史密斯克林貝克曼公司 6.美國麻薩諸塞州瑞維瑞市法蘭克林街105號
三、申請人	姓名（名稱）	1.美商先進免疫醫療股份有限公司 2.英商史密斯克林貝克曼公司
	國籍	1.美國　2.英國
	住、居所（事務所）	1.美國麻薩諸塞州劍橋市席尼街38號 2.英國米德萊賽省班特福市新界
	代表人姓名	1.優娜 S. 雷恩 2.皮・傑・吉汀斯

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

年 月 日 修正補充
88. 2. 26

公告本

386878

申請日期	83.01.21
案號	82108937
類別	A61K 38/36, 38/49

（以上各欄由本局填註）

386878 A4 C4

中文說明書修正頁(88年2月)

發明 新型 專利說明書

一、發明新型名稱	中文	新穎糖型式之可溶性補體受體1
	英文	NOVEL GLYCOFORMS OF SOLUBLE COMPLEMENT RECEPTOR 1
二、發明創作人	姓名	1.亨利・希・馬西二世　4.約翰・利夫特 2.理查・艾・基・史密斯　5.安・瑪利・福曼 3.章一吉・葛利斯・葉　6.麥可・勞・葛斯林
	國籍	1. 3. 4. 6. 美國　2. 5. 英國
	住、居所	1.美國麻薩諸塞州瑞汀市高街218號 2.英國艾普森色瑞郡耶樹底路大伯區史密斯克林貝克曼公司 3.美國麻薩諸塞州紐頓市亞當街298號 4.美國麻薩諸塞州威斯萊市比萊爾路23號 5.英國艾普森色瑞郡耶樹底路大伯區史密斯克林貝克曼公司 6.美國麻薩諸塞州瑞維瑞市法蘭克林街105號
三、申請人	姓名（名稱）	1.美商先進免疫醫療股份有限公司 2.英商史密斯克林貝克曼公司
	國籍	1.美國　2.英國
	住、居所（事務所）	1.美國麻薩諸塞州劍橋市席尼街38號 2.英國米德萊賽省班特福市新界
	代表人姓名	1.優娜 S. 雷恩 2.皮・傑・吉汀斯

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 1 ）

發明範圍

本發明有關於新穎糖型式之可溶性補體受體第1型（sCR1），以及用於診斷及治療涉及補體活性之病症以及各種發炎及免疫病症之用途。本發明亦提供生產，偵測，及純化此類糖型之方法。

發明之背景

補體系統

構成約10%正常血清球蛋白，補體系統由許多不同蛋白質組成，這些蛋白質對於外來抗原的免疫系統反應方面具重要性。當補體系統的主要成份成為片段時，系統變活化，這些片段，單獨或與其他蛋白質一起，活化另外的補體蛋白質，造成一連串蛋白質溶解。補體系統之活化導致血管通透性增加，吞噬細胞之趨化性，發炎細胞之活化，外來粒子的調理作用，直接殺死細胞以及組織傷害。補體系統之活化作用可由抗原－抗體複合體（傳統途徑）或例如，由病原菌細胞壁中存在的脂多糖類（另一種途徑）制發。

膜結合的補體受體第1型

補體受體第1型（CR1）存在於紅血球，單核血球／巨噬細胞，顆粒細胞，B細胞，一些T細胞，脾濾泡樹突細胞，及小球足細胞之膜上。CR1與補體組份C3b及C4b結合，亦稱之為C3b／C4b受體。已知CR1之結構組織及其原始次序[克利斯坦（Klickstein）等人，1987, J. Exp. Med. 165:1095-1112，克利斯坦等人，1988，J. Exp. Med. 168:1699-1717]與卡得（Hourcade）等人，1988，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）甲4規格（210×297公釐）

五、發明說明(2)

J. Exp. Med. 168:1255-1270)。它由30個含60-70個胺基酸，短且一致的重複單位(SCRs)組成。各SCR中，保留平均65個胺基酸中之29個。各SCR已透過雙硫連接(雙硫鍵中之第三與第一個，以及第四個與第二個一半胱胺酸)形成一種三方位的參環構造。CR1進一步安排為4個長的均質複單位(LHRs)，各有7個SCRs。前導次序(此前導順序於轉譯後去除)後，CR1分子由大多數含有C4b結合區域的N-末端LHR-A，接下來兩個重複單位，含C3b結合區域的LHR-B及LHR-C，以及大部C-端的LHR-D，後接2個其他的SCRs，一個25殘基的假定的膜區及一個43殘基的細胞質尾端組成。

CR1是特點為此種SCR同種性的蛋白質亞目(superfamily)之一個成員。一些具有C3/C4結合功能的亞目成員包括CR2，C4結合蛋白質，因子H，因子B，及C2，而缺乏此種功能的蛋白質包括介白素-2(interleukin-2)受體，β2-糖蛋白質I，C1r，肝球蛋白α鏈，及因子XIIIb。

已知CR1為一種糖蛋白，推演其胺基酸次序於細胞外區域具有25個供N-連接糖基化作用(胺基酸一致次為NXS或NXT)的可能部位。僅其中6-8個可用部位經報告與寡糖連接(Sim, 1985, Biochem. J. 232:883)。已於坦尼卡黴素(tunicamycin)之存在下產生CR1之非糖基化形式，並顯示減少與iC3之結合[路布林(Lublin)等人，1986，J. Biol. Chem. 261:5736]糖蛋白質之N-端顯然被阻斷。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(3)

至今，已認證出四種不同的CR1 對偶型或倒錯型，其大小不同，以30-50 kDa 增加。人類群中此等倒錯型之基因頻率不同[霍勒(Holer)等人，1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2459-2463]。F (或A) 倒錯型由4 個LHR 組成，分子量約250 kDa ；較大的S (或B) 倒錯型，分子量約290 kDa ，含有一個第5 LHR ，是LHR-B 之5'端一半與LHR-A 之3'端一半之雜體(chimera) ，預測具有第3 個C3b 結合部位[王(Wang)等人，1989, J. Exp. Med. 169:847]。最小的F'(或C) 倒錯型，最可能來自LHR-B 之缺失及一個C3b 結合部位，在患有全身紅斑性狼瘡(SLE)之患者中盛行率增加[凡德因(Van Dyne) 等人，1987, Clin, Exp. Immunol. 68:570；代克門(Dykman)等人，1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1698) 。

可溶補體受體第1 型

已於正常個體及某些SLE 個體中偵測出一種天然發生的CR1 可溶型(雍(Yoon)等人，1985, J. Immunol. 134:3332-3338)。它的特性與紅血球(細胞表面)CR1 結構及功能方面的特性相似。郝卡德(Hourcade)等人，1988, J. Exp. Med. 168:1255-1270亦於人類CR1 轉錄單位中見到另一種聚腺嘌呤化(polyadenylation) 位置，預測會產生CR1 之分泌形式。由此種切短的次序所編碼的mRNA包含CR1 之第一個8.5 SCRs，並編碼一個包括C4b 結合區域的約80 kDa之蛋白質。當對應於此種切短次序的cDNA轉形感染成COS 細胞並表現持，證實C4b 結合活性，但不與C3b

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(4)

結合[克利許(Kuych)等人，1989，FASEB J. 3:A368]。克利許等人亦於數個人類細胞系中見到類似於預測的mRNA，並認為此種具有C4b 結合活性的切短的CR1 可溶形式可於人類中合成。

亦已經由重組DNA 步驟，去除正被表現的DNAs穿膜區域，產生數種可溶CR1 片段[非爾龍(Fearon)等人，Intl. Patent Publ. WO 89/09220, 10/5/89 ；非爾龍等人，Intl. Patent Publ. WO 91/05047, 4/18/91]。此類可溶CR1 片段具功能性，結合C3b 及／或Cb4 ，並依據它們所包含區域顯露因子I 輔因子活性。此種構造在活體外抑制補體活化作用之結果，如嗜中性血球氧化性猝發(burst)，補體中介的溶血，及C3a 與C5a 產生。可溶性構造，sCR1/pBSCR1c，亦於活體外顯露在逆被動亞瑟氏(Arthus)反應方面之活性[非爾龍(Fearon)，1989，1911，前文；葉(Yeh) 等人，1991, J. Immunol. 146:250]，壓制缺血後心肌發炎及壞死[非爾龍等人，前文；魏思曼(Weisman) 等人，Scicene, 1990, 249:146-151]以及移植後增大存活率[布魯特(Pruitt)與百靈吉(Bollinger), 1991, J, Surg. Res 50:350；布魯特等人，1991, Transplantation 52; 868]。此外，載體sCR1/pBSCR1c與對－茴香醯基化的人類纖維蛋白溶酶原－鏈激酶－活性因子複合體(APSAC) 共同調配，造成類似單獨sCR1/pBSCR1c產品的抗溶血活性，顯示補體抑制劑sCR1與一種血栓溶解劑之組合是可行的[前述非爾龍等人

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(5　)

)。

國際專利案公告號碼WO 89/09220, 1989, 10.5 公布，以及WO 91/05047, 1991, 4, 18日公佈，其全文併入本文作參考。

發明總論

本發明有關可溶補體受體1蛋白質(sCR1)之新穎可溶糖型式，及其治療涉及補體活性之病症及各種免疫及發炎病症的用途。

本發明者已發現，在某些生產條件下，可獲得新穎的sCR1糖型式，其具有所需延長血中清除並同時保有具意義功能性之特性。長的功能半衰期使能行簡化的，一次大量的投藥，並提供活體內效力。

本發明者已應用各種純化法解決並增多特定的sCR1，糖型式。因此，本發明提供一種可溶性補體受體1 (sCR1)糖蛋白分子，此種分子含一種或多種複合寡糖構造，其一或多個構造以平均一或多個唾液酸殘基終止。

一項具體實例提供sCR1糖蛋白之製備，其中分子含一或多個寡糖構造，至少其中40%寡糖構造含平均至少一個末端唾液酸殘基。以分子含一或多個寡糖構造，其中至少70%含平均至少一個末端唾液酸殘基較佳。

一項具體實例中，sCR1製劑含sCR1糖蛋白分子，其中主要的糖型式具等電點，pI，少於或等於5.1(由層析調焦測定)，用神經胺酸酶(neuraminidase)處理後pI增加。

另一項體實例中，sCR1製劑含一個sCR1糖蛋白，其中唾

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 6 ）

液酸對甘露糖之莫耳比大於或等於0.25。

依據本發明之sCR1製劑以具有至少25%去糖基sCR1的功能性補體抑制活性較佳。

本發明分子或製劑的較佳具體實例中，sCR1糖蛋白之蛋白質骨架含LHR-A, LHR-B, LHR-C, LHR-D, SCR29 ，及SCR30 區域達到（並包括）穿膜區域的第一個丙胺酸。

本發明亦有關含治療有效量sCR1糖蛋白分子（如上述）及醫藥合用載劑或賦形劑之醫藥組合物。一個具體實例中，醫藥組合物另含治療有效量的血栓溶解劑。

血栓溶解劑以由下列各物中選出較佳：

(a) 纖維蛋白溶酶原活化因子或其突變蛋白質（mutein）；

(b) 茴香醯化的纖維蛋白溶酶原－鏈激酶－活化因子複合體（APSAC）；

(c) 單鏈尿激酶（urokinase）；

(d) 雙鏈尿激酶；

(e) 鏈激酶；

(f) 一種具纖維蛋白溶解活性的雜體蛋白質，其含第一種雙鏈蛋白酶之一鏈，連接於第二個雙鏈蛋白酶之一鏈，該第一或第二蛋白酶至少其中之一具有纖維蛋白溶解性，使該雜體蛋白具有提供纖維蛋白溶解活性必備的觸媒部位，此部位視情況由可去除的阻斷基阻斷；及

(g) 一種活體內受可逆性阻斷的纖維蛋白溶解酶，其中

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）甲4規格（210×297公釐）

五、發明說明（ 7 ）

該酶中纖維蛋白溶解所必須的催化部位受一個基因阻斷，此基因可由水解去除，水解速率使得水解的偽第一因次速率常數其範是10^{-6}秒$^{-1}$至10^{-3}秒$^{-1}$（於等張水溶液中，37℃，pH 7.4）。

本發明亦提供治療由發炎或不適當補體活化引起的病症之方法，此法包含將上述治療有效量sCR1醫藥組合物投藥至需要此種治療的個體。

亦提供治療血栓狀況之方法，包含將有效量sCR1醫藥組合物（或如前述包括血栓溶解劑之醫藥組合物較佳）投藥至需要此種治療的個體。

上述方法中，個體以人類較佳。

本發明另有關製備如前述sCR1糖蛋白或sCR1製劑之方法，包含：

(a) 在其中細胞生長不受營養供應限制以及其中宿主細胞能夠唾液醣基化寡糖鏈的條件下，在培養中的哺乳類宿主細胞中表現編碼sCR1蛋白質骨架的DNA分子；及

(b) 自培養物中分離sCR1糖蛋白。

較佳具體實例中，方法進一步包含下個步驟：

(c) 自步驟(b)所得的物質中分離含唾液酸分子。

上述方法中，較佳的培養條件包括流動床生物反應器，中空纖維生物反應器，滾動瓶培養或攪拌槽生物反應系統，後兩個系統中，具或不具細胞微小載體。

上述細胞培養物之sCR1糖蛋白產物可由親和，大小排除

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）甲4規格（210×297公釐）

五、發明說明(8)

，離子交換及／或疏水性交互作用層析。增多含唾液酸分子以由離子交換軟明膠層析或使用陽離子－或陰離子交換樹脂之HPLC達成較佳，收集較酸性餾份。含唾液酸之分子亦可由色層調焦或外源凝集素層析分離。

哺乳類宿主細胞以能夠表現唾液基轉移酶，其程度足以保證在表現sCR1糖蛋白中有增多的唾液醣基化之寡糖較佳。適當之宿主細胞包括CHO 系，以DUX B11 細胞系較佳。

