

89.11.22
年 月 日
修正
補充

申請日期	85.7.12
案 號	85108439
類 別	C07K 1/18, 14/56

公告本

442492

中文說明書修正頁(89年11月)

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	提高干擾素濃度之方法
	英 文	PROCESS FOR THE ENRICHMENT OF INTERFERON
二、發明 創作人	姓 名	1. 皮瑞·凡可斯·佛魁克斯 2. 卡撒琳·庚歐格斯
	國 籍	1. 瑞士 2. 比利時
	住、居所	1. 瑞士，4053巴塞爾，貴德丁格街133號 2. 瑞士，4147埃詩，梨園9號
三、申請人	姓 名 (名稱)	瑞士商諾華公司
	國 籍	瑞士
	住、居所 (事務所)	瑞士巴塞爾市史克瓦司伍德利路215號
	代 表 人 姓 名	亞瑟·凱能尼克 克里斯多夫·湯姆

015656559 DCCMFY

- 1 -

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

裝 訂 線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6
B6

本案已向：

德 國 (地 區) 申 請 專 利 ， 申 請 日 期 ： 1995.7.26 案 號 ： 95810485.3' 有 無 主 張 優 先 權
(歐 洲 專 利 申 請 案)

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

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 ()

本發明有關用銅螯合-親和力層析術之蛋白質新純化方法。

銅螯合物-親和力層析術係利用將蛋白質之易接近之電子供予基(例如組胺酸)連結在銅離子上(用螯合基共價附在靜止撐體上)之方法完成。單獨一個易接近之組胺酸之存在通常足夠讓蛋白質吸附在一銅(II)-IDA-螯合物上(IDA=亞胺二乙酸酯)。蛋白質在銅螯合物-親和力層析中之停留視可與金屬交互作用之蛋白質上之側基之數目及種類而定。交互作用係受各種獨立變數像pH、溫度、溶劑種類、鹽種類及鹽濃度影響。在中性或低鹼性pH範圍內與銅螯合物結合之蛋白質通常利用一競爭性試劑之漸減之pH梯度(連續或逐步)或漸增之濃度梯度(連續或逐步)溶析,例如用路易士鹼像咪唑溶於緩衝液之溶液溶析。或者,第三個可能的溶析方法包括一溶析液中之螯合物(像EDTA)。

然而,這些方法有幾個缺點:

- 低選擇性,即在相同條件下可析出數個蛋白質
- 低濃化
- 蛋白質與高濃度銅(II)離子共溶析,若使用競爭性或螯合試劑
- 需要另外之純化步驟以去除溶析液
- 爲了提高選擇性,通常必須使用連續梯度溶析期望之蛋白質。

(請先閱讀背面之注意事項
填寫本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明 ()

例如在蛋白質使用一競爭性或螯合試劑溶析之情況，析出液含蛋白質、競爭性或螯合試劑及釋出之銅(II)離子。所以，競爭性試劑及銅(II)離子必須利用額外之純化步驟去除，而且，許多蛋白質在溶液中含高濃度銅(II)離子下不安定(氧化作用)或在低pH值下不安定(沉澱作用)，且失活。

本發明現在提供一特別有利之從銅螯合物-複合物中溶析蛋白質之方法。利用本發明方法，驚異地可用去離子水(其可選擇性地含額外之蛋白質安定劑)溶析期望之蛋白質。使用去離子水有幾個優於先前技術之優點：

- 不使用競爭性或螯合試劑，所以不需要額外之純化步驟
- 期望之蛋白質不與可能引起氧化問題之高濃度銅(II)離子共溶析
- 期望之蛋白質在可能引起沉澱或失活問題之低pH值下不析出
- 期望之蛋白質以特別高純度及高產率回收
- 溶析可利用一步驟實施，而不使用一梯度(連續或逐步)
- 析出之蛋白質不用另外處理即可儲存。

發明詳述

本發明有關提高蛋白質濃度之方法，該方法包括以下之步驟：

- a) 將不純或純化前之蛋白質吸附在固定之銅(II)離子上，

(請先閱讀背面之注意事項 填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

b) 用一路易士鹼溶液清洗吸附之蛋白質，及

c) 用去離子溶析期望之蛋白質。

銅(II)離子通常固著在一靜止撐體(例如，無機載體像矽石或聚合基質)上。

靜止撐體必須可與銅(II)離子形成螯合物。此靜止撐體之實例為那些，其中之螯合基(像亞胺乙酸(IDA)、N,N,N'-叁(羧甲)-伸乙二胺(TED)、羧甲基化之天冬胺酸(CM-ASP)、四伸乙基五胺(TEPA)、氮乙酸(NTA)或羧甲基化之 α,β -二胺琥珀酸(CM-DASA))共價結合在靜止撐體上者。螯合基可直接或經由間隔基附在靜止撐體上。聚合載體可為任何傳統用於金屬離子-親和力層析術之聚合化合物。此類聚合材料之實例包括瓊脂糖、葡聚糖或其它合成聚合物；偏愛者為瓊脂糖及乙烯基聚合物。有共價附著之螯合基之製備方法係描述在，例如，Hochuli, CHIMIA (1986), 40, 408 - 412 (亦參見 Figuroa et al., J. Chromatography (1986), 371, 335 - 352；Porath, Protein expression and purification (1992), 3, 263 - 281；L. Kågedal in "Protein Purification, principles, high resolution methods and applications" Janson and Ryden Eds. (1989), 227 - 251, VCH Publishers, New York)。在本發明之一偏愛之具體實施例中，靜止撐體可在1 - 200，且更適宜在10 - 100微摩爾/毫升靜止撐體之濃度下，與銅(II)離子形成螯合物。

適合使用在本發明中之聚合載體亦可在市面上購得，像：

(請先閱讀背面之注意事項
填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

- 螯合之西法露快流 (Chelating-Sepharose Fast Flow)[®] (Pharmacia 公司, Uppsala) , 其中間隔基上之亞胺二乙酸基係利用安定之醚連接鍵耦合至西法露快流 (Sepharose Fast Flow) 上 ;
- 螯合之西法露 6B (Chelating-Sepharose 6B)[®] (Pharmacia 公司 , Uppsala) ; 及
- TSK Toyopearl AF-Chelate-650 M[®] (TosoHaas 公司 , Stuttgart) , 其中亞胺二乙酸基係固著在一由寡乙二醇、甲基丙烯酸縮水甘油酯及二甲基丙烯酸異戊四酯之共聚物製成之親水性半硬靜止撐體上。