縮寫與定義

APSAC= 茴香醯基化的纖維蛋白溶酶原－鏈激酶－活化因子複合體

pI= 等電點

HPLC= 高功效液體色層分析

IH50% = 產生抑制50%溶血的濃度

SRBC= 羊紅血球

EIA= 酵素免疫檢測

w/v= 重量對體積比

v/v= 體積對體積比

kDa= 千道爾頓

ELISA= 酵素連接的免疫吸附檢測

gu 葡萄糖單位

SDS-PAGE= 十二基硫酸鈉聚丙烯醯胺膠電泳

糖型式= 糖蛋白物種，如本發明之可溶CR1 糖蛋白，特徵為它們的碳水化合物含量，層析行為，及／或電荷

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(9)

TP10HD= 一種特定的可溶CR1 構造，含LHR-A，LHR-B, LHR-C, LHR-D, SCR29, SCR30區域多至（且包括）穿膜區域的第一個丙胺酸殘基；TP10HD對應於質體pBSCR1c 中CR1 字碼次序[非爾龍(Fearon 等人，Int'l. Patent Publication No. WO 89/09220 (1989, 10, 5)]。

TP10HD-CC= 由培養於流動床灌注生物反應器中的細胞所產生的TP10HD，並如文中所述由合併層析法純化

TP10HD-CCW= TP10HD-CC 之弱陽離子形式，由製備性HPLC陽離子交換層析分離

TP10HD-CCS= TP10HD-CC 之強陽離子形式，由製備性HPLC陽離子交換層析分離

TP10HD-CX= 由培養於中空纖維生物反應器中的細胞所產生之TP10HD，由HPLC陽離子交換層析純化（前述非爾龍等人）

TP10HD-CXD= 用正-聚葡萄糖酶(n-glycanase) 將TP10HD-CX 脫去糖基

圖之簡介

圖1 是於280 nm處一系列吸收描圖，顯示以不同方式純化的TP10HD製劑之分析性HPLC的結果。使用水孔-SCX (Hydropore-SCX) HPLC純化法的一種修飾法證明TP10HD糖型式之存在。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(10)

A圖：由親和性層析純化的TP10HD物質，含多種糖型，主要的糖型式為強陽離子性(即於約125 mM NaCl溶離)。

B圖：由組合層析純化的TP10HD物質含多種糖型；弱陽離子糖型式對強陽離子糖型式之比例，範圍自70:30至80:20。

C圖：由HPLC陽離子交換層析純化的TP10HD僅含強陽離子糖型式。

圖2顯示TP10HD從一個S-西法洛斯柱(S-Sepharose column)，用50-250 mM NaCl梯度之溶離廓圖。顯示對應於池1(Pool 1)與池2(Pool 2)之尖端。流速為2毫升／分鐘。製圖速度為0.25公分／分鐘。敏感度於280 mM處全計量(full scale)為0.2吸收單位。

圖3顯示自圖2之S-西法洛注溶離的SDS-PAGE明膠型態。路徑1：高分子量標準；路徑5及8：S-西法洛斯池1(各為2.4微克)；路徑6與9：S-西法洛斯池2(分別為5.0及6.7微克)。

圖4顯示來自TP10HD-CCW(右圖)及TP10HD-CCS(左圖)之四種寡糖鏈放射電泳圖。底下二圖顯示神經胺酸酶處理後之型態。

圖5是顯示來自TP10HD-CCS(A)及TP10HD-CCW(B)之寡糖鏈大小與相對比例的層析圖。

圖6為來自對TP10HD-CC(上部)及TP10HD-CX(下部)之色層調焦柱之描圖。

較佳具體實例之詳細說明

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(11)

本發明有關可溶性補體受體第1型蛋白質(sCR1)之新穎糖型式及其於診斷或治療涉及補體活性之病症以及各種發炎及免疫病症。

可溶性補體受體第1型(sCR1)於此處定義為含所有30個細胞外SCR領域的人類CR1之可溶型式。

sCR1及其製備法揭述於國際專利公告案WO 89/09220 (1989, 10, 5)及WO 91/05047 (1991, 4, 18)。以將中國蒼鼠卵巢(CHO) DUX B11細胞培養在流動床灌注生物反應器中製備sCR1物質較佳(見WO 91/05047，見前文)。較佳範圍中，可使用CHO細胞系DUX B11潛伏質體pBSCR1c/pTCSgpt, ATCC登記號碼CRL 10052。

本發明之sCR1糖型式以它們的碳水化合物含量，層析圖行為及／或電荷為特點。因此，本發明提供：

(1) sCR1，含有一個由一或多個唾液酸殘基終止的複合寡糖；

(2) sCR1，具有等點點，由層析調焦測得的pI≦5.1，其中經神經胺酸酶處理後pI增加；

(3) sCR1製劑，其中至少40%寡糖含有由一或多個唾液酸殘基終結的複合寡糖；

(4) sCR1製劑，以含寡糖構造較佳，其中至少70%此種結構為唾液酸終止的分子；

(5) sCR1製劑，其中唾液酸對甘露糖之莫耳比≧0.25；及

(6) 較佳的sCR1糖型式及製劑，具有至少25%非糖基

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(12)

化sCR1之官能性抗補體性。

較佳的糖蛋白為含有之寡糖類似於，或等於人類糖蛋白中天然發生的寡糖。具有此種寡糖之sCR1製劑的優點包括投用至人類時成為免疫原的危險較低。

本發明之sCR1糖型式及製劑其特點為其功能性。以具有任何一種或多種與CR1分子有關的活性較佳，包括但不限於：

(1) 結合於單體及／或多體C3b及／或C4b或C4ma；

(2) 預防補體活化的血漿中產生C3a 或C5a ；

(3) 因子I 輔因子活性；

(4) 抑制補體誘發的嗜中性血球氧化猝發；及

(5) 抑制補體中介的溶血。

sCR1糖型式之培養，純化及增多

本發明之sCR1糖型式及製劑可由表現重組sCR1- 編碼DNA 之細胞培養在各種細胞培養條件下產生，培養條件包括但不限於流動床生物反應器，中空纖維生物反應器，滾筒培養或攪拌槽生物反應器系統，最後兩種系統中，具或不具有微載劑。

本發明之sCR1糖型式可由將編碼sCR1或編碼sCR1片段的DNA 表現於哺乳宿主細胞產生。哺乳類宿主細胞以能表現功能性唾液基轉移酶較佳，其造成產生含寡糖鏈之sCR1糖型式，此鏈以具一或多個終端唾液酸殘基較佳。依據本發明之適當宿主細胞包括CHO 系，以DUX B11 細胞系較佳。

選擇細胞培養條件以達到所需程度的唾液基化作用。影

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明（13）

響唾液基化程度的過程參數包括氧與葡萄糖濃度。細胞密度，時間，及貯存狀況如溫度，亦影響唾液基化作用。

每個複合寡糖構造含2或多個唾液酸殘基之sCR1糖型式具有較長的活體內清除率。因此製劑的清除率可由製劑的總唾液基化之程度在寬限中善理。碳水化合物含量對血清（或血漿）清除率的作用與功能活性間之關係不強，但會極少量增加活體外功能性。

於此等培養物中所產生表現的sCR1糖型式可由習用法純化，例如，親和，大小去除，離子交換及／或疏水性交互作用層析（HIC）。可取數種CR1-專一的抗體用於親和性層析[陳吉林（Changelian）等人，1985, J. Immunol. 134: 1851]。

許多母組織可用於製備HIC柱，最廣泛使用的是瓊脂。可使用二氧化矽及有機聚合物。有用的疏水性配位基包括，但不限於，約2至約10個碳原子之烷基，如丁基，丙基，或辛基；或芳基如苯基。供明膠及柱使用的習用HIC產品可購用商品名稱為丁基－西法洛斯（butyl-SEPHAROSE®），苯基－西法洛斯®（phenyl-SEPHAROSE®）CL-4B，辛基－西法洛斯®FF（octyl-SEPHAROSE® FF）；苯基－西法洛斯®（phenyl-SEPHAROSE®）FF [Pharmia KLB AB, Uppsala, Sweden）；托又皮爾（TOYOPEARL）丁基650M [Fractogel TSK Butyl-650)或TSK-GEL 苯基-5PW [Tosoh Corporation, Tokyo, Japan]；烷基瓊脂，其中烷基含2-10個碳原子[Miles-Yeda, Rehovot, Israel]

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）甲4規格（210×297公釐）

五、發明說明(14)

；及貝克邦(Bakerbond) WP-HI 丙基[J. T. Baker, Phillipsburg, NJ]。

亦可利用習用化學製備所需之HIC 柱。見例如，Er-el, Z. 等人，Biochem. Biophys. Res. Comm. 49:383 (1972)；Ulbrich, V.等人，Coll. Czech. Chem. Commun. 9:4566(1964)。特定明膠之選擇可由本技藝中固有技術之一測定。通常，蛋白質與HIG 配位基間交互作用的強度隨烷基配位基鏈長度增加，但具有約4 至約8 個碳原子之配位基適於大部份之分離作用。高鹽濃度有利蛋白質吸附於HIC 柱，但是實際濃度可在某一大範圍內改變，依據蛋白質性質及所選擇特定HIC 配位基而定。通常，使用鹽濃度為硫酸銨約0.75與約2M間，或NaCl約1至4M間。

溶離作用，不論是分步或呈梯度形式，可以由許多方法完成：(a)改變鹽濃度，(b)改變溶劑的極性或(c)加清潔劑。

當與其他蛋白質純化技術併用時以HIC 特別有用。

如本技藝中熟知，作離子交換層析，各種陰離子或陽離子取代基可附著於母組織上以形成陰離子或陽離子載體。陰離子交換取代基包括二乙胺基乙基(DEAE)，四級胺乙基(QAE)及四級胺(Q)基團。陽離子交換取代基包括羧基甲基(CM)，磺基乙基(SE)，磺基丙基(SP)，磷酸根(P)及磺酸根(S)。市售離子交換物質包括：纖維離子交換樹脂如DE23, DE32, DE52, CM-23, CM-32及CM-52 (Whatman Ltd. Maidstone, Kent, UK)；SEPHADEXr- 為基且交連的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(15)

離子交換劑，例如，DEAE-，QAE-，CM-，及SP-SEPHADEX® 及DEAE-，Q-，CM-及S-西法洛斯(SEPHAROSE)® [Pharmacia AB]；DEAE-及CM-衍生的乙二醇-甲基丙烯酸共聚物如托又皮爾迪(TOYOPEARL DEAE)-650S及托又皮爾CM-650S (Toso Haas Co., Philadelphia, PA)。

大小去除或明膠過濾層析是依據分子大小分離。較佳的母組織物質為化學鈍性，堅硬且高度多孔。為作大量處理，在建立整體流速上剛度最重要。以最近發展的明膠較佳，它的剛度增加，例如，西法克爾®(SEPHACRYL®)，勿撮吉爾®(ULTROGEL®)，速皮洛斯®(SUPEROSE®)及托又皮爾(TOYOPEARL) HW系列母組織(Toso Haas)。

由離子交換軟明膠層析或使用陽離子或陰離子交換樹脂之HPLC使本發明所需之sCR1糖型富含含唾液酸之分子，收集其中較酸之餾份。用以分離sCR1糖型之母組織以S-西法洛斯(S-Sepharose)較佳。S-西法洛斯層析步驟可早早於總體蛋白質純化方法中施用。此時，可自其他糖型式分離所需的sCR1糖型式，其餘的純化步驟對此糖型式進行。另外，可於多步驟蛋白質純化步驟結束後進行另一個S-西法洛斯純化步驟，此步驟設計成溶解糖型式，如下文實例V中所舉例說明的。

經由外源凝集素層析或色層調焦亦可選擇特定的sCR1糖型式。

若需要，sCR1糖型式之碳水化合物部份可立即由習用的碳水化合物分析技術分析。因此，例如，如技藝中熟知的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(16)

外源凝集素墨點法，顯示低比例的終端甘露糖或其他糖類如半乳糖。亦可使用無水肼或酵素法以及離子交換或大小排除層析或其他本技藝中已知之方法自蛋白質中釋出糖，以確定由唾液酸終止單-，二-，三-或四觸角狀之寡糖。在認證糖型式的進一步試驗中，在用神經胺酸酶處理以去除唾液酸的前後，測量pI。神經胺酸酶處理後pI之增加顯示糖型式上唾液酸之存在。

CR1 糖型式之製備

本發明sCR1糖型式及製備可用治療或診斷許多補體中介的或與補體有關的疾病症，包括但不限於列於表1 中者。

表 1

涉及補體之疾病及病症

神經病症

多發性硬化

中風

病毒性腦炎癥候簇

創傷性腦受傷

柏金森氏症

不適當或多餘的補體活化作用之病症

溶血性併發症

極急性同種異體移植排斥

異種移植排斥

於IL-2治療期間介白素-2(interleukin-2) 誘發的毒性

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(17)

發炎病症

自動免疫疾病之發炎

孔羅病 (Chron's Disease)

成人呼吸壓迫癥候簇

熱傷害包括燒傷或凍傷

缺血後再灌注病況

心肌梗塞

氣球血管造形術

心肺繞道或腎臟血液透析後之抽唧後 (post-pump) 癥候簇

腎缺血

發炎疾病或敗血症

免疫複合病症及自動免疫病

風濕性心臟病

全身紅斑性狼瘡

SLE 腎炎

增生性腎炎

腎小球腎炎

溶血性貧血

重症肌無力

治療不適當的補體活化作用或發炎所引起之疾病或病之方法中，將治療有效量之sCR1糖型式或製劑投藥至需要此種治療之個體。較佳之個體是人。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(18)

治療疾病或病症之sCR1糖型式之有效量劑量範圍為0.01-100毫克／公斤；以0.1-10毫克／公斤較佳。

為投藥用，sCR1糖型式及製劑應調配成適當的醫藥或治療組合物。此種組合物一般含治療有效量之sCR1糖型式或製劑及醫藥合用賦形劑或載劑如食鹽水，緩衝食鹽水，右旋葡萄糖，或水。組合物亦可含特定安定劑如糖，包括甘露糖及甘露醇，及注射用組合物之局部麻醉劑，包括，例如，利多卡因(lidocaine)。

為抑制補體活化，以及同時提供血栓溶解治療，本發明提供另含治療活性量之血栓溶解劑之組合物。血栓溶解劑有效量劑量範圍0.01-10 毫克／公斤；以0.1-5 毫克／公斤較佳。較佳之血栓溶解劑包括，但不限於，鏈激酶，人類組織型纖維蛋白溶酶原活化劑及尿激酶分子與衍生物，片斷及其軛合物。血栓溶解劑可含一或多鏈，可融合或可逆地連結至其它物劑，形成雜體分子(EP-A-0297882 與EP 155378)，例如，尿激酶連結至纖維蛋白溶酶(EP-A-0152736)，纖維蛋白溶解酶連結至水溶性聚合物(EP-A-0183503)。血栓溶解劑亦可含纖維蛋白溶酶原活化劑之突變蛋白質(muteins)(EP-A-0207589)。較佳具體實施例中，血栓溶解劑可含活體中被可逆性阻斷的纖維蛋白溶解酶，如美國專利第4,285,935 號所揭述。酶以對－茴香醯基－纖維蛋白溶酶原－鏈激酶活化劑複合體最佳，如美國專利第4,808,405 中所揭述，由SmithKline Beecham Pharmaceuticals 上市，商名為EMINASE[例如，

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝 訂 線

五、發明說明（19）

俗名為苗鏈酶（anistreplase），亦稱為APSAC；蒙克（Monk）等人，1987, Drug 34:25-49]。

抑制補體活化或作合併治療用之較佳治療組合物，如上述，含有本發明之新穎sCR1糖型式及製劑，其具備血中清除時間延長並同時保留明顯的功能活性。此種功能半衰期的延長，使產生簡化，大量靜注的投藥，並造就活體內效力。治療組合物中較佳的補體活化抑制劑包括上述sCR1糖型式及製劑，例如：

(1) sCR1糖型式，包含由一或多個唾液酸殘基終止之複合寡糖；

(2) 製劑，具有一個等電點，pI≦5.1，（由色層調焦測定），其中pI對神經胺酸酶之處理敏感；

(3) sCR1製劑，包含複合寡糖，其中至少40%寡糖由一或多個唾液酸殘基終止；或

(4) sCR1製劑，具有唾液酸對甘露糖之莫耳比≧0.25。

治療活性的sCR1糖型式及製劑以應包含至少70%唾液酸終止之分子，且具有至少25%非糖基化sCR1之抗補體活性較佳。另一種較佳的治療活性補體活化抑制劑應包含與人類糖蛋白中天然發生的寡糖類似或相同的寡糖。

本發明個別的或合併的治療組合物，其投藥途徑包括標準途徑，例如，靜脈滴注或大量靜注。活性補體阻斷劑及血栓溶解劑可一起或以任何次序依序投藥。

本發明亦提供治療人類或非人類動物血栓病況（特別是

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）甲4規格（210×297公釐）

五、發明說明(20)

急性心肌梗塞）之方法。此法包含將有效量依據本發明之sCR1糖型式或製劑及有效量血栓溶解劑投用至需要此種治療之人類或動物。

亦提供使用本發明sCR1糖型式或製劑以及血栓溶解劑製造用於人類或動物血栓病況之藥物之用途。此方法及用途可如稍早所述進行（國際專利申請案WO 91/05047，併入此處作參考）。

本發明另提供於人類或非人類動物治療成人呼吸壓迫癥候簇(ARDS)之方法。此法包含將有效量依據本發明之sCR1糖型式或製劑投藥至患者。

本發明亦提供於接受移植之人類或非人類動物延遲極急性同種異體移植排斥或異種移植排斥之方法，即投用有效量依據本發明之sCR1糖型式或製劑。

現概括的揭述本發明，透過參考下列實例，利用舉例說明，更能快速了解，但除非另有說明，無意限制本發明。

實例I

TP10HD製劑之產生及純化

由調理過的組織培養基製得的TP10HD，由親和性層析，HPLC(或非HPLC)陽離子交換層析，以及陽離子交換，疏水性交互作用及大小排除之組合純化。

調理過的組織培養基之來源

A.中空纖維生物反應器

表現sCR1基因產物TP10HD（前文所述菲爾龍等人，1989，1991）的重組CHO DUX B11 細胞利用一種模式

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(21)

IV-L，30000 道爾頓分子量切斷筒[Cell-Pharm Cell Culture System I, CD Medical, Midical, Miami Lales, FL)接種至適當生長培養基[例如CHO-1 完全培養基系統(Ventrex Laboratories, Inc. Poryland, ME)，補充有麩胺酸(GIBCO, Grand Island, NY) 及1-10%胎兒牛血清(HyClone Laboratories, Inc. Logan, UT)] 中之中空纖維生物反應器，並依據製造者指示操作。合成的TP10HD分泌進入生長培養基中，因為其大分子量，約200 kDa ，留在反應筒之細胞成份中。隔1-3 天，取出細胞成份內調理過的培養基，由離心去除污染的細胞及細胞殘屑，將澄清的，調理過的培養基調配入用過即丟的塑膠實驗器內，保存在2-8 ℃直至純化。此種情況下，調理過的培養基含高至500 微克／毫升之TP10HD。

B.滾轉瓶細胞培養基

將表現TP10HD之重組CHO DUX B11 細胞接種至在適當生長培養基[例如自Hams F12與DMEM混合物製得之無血清調配物(JHR Biosciences, Inc., Denver, PA) ，補充有麩胺酸(GIBCO, Grand Island, NY) 及牛血清白蛋白，人類輸血蛋白及牛胰島素(Pentex-Miles Inc., Kankakee, IL, Intergen, Purchase, NY)]中之滾轉瓶內。建立培養後，約3 天，由培養基顏色改變顯示，自粉紅色變成黃色，隨新鮮培養基添加約10毫克膠原微載體(Verax Corporation, Lebanon, NH) 。以3 天間隔，更換一半培養基(約150 毫升)。調整過的培養基過濾去除細胞及細胞

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(22)

殘屑，將澄清的，調理過的培養基調配入用過即丟的塑膠實驗容器內，保存在 -70℃直至純化。此種狀況下，調理過的培養基含約15微克／毫升TP10HD。

C.流動床灌注生物反應器

表現TP10HD之重組CHO DUX B11 細胞接種至在適當培養基[例如自Hams F12與DMEM混合物製得之無血清調配物(JHR Biosciences, Inc., Denver, PA)，補充有麩胺酸(GIBCO, Grand Island, NY)及牛血清白蛋白，人類輸血蛋白及牛胰島素(Pentex-Miles Inc., Kankakee, IL, Intergen, Purchase, NY)]中之流動床灌注生物反應器[系統S200及系統S20000, Verax Corporation, Lebanon, NH]內，生物反應器依據製造者指示操作。約2天間隔，自生物反應器收獲貯存槽中取出所收集經調理過之培養基，過濾去除細胞及細胞殘屑，通過50 kDa或100 kDa分子量切斷超過濾膜(Millipore Corp., Bedford, MA)濃縮10至100倍。將此濃的，經調理過的培養基調配入塑膠瓶內，保存在 -70℃或低於此溫，直至純化。此種狀況下，調理過的培養基含>900微克／毫升TP10HD。

純化設計

A.親和性層析

中空纖維維生物反應器所得調理過的培養基接受使用單株抗體(mAb)親和樹脂之純化作用。單株抗體認證出天生人類CR1之細胞外部份上的表位[張吉林(Changelian) PS 等人，1985, J. Immuno 134:1851, 王(Wong)等人，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(23)

1985, J. Immunol. Methods, 82:303-313]。此mAb依據製造者指示共軛於親和膠-10 (Affigel-10)(BioRad Corporation, Richmond, CA)，產生一種母組織，此母組織能夠自含牛血清污染物之調理過的培養基中分離TP10HD，如先前所述[前文，雍(Yoon)等人]。簡言之，調理過的培養基與親和母組織培養於4℃，隔夜，同時溫和攪混。此混合物倒至層析柱內，用10 Mm Hepes, 0.1 M NaCl pH 7緩衝廣泛清洗，以自母組織去除所有非特定性結合之物質。用20 mM磷酸鈉，0.7 M NaCl, pH 12緩衝液自母組織釋出TP10HD，利用一種市售檢測(BioRad Corporation, Richmond, CA)檢查柱餾份中蛋白質存在與否。收集含蛋白質之餾份，於4℃，對磷酸鹽緩衝食鹽水(pH 7.20-7.4)透析。用TP10HD專一的免疫檢測確定製劑中TP10HD之存在。此步驟產生一種TP10HD製劑，此製劑經4-20%線性梯度SDS-PAGE估計，純度 >90%。

B.組合層析

來自滾瓶培養或流動床灌注生物反應器之調理過的培養基通過一系列層析步驟處理。用1N HCl酸化調理過的培養基，pH降至5.2-5.5。酸化期間，培養基變混濁，接著通過0.45及0.2微米膜過濾使澄清。酸化且澄清的調理過之培養基施用於陽離子交換柱，S-西法洛斯(Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ)，此柱用磷酸鈉，0.02M，氯化鈉，0.06M, pH 5.5緩衝液平衡。施用試樣後，持續用起始緩衝液清洗柱直至其吸收性回復基線止。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(24)

在此種狀況下，所有TP10HD皆結合至樹脂，而大多數來自組織培養基之污染蛋白質保持未結合狀通過柱。用磷酸鈉，0.02M，氯化鈉，0.05M，pH 8.0緩衝液將TP10HD自柱中溶離。含TP10HD貯池之溶離由280 nm處吸收測定。

S-西法洛斯溶離物與硫酸胺混合至終濃度0.8-0.9 M，並施用至疏水性交互作用柱，丁基－西法洛斯(Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ)，此柱用磷酸鈉，0.1 M，硫酸銨，0.9 M，pH 7.0緩衝液平衡。施用試樣後，持續用起始緩衝液清洗柱直至其吸收性回復至基線止。在此種狀況下，所有TP10HD糖型式皆結合至樹脂，而大多數來自組織培養基之污染蛋白質保持未結合狀通過柱。用磷酸鈉，0.1 M, pH 7.0 緩衝液將TP10HD自柱中溶離；將溶離緩衝液中之硫酸銨去除後，TP10HD自樹脂釋出。由280 nm處之吸收監測含池(pool)的TP10HD之溶離。

丁基－西法洛斯溶離物施用至大小排除柱，西法克爾S-300 (Sephacryl S-300) (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ)，此柱用磷酸緩衝食鹽水[0.01 M 磷酸鈉，0.15 M氯化鈉]，pH 7.2-7.4平衡。施用試樣後，由吸收監測TP10HD之溶離。收集恰於柱排除柱體積後溶離之物質，用對TP10HD專一的酵素免疫檢測定純化的TP10HD之量。分成整份貯存於-70℃或低於-70℃。此方案產生一種TP10HD製劑，此製劑經4-20%線性梯度SDS-PAGE估計，純度>90%。

結論

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(25)

表現修飾sCR1 DNA並產生稱為TP10HD之sCR1蛋白質之重組CHO DUX B11 細胞可於實驗室條件下培養，例如，使用中空纖維生物反應器或滾轉瓶，或大量培養狀況，例如，流動床灌注生物反應器，產生含TP10HD之調理過之組織培養基。可用數種方法分離分泌出的重組蛋白。特別是親和層析，陽離子交換HPLC，或離子交換，疏水性交互作用及大小排除層析之組合，以產生純化的製劑。

實例II

TP10HD製劑的分子差異特性之認證

於不同條件下產生並由多重步驟純化之TP10HD製劑包含一個多肽骨架，此多肽骨架，此多肽骨架有不同程度之糖基化。

步驟

當由4-20% SDS-PAGE檢查時，由陽離子交換HPLC及由組合層析所分離出之TP10HD製劑(如實例I所述)，產生不同之分子量。由陽離子交換HPLC製備之物質比由組合層析製備之物質其分子量較低，約30 kDa。當各製劑由正-葡聚糖酶消化時，如製造者所揭述(Genzym Corporation, Boston, MA；見下列實例6)，分子量減低至一個數值，相當於多肽鏈貢獻予TP10HD分子之理論分子量，約200 kDa。

結論

此結果證實在不同細胞培養條件下產生且由多種純化策略分離的TP10HD分子係由不同程度糖基化之類似多肽鏈組

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(26)

成，造成分子量上可見上之差異。此作為第一個指示：存在具有不同碳水化合物組成之TP10HD糖型式。

實例III

TP10HD糖型式存在之其它證明

HPLC分析顯示，在數種不同條件組之一，包括(a)中空纖維生物反應器中；(b)含微載體之滾動瓶中；或(c)流動床灌注生物反應器，調理的細胞培養基所產生，並由陽離子交換，疏水性交互作用及大小排除層析之組合，或由親和性層析純化時，TP10HD由糖型混合物組成。

分析法

由數種不同方式純化之TP10HD試樣相對磷酸鈉，20 mM，氯化鈉，30 mM，pH 7.0緩衝液透析，通過0.2微米膜過濾。一種水孔-SCX(Hydropore-SCX) HPLC柱，10 x 100毫米(Rainin Istrument Company, Emeryville, CA)，用相同的緩衝液平衡，試樣以2毫升／分鐘施用，柱持續用起始緩衝液清洗直至吸收回復至基線止。緩衝液中NaCl濃度增加至50 mM，呈弱陽離子性糖型式之TP10HD自樹脂中溶離。吸收回復基線後，用線性NaCl梯度，50至250 mM溶離高度陽離子性糖型式。結果示於圖1中。