銅(II)離子固定前，靜止撐體通常要清洗。例如，靜止撐體連續用 1-10，較適宜者為 3-7 倍床體積之 5-50%，較適宜者為 10-30% 乙醇； 1-10，較適宜者為 3-7 倍床體積之去離子水； 1-10，較適宜者為 3-7 倍床體積之 0.01-0.1 M，較適宜者為 0.03-0.07 M EDTA 及 0.1-1 M，較適宜者為 0.3-0.7 M NaCl； 1-15，較適宜者為 3-10 倍床體積之去離子水清洗；最後用 1-10，較適宜者為 3-7 倍床體積之 0.01-1%，較適宜者為 0.05-0.5% 甲酸及 1-15，較適宜者為 3-10 倍床體積之去離子水清洗。這些清洗溶液之流率通常為每小時 1-50，較適宜者為 5-20 倍床體積。

銅(II)離子在以上之靜止撐體中之固著可簡單地用銅離子充滿靜止撐體之方法達成。常見之銅(II)離子源為銅(II)鹽，像 CuCl_2 、 $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 及特別是 CuSO_4 。通常使用 1-10，較適宜者為 3-7 倍床體積之 0.001-0.1 M，較適宜者為 0.003-0.1 M 之 $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 水溶液，隨後將靜止撐體用大過量之水清洗，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

編

五、發明說明 ()

以消除剩餘之未結合銅離子。如是製備之含固著之銅(II)離子之靜止撐體立即可用於本發明之方法中。

視靜止撐體、含蛋白質之溶液之pH及離子強度而定，有時在充填含蛋白質之溶液前，較適宜用一有相同pH及離子強度之溶液處理，以避免吸附蛋白質時發生膨脹或收縮。此一處理之必要性可利用一小規模試驗很容易地檢查。此預處理可將1-10，較適宜者為3-7倍床體積之處理溶液流過靜止撐體而達成。

蛋白質經由螯合物之形成在以上製備之靜止撐體上之吸附係簡單地將一含蛋白質之溶液載入含固著之銅(II)離子之管柱中而達成。

蛋白質溶液可得自各種來源，且可預純化或未預純化。例如，若要單離之蛋白質被宿主分泌至培養液內，例如，可在離心後直接將培養液加於靜止撐體。若蛋白質在宿主內產生及儲存，細胞必須破壞且含蛋白質之溶液必須從細胞碎屑中分離出，例如利用離心法。如此得到之含蛋白質之溶液可如上所述直接加入靜止撐體中，或可進一步純化，例如利用技術上熟知之沉澱、萃取或層析法。因此，含蛋白質之溶液可得自各種來源，且其可能含各種不純物，像離子物種、外來蛋白質等。

蛋白質是否可用本發明方法純化可輕易地在一小規模試驗中決定，其中蛋白質係吸附在少量充填銅(II)之靜止撐體上，用如下定義之路易士鹼處理，接著決定可用去離子水溶析之蛋白質量，並與可用2M NH₄Cl溶析之蛋白質量比

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明()

較。通常，本發明方法可應用於以如下定義之路易士鹼不完全破壞該蛋白質與銅(II)離子間之複合物為特徵之蛋白質。偏愛之蛋白質為干擾素、澱粉酶、胰蛋白酶及相關之蛋白質。特別偏愛者為干擾素- α 、胰蛋白酶及 α -澱粉酶。

要載入靜止撐體上之含蛋白質溶液之量係決定於固著在此靜止撐體上之銅(II)離子濃度、溶液中之蛋白質濃度及蛋白質性質。所以，要載入之適當溶液量係靠經驗決定，使用一檢測器（像紫外光監測器）觀測流出液。

本發明之一重要步驟為用去離子水溶析前，用路易士鹼清洗吸附在靜止撐體上之蛋白質。路易士鹼為一電子對予體像胺、 HO^- 、磷烷或磷。實例為 NH_3 、 CH_3NH_2 、 $(\text{CH}_3)_2\text{NH}$ 、 $(\text{CH}_3)_3\text{N}$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5(\text{CH}_2)_2\text{N}$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{NH}_2$ 、 $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{NH}$ 、 $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$ 、 $\text{C}_3\text{H}_7\text{NH}_2$ 、 $\text{C}_4\text{H}_9\text{NH}_2$ 、 $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NH}_2$ 、 $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NH}_2$ 、 CH_3PH_2 、 $(\text{CH}_3)_2\text{PH}$ 、 $(\text{CH}_3)_3\text{P}$ 、胺基酸、脘胺酸、帶有羥基之胺像 HOCH_2NH_2 、 $(\text{HOCH}_2)_2\text{NH}$ 或 $(\text{HOCH}_2)_3\text{N}$ 、 $\text{HOC}_2\text{H}_4\text{NH}_2$ 、 $(\text{HOC}_2\text{H}_4)_2\text{NH}$ 或 $(\text{HOC}_2\text{H}_4)_3\text{N}$ ；或為 TRIS-HCl 。

在本發明之一偏愛之形式中，路易士鹼溶液含中性或低鹼性pH範圍之 NH_4^+ 或第一、第二或第三胺、或高鹼性pH範圍之 OH^- 。在本發明之一更偏愛之具體實施例中，路易士鹼溶液含 NH_4^+ 或第一、第二或第三胺，且最偏愛者為一含 NH_4^+ 或第一胺像乙醇胺、脘胺酸、 NH_4SCN 、 NH_4Cl 、 $\text{NH}_4^+\text{CH}_3\text{COO}^-$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 或 TRIS-HCl 之溶液。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 ()

爲了不使路易士鹼溶液溶析期望之蛋白質，可調節路易士鹼之濃度或含路易士鹼溶液之pH。適宜之胺（路易士鹼）之濃度範圍爲從0.001至1M。

路易士鹼之最佳濃度強烈地決定於電子予體。例如，在胱胺酸之情況，最佳濃度爲1mM，然而在NH₄Cl之情況，最佳濃度爲300-500mM。數種鹽之最佳濃度爲，例如，NH₄SCN爲10-100mM，NH₄Cl爲10-500mM，NH₄(CH₃COO)爲10-800mM或更高及(NH₄)₂SO₄爲10-500mM或更高。

在使用胺爲路易士鹼之情況，pH宜調成pH 6-9；更適宜者爲6.5-8.5；且最適宜者爲7.0-8.0。在使用OH⁻爲路易士鹼之情況，pH宜調成9-11，例如用硼酸鹽或磷酸鹽緩衝液。

亦可使用不同路易士鹼之混合物以改進結果，或額外加入非路易士鹼之鹽像NaCl或KCl。額外鹽之濃度可高至5M，且較適宜者爲高至2M。

典型上，已吸附蛋白質之靜止撐體係用1-10或較適宜者爲3-7倍床體積之上述之清洗溶液清洗。流率係由經驗決定，且爲，例如，1-10或較適宜者爲3-5倍床體積/小時。

上述之清洗步驟最好是恰在蛋白質用去離子水溶析前實施。亦可在載入蛋白質同時進行此清洗步驟，倘若其後立即實施溶析步驟。

期望之蛋白質可在用如上述之路易士鹼清洗後溶析，簡單地用去離子水清洗靜止撐體。爲了得到高純度，去離子水不可含超過0.001M之離子化合物。相反地，去離子水可含非離子化合物，例如，以安定蛋白質之第三或第四結

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 ()

構。適合之非離子化合物為，例如，糖或多醇像甘露糖醇、葡萄糖、乳糖、果糖、甘油、聚乙二醇；或含維持蛋白質之巰基氧化態之其它化合物。去離子水之用量宜為1-10，且更適宜者為3-7倍床體積。

在本發明之方法中，大多數與靜止撐體特異結合之外來蛋白質不被去離子水溶析。其仍然被吸附，且其後可使用傳統溶析溶液（例如2M NH_4Cl 在25 mM TRIS-HCl 緩衝液中，pH 7.6）去除。所以，造成之產物濃化特別高。例如，對干擾素- $\alpha\text{B}_1\text{D}_2\text{B}_3\text{B}_4$ 之情況，產物純度高至大約90%（由30%純度之吸附溶液開始），然而先前技術銅螯合物-親和力層析術達到之純度僅為30-50%。

為了使期望之蛋白質達到最佳純度及回收，可在蛋白質吸附步驟與用路易士鹼清洗步驟間選擇性地加入一或多個用適當緩衝液（像硼酸鉀緩衝液）及／或用去離子水之額外清洗步驟。因此，在本發明之一更偏愛之具體實施例中，被吸附之蛋白質係用非路易士鹼緩衝液清洗，及／或在用路易士鹼溶液清洗前用去離子水清洗。此發現是驚人的，因為清洗步驟及溶析步驟可利用相同手法（即去離子水）進行。

此使用去離子水之中間清洗步驟是有效的，例如，用於消除副產物，特別是那些經由疏水性交互作用（及非經特異之銅離子親和力）與靜止撐體結合者。

由其它基於銅(II)螯合物之純化程序得知，單離蛋白質之溶液可含極少量銅(II)離子。這些離子可利用技術上已知

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

編

五、發明說明 ()

之方法（像離子交換或銅(II)離子螯合管柱）輕易地去除。後一個純化步驟可各別進行或，例如，緊接在管柱下半部填滿銅(II)離子去除材料後進行。

純化後，銅充填之靜止撐體可清洗或及用於另一純化，或爲了得到可再現之結果，銅(II)離子最好用一競爭性螯合劑（例如EDTA）從靜止撐體中去除，接著將靜止撐體再度如上述地填滿銅(II)離子。

實施例

實施例1：IFN-B/D之純化

基因重組之人類雜交干擾素- α B₁D₂B₃B₄（以下稱爲IFN-B/D）係如專利案EP-A-205404中所述而建造。IFN-B/D係利用啤酒酵母菌菌株HT 393產生，其相當於海因梅爾(Heinemeyer)等人發表之E 95-1-2A (EMBO Journal (1991), 10, 555-562; DSM 9697)，且其用質體pDP34R/PHO5/IFN AM119轉形。酵母菌載體pDP34R及酵母菌酸磷酸酶基因啓動子PHO5參見海連(Hinnen)等人（在：“Yeast Genetic Engineering”, Barr et al., Eds, Butterworths, Boston (1989), 193-213中）。IFN AM119爲IFN-B/D之編碼序列，且參見專利案EP-A-205404。

含編碼IFN-B/D之基因重組質體之酵母菌菌株HT 393在大發酵槽中生長。發酵完全後，將生物量利用離心收集。將得到之細胞沉澱物用含0.5 M NaCl之0.07 M磷酸鉀緩衝液(pH 7)稀釋成50%之濕細胞濃度。當細胞流過一玻璃珠研磨器打碎後，利用一含40%（重量百分比）細胞勻漿、18%

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

五、發明說明 ()

(重量百分比) 聚乙二醇 1500、4% (重量百分比) 磷酸鉀 (pH 7) 及總濃度 1 摩爾 / 公斤之 NaCl 之水性兩相系統中分配，將 IFN-B/D 蛋白質從細胞勻漿萃取出。在流過轉速 8150 rpm (13000 g) 之離心盤架分離為相分離後，收集上層相，並在第二個水性兩相系統中分配清洗 (第二個系統係將 4 份 (重量百分比) 上層相及 1 份 (重量百分比) 含 20% (重量百分比) 磷酸鉀 (pH 7) 之 1 摩爾 / 公斤 NaCl 溶液混合而成)。在一沉降槽中相分離後，將 IFN-B/D 從新的上層相利用在第三個水性兩相系統中反萃取而回收 (第三個系統係將 3 份 (重量百分比) 第二個兩相系統之上層相及 7 份 (重量百分比) 1.56 摩爾 / 公斤硫酸鎂溶液混合而成)。在一沉降槽中相分離後，將重相收集，用雙倍體積的水稀釋，經由 0.2μ 濾網過濾，然後在利用銅螯合物層析術加工前，在 4°C 下儲存數天。

此吸附溶液具有以下之特性：pH 5.6，電導度約 43 mS/cm (主要為 MgSO_4 所致)，聚乙二醇濃度 6 毫克 / 毫升，IFN-B/D 濃度約 0.1-0.5 毫克 / 毫升，IFN-B/D 純度約 30% 之總蛋白質含量。

銅螯合物層析術係在室溫下，使用一充填 100 毫升螯合之西法露快流 (Chelating-Sepharose Fast Flow)[®] (Pharmacia 公司，Uppsala) 之管柱 (直徑 44 毫米) 實施。將靜止撐體連續用下列溶液清洗：5 倍床體積之 20% 乙醇、5 倍床體積之去離子水、5 倍床體積之 0.05 M EDTA 及 0.5 M NaCl、5 倍床體積之 0.25 M NaOH 及 1 M NaCl、7 倍床體積之去離子水、5 倍床體積之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

編

五、發明說明()

0.1%甲酸及7倍床體積之去離子水，流率為每小時12倍床體積。然後將靜止撐體充滿銅離子，加入5倍床體積之0.008 M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液，並用大量去離子沖洗，以消除剩餘之未結合之銅。在吸附步驟前，將管柱用500毫升緩衝溶液使之平衡，該緩衝溶液係由0.68 M MgSO_4 及0.092 M 醋酸鈉（pH用醋酸調成5.6）組成，具有大約與吸附溶液相同之電導度，即43 mS/cm。然後將一體積為5000毫升之IFN-B/D吸附溶液以300毫升/小時之流率加入管柱中。流出液係利用一設定在280 塵米波長之紫外光監測器監控。

裝填後，在500毫升/小時之流率下連續進行三次清洗：第一次用500毫升之已在吸附前使用過之平衡緩衝液(pH 5.6)，第二次用500毫升去離子水及第三次用500毫升之含0.2 M NH_4Cl 及1 M NaCl 之0.025 M TRIS-HCl 緩衝液(pH 7.6)。然後將IFN-B/D再度簡單地使用400毫升去離子水，在500毫升/小時之流率下析出。將利用紫外光監測器監控之三次清洗液及水析出液收集。