在此種施用條件下，所有TP10HD糖型式皆結合於樹脂。直接通過柱而未被吸附之物質顯示為一種非蛋白質，非-TP10HD之污染物，根據下列準則，最可能是細胞DNA：(a)其吸收紫外線光譜處之光；(b)在偵測蛋白質之化學檢測中不

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(27)

具反應性；(c)其與一種使SDS-PAGE上物質成為可見的蛋白質專一性染點不反應；及(d)於TP10HD-專一性免疫檢測中不具反應性。

施用後，緩衝液中之NaCl濃度增加至50 mM，定為弱陽離子性之TP10HD分子自樹脂中溶離。所有呈弱陽離子糖型式溶離之物質在一種特定免疫檢測中認證為TP10HD。最後，以線性方式增加NaCl濃度，將結合較緊密之蛋白質溶離。在NaCl濃度~125 mM，定為強陽離子糖型式之TP10HD分子溶離出(圖1)。所有呈強陽離子型式溶離之物質在一種特定免疫檢測中認證為TP10HD。

由親和層析純化TP10HD

由親和層析純化之TP10HD物質，當由HPLC陽離子交換步驟分析時，含多重糖型式。示於圖1A中之吸收軌跡證實主要的糖型為強陽離子性(即，於約125 mM NaCl溶離)。

由組合層析純化TP10HD

當由HPLC陽離子交換步驟分析時，得自流動床灌注生物反應器之物質顯示含多重TP10HD糖型式。弱陽離子糖型式對強陽離子糖型式之比例範圍自70:30至80:20(圖1B)。得自滾動瓶培養基之物質亦顯示含多種TP10HD糖型式，其弱陽離子糖型式對強陽離子糖型式之比例為76:24。

由離子交換層析純化TP10HD

本物質顯示僅含TP10HD強陽離子型式(圖1C)。如先前揭述(國際專利公告案WO89/09220及WO91/05047；魏斯曼(Weisman) HF等人，1990。Science 249:146；葉(Yeh)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 28 ）

CG等人，1991，J. Immunol 146:250），以本法分離之物質，證實有活體外及活體內人類sCR1蛋白質之功能特性。

結論

此結果證實可由陽離子交換層析區分的多重TP10HD型式存在於得自流動床灌注生物反應器，滾桶瓶培養物以及中空纖維生物反應器之調理過培養基中，唯不同來源介質中不同糖型式之比例明顯不同。

實例IV

弱及強陽離子性糖型式之純化製劑的分離

弱及強陽離子性糖型式由HPLC製備。

方法

在21.4毫米 x 100毫米磺基丙基取代之離子交換樹脂柱[水孔-SCX (Hydropore-SCX) Rainin Istrument Company, Emeryville, CA]上進行製備性HPLC。此柱經20 mM 磷酸鈉，30 mM NaCl, pH 7.0緩衝液平衡。由上述組合層析純化的TP10HD試樣，在使用前對相同緩衝液透析。施用試樣後，持續柱的展延，一般是20分鐘，使用相同緩衝液，以自樹脂清洗非特定性結合之蛋白質。緩衝液改換成20 mM 磷酸鈉，50 mM NaCl pH 7.0，繼續展延，一般再20分鐘，直至所有弱陽離子性糖型自柱中溶離為止。最後，用一種線性，50-250 mM NaCl梯度（20 mM磷酸鈉，pH 7.0）完成展延。一般用~125 mM NaCl將強陽離子糖型式自柱中溶離。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）甲4規格（210×297公釐）

五、發明說明(29)

結果

一般製劑中，將125毫升試樣(含100毫克TP10HD)施用至柱。如指示收集對應於弱(TP10HD-CCW)及強(TP10HD-CCS)陽離子糖型式之餾份，用TP10HD專一免疫檢測測定TP10HD之量。

結論

分離足量多重TP10HD之糖型式以能作活體外及活體內的功能研究及詳細的生化分析。

實例V

TP10HD純化後由使用S-西法洛斯之陽離子交換層析溶解TP10HD

上述HPLC陽離子交換純化方案將TP10HD之糖型式溶解成兩個餾份(見，例如，圖1B)，一個尖鋒稱為"尖峰2"(糖基化較深之物質)，為左邊數來第2尖鋒，"尖鋒3"(糖基化較淺物質)，是最右邊的尖鋒。最初方案使用一種HPLC陽離子交換柱，水孔-SCX (Hydropore-SCX)，購自Rainin Instrument。觀察一段長時間後見到，層析步驟之結果變得易變。此不定性歸因於HPLC柱在其使用及貯存條件下可用期受限制。

本發明人因此尋求另一種純化法溶解sCR1糖型式，此法較能於一段時間後可恆定的再製。不評估取自各種其它供應商之HPLC柱，而選擇S-西法洛斯快速流動樹脂(S-Sepharose Fast Flow resin)(Pharmacia)作試驗。選擇此樹脂主要是因S-西法洛斯柱上之官能基與水孔-SCX

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(30)

(Hydropore-SCX) 上之官能基相同。此等樹脂間之唯一差異是於載體母組織上：瓊脂(S-西法洛斯)相對於以親水聚合物層覆蓋的矽石基填料(SCX)。

用填裝大小為2.5 x 1.8 公分之S-西法洛斯，以及一個連線UA-6 UV 監測器(Isco)製備2.5 公分空特－弗雷斯(Kontes-Flex) 柱。

本研究所試驗之TP10HD物質係使用流動床灌注生物反應器(Verax System S200；見上述) 產生，其蛋白質濃度為5.5 毫克／毫升。由濃縮的調理過的細胞培養基獲得之TP10HD，在本研究之前，已先接受一系列純化步驟[見美國專利申請案，蓋爾符蘭納－瓦塞門(Gail Folena-Wasserman 等人，"Protein Purification", 1992, 3, 24歸檔，序號07/857022 ，其全文併入此處作參考)。

首先，粗培養基接受S-西法洛斯上之陽離子交換層析，用20 mM 磷酸鈉，500 mM NaCl ，pH 7.0溶離。溶離的蛋白質經用硫酸銨析出，再溶解，吸附至一個疏水性交互作用層析載體上，此載體為一種丁基－托又皮爾(butyl-TOYOPEARL)柱，此柱經過0.8 M $(NH_4)_2SO_4$ 之100 mM磷酸鈉溶液平衡。所需之物質用0.7 M $(NH_4)_2SO_4$ 之100 mM磷酸鈉溶液，pH 7.0溶離。溶離物吸附至陰離子交換載體迪－托又皮爾(DEAE-TOYOPEARL)，溶離，接受第二次陽離子交換層析步驟，此步驟使用托又皮爾(TOYOPEARL) CM 650S 作為載體。用5 個柱體積線性梯度的0-250 mM NaCl 之50 mM MES/MES.Na溶液，pH 5.5溶離，用1/10體

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(31)

積0.5 M 二元磷酸鈉中和。然後托又皮爾CM (TOYOPEARL CM) 產物於托又皮爾HW65S (TOYOPEARL HW65S) 柱上接受大小排除層析，此柱先經10 mM 磷酸鈉，0.9 % w/v NaCl，pH 7平衡。收集所有產物尖鋒，濃縮貯存。現在TP10HD準備作本研究中之試驗。

使用下列緩衝液作S-西法洛斯分餾：平衡與清洗緩衝液-20 mM磷酸鈉，30 mM NaCl，pH 5.2；第2 清洗緩衝液及緩衝液A-20 mM 磷酸鈉，50 mM NaCl，pH 7.0；緩衝液B-20 mM 磷酸鈉，250 mM NaCl，pH 7.0。

1.5 毫升純化的TP10HD之試樣(8.25毫克蛋白質)施用至預先平衡成pH 5.2之S-西法洛斯柱。然後清洗柱直至流出物得到基線讀值(A_{280})止。此柱然後用2.5 底體積之清洗緩衝液2 清洗。施用緩衝液A 之線性梯度（10底體積）與緩衝液B (50至250 mM NaCl) 。根據UV吸收性收集TP10HD。各餾份之蛋白質濃度由使用消光係數之A280對等於10cm^{-1}之1 %溶液E (1 %／280) 測定。

結果

結果示於圖2 與3 中。圖2 中所示之小尖鋒，定名為池1 (Pool 1)，對應於圖1B之"尖鋒2"，代表所施用試樣之2 %。圖2 中所示之主尖鋒，定名為池2 (Pool 2)，對應於圖1B之"尖鋒3"，代表所施用試樣之約89%。

於上述兩種池(pool)上完成SDS PAGE。結果示於圖 3中。當於SDS-PAGE時，池1 中之物質比池2 之物質有較大分子量。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(32)

結論

根據上述結果結論出，非HPLC陽離子交換樹脂層析法，使用S-西法洛斯，是可再生性分離TP10HD主要糖型式餾份之有用方法，且優於上述HPLC SCX柱法。此純化步驟可於TP10HD自經調理培養基多步驟純化後完成。另外，多步驟純化法中最初的S-西法洛斯步驟可用以分離不同糖型式，且可獨立完成此等糖型式之另外的純化作用。

實例VI

sCR1糖型式之藥動研究

測定不同糖型式製劑之血漿藥動半衰期及／或清除率。弱陽離子糖型式與強陽離子糖型式比較，前者血半衰期增加及／或總清除率較低，兩種糖型式皆比經酶去糖基的糖型式製劑產生明顯較大的血中半衰期及／或較低的總清除率。

材料及方法

A.研究材料之來源

見上述對各種TP10HD製劑(TP10HD-CX, TP10HD-CC, TP10HD-CCW, TP10HD-CCS，及TP10HD-CXD) 作定義之定義段。試驗材料如實例1 中所述純化。

B.藥動研究

下表2 中列出9 種不同之藥動研究。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(33)

表 2

研究#	物 質	動物種
1	TP10HD-CX	老鼠
2	TP10HD-CX	兔子
3	TP10HD-CC	豬
4	TP10HD-CC	老鼠
5	TP10HD-CCW	老鼠
6	TP10HD-CCW	兔子
7	TP10HD-CCS	老鼠
8	TP10HD-CCS	兔子
9	TP10HD-CXD	老鼠

C.研究材料之碘化

研究1,2,4,5,7及9中，由氯胺-T(chloramine-T)步驟進行碘化作用。將磷酸鈉緩衝液，0.5 M，pH 7.6，50微升，加至提供的1 mCi Na-^{125}I (New England Nuclear, Boston, MA)內。加TP10HD試樣，一般是100微克於100微升（研究5=69微克；研究7=34微克；研究9=91微克）內，接著加50微升15毫升新鮮製得之氯胺-T溶液。反應混合物劇列振搖60秒。將偏貳亞硫酸鈉（50微升，15毫克／毫升）及碘化鈉(100微升，10毫克／毫升)連續滴量至反應小瓶內。反應混合物通至PD10柱上(Pharmacia Fine

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明（34）

Chemicals, Piscatoway NJ)，此柱先用含0.1％牛血清白蛋白(Sigma Chemical Company , St. Louis, MO) 之磷酸鹽緩衝食鹽水(pH 7.2-7.4)平衡。收集10個0.5 毫升餾份，與100 微升0.1 ％牛血清蛋白溶液及1 毫升20％三氯乙酸合併後直接計數2 微升整份。於0 ℃培養1 小時後，1000 X g離心10分鐘，收集與放射活性有關的酸可析出蛋白質，由閃爍計數定量。收集含酸析出物中總放射活性>90％之餾份作另外之用途。

研究6 與8 中，由生碘(iodogen) 法完成碘化[富類克(Fraker)等人，1978，Biochem Biophys Res Commun 80:849]；^{125}I 取代作用之平均程度，研究6 為0.56原子／蛋白質分子，造成特定活性22.7 kBq／毫克，^{125}I取代作用之平均程度，研究8 為0.76原子／蛋白質分子，造成特定活性29.5 kBq／毫克。

D.劑量溶液之製劑

研究1 ：放射碘化的TP10HD-CX 與未標記的TP10HD-CX 混合物產生適於投用含16-25 x 10^6 cpm 放射標記的TP10HD-CX 之1 毫克／公斤總TP10HD劑量之劑量溶液。

研究2 ：放射碘化的TP10HD-CX ，~5％ w/w ，與純化的TP10HD-CX 混合以產生含1 毫克／毫升TP10HD-CX 於0.1 M Hepes, 0.15 M NaCl, pH 7.4緩衝液之劑量溶液。

研究3 ：TP10HD-CC 以成為終劑量1 毫克／公斤投用。

研究4 ：放射碘化的TP10HD-CC 與純化未標記的TP10HD-CC 混合，產生適於投用含~20 X 10^6 cpm 之1 毫

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(35)

克／公斤或3 毫克／公斤的總TP10HD劑量之劑量溶液。

研究5 ：放射碘化的TP10HD-CCW與純化未標記的TP10HD-CCW混合，產生適於投用~20 X 10^6 cpm 之1 毫克／公斤的總TP10HD劑量之劑量溶液。

研究6 與8 ：如研究2 中所述，但添加放射標記的TP10HD-CCW至~1 % w/w。

研究7 ：放射碘化的TP10HD-CCS與純化未標記的TP10HD-CCS混合，產生適於投用含~20 X 10^6 cpm 之1 毫克／公斤總TP10HD劑量之劑量溶液。

研究9 ：放射碘化的TP10HD-CXD與純化未標記的TP10HD-CXD混合，產生適於投用含~20 X 10^6 cpm 之1 毫克／公斤總TP10HD劑量之劑量溶液。

E.方案

研究1,4,5,7 與9 中試驗物質由靜脈注射(iv)進入四隻司布格－道威(Sprague-Dawley)鼠(2 雄，2 雌)。於注射後1, 3, 5,10,20,30,45與60 分鐘，自眼眶後靜脈叢採血樣，測定放射活性。其它的注射後血樣是於注射後2,3,4小時(研究4)與120 分鐘(研究5)採樣。保留剩餘的血漿餾份作進一步之分析。