吸附溶液、三次清洗液及水析出液中之IFN-B/D濃度係利用反相高效液相層析術(HPLC)分析測量（管柱：Vydac C-18，30 塵米，粒子大小5 m；移動相A：0.1%三氟乙酸水溶液，移動相B：80%乙腈、19.91%水及0.09%三氟乙酸；流率1 毫升/分；注射體積0.05 毫升；在216 塵米下實施紫外光檢測）。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

編

五、發明說明 ()

在三個清洗液中發現之 IFN-B/D 量可忽略不計。出乎意料地，發現水析出液中含回收產率約 70% 之 IFN-B/D，且具有高純度：大約 90% 之總蛋白質含量（即 IFN-B/D 加濃 3 倍）。

這種水溶析是特別驚人的，因為在第二個清洗液中未發現 IFN-B/D（回收產率小於 5%），其完全由相同液體（即純水）組成。

在低鹽濃度及大約 8 之 pH 值下有特別高 IFN-B/D 濃度（大約 1 毫克 / 毫升）之水析出液在 4°C 下儲存時是安定的；經過數天未發生 IFN-B/D 沉澱。

實施例 2：利用水溶析得到之各個 IFN-B/D 溶液之特性

IFN-B/D 水溶液係利用類似於實施例 1 中描述之水溶析得到，但改變溶析所用之水體積及 / 或恰在水溶析前之清洗步驟所用之緩衝液之組成。

第一個 IFN-B/D 溶液係使用與實施例 1 相同之清洗緩衝液（含 0.2 M NH_4Cl 及 1 M NaCl 之 0.025 M TRIS-HCl 緩衝液 (pH 7.6)），且僅使用大約 0.67 倍床體積之去離子水溶析獲得。

第二個 IFN-B/D 溶液係使用含 0.2 M NH_4Cl 之 0.025 M 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.6) 為清洗緩衝液及 1.5 倍床體積之去離子水為溶析液獲得。

第三個 IFN-B/D 溶液係使用 0.025 M TRIS-HCl 緩衝液 (pH 7.6)（不含 NH_4Cl 及 NaCl ）為清洗緩衝液及 4 倍床體積之去離子水為溶析液獲得。三個 IFN-B/D 溶液之特性列於表 1 中。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

五、發明說明 ()

表1：利用水溶析得到之各個IFN-B/D溶液之特性

使用之清洗緩衝液	IFN-B/D 濃度 (毫克/毫升)	pH	電導度 (mS/cm)
0.025 M TRIS-HCl pH 7.6 + 0.2 M NH ₄ Cl + 1.0 M NaCl	7.0	8.8	11.3
0.025 M 磷酸鉀 pH 7.6 + 0.2 M NH ₄ Cl	2.5	7.6	7.4
0.025 M TRIS-HCl pH 7.6	1.5	8.2	0.4

第一個溶液有特別高的干擾素濃度（7毫克/毫升），且發現在4°C下儲存時驚異地安定；經過一夜未發生IFN-B/D沉澱。比較上，純IFN-B/D在0.1M磷酸鉀緩衝液(pH 7.6)中或在0.1M碳酸氫鈉緩衝液(pH 8.0)中之溶解度低於0.5毫克/毫升。

第二及第三個溶液在4°C下儲存數天。1週後，利用反相高效液相層析術分析測量（如實施例1中所述），發現這兩個溶液中之干擾素濃度未改變。在第三個溶液之情況，此安定性特別驚人，其在高至1.5毫克/毫升之干擾素濃度下，有非常低的鹽濃度（電導度<0.5 mS/cm）。

實施例3：IFN-B/D溶析之回收產率之估計

實驗係在室溫下，使用一FPLC[®]層析術系統（Pharmacia公司，Uppsala）及一充填5毫升螯合之西法露快流(Chelating-Sepharose Fast Flow)[®]（Pharmacia公司，Uppsala）之玻璃管柱（直徑10毫米）實施。所有泵經管柱之溶液之流率設定在60毫升/小時。流出液係利用一波長設定在280 厘米之紫外光監測器監控。靜止撐體之再生及製備係如實施例1中所述實施，連續將以下之溶液泵經管柱：25毫升之0.05 M EDTA及

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

五、發明說明 ()

0.5 M NaCl、25 毫升之 0.25 M NaOH 及 1 M NaCl、35 毫升去離子水、25 毫升之 0.1% 甲酸、35 毫升去離子水、25 毫升之 0.008 M $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 及 40 毫升去離子水。

在第一個實驗中，將大約 80 毫升之純 IFN-B/D (純度：99.9% 之蛋白質含量；濃度：大約 0.3 毫克/毫升) 溶於 0.2 M 甘露糖醇及 0.03 M 磷酸鈉 (pH 7.6) 之溶液載入管柱中。用 35 毫升之 0.3 M 氯化銨緩衝液 (pH 7.6) 清洗後，使用 35 毫升去離子水析出干擾素。然後，將一 35 毫升體積之含 2 M 氯化銨之 0.025 M TRIS-HCl 緩衝液 (pH 7.6) 泵經管柱，以確定所有仍結合在靜止撐體上之干擾素之溶析。收集液之干擾素濃度係利用反相高效液相層析術分析測量，如實施例 1 中所述。得到之相當回收產率列於表 2 中。

重覆相同實驗，但使用 0.1 M 硼酸鉀 (pH 7.6) 為清洗緩衝液取代 0.3 M 氯化銨 (pH 7.6)。結果亦列於表 2 中。

表 2：IFN-B/D 溶析之回收產率

使用之清洗 緩衝液	用清洗緩衝液 析出之 %	用 H_2O 析出之 %	用 2 M NH_4Cl 析出之 %
0.3 M NH_4Cl pH 7.6	0	92	8
0.1 M 硼酸鉀 pH 7.6	0	9	91

如表 2 中所示，恰在溶析前之清洗步驟使用之緩衝液之組成大大地影響用水之溶析。

實施例 4：清洗步驟之影響

進行數次與實施例 3 中相同之實驗，僅改變清洗緩衝液之組成。各個測試之清洗緩衝液及得到之相當之回收產率列於表 3 中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 ()

表3：IFN-B/D 溶析之回收產率

使用之清洗 緩衝液	用清洗緩衝液 析出之 %	用 H ₂ O 析出之 %	用 2 M NH ₄ Cl 析出之 %
0.1 M 硼酸鉀 pH 7.6	0	9	91
0.1 M 硼酸鉀 pH 8.5	0	35	65
0.1 M 硼酸鉀 pH 9.5	0	66	34
0.3 M 硼酸鉀 pH 7.6	0	26	74
0.3 M 醋酸銨 pH 7.6	0	85	15
0.2 M N(CH ₃) ₄ Cl pH 7.6	0	12	88
0.2 M 三乙醇胺 pH 7.6	0	68	32
0.2 M 二乙醇胺 pH 7.6	0	70	30
0.2 M 乙醇胺 pH 7.6	0	82	18
0.3 M NH ₄ Cl pH 7.6	0	92	8
0.001 M 胱胺酸 pH 7.6	0	77	23
0.5 M NH ₄ Cl pH 7.6	19	72	9

如表3中所示，用水溶析得到好的產率（高於60%），若清洗緩衝液之pH值在鹼性範圍內（例如用0.1 M 硼酸鉀(pH 9.5)），或若清洗緩衝液含一接近中性pH值之胺或銨鹽（例如用0.3 M 醋酸銨(pH 7.6)，而不是用0.5 M 醋酸鉀(pH 7.6)）。在此情況，胺可為第一胺（例如乙醇胺）、第二胺（例如二乙醇胺）或第三胺（例如三乙醇胺），但不能為第四胺（例如氯化四甲銨）。清洗緩衝液之最佳濃度大大地視使用之胺而定：例如在胱胺酸(pH 7.6)之情況約1 mM，或在NH₄Cl(pH 7.6)之情況為300-500 mM。

實施例5：路易士鹼處理後之第二清洗步驟之影響

重覆實施例3中描述之相同實驗，但在用35毫升之0.3 M 氯化銨緩衝液(pH 7.6)進行之第一清洗步驟與用水溶析間插

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 ()

入用 35 毫升之 0.1 M 硼酸鉀 (pH 7.6) 進行之第二步驟。發現之回收產率為：

在第一次清洗液中 (0.3 M NH_4Cl pH 7.6):	0%
在第二次清洗液中 (0.1 M 硼酸鉀 pH 7.6):	0%
在第一次析出液中 (水)	22%
在第二次析出液中 (2M NH_4Cl + 0.025M TRIS-HCl pH 7.6):	78%

在水析出液中發現少量的 IFN-B/D。但儘管在第一次清洗步驟中存在銨離子，得到之回收產率仍低（大約 22%），表示恰在溶析前之清洗步驟有較高影響。

實施例 6：無清洗步驟之 IFN-B/D 溶析之回收產率

重覆實施例 3 中描述之相同實驗，但在吸附步驟與用水之溶析步驟間無清洗步驟。

第一次實驗係完全使用實施例 3 中提到之相同之載入溶液（0.3 毫克 / 毫升 IFN-B/D 在 0.2 M 甘露糖醇及 0.03 M 磷酸鈉 (pH 7.6) 中）進行。然後第二次實驗亦用相同之載入溶液進行，但額外含濃度為 0.3 摩爾 / 升之氯化銨。得到之相當之回收產率列於表 4 中。

表 4：IFN-B/D 溶析之回收產率（無清洗步驟情況）

載入緩衝液	用 H_2O 析出之 %	用 2 M NH_4Cl 析出之 %
0.03 M 磷酸鈉 pH 7.6 + 0.2 M 甘露糖醇	37	63
0.03 M 磷酸鈉 pH 7.6 + 0.2 M 甘露糖醇 + 0.3 M NH_4Cl	95	5

如表 4 中所示，恰在溶析前之載入緩衝液之組成大大地影響用水之溶析。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五

五、發明說明 ()

實施例7：鹽析效應之影響

部份純IFN-B/D (純度：大約90%之蛋白質含量) 之水溶液係利用類似於實施例1中描述之方法，用水溶析獲得。將此溶液部份冷凍，在大約-5至-10°C下儲存，並在使用前解凍。

此儲液之組成爲：

IFN-B/D:	0.5 - 1 毫克 / 毫升
TRIS-HCl:	大約 0.02 M
NaCl:	大約 0.01 M
醋酸鈉:	大約 0.01 M
NH ₄ Cl:	大約 0.002 M
Cu ²⁺ :	大約 1 μM
pH:	8
電導度:	2.2 mS/cm

進行數次與實施例3中相同之實驗，載入50毫升之此儲液，並僅改變清洗緩衝液之組成。各個測試之清洗緩衝液及得到之相當之回收產率列於表5中。

表5：IFN-B/D 溶析之回收產率

使用之清洗 緩衝液	用清洗緩衝液 析出之 %	用 H ₂ O 析出之 %	用 2 M NH ₄ Cl 析出之 %
0.025 M NH ₄ SCN pH 7.6	0	84	16
0.1 M NH ₄ SCN pH 7.6	0	96	4
0.2 M NH ₄ SCN pH 7.6	50	50	0
0.3 M NH ₄ SCN pH 7.6	98	2	0
0.4 M NH ₄ SCN pH 7.6	100	0	0
0.5 M NH ₄ SCN pH 7.6	100	0	0
0.025 M NH ₄ Cl pH 7.6	2	97	1

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明()

0.1 M	NH ₄ Cl	pH 7.6	0	100	0
0.2 M	NH ₄ Cl	pH 7.6	0	100	0
0.3 M	NH ₄ Cl	pH 7.6	0	96	4
0.5 M	NH ₄ Cl	pH 7.6	8	91	1
0.8 M	NH ₄ Cl	pH 7.6	19	81	0
0.025 M	醋酸銨	pH 7.6	0	89	11
0.1 M	醋酸銨	pH 7.6	0	97	3
0.5 M	醋酸銨	pH 7.6	0	98	2
0.8 M	醋酸銨	pH 7.6	0	100	0
0.025 M	(NH ₄) ₂ SO ₄	pH 7.6	0	80	20
0.1 M	(NH ₄) ₂ SO ₄	pH 7.6	0	98	2
0.2 M	(NH ₄) ₂ SO ₄	pH 7.6	0	96	4
0.3 M	(NH ₄) ₂ SO ₄	pH 7.6	0	100	0
0.5 M	(NH ₄) ₂ SO ₄	pH 7.6	0	97	3

所有測試之清洗緩衝液為pH 7.6之銨鹽。用作相對離子之陰離子係依照順序排在表5中，這些結果顯示破壞水結構之趨勢（紊向效應），並造成疏水性交互作用強度之相對降低（相對增加疏水性交互作用（鹽析效應）特別有效者）：

漸增之鹽析效應： $\text{SCN}^- < \text{Cl}^- < \text{CH}_3\text{COO}^- < \text{SO}_4^{2-}$

如表5中所示：

- 在NH₄SCN之情況（低鹽析效應），若銨離子濃度太高（≥ 0.3 M），則IFN-B/D直接用清洗緩衝液析出。當NH₄SCN之濃度≤ 0.1 M時，水溶析得到高產率（> 90%）。
- 在NH₄Cl之情況，當NH₄Cl之濃度≤ 0.5 M時，水溶析得到高產率。
- 在醋酸銨之情況，可使用高至0.8 M之濃度，且水溶析可得到高產率。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

五、發明說明()