測量下列事項以分析血漿試樣之殘餘試驗物質：

(1) 總殘餘放射活性；

(2) 由TCA 析出的放射標記物質之百分比；

(3) 在SDS 之存在下的殘餘的酸可析出物之放射活性；及

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(36)

(4) 於酵素免疫檢測中可如TP10HD免疫認證之物質。

放射同位素數據定量為總cpm/毫升血液或血漿以及理論上零時間數值之百分比。藥動半衰期從放射度量數據計算。

研究2中，試驗物質經iv注射進入兩組各5隻雄性荷蘭兔(約1公斤)內，劑量1毫克／毫升。恰於給藥前，及於5, 10, 20, 45, 60, 120 180分鐘時自耳動脈採血樣，與肝素混合（終濃度25微克／毫升）。於一個整份中由閃爍計數測定放射活性，於2000 X g離心5分鐘所得之血漿貯存於-40℃。

由活體外功能檢測，人類補體抑制包被羊紅血球(SRBC)之抗體溶血作用，以分析血漿試樣中殘餘試驗物質。從殘餘功能活性之標記值計算藥動半衰期。

研究3中，試驗物質由iv注射，通過頭靜脈管進入體重範圍4.5-6.1公斤之小豬體內。經由預先植入的靜脈管採血放入含肝素鋰(終濃度為15單位／毫升)之針管內。於零時間時採輸注前試樣10毫升，於5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300, 360分鐘及24小時採輸注後試樣。抗凝血血樣於-300 rpm, 4 ℃，離心5分鐘，將含少量血板之血漿分成整份，貯存於-70℃或低於-70℃。

由上述活體外功能檢測分析血漿試樣中殘餘試驗物質，使用豬而非人類補體。從殘餘功能活性之標記值計算藥動半衰期。

研究6與8中，試驗物經iv注射進入一組5隻荷蘭兔(

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明（37）

約1公斤）內，劑量為1毫克／毫升。恰於給藥前，及於5，10，20，45，60，120及180分鐘時自耳動脈採血樣1毫升，與肝素混合，用三氯乙酸析出後，於一個整份中由閃爍計數測定放射活性。

由一種TP10HD專用的酵素免疫檢測（EIA）分析血樣中殘餘試驗物質。從放射度量及免疫檢測數據計算藥動半衰期。

F.葡聚糖酶處理

研究9中，由正－聚葡萄糖酶消化作用去除N-連結之寡糖鏈，依據製造者指示完成（Genzyme Corportaion, Biston, NA）。通常，58微克TP10HD-CX與10.5單位正－聚葡萄糖酶於37℃，0.2M磷酸鈉，pH 8.6緩衝液中培養18小時。

G.酸析出作用

如下進行三氯乙酸析出作用：依序添加450微升0.13 M Tris HCl，4％ SDS，10％甘油，pH 6.8之緩衝液，接著30微升胎兒牛血清及500微升20％三氯乙酸析出血漿（20微升）。各次添加後，試管劇烈混合，於4℃培養72小時；於1000 x g離心10分鐘收集可析出蛋白質之小丸，取出上清液並丟棄，由閃爍計數測量殘餘的放射活性。

H.酵素免疫檢測

利用一種市售檢測（Cellfree® CD35, T Cell Diagnostics, Icn. Cambridge, MA）。簡言之，用多株兔子抗-TP10HD抗體塗裝之聚苯乙烯小珠與稀釋試樣及獐菜

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）甲4規格（210×297公釐）

五、發明說明(38)

過氧化酶－共軛的多株兔子抗－TP10HD抗體同時培養。培養後，自反應混合物中移走小株，洗去未特定結合之物質，接著在存在適當稀釋受質條件下培養。添加硫酸終止顏色開展，測定吸收性(光密度)作為TP10HD濃度之評量。

I.溶血檢測

兔子血漿試樣，在甲基胺(12.5 mM)之存在下，於56℃，加熱1小時以胺基化硫基酯基因並使內生的補體成份C3與C4失去活性。此步驟排除試樣中內生性兔補體活性而未明顯影響TP10HD活性。試樣然後用0.1 Hepes, 0.15 M NaCl, pH 7.4緩衝液稀釋成1:50，並檢測。

用兔子抗SRBC抗體(Diamedix, Miami, FL)展現之SRBC，於一個V-底微滴定小井(Costar, Cambridge, MA)中，與適當稀釋度之試驗血漿及一份作為補體來源之稀釋的人類血漿混合。於37℃，培養1小時後，離心，將未溶解的紅血球作成小丸，將上清液轉送至對應平底微滴定小井(Costar, Cambridge)內，測量於415 nm處之吸收。試驗化合物存在下吸收之減少，作為測量抑制補體中介的，塗裝SRBC抗體的溶解作用。可以使用已知量TP10HD的標準曲線校準檢測，故結果可表示為相對於時間留於血漿中之毫克／毫升TP10HD。

研究3 溶血檢測

滴注TP10HD-CC前，自每一隻豬隻收集血漿作為試樣稀釋物及補體來源以供溶血檢測使用。用0.1 M Hepes, 0.15 M NaCl, pH 7.4緩衝液稀釋成最小1:50。為得更大

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(39)

稀釋度，試樣用滴注前的血漿稀釋（此血漿已用相同緩衝液稀釋1:50），由此保持終血漿濃度於1:50。於此稀釋度，溶血程度等於如上述使用人類補體之溶血。其它之處置方式如上述。可以使用已知量TP10HD的標準曲線校準檢測，故結果可表示為相對於時間留於血漿中之微克／毫升TP10HD。

結果

藥動研究之結果示於表3-7中。研究1,4,5,7,及9，分別於老鼠中測定^{125}I-TP10HD-CX，^{125}I-TP10HD-CC，^{125}I-TP10HD-CCW，^{125}I-TP10HD-CCS，及^{125}I-TP10HD-CXD血中清除率。自各老鼠眼眶後靜脈叢收集全血(~300微升)。各時間點取雙份100微升試樣計數，由各組平均，正常化成cmp/毫升。來自各時間點之試樣，在SDS之存在下，用TCA沉澱，計數，各組平均，正常化成cpm/毫升。由^{125}I-標記物質之總TCA可析出計數及由EIA測定清除率。結果示於表3中，各研究顯示兩期清除模式，短的α期半衰期及較長的β期半衰期。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明（40）

表　3

兩期清除輪廓圖

研究#	動物種	物質	α期（分鐘）	β期（分鐘）
1	老鼠	TP10HD-CX	4.3	167
2	兔子	TP10HD-CX	9-11	
3	豬	TP10HD-CC	8.3	360
4	老鼠	TP10HD-CC		
		（1毫克/公斤）	9.2	181.1
		（3毫克/公斤）	9.8	267.1
5	老鼠	TP10HD-CCW	12.21	100
6	兔子	TP10HD-CCW	8	216
7	老鼠	TP10HD-CCS	6.64	133
8	兔子	TP10HD-CCS	6	216
9	老鼠	TP10HD-CXD	<1	6.1

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）甲4規格（210×297公釐）

五、發明說明(41)

表 4

TP10HD-CX於兔子中之血中藥物動力(研究2)

測量	單位	第1組	第2組
血中半衰期	分鐘	9.1±1.4	11.1±1.2
分佈體積	毫升/公斤	67.0±19.0	44.6±3.7
尖鋒(t=0)濃度	微克/毫升	16.5±2.4	23.7±1.7
總清除率	毫升/分鐘/公斤	5.8±1.2	2.9±0.1

表 5

TP10HD-CC於豬體之血中藥物動力(研究3)

測量	單位	平均值(8隻動物)
血中半衰期，α-期	分鐘	8.3
血中半衰期，β-期	分鐘	363
分佈體積 α-期	毫升/公斤	36
分佈體積 β-期	毫升/公斤	73
尖鋒(t=0)濃度	微克/毫升	29.3
總清除率	毫升/分鐘/公斤	0.24

給藥後24小時採的血樣，得到之TP10HD-CC濃度與控組濃度無法區分。將各豬之數據配成二至三個區格模式，得到清除率，區格體積，速率常數及半衰期之藥動參數。統

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(42)

計分析顯示，對某些豬，三區隔模式更適合，而對其它豬隻，二區格模式較佳；為避免所有豬隻之複雜性數據，使用二區格模式處理豬隻。發現平均半衰期在α- 期為8.3小時，而β- 期為6 小時。此二期分別代表某劑量之69%與31%，使約三分之一劑量緩慢清除。

本研究證實TP10HD-CC 製劑顯示一種顯著的兩期清除模式，其中β-期比α-期慢很多。此等結果符合糖型式群之差異清除率，有些種類極慢去除。

研究6 之結果總結於下表6 中。

表 6

TP10HD-CCW於兔子中之血中藥物動力(研究6)

測量	單位	放射計量數據	免疫檢測數據
血中半衰期，α-期	分鐘	7.8± 0.5	14
%清除的劑量，α-期		30.9± 1.5	30
血中半衰期，β-期	分鐘	216.6± 18.8	376
%清除的劑量，β-期		69.1± 1.9	70
分佈體積 α-期	毫升/公斤	56.2± 1.0	
分佈體積 β-期	毫升/公斤	22.6± 1.9	
尖鋒(t=0)濃度	微克/毫升	17.8± 0.3	
總清除率	毫升/分鐘/公斤	0.26± 0.02	0.1

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明（43）

由放射度量分析測定之TP10HD-CCW之藥動半衰期，α-期約8分鐘，β-期約216分鐘。在快速之α-期期間清除約30%總劑量，在較長之β-期期間清除約70%總劑量。此糖型式之總清除率為0.26毫升／分鐘／公斤，β-期之區格體積為23毫升／公斤。

研究8之結果總結於下表7中。

表 7

TP10HD-CCS於兔子之血中藥物動力（研究8）

測量	單位	放射計量數據	免疫檢測數據
血中半衰期，α-期	分鐘	6.0± 0.4	10
%清除的劑量，α-期		74.5± 1.4	73
血中半衰期，β-期	分鐘	216.6± 36.8	76
%清除的劑量，β-期		25.5± 1.5	27
分佈體積 α-期	毫升/公斤	69.8± 4.8	
分佈體積 β-期	毫升/公斤	162.0± 13.9	
尖鋒（t=0）濃度	微克/毫升	14.6± 1.0	
總清除率	毫升/分鐘/公斤	0.85± 0.12	1.24

由放射度量分析測定TP10HD-CCS之藥動半衰期，α-期約6分鐘，β-期約216分鐘。在快速之α-期期間清除

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）甲4規格（210×297公釐）

五、發明說明（44）

約75%總劑量，在較長之β-期期間清除約25%總劑量。此糖型式之總清除率為0.85毫升／分鐘／公斤，β-期之區格體積為~162毫升／公斤。

研究9中，由放射度量分析測定TP10HD-CXD之藥動半衰期，α-期約<1分鐘，β-期約6.1分鐘。

結論

上述結果證實純化的TP10HD製劑含清除率不同之糖型式。此種差異乃因於糖基化不同之結論符合下列結果：

(1) 純化的TP10HD製劑之去糖基作用產生一種平常分子量分子，證明所有TP10HD製劑之多肽鏈相等；

(2) 脫除糖基的TP10HD快速被清除；及

(3) 特徵為因糖基化增加而分子量較大之TP10HD製劑（例如TP10HD製劑CC與CCW），證實比特徵為因糖基化較低而分子量較小之製劑（例如製劑CX與CCS）血中半衰期較長及／或總清除率較低。

比較研究6與8結果顯示TP10HD-CCW與TP10HD-CCS製劑間之主要差異不在特徵為兩期清除作用之半衰期，但在緩慢被清除物質之比例（在TP10HD-CCW中比例較高）。

如下所示，詳細的碳水化合物分析說明TP10HD糖型式間之差異是因於糖基化之程度，寡糖鏈之組成，末端寡糖碳水化合物殘基之相同性。

實例VII

測定TP10HD多重糖型式之終端寡糖殘基

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(45)

TP10HD糖型式終端寡糖殘基之測定，證實弱陽離子糖型式之唾液基化程度較高。

方法

評估TP10HD製劑之終端碳水化合物構造。各製劑試樣，1微克，使用市售多-布洛特(Dot-Blot)(Bio-Rad, Richarmond, CA)裝置固定於硝基纖維素之上。依據製造者指示使用市售聚葡萄糖區分套組(Glycan Differential Kit)，認證糖蛋白上之寡糖殘基(Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN)。此套組含五種洋地黃素-外源凝集素(digoxigenin-lectin)探子：Galanthus nivalis 凝集素(GNA)；Sambucus nigra 凝集素(SNA)；Maackia amurensis凝集素(MAA)；花生凝集素(PNA)；及Datura stramonium 凝集素(DSA)。

簡言之，用生洋地黃素-外源凝集素(digoxigenin-lectin)複合物探測各TP10HD製劑之雙重試樣；改變外源凝集素，探子之專一性改變成允許偵測多種碳水化合物殘基。結合後，由鹼性磷酸酶軛合的羊抗生洋地黃素Fab'試劑檢測生洋地黃素表位觀察探子；添加受質後5分鐘內發生顏色展開。

結果總結於表8中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 46 ）

表 8

TP10HD多重糖型式之終端寡糖殘基

	LECTIN				
	GNA	SNA	DSA	MAA	PNA
碳水化合物	終端	NeuAc	Gal	NauAc	Gal
專一性	Man	α (2-6)	β (1-4)	α (2-3)	β (1-3)
		Gal	GlcNAc	Gal	GlcNac
TP10HD-CX	+	-	-	-	-
TP10HD-CC	-	-	+	+	-
TP10HD-CXD	-	-	-	-	-
TP10HD-CCW	-	-	±	+	-
TP10HD-CCS	+	-	±	±	-