- 在 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 之情況(高鹽析效應)，可使用高至1.0 M之銨離子濃度，且水溶析可得到高產率。

實施例8：pH及濃度之影響

重覆與實施例7相同之實驗，而改變清洗緩衝液之組成。各個測試之清洗緩衝液及得到之相當之回收產率列於表6中。

表6：IFN-B/D溶析之回收產率

使用之清洗緩衝液			用清洗緩衝液析出之%	用H ₂ O析出之%	用2 M NH ₄ Cl析出之%
0.025 M	醋酸鉀	pH 5.6	0	5	95
0.1 M	醋酸鉀	pH 5.6	0	9	91
0.25 M	醋酸鉀	pH 5.6	0	6	94
0.5 M	醋酸鉀	pH 5.6	0	3	97
0.025 M	TRIS-HCl	pH 5.6	0	21	79
0.1 M	TRIS-HCl	pH 5.6	0	21	79
0.3 M	TRIS-HCl	pH 5.6	0	22	78
0.5 M	TRIS-HCl	pH 5.6	0	17	83
0.025 M	TRIS-HCl	pH 7.6	0	62	38
0.1 M	TRIS-HCl	pH 7.6	0	89	11
0.3 M	TRIS-HCl	pH 7.6	1	89	10
0.5 M	TRIS-HCl	pH 7.6	26	71	3
0.025 M	TRIS-HCl + 1.7 M NaCl	pH 7.6	0	98	2
0.1 M	TRIS-HCl + 1.7 M NaCl	pH 7.6	0	98	2
0.2 M	TRIS-HCl + 1.7 M NaCl	pH 7.6	10	89	1

如表6中所示：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 ()

- 在醋酸鉀 (pH 5.6) 之情況 (低 pH 值; 不含胺) 及在 TRIS-HCl (pH 5.6) 之情況 (低 pH 值; 有胺存在), 水溶析得到之回收產率非常低。
- 在 TRIS-HCl (pH 7.6) 之情況 (接近中性之 pH 值; 有胺存在), 水溶析得到之回收產率佳 (高於 60%)。若胺濃度太高 (> 0.3 M), 則直接用清洗緩衝液產生 IFN-B/D 部份溶析。若胺濃度太低 (< 0.1 M), 則水溶析無法定量, 且剩餘量之 IFN-B/D 其後可使用 2 M NH_4Cl + 0.025 M TRIS-HCl 緩衝液 (pH 7.6) 析出。這最後一個問題可利用 NaCl (濃度為 1.7 M) 之加入而避免, NaCl 將阻止靜止撐體與干擾素蛋白質間之離子交互作用。

實施例 9: 用梯度之溶析

進行與實施例 7 相同之實驗, 使用 0.1 M TRIS-HCl (pH 7.6) 為清洗緩衝液。水溶析得到之回收產率為 89%。IFN-B/D (11%) 之剩餘量隨後用 2 M NH_4Cl + 0.025 M TRIS-HCl 緩衝液 (pH 7.6) 析出。

用相同之清洗緩衝液 (20 毫升之 0.1 M TRIS-HCl (pH 7.6)) 重覆此實驗, 但在此清洗步驟後, 進行 12 倍床體積 (60 毫升) 之從 100% 清洗緩衝液至 100% 去離子水之線性梯度溶析。將管柱另外用 55 毫升水沖洗, 然後使用 7 倍床體積 (35 毫升) 之從 100% 水至 100% 之 2M NH_4Cl + 0.025 M TRIS-HCl 緩衝液 (pH 7.6) 之第二個線性梯度溶析。最後將管柱用 15 毫升之此最後緩衝液沖洗。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 ()

IFN-B/D 被發現在第一個梯度末端，在大約 10 至 5 mM TRIS-HCl (pH 7.6) 之相當濃度下析出，且回收產率為 60%。IFN-B/D (40%) 之剩餘量在第二個梯度中段，在大約 1 M NH₄Cl + 12.5 mM TRIS-HCl (pH 7.6) 之相當濃度下析出。

實施例 10：溶析溶液之組成

重覆與實施例 7 相同之實驗，仍使用 0.1 M TRIS-HCl (pH 7.6) 之溶液為清洗緩衝液，但改變第一個溶析溶液之組成，即水溶析之組成。各個測試之溶析溶液及得到之相當之回收產率列於表 7 中。

表 7：IFN-B/D 溶析之回收產率

溶析溶液	電導度 (mS/cm)	用清洗緩衝液析出之 %	用溶析溶液析出之 %	用 2 M NH ₄ Cl 析出之 %
去離子水	0.0012	0	89	11
0.001 M NaCl	0.17	0	45	55
0.003 M NaCl	0.36	0	18	82
0.005 M NaCl	0.59	0	2	98
0.001 M MES	≤ 0.03	0	59	41
0.010 M MES	≤ 0.03	0	0	100
0.002 M 甘露糖醇	≤ 0.03	0	87	13
0.010 M 甘露糖醇	≤ 0.03	0	77	23
0.5 M 甘露糖醇	≤ 0.03	0	90	10
2.7 M 甘油	≤ 0.03	0	65	35

如表 7 中所示：

- 水中殘留之鹽濃度必須極低 (< 0.001 M)，以得到回收產率高於 50% 之 IFN-B/D 溶析。
- 未帶電荷之溶質如甘露糖醇或甘油可存在溶析溶液中，甚至在高濃度下（在 1 M 之範圍內），但兩性離子

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 ()

則不可以。例如，MES(2-[N-嗎啉]乙磺酸)之濃度必須低於0.001 M，以得到良好的回收產率。

- 一 溶析溶液之電導度不可用作判斷依據，以預測IFN-B/D溶析發生或不發生。

實施例 11：IFN-B 及 IFN-D

實驗係用人類干擾素- α B (IFN-B) 或用人類干擾素- α D (IFN-D)，如實施例 3 中描述之人類雜交干擾素- α B₁D₂B₃B₄ (IFN-B/D) 之方法實施，但使用僅充填 0.5 毫升螯合之西法露快流 (Chelating-Sepharose Fast Flow)[®] (Pharmacia 公司, Uppsala) 之較小玻璃管柱 (直徑 5 毫米)。泵經管柱之相當之流率及相當之溶液體積縮小 10 倍。

IFN-B 及 IFN-D (專利案 EP-A-205404 中描述之 IFN-B/D 之母分子) 係利用在酵母菌 (啤酒酵母菌) 中基因重組之 DNA 表現，發酵，回收及部份純化而產生。

在 0.025 M TRIS-HCl 緩衝液 (pH 7.6) 中得到一 IFN-B 儲液，其具有一 0.05 毫克 / 毫升之干擾素濃度及與實施例 7 中描述之 IFN-B/D 儲液大約相同之純度。

得到一 IFN-D 儲液，其具有與實施例 1 中描述之 IFN-B/D 吸附溶液相同之組成及大約相同之純度。

如實施例 3 中所述，載入管柱之干擾素係連續用一適當緩衝液清洗，用去離子水溶析及用含 2 M 氯化銨之 0.025 M TRIS-HCl 緩衝液 (pH 7.6) 溶析。收集液之干擾素濃度係利用反相高效液相層析術分析測量，如實施例 1 中所述，且利用牛細胞 (Madin-Darby 牛細胞) 上對體外疱狀口炎病毒之生物抗

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 ()

病毒活性分析確定。各個測試之清洗緩衝液及得到之相當之回收產率列於表8中。

表8：IFN-B或IFN-D溶析之回收產率

IFN	使用之清洗緩衝液	用清洗緩衝液析出之%	用H ₂ O析出之%	用2M NH ₄ Cl析出之%
IFN-B	0.1 M TRIS-HCl pH 7.6	0	53	47
"	0.3 M TRIS-HCl pH 7.6	39	61	0
"	0.3 M (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 7.6	18	82	0
"	0.3 M 醋酸銨 pH 7.6	2	98	0
IFN-D	0.01M TRIS-HCl pH 7.6	0	91	9

如表8中所示，IFN-B及IFN-D可用水析出。

實施例12： α -澱粉酶及胰蛋白酶

實驗係用各種蛋白質實施，如實施例3中描述之IFN-B/D，使用相同之FPLC[®]層析術系統、相同量（5毫升）之螯合之西法露快流(Chelating-Sepharose Fast Flow)[®]及相同之層析術條件實施。

測試之蛋白質為：得自桿菌屬之 α -澱粉酶（Sigma產品N° 6380）、得自牛胰臟之胰蛋白酶（Serva產品N° 37260）。各實驗係利用裝入大約50毫升相當之蛋白質溶液（濃度0.5毫克/毫升）之方法，在0.01 M TRIS-HCl緩衝液(pH 7.6)中（若使用TRIS-HCl為以下之清洗緩衝液），或在0.01 M 硼酸鉀緩衝液(pH 7.6)中（若使用硼酸鉀為以下之清洗緩衝液或取消清洗步驟）進行。

如實施例3中所述，載入管柱之蛋白質係連續用一緩衝液（TRIS-HCl或硼酸鉀）清洗，用去離子水溶析及用含2 M 氯化銨之0.025 M TRIS-HCl緩衝液(pH 7.6)溶析。收集液之蛋白

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

五、發明說明 ()

質濃度係利用 Bio-Rad 蛋白質分析法 (Bio-Rad 產品 N° 500-0006, 微量分析法) 測量。測試之蛋白質及清洗緩衝液, 以及得到之相當之回收產率, 列於表 9 中。

表 9: 各個蛋白質溶析之回收產率

蛋白質	使用之清洗緩衝液	用清洗緩衝液析出之 %	用 H ₂ O 析出之 %	用 2M NH ₄ Cl 析出之 %
α-澱粉酶	0.010 M TRIS-HCl pH 7.6	0	71	9
"	0.025 M TRIS-HCl pH 7.6	0	97	3
"	0.050 M TRIS-HCl pH 7.6	0	97	3
"	0.100 M TRIS-HCl pH 7.6	5	89	6
"	0.300 M TRIS-HCl pH 7.6	100	0	0
"	0.100 M 硼酸鉀 pH 7.6	0	15	85
"	0.100 M 硼酸鉀 pH 9.5	0	100	0
"	無清洗緩衝液	—	22	78
胰蛋白酶	0.025 M TRIS-HCl pH 7.6	0	43	57

如表 9 中所示：

- α-澱粉酶 (得自桿菌屬) 可用水析出 (回收產率: 大約 90-100%), 若清洗緩衝液之 pH 值在鹼性範圍內 (例如用 0.1 M 硼酸鉀 (pH 9.5)), 或清洗緩衝液含一接近中性 pH 值及適當濃度之胺 (例如用 0.025 M 至 0.1 M TRIS-HCl (pH 7.6))。
- 胰蛋白酶 (得自牛胰臟) 亦可用水析出 (回收產率高於 40%), 例如使用 0.025 M TRIS-HCl (pH 7.6) 為清洗緩衝液。

實施例 13: 層析介質

進行兩次與實施例 7 相同之實驗, 仍使用 0.1 M TRIS-HCl (pH 7.6) 為清洗緩衝液, 但改變層析介質。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 ()

第一個實驗使用之介質為螯合之西法露快流 (Chelating-Sepharose Fast Flow)[®] (Pharmacia 公司 , Uppsala) , 如在實施例 1 至 12 中所用者。粒徑為 0.045 - 0.165 毫米。螯合之西法露快流 (Chelating-Sepharose Fast Flow) 包含間隔基上之亞胺二乙酸基 , 係利用安定之醚連接鍵耦合至西法露快流 (Sepharose Fast Flow)[®] :

[西法露快流 (Sepharose Fast Flow)]-O-CH₂-CHOH-CH₂-O-CH₂-CHOH-CH₂-N-(CH₂COOH)₂

基質 - 西法露快流 (Sepharose Fast Flow) - 為交聯之瓊脂糖。

第二個實驗使用之介質為 TSK Toyopearl[®] AF-Chelate-650 M (Tosohaas 公司 , Stuttgart) 。粒徑為大約 0.065 毫米。TSK Toyopearl[®] 為一親水性半硬凝膠、一寡乙二醇、甲基丙烯酸縮水甘油酯及二甲基丙烯酸異戊四酯之共聚物。配位子由固著之亞胺二乙酸基組成。

每一個實驗之玻璃管柱 (直徑 10 毫米) 充填 5 毫升各自之凝膠。螯合之西法露快流 (Chelating-Sepharose Fast Flow)[®] 介質及 TSK Toyopearl AF-Chelate-650 M[®] 介質使用相同之再生及製備方法 (載入銅離子) , 如實施例 3 中所述。使用之 IFN-B/D 之吸附溶液為實施例 7 中描述之儲液。得到之相當之回收產率列於表 10 中。在兩情況中, 用水溶析得到高回收產率。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 ()

表 10：各個層析介質之 IFN-B/D 溶析之回收產率（清洗緩衝液為 0.1 M TRIS-HCl (pH 7.6)）

層析介質	凝膠之基質	用清洗緩衝液析出之%	用 H ₂ O 析出之%	用 2M NH ₄ Cl 析出之%
螯合之西法露快流 (Chelating-Sepharose Fast Flow) [®]	瓊脂糖	0	89	11
TSK Toyopearl AF-Chelate-650 M [®]	“乙烯基聚合物”型	0	100	0

微生物之寄存

以下之微生物菌株係寄存在德國菌體收集中心 (DSM)，地址：德國，D-38142 布朗席維格，馬歇歐得路 1B（登錄號及寄存日期如下）：

啤酒酵母菌 HT 393 DSM 9697 27.01.1995

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

修正
89.11.22 補充

A5
B5

四、中文發明摘要(發明之名稱：提高干擾素濃度之方法)

本方法有關用銅螯合物-親和力層析術之蛋白質新純化方法，其中不純或純化前之蛋白質吸附在固定之銅(II)離子上，選擇性地用緩衝劑及去離子清洗，用一路易士鹼溶液清洗，最後用去離子水溶析。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

英文發明摘要(發明之名稱：PROCESS FOR THE ENRICHMENT OF INTERFERON)

The instant invention relates to a new method for the purification of proteins using copper chelate-affinity chromatography, wherein the impure or pre-purified protein is adsorbed on immobilized copper(II) ions, optionally washed with buffer and deionized water, washed with a solution of a Lewis-base, and finally eluted with deionized water.