縮寫：Gal，半乳糖；Man，甘露糖；GlcNAc，N-乙醯基葡糖胺；NeuAc，5-N-乙醯基神經胺糖酸＝唾液酸

TP10HD-CX 僅與GNA 外源凝集素反應，顯示此製劑產生終端甘露糖殘基。TP10HD-CXD，如預期，與所有探子皆未反應，顯示N-聚葡萄糖酶處理已去除寡糖鏈。

TP10HD-CCW與MAA 強力反應，但與DSA 微弱反應，顯示終端唾液酸 α (2,3) 半乳糖以及半乳糖 β (1,4) N-乙醯基葡糖胺構造。TP10HD-CCS與GNA 強力反應，顯示終端甘露糖殘基佔大多數，支持與TP10HD-CCW交叉污染之說法。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(47)

結論

此等結果證實純化的TP10HD展現不同寡糖構造，具有弱陽離子糖型式，TP10HD-CCW，特徵為終端唾液酸殘基及強陽離子糖型式，TP10HD-CX 及TP10HD-CCS，特徵為終端甘露糖殘基。此等發現支持終端唾液酸殘基之存在造成血中清除率較慢或終端甘露糖殘基之存在造成TP10HD與細胞碳水化合物受體組合程度較高，導致較快速血漿清除率。

實例VIII

測定TP10HD寡糖碳水化合物組成及構造

TP10HD之寡糖碳水化合物組成及構造（如上述實例II中製備）之測定，顯示，較強陽離子TP10HD糖型式之唾液酸含量比弱陽離子糖型式低。快速血漿清除率與寡糖鏈上很少或無唾液酸以及（推斷）蛋白質對甘露糖或半乳糖受體的接近性有關。慢速血漿清除與一或多個終端唾液酸殘基有關。

TP10HD糖型式之單糖組成

A.試驗物質之來源

如上述實例I 與V 中所述分離TP10HD，並溶解成弱陽離子糖型式，TP10HD-CCW，及強陽離子糖型式，TP10HD-CCS。

B.方法

使用下列步驟完成分析：

1. 試樣（約270-280毫克）對去離子水透析，以去除所有緩衝液鹽，接著凍乾。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(48)

2. 用無水肼釋出完整的寡糖鏈。

3. 用無水甲醇HCl 處理完整寡糖鏈，放出呈O-甲基衍生物之個別單糖。

4. N-乙醯化任何一級胺基基團。

5. 衍生化得到過-O-三甲基矽烷基甲基糖苷。

6. 由CP-SIL8柱上毛細GLC(氣體－液體層析)分離此等衍生物。

7. 由GLC 的滯留時間及質譜，與已知標準比較，認證出個別糖苷。

8. 由FID ，用內在標準(13-O-甲基-D-葡萄糖)定量個別衍生物。

C.結果

兩種糖型式中各單糖之相對莫耳含量示於下表9 中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明（49）

表 9

兩種TP10HD糖型式中各單糖之相對莫耳含量

單糖	TP10HD-CCS	TP10HD-CCW
巖藻糖	1.0*	1.0
半乳糖	3.0	3.4
甘露糖	5.4	4.1
N-乙醯基葡萄糖胺	8.2	7.5
唾液酸	0.9	1.3
葡萄糖	ND	ND
N-乙醯基半乳糖胺	ND	ND
木糖	ND	ND

* 數值以相對於巖藻糖（=1.0）展現。ND＝未偵測得。

D. 與TP10HD-CC比較

為對單糖組成中之任何差異定出特性（此差異可能存在於如前述中空纖維生物反應器中所生之TP10HD（TP10HD-CX），經分餾的糖型式TP10HD-CCW與TP10HD-CCS，流動床生物反應器中產生的未經分餾之物質（TP10HD-CC）間］使用另一種方法比較多批次此等物質。

中性及胺基糖由高功效陰離子交換層析合併脈動電流偵測（HPAE-PAD Carbohydrate System, Dionex Corp.）測定。於100 ℃，20%（v/v）三氟乙酸中水解6小時釋出糖。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）甲4規格（210×297公釐）

五、發明說明(50)

水解物由凍乾或用加速-Vac(Speed-Vac) (Savant Instruments)乾燥。殘餘物溶於1 %乙酸鈉三水合物溶液中，並於HPLC-AS6柱上如安幕勒(Anmula)等人分析，(Anal. Biochem. 195:269-280 (1991))。試樣分析四次。

由堯(Yao)等人之直接比色法(Anal Biochem. 179:332-335 (1989))，在三份試樣分別測定唾液酸。

結果示於下表10中。

表 10

TP10HD各批次及糖型式中各單糖之相對莫耳含量

批次號：	TP10HD-CX R	TP10HD-CX V	TP10HD-CCS	TP10HD-CC G020	TP10HD-CC KOO2	TP10HD-CC H115	TP10HD-CCW H118	TP10HD-CCW
糖類								
巖藻糖	0.7*	0.9	0.5	0.4	0.6	0.7	0.6	0.5
半乳糖	0.9	1.3	1.6	1.9	2.1	2.3	2.2	2.1
甘露糖	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
葡萄糖胺	3.5	4.1	3.5	3.9	4.3	4.1	4.0	4.0
唾液酸	0.2	0.4	0.7	1.7	1.6	1.3	1.1	1.6
唾液酸／甘露糖比例	0.08	0.15	0.24	0.56	0.54	0.42	0.38	0.53

* 以相對於甘露糖(=3)表示結果
本檢測中之葡糖胺等於上述檢測中所使用之N-乙醯基葡萄糖胺。

結論

TP10HD-CCW與TP10HD-CC 糖型式之單糖組成一般為唾液

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明（51）

酸終止的單-，雙-，及三觸角狀複合體寡糖，此寡糖在接近N-連接的蛋白質取代部位處經巖藻糖基化，並含三甘露糖核心。可結論出，糖型TP10HD-CCW物質比糖型TP10HD-CCS含明顯較高的唾液酸比例及／或較低之甘露糖比例。半乳糖及（N-乙醯基）-半乳糖胺含量之差異可能不明顯。TP10HD-CX之唾液酸／甘露糖比例顯示此物質（前文，由菲爾龍等人接述）擬似TP10HD-CCS，而與TP10HD-CCW及TP10HD-CC不同。後者顯然主要由弱陽離子糖型式組成，符合上述數據。

結果顯示，較低的血漿清除率(TP10HD-CCS)與較高唾液酸含量或唾液酸／甘露糖比例(>0.25)有關。相對低甘露糖含量亦反應出此物質有較高程度的分支（即更多的雙-，及三觸角狀構造）。

實例 IX

自TP10HD糖型式中釋出的寡糖之電荷與大小分佈分析

自各糖型式試樣(0.6毫克)，由肼解作用釋出複合寡糖。用還原氚化作用加放射標記於寡糖鏈。荷電的寡糖在鹼性條件下接受高電位紙電泳，偵測尖鋒，由氚放射照相定量。寡糖鏈經Arrhrobacter ureafaciens神經胺酸酶處理以去除唾液酸，重複作電泳。

放射標記的去唾液基(即中性的)寡糖鏈，於BioGel P4，400篩號，2米 x 15公分(BioRad Corporation, Richard, CA)上接受大小去除層析，如下述。層析，於水中，55℃進行，流速為0.2毫升／分鐘。試樣與未標記的

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(52)

葡聚糖之部份酸水解物混合作為內在標準。放射標記的糖型寡糖鏈由一種連線流動放射同位素監測器偵測，寡糖標準組則由一種連線差式折射計偵測。在下列結果中個別寡糖之流體動力體積以顯現的葡萄糖單位(gu)表示，緊鄰於寡糖醛醇之葡萄糖寡合物間以立方栓內推法(cubic spline interpolation)測定數值。

圖4比較神經胺酸處理前後TP10HD-CCW與TP10HD-CCS之放射電泳圖。二例中，神經胺酸酶處理使所有經標記的寡糖鏈呈中性，顯示負電荷完全歸因於唾液酸。

糖型式TP10HD-CCS，約64%寡糖鏈最初為中性，其餘的具有對應於唾液酸單位之流動性。對於來自糖型式TP10HD-CCW之寡糖鏈，有較高比例，69%之酸性寡糖，其中40-50 %具有對應於二或多個唾液酸單位流動性的殘基。僅有約31%來自糖型式TP10HD-CCW之寡糖鏈在神經胺酸處理前是中性。

由大小輪廓分析偵測的去糖基糖型式寡糖之大小示於下表11中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(53)

表 11

去唾液基糖型式寡糖鏈之大小輪廓分析

TP10HD-CCW	TP10HD-CCS
21.0*	20.0
17.3	17.3
15.0	15.0
14.0	14.0
12.8	12.7
11.5	11.6
10.4	10.5
9.3	9.3
3.0	3.0

* 數值以葡萄糖單位表示(gu)

因此，得自糖型式之寡糖大小極類似。但是，如圖5所示，各種大小之相對比例不同。TP10HD-CCW比TP10HD-CCS含有較高比例的大小較大的寡糖鏈，尤為區域15 gu寡糖鏈，以及較低比例之14 gu種類。

結論

電荷分佈數據進一步確定由TP10HD-CCW所證實高唾液酸含量與緩慢的血漿清除率間之關連。兩種糖型式（見實例VI），其酸性與中性寡糖鏈間之相對比例類以自血漿中快

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明（54）

速或緩慢清除的物質之比例。此支持下列觀點：其中主要N-連接之寡糖具有一或多個唾液酸殘基之糖型式分子，自血漿中清除較慢，而中性寡糖鏈與呈尚未知的機轉之快速清除有關。

寡糖鏈大小輪廓單獨無法清晰認證出複合寡糖鏈之準確構造。但是，組成及大小數據一起，與含具有可變的唾液基化終端半乳糖及可變的巖藻糖基化之三甘露糖核心（即二觸角狀）的主要構造符合。其它的可能性包括進一步分支得到具有三個Gel 單位之三觸角狀構造。顯然，大小輪廓本身無法支持任何與低血漿清除率有關的主要構造類型。

緩慢血漿清除率僅與少數上述類型核心構心構造的唾液基化程度有關。

實例　X

弱陽離子性TP10HD糖型式之pI比強陽離子糖型式低

重度唾液基化糖型式之pI低於輕度唾液基化糖型式之pI。

方法

層析調焦是一種依據等電點pI分離蛋白質異構型之方法，使用離子交換柱及不同pH之兩性游子產生之pH梯度。本研究中，使用pH梯度7.1至4.0完成TP10HD製劑之分析。層析樹脂為Mono P, Hr5/5 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ)；起始緩衝液是0.025 M Bis/Tris，此緩衝液經飽和的亞胺基二乙酸滴定成pH

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(55)

7.1 ；溶離劑是多緩衝液7-4 (polybuffer 7-4) (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ)，經水稀釋成1:10 (v/v)，用HCl 調整成pH 4.0；清潔緩衝液為2 M NaCl之水溶液。選擇實驗條件以產生一種7.1 至4.0 單位之線性梯度。

結果

圖6 總結本實驗之結果。TP10HD-CX 中重要異構型具有pI約6.0 及5.7 ，少量pI為5.0 及以下之物質。TP10HD-CC 中，pI 5.7異構型為小量組份；主要異構型具有pI為5.1 及4.8 。整合這些尖鋒，提出，約40% TP10HD-CC 製劑具有pI<4.9。因為TP10HD-CX 中pI<4.9之物質數量太小，無法正確估計此製劑中低pI物質之比例。

結論

發現TP10HD-CX 比TP10HD-CC 之平均pI較高，與轉譯後衍得的基團含量低一致。但是，兩種TP10HD製劑間，異構型方面有一些重疊。具低pI(pI<4.9)之TP10HD-CC 之百分比與自豬血漿中慢慢清除之物質之百分比有關（見實例VI）。結果符合實例VIII中所述之發現，具有較高程度終端唾液酸殘基之糖型式證實其pI較低。

實例 XI

各種TP10HD糖型式具有可相比的活體外抗溶血功能性，屬檢測的信任間隔(confidence interval) 內，如下列結果所示。

方法

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝 訂 線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(56)

溶血檢測是根據TP10HD溶液抑制SRBC溶血之能力而定，此SRBC以兔子多株抗體在作為補體來源之人類血清存在下致敏化，如上述實例VI所述。

活性以標準檢測下得到抑制50%溶血之濃度表示，IH_{50}。TP10HD，或TP10HD糖型式產生50%抑制作用之濃度較低，製劑之強度越大。各試樣檢查範圍為7.8 至1000毫微克／毫升稀釋度之TP10HD或TP10HD糖型式。

結果

TP10HD-CX 證實具有一般之IH_{50}，為20±7 毫微克／毫升，而TP10HD-CC 之此種數值較高，約50±3 毫微克／毫升，支持含明顯量弱陽離子，深度唾液基化的糖型式之製劑，其效力約低於強陽離糖子型式之2-倍之說法。TP10HD-CCW具有一般IH_{50}，為44毫微克／毫升，而TP10HD-CCS具有一般IH_{50}，為27毫微克／毫升。結果符合未分餾的TP10HD-CS 及TP10HD-CC 製劑之數值。去糖基作用使IH_{50}自TP10HD-CX 之80毫微克／毫升降至TP10HD-CXD之40毫微克／毫升。

結論

本檢測之檢測內可變性其範圍為15-20 %，故難以解釋IH_{50}值之兩倍差異，而四倍或更大之改變則被認為有意義。因此本檢測無基礎對TP10HD-CC ，TP10HD-CCW及TP10HD-CCS其效力不同作出結論。此等糖型式糖基化或唾液基化增加（顯著增加活體內血漿半衰基），對於活體外抑制溶血之作用沒有重大影響。

中國蒼鼠(chinese hamster) 卵巢(CHO) 細胞系DUX

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

五、發明說明(57)