訂

線

六、申請專利範圍

1. 一種提高干擾素濃度之方法，該方法包括下列步驟：
 - a) 將不純或純化前之干擾素吸附在固定之銅(II)離子上，
 - b) 用一含中性或低鹼性pH範圍之 NH_4^+ 或第一、第二或第三胺、或高鹼性pH範圍之 OH^- 之路易士鹼溶液清洗吸附之干擾素，及
 - c) 用去離子溶析期望之干擾素。
2. 如申請專利範圍第1項之方法，其中銅(II)離子係固著在一靜止撐體上。
3. 如申請專利範圍第2項之方法，其中靜止撐體為瓊脂糖或乙烯基型聚合物。
4. 如申請專利範圍第1項之方法，其中路易士鹼溶液含 NH_4^+ 或第一、第二或第三胺。
5. 如申請專利範圍第1項之方法，其中路易士鹼溶液含 NH_4^+ 或第一胺。
6. 如申請專利範圍第1項之方法，其中路易士鹼溶液含 OH^- 在緩衝之pH範圍9-11。
7. 如申請專利範圍第1項之方法，其中路易士鹼係選自由乙醇胺、脘胺酸、 NH_4SCN 、 NH_4Cl 、 $\text{NH}_4^+\text{CH}_3\text{COO}^-$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 及 TRIS-HCl 組成之一組。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

須請送交員司示，本案修正

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

六、申請專利範圍

8. 如申請專利範圍第1項之方法，其中使用之路易士鹼之濃度為0.001至1 M。
9. 如申請專利範圍第1項之方法，其中路易士鹼溶液額外含一或多種非路易士鹼之鹽。
10. 如申請專利範圍第9項之方法，其中額外之鹽為NaCl或KCl。
11. 如申請專利範圍第9項之方法，其中額外使用之鹽之濃度高至5 M。
12. 如申請專利範圍第9項之方法，其中額外使用之鹽之濃度高至2 M。
13. 如申請專利範圍第4項之方法，其中路易士鹼係調至pH 6-9。
14. 如申請專利範圍第1項之方法，其中去離子水不含超過0.001 M離子化合物。
15. 如申請專利範圍第1項之方法，其中干擾素之特徵為路易士鹼完全不破壞該干擾素與銅(II)離子間之複合物。
16. 如申請專利範圍第1項之方法，其中干擾素為干擾素- α 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

17. 如申請專利範圍第1項之方法，其中去離子水含非離子化合物。
18. 如申請專利範圍第1項之方法，其中去離子水含糖或多醇。
19. 如申請專利範圍第1項之方法，其中去離子水含甘露糖醇或甘油。
20. 如申請專利範圍第1項之方法，其中被吸附之干擾素係用一非路易士鹼緩衝液清洗，及／或在用路易士鹼溶液清洗前用去離子水清洗。
21. 如申請專利範圍第1項之方法，其中干擾素在固著之銅(II)離子上之吸附及用一路易士鹼溶液之處理步驟係同時進行。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

89.11.22
年 月 日
修正
補充

申請日期	85.7.12
案 號	85108439
類 別	C07K 1/18, 14/56

公告本

442492

中文說明書修正頁(89年11月)

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	提高干擾素濃度之方法
	英 文	PROCESS FOR THE ENRICHMENT OF INTERFERON
二、發明 創作人	姓 名	1. 皮瑞·凡可斯·佛魁克斯 2. 卡撒琳·庚歐格斯
	國 籍	1. 瑞士 2. 比利時
	住、居所	1. 瑞士，4053巴塞爾，貴德丁格街133號 2. 瑞士，4147埃詩，梨園9號
三、申請人	姓 名 (名稱)	瑞士商諾華公司
	國 籍	瑞士
	住、居所 (事務所)	瑞士巴塞爾市史克瓦司伍德利路215號
	代 表 人 姓 名	亞瑟·凱能尼克 克里斯多夫·湯姆

015656559 DCCMFY

- 1 -

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

裝 訂 線

修正
89.11.22 補充

A5
B5

四、中文發明摘要(發明之名稱：提高干擾素濃度之方法)

本方法有關用銅螯合物-親和力層析術之蛋白質新純化方法，其中不純或純化前之蛋白質吸附在固定之銅(II)離子上，選擇性地用緩衝劑及去離子清洗，用一路易士鹼溶液清洗，最後用去離子水溶析。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

英文發明摘要(發明之名稱：PROCESS FOR THE ENRICHMENT OF INTERFERON)

The instant invention relates to a new method for the purification of proteins using copper chelate-affinity chromatography, wherein the impure or pre-purified protein is adsorbed on immobilized copper(II) ions, optionally washed with buffer and deionized water, washed with a solution of a Lewis-base, and finally eluted with deionized water.

訂

線

六、申請專利範圍

1. 一種提高干擾素濃度之方法，該方法包括下列步驟：
 - a) 將不純或純化前之干擾素吸附在固定之銅(II)離子上，
 - b) 用一含中性或低鹼性pH範圍之 NH_4^+ 或第一、第二或第三胺、或高鹼性pH範圍之 OH^- 之路易士鹼溶液清洗吸附之干擾素，及
 - c) 用去離子溶析期望之干擾素。
2. 如申請專利範圍第1項之方法，其中銅(II)離子係固著在一靜止撐體上。
3. 如申請專利範圍第2項之方法，其中靜止撐體為瓊脂糖或乙烯基型聚合物。
4. 如申請專利範圍第1項之方法，其中路易士鹼溶液含 NH_4^+ 或第一、第二或第三胺。
5. 如申請專利範圍第1項之方法，其中路易士鹼溶液含 NH_4^+ 或第一胺。
6. 如申請專利範圍第1項之方法，其中路易士鹼溶液含 OH^- 在緩衝之pH範圍9-11。
7. 如申請專利範圍第1項之方法，其中路易士鹼係選自由乙醇胺、脘胺酸、 NH_4SCN 、 NH_4Cl 、 $\text{NH}_4^+\text{CH}_3\text{COO}^-$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 及 TRIS-HCl 組成之一組。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

須請送員時，本表修正

經濟部中央標準局員工消費合作社印製