B11，攜帶有質體pBSCR1c/pTCSgpt，於1989，3，23由馬里蘭(Maryland)，洛克菲爾(Rockville0之美國種類培養物收集處[American Type Culture Collection (ATCC)]存放，登記號碼為CRL 10052。

前述所述之參考文，不論是否有明定併入與否，皆併入本文作參考。

現已充份揭述本發明，精於本技藝者將會了解，在相等參數，濃度，及條件下寬廣範圍內可以作出相同物，而不偏離本發明之精神與範圍，且無不當之實驗。

雖然已以其特定具體實例揭述本發明，應了解它能作進一步之修飾。本申請案意欲涵蓋一般言遵循發明原理並包括離開本發明揭述之部份，如本發明所包含技藝中已知或習用之應用，以及適用於下文所附申請專利部份的範疇中所列的前述基本特點的本發明任何變異，用途，或改換。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)甲4規格(210×297公釐)

四、中文發明摘要（發明之名稱：　新穎糖型式之可溶性補體受體1　）

本發明有關可溶性補體受體第1型(sCR1)之新穎糖型式及製劑，及其於治療補體中介的疾病，及涉及發炎及不適當補體活化之病症，及於栓塞或休克狀態之用途。本發明提供新穎糖型式，以及供產生，偵測，增多與純化此類糖型式之方法。本發明另提供由重組或化學方式專一地產生糖型式之方法。本發明較佳具體實例包括唾液基糖型式，以及pI≦5.1的糖型式(由層析調焦測定)，或其唾液酸對甘露糖之莫耳比≧0.25之糖型式。治療組合物中可單獨調配此類糖型式，或加上血栓溶解劑。

英文發明摘要（發明之名稱："NOVEL GLYCOFORMS OF SOLUBLE COMPLEMENT RECEPTOR 1"）

The present invention relates to novel glycoforms and preparations of the soluble complement receptor type 1 (sCR1), and their uses in the therapy of complement mediated diseases and disorders involving inflammation and inappropriate complement activation and in thrombotic or shock state conditions. The invention provides novel glycoforms and methods for producing, detecting, enriching and purifying such glycoforms. The invention further provides methods of specifically producing a glycoform by recombinant or chemical means. Preferred embodiments of the invention include sialylated glycoforms and glycoforms with a pI ≤ 5.1 determined by chromatofocusing or with a

附註：本案已向　美　　國（地區）申請專利、申請日期：1992.8.7　案號：07/927099

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

A5
B5

四、中文發明摘要（發明之名稱：　　）

英文發明摘要（發明之名稱：　　）

sialic acid to mannose molar ratio of ≥ 0.25. The glycoforms may be formulated alone in therapeutic compositions or in combination with thrombolytic agents.

附註：本案已向　　國（地區）申請專利、申請日期：　　案號：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製
本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）甲4規格（210 X 297公釐）

公告本 申請專利範圍

修正 年 月 日 88.12.29 補充

1. 一種包含sCR1糖蛋白質分子之組合物，其中該sCR1含有30個CR1之細胞外短小一致重複部位，而該sCR1糖蛋白質分子含有一種或多種複合寡糖構造，該一或多種複合寡糖構造以平均每構造一或多個唾液酸殘基終止，其中該組合物中所有sCR1糖蛋白質分子形成一種具有唾液酸對甘露糖之莫耳比大於或等於0.25之sCR1糖蛋白質分子群。

2. 根據申請專利範圍第1項之組合物，其中於該組合物中之sCR1糖蛋白質分子形成一種具有唾液酸對甘露糖之莫耳比大於或等於0.38之sCR1糖蛋白質分子群。

3. 根據申請專利範圍第1項之組合物，其中於該組合物中之sCR1糖蛋白質分子形成一種具有唾液酸對甘露糖之莫耳比大於或等於0.42之sCR1糖蛋白質分子群。

4. 根據申請專利範圍第1項之組合物，其中於該組合物中之sCR1糖蛋白質分子形成一種具有唾液酸對甘露糖之莫耳比大於或等於0.53之sCR1糖蛋白質分子群。

5. 根據申請專利範圍第1項之組合物，其中該組合物存有主要之sCR1糖型式，該主要糖型式具有由層析調焦測量之等電點低於或等於約5.1。

6. 根據申請專利範圍第1項之組合物，其中該組合物中實質上所有之sCR1糖蛋白質分子含一或多種複合寡糖構造，且至少約40%之該寡糖構造以每寡糖構造一或多個

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

公告本 申請專利範圍

修正 年 月 日 88.12.29 補充

1. 一種包含sCR1糖蛋白質分子之組合物，其中該sCR1含有30個CR1之細胞外短小一致重複部位，而該sCR1糖蛋白質分子含有一種或多種複合寡糖構造，該一或多種複合寡糖構造以平均每構造一或多個唾液酸殘基終止，其中該組合物中所有sCR1糖蛋白質分子形成一種具有唾液酸對甘露糖之莫耳比大於或等於0.25之sCR1糖蛋白質分子群。

2. 根據申請專利範圍第1項之組合物，其中於該組合物中之sCR1糖蛋白質分子形成一種具有唾液酸對甘露糖之莫耳比大於或等於0.38之sCR1糖蛋白質分子群。

3. 根據申請專利範圍第1項之組合物，其中於該組合物中之sCR1糖蛋白質分子形成一種具有唾液酸對甘露糖之莫耳比大於或等於0.42之sCR1糖蛋白質分子群。

4. 根據申請專利範圍第1項之組合物，其中於該組合物中之sCR1糖蛋白質分子形成一種具有唾液酸對甘露糖之莫耳比大於或等於0.53之sCR1糖蛋白質分子群。

5. 根據申請專利範圍第1項之組合物，其中該組合物存有主要之sCR1糖型式，該主要糖型式具有由層析調焦測量之等電點低於或等於約5.1。

6. 根據申請專利範圍第1項之組合物，其中該組合物中實質上所有之sCR1糖蛋白質分子含一或多種複合寡糖構造，且至少約40%之該寡糖構造以每寡糖構造一或多個

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

修正補充
年 月 日
88.12.29

33.一種製備根據申請專利範圍第1至9項中任一項之組合物中之sCR1糖蛋白質之方法，其包含：

(a) 在細胞生長不限制營養供應的條件下，培養含質體pBSCRlc之重組中國倉鼠卵巢細胞DUX B11於流動床灌注反應器中或中空纖維反應器中；及

(b) 自該培養物中分離該sCR1糖蛋白質。

34.根據申請專利範圍第33項之方法，其另包含：

(c) 自步驟(b)中所得之物質分離含唾液酸之分子。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

唾液酸殘基終止。

7. 根據申請專利範圍第1項之組合物，其中該組合物中實質上所有之sCR1糖蛋白質分子含一或多種複合寡糖構造，且至少約70%之該寡糖構造以每寡糖構造一或多個唾液酸殘基終止。

8. 根據申請專利範圍第1項之組合物，其中該組合物中所有該sCR1糖蛋白質分子之至少40%具有由層析調焦測量之等電點低於或等於約5.1。

9. 根據申請專利範圍第1項之組合物，其中該組合物中所有該sCR1糖蛋白質分子之至少70%具有由層析調焦測量之等電點低於或等於約5.1。

10. 根據申請專利範圍第1至9項中任一項之組合物，具有至少25%去糖基sCR1之功能性補體抑制活性。

11. 根據申請專利範圍第1至9項中任一項之組合物，其中該sCR1分子之蛋白質骨架含有sCR1之全部細胞外功能部位，包括LHR-A, LHR-B, LHR-C, LHR-D, SCR29，SCR30及區域達到且包括穿膜區域之第一個丙胺酸殘基區域。

12. 一種用於治療受體發炎或不當補體活化有關疾病或病症之醫藥組合物，其包含治療有效量之根據申請專利範圍第1至9項中任一項之組合物及醫藥可接受之載劑或賦形劑。

13. 一種用於治療受體成人呼吸壓迫癥候群之醫藥組合物，

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

其包含治療有效量之根據申請專利範圍第1至9項中任一項之組合物及醫藥可接受之載劑或賦形劑。

14. 一種用於治療受體移植排斥之醫藥組合物，其包含治療有效量之根據申請專利範圍第1至9項中任一項之組合物及醫藥可接受之載劑或賦形劑。

15. 根據申請專利範圍第14項之醫藥組合物，其中移植是一種同種異體移植或一種異種移植。

16. 一種用於治療受體血栓病症之醫藥組合物，其包含治療有效量之根據申請專利範圍第1至9項中任一項之組合物及醫藥可接受之載劑或賦形劑。

17. 根據申請專利範圍第16項之醫藥組合物，其中該血栓溶解劑係由下列組成之群選出：

(a) 纖維蛋白溶酶原活化因子及其突變蛋白質(muteins)；

(b) 茴香醯化的纖維蛋白溶酶原-鏈激酶-活化因子複合體；

(c) 單鏈尿激酶(urokinase)；

(d) 雙鏈尿激酶；

(e) 鏈激酶；

(f) 一種具纖維蛋白溶解活性之雜體蛋白質，此蛋白質含第一個雙鏈蛋白酶之一鏈，連接於第二個雙鏈蛋白酶之一鏈，至少一個之具有纖維蛋白溶解活性之該第一或第二個蛋白酶，使得該雜體蛋白質具有一個纖維蛋

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

六、申請專利範圍

白溶解活性所必需之催化部位，此部位視情況由可去除之阻斷基所阻斷；及

(g) 一種活體內可逆性阻斷之纖維蛋白溶解酶，其中該酶中纖維蛋白溶解活性所必需的催化部位由一個基團阻斷，此基團可水解去除，水解速度使得在等張水性溶液中，pH 7.4，37℃時水解的偽第一因次速速常數(pseudo first order rate constant)範圍為10^{-6}秒$^{-1}$至10^{-3}秒$^{-1}$。

18. 一種用於治療受體與發炎或不當補體活化有關之疾病或病症之醫藥組合物，包括治療有效量之根據申請專利範圍第1至9項中任一項之組合物，治療有效量之血栓溶解劑，及醫藥可接受之載劑或賦形劑。

19. 一種用於治療受體成人呼吸壓迫癥候群之醫藥組合物，包括治療有效量之根據申請專利範圍第1至9項任一項之組合物，治療有效量之血栓溶解劑，及醫藥可接受之載劑或賦形劑。

20. 一種用於治療受體移植排斥之醫藥組合物，包括治療有效量之根據申請專利範圍第1至9項任一項之組合物，治療有效量之血栓溶解劑，及醫藥可接受之載劑或賦形劑。

21. 根據申請專利範圍第20項之醫藥組合物，其中移植是一種同種異體移植或一種異種移植。

22. 根據申請專利範圍第1至9項中任一項之組合物，係用於

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

六、申請專利範圍

治療受體發炎或不當補體活化有關之疾病或病症、成人呼吸壓迫癥候群、血栓症狀或移植排斥。

23. 根據申請專利範圍第12項之醫藥組合物，其中該個體為人類。

24. 根據申請專利範圍第13項之醫藥組合物，其中該個體為人類。

25. 根據申請專利範圍第14項之醫藥組合物，其中該個體為人類。

26. 根據申請專利範圍第15項之醫藥組合物，其中該個體為人類。

27. 根據申請專利範圍第16項之醫藥組合物，其中該個體為人類。

28. 根據申請專利範圍第17項之醫藥組合物，其中該個體為人類。

29. 根據申請專利範圍第18項之醫藥組合物，其中該個體為人類。

30. 根據申請專利範圍第19項之醫藥組合物，其中該個體為人類。

31. 根據申請專利範圍第20項之醫藥組合物，其中該個體為人類。

32. 根據申請專利範圍第22之醫藥組合物，其中該個體為人類。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

六、申請專利範圍

修正補充
年 月 日
88.12.29

33.一種製備根據申請專利範圍第1至9項中任一項之組合物中之sCR1糖蛋白質之方法，其包含：

(a) 在細胞生長不限制營養供應的條件下，培養含質體pBSCRlc之重組中國倉鼠卵巢細胞DUX B11於流動床灌注反應器中或中空纖維反應器中；及

(b) 自該培養物中分離該sCR1糖蛋白質。

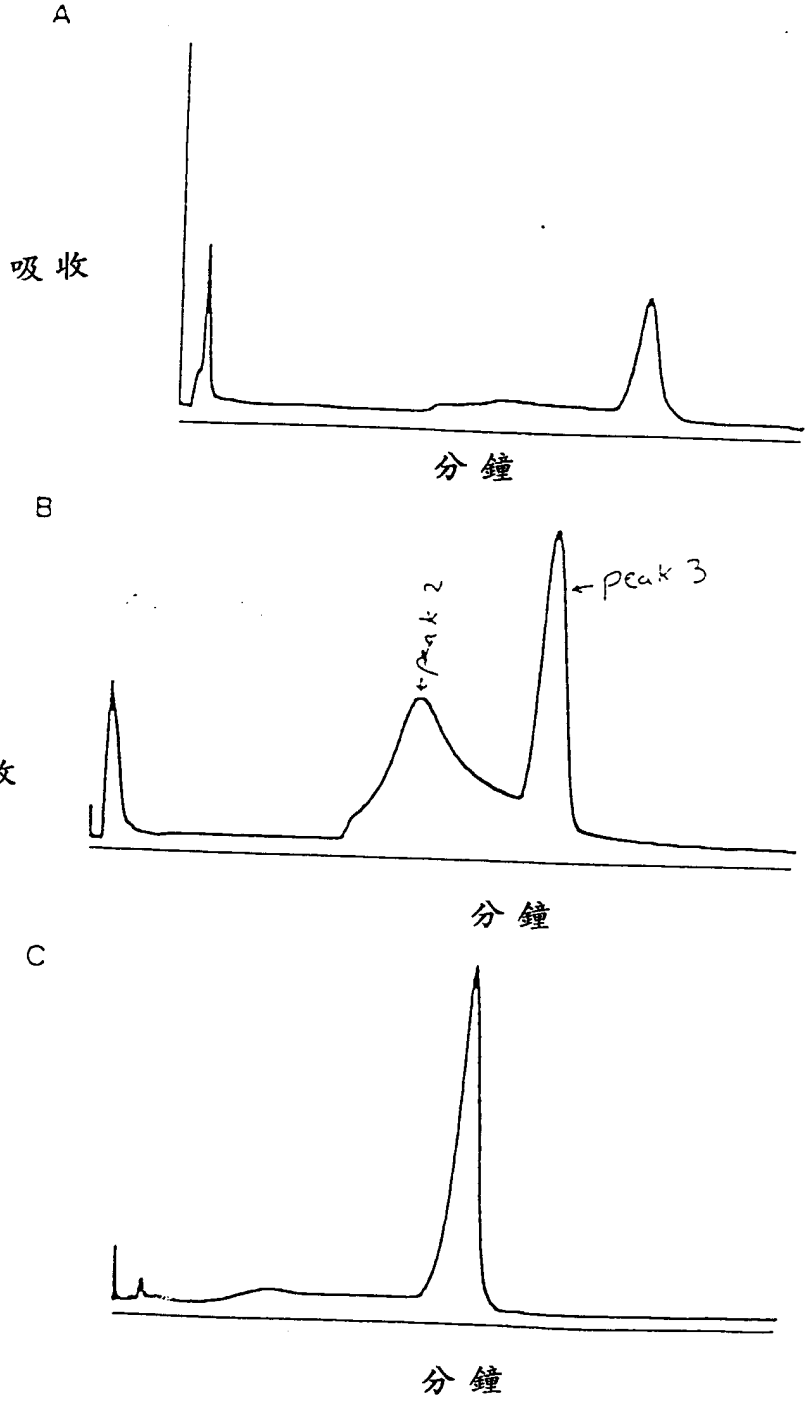
34.根據申請專利範圍第33項之方法，其另包含：

(c) 自步驟(b)中所得之物質分離含唾液酸之分子。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部中央標準局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準（CNS）A4規格（210×297公釐）

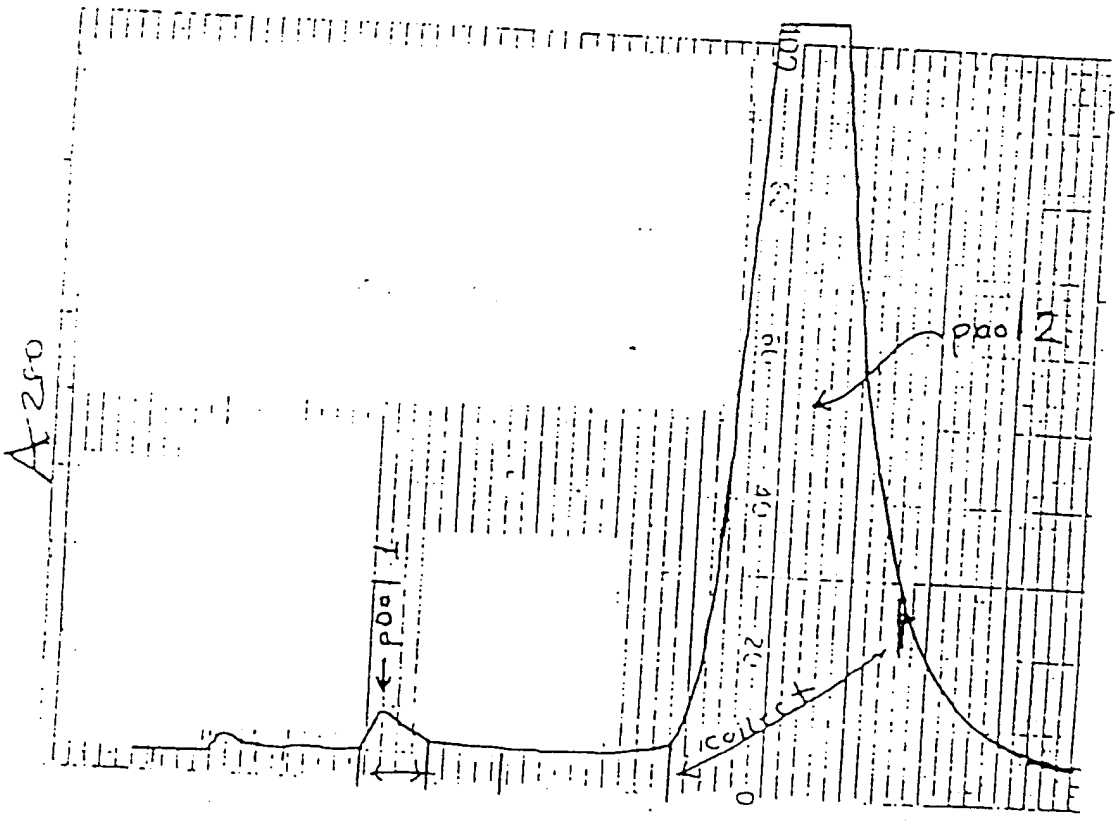
第 1 圖



386878

5929 (Sheet 2 of 6)

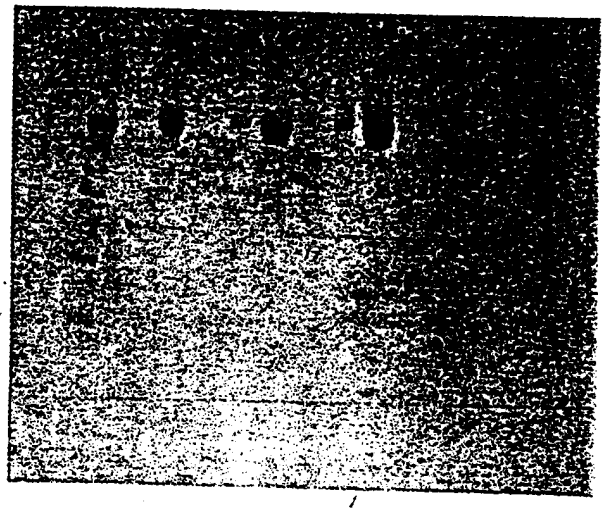
第 2 圖



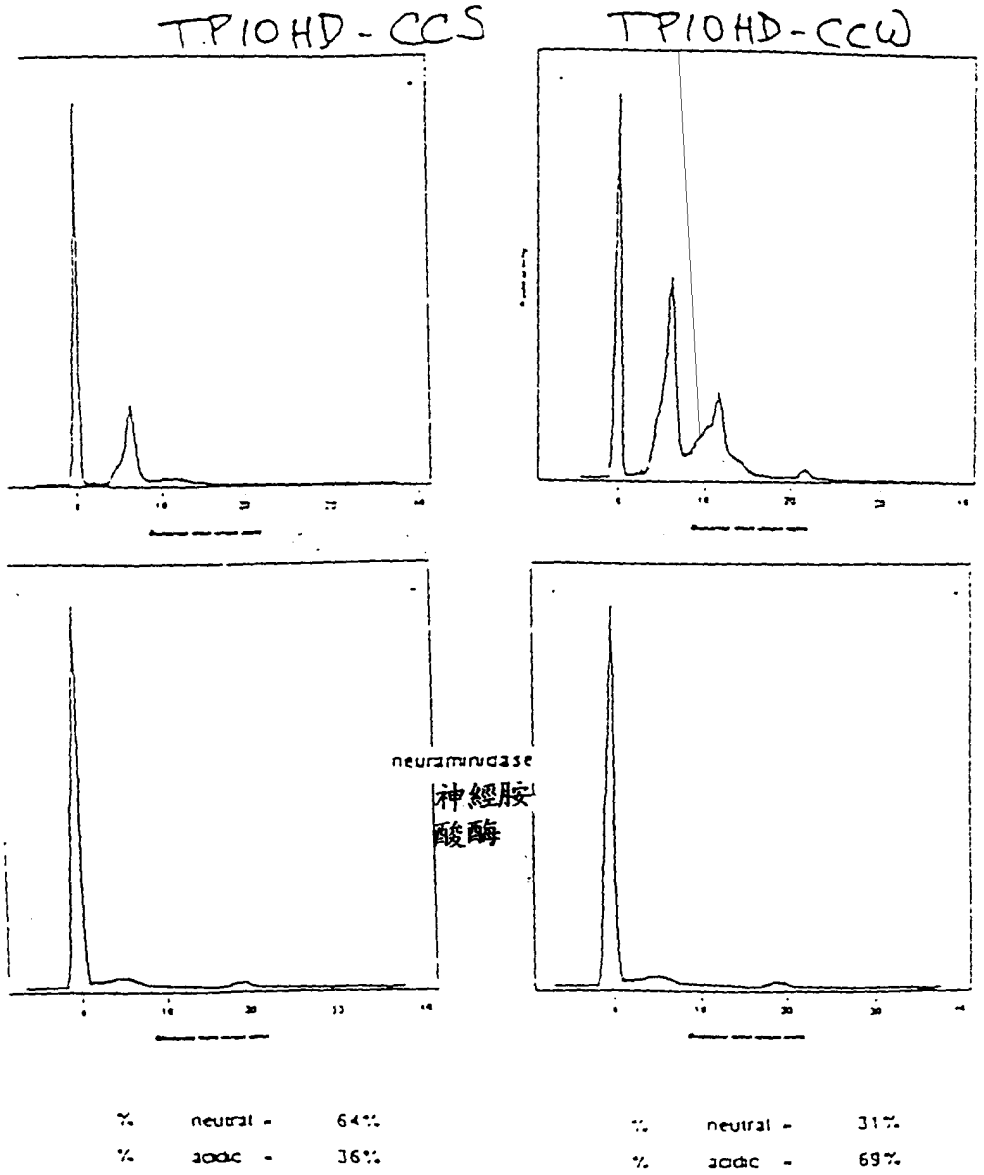
386878

[redacted] 3 [redacted]

1 56 89

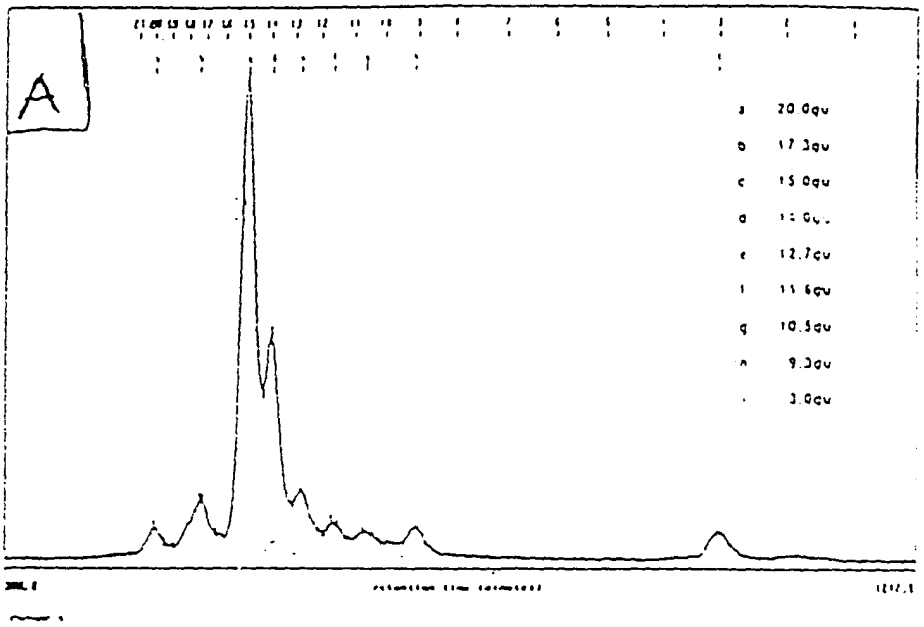


第 4 圖

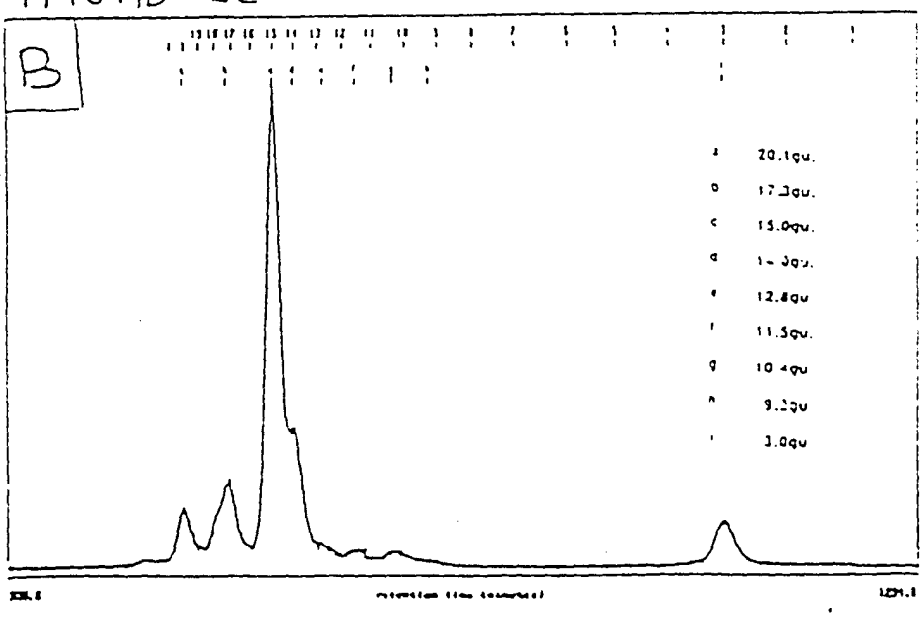

TP10HD-CCS
TP10HD-CCW
neuraminidase
神經胺
酸酶
% neutral - 64%
% acidic - 36%
% neutral - 31%
% acidic - 69%

第 5 圖

TP10HD-CCS



TP10HD-CCW



第 6 圖

