

## (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2014年6月26日 (26.06.2014)



(10) 国际公布号  
WO 2014/094579 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 19/00 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)  
C07K 14/505 (2006.01) A61K 38/18 (2006.01)  
C12N 15/62 (2006.01) A61P 7/06 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2013/089544

(22) 国际申请日: 2013年12月16日 (16.12.2013)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
201210551666.7 2012年12月18日 (18.12.2012) CN

(71) 申请人: 联亚生技开发股份有限公司 (UNITED BIOMEDICAL, INC., ASIA) [CN/CN]; 中国台湾省新竹县湖口乡光复北路45号, Taiwan 30351 (CN)。

(72) 发明人: 彭文君 (PENG, Wen-Jiun); 中国台湾省新竹县湖口乡光复北路45号, Taiwan 30351 (CN)。 杨淑萍 (YANG, Shu-Ping); 中国台湾省新竹县湖口乡光复北路45号, Taiwan 30351 (CN)。 彭宏智 (PENG, Hung-Chih); 中国台湾省新竹县湖口乡光复北路45号, Taiwan 30351 (CN)。 陈郁鸿 (CHEN, Yu-Hung); 中国台湾省新竹县湖口乡光复北路45号, Taiwan 30351 (CN)。

(74) 代理人: 中科专利商标代理有限责任公司 (CHINA SCIENCE PATENT AND TRADEMARK AGENT

LTD.); 中国北京市海淀区西三环北路87号国际财经中心D座11层, Beijing 100089 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: RECOMBINANT PROTEIN

(54) 发明名称: 重组蛋白

(57) Abstract: Provided is a recombinant protein, comprising erythropoietin and highly glycosylated fragments. The recombinant protein has the bioactivity of erythropoietin and has a relatively long half-life. The recombinant protein can also comprise a carboxyl-terminal peptide of human chorionic gonadotropin and a carboxyl-terminal peptide of thrombopoietin.

(57) 摘要: 提供了一种重组蛋白, 包括红细胞生成素, 以及高糖基化片段。该重组蛋白具有红细胞生成素的生物活性, 且具有较长的半衰期。所述重组蛋白还可包括人类绒毛膜促性腺激素的羧基末端肽, 以及促血小板生成素的羧基末端肽。



WO 2014/094579 A1

## 重组蛋白

**【技术领域】**

**【0001】** 本发明涉及一种重组蛋白，特别涉及一种具有较长半衰期的高糖基化的红细胞生成素。

**【先前技术】**

**【0002】** 红细胞生成素 (Erythropoietin, 简称 EPO) 是一种糖蛋白质激素，骨髓中红细胞前驱的细胞因子。在人体中，可进行红细胞的制造、荷尔蒙的调节。同时，它也具有其他的生物功能，例如，当神经受到伤害时，细胞生成激素也参与伤口愈合过程。

**【0003】** 红细胞生成作用是指红细胞的生成，其作用为弥补被破坏的细胞。红细胞生成是一种受控制的生理机制，使足够的红细胞可被运用于适当的组织氧合作用。人类红细胞生成素 (hEPO) 由肾所产生，为一种体液血浆因子，可刺激红细胞的生成 (Carnot, P and Deflandre, C (1906) C.R. Acad. Sci. 143:432; Erslev, AJ (1953) Blood 8: 349; Reissmann, RR (1950) Blood 5: 372; Jacobson, LO, Goldwasser, E, Freid, W and Plzak, LF (1957) Nature 179: 6331-4)。自然生成的 EPO 可刺激骨髓中红细胞前驱细胞的分裂及分化，并经由与红细胞前驱物受体的结合而展现其生物活性 (Krantz, BS (1991) Blood 77:419)。

**【0004】** 利用重组体 DNA 技术已可合成红细胞生成素 (Egrie, JC, Strickland, TW, Lane, J et al. (1986) Immunobiol. 72: 213-224)，将经选殖的人类 EPO 基因嵌入，并以中国仓鼠卵巢组织细胞表达。EPO 多肽在无糖情形下的分子量是 18,236 Pa。在完整的 EPO 分子中，分子量中约有 40% 为碳水化合物基团，其在蛋白质糖基化作用位置上将蛋白质糖基化 (Sasaki, H, Bothner, B, Dell, A and Fukuda, M (1987) J. Biol. Chem. 262: 12059)。

【0005】 因红细胞生成素是形成红细胞所必要的，所以EPO可用来治疗红细胞低下或缺失的血液失调症。就临床而言，EPO可用于治疗慢性肾衰竭病人(CRF)(Eschbach, JW, Egri, JC, Downing, MR et al. (1987) NEJM 316: 73-78; Eschbach, JW, Abdulhadi, MH, Browne, JK et al. (1989) Ann. Intern. Med. 111: 992; Egrie, JC, Eschbach, JW, McGuire, T, Adamson, JW(1988) Kidney Intl. 33: 262; Lim, VS, Degowin RL, Zavala, D et al. (1989) Ann. Intern. Med. 110:108-114)、AIDS及接受化疗的癌症病人的贫血(Danna, RP, Rudnick, SA, Abels, RI In: MB, Garnick, ed. Erythropoietin in Clinical Applications-An International Perspective. New York, NY: Marcel Dekker; 1990: p. 301-324)。然而，目前EPO蛋白质治疗的生物利用率，受限于不良的血浆半衰期，以及蛋白酶的降解作用，使其难以获得良好的临床效力。

### 【发明内容】

【0006】 本发明的目的为提供一种具有较长半衰期的高糖基化红细胞生成素。

【0007】 为达上述目的，本发明提供一种重组蛋白，包括红细胞生成素，以及高糖基化片段。

【0008】 本发明更提供一种核苷酸序列，其编码上述重组蛋白。

【0009】 本发明更提供一种细胞，其转染上述核苷酸序列以表达上述重组蛋白。

【0010】 本发明更提供一种组成物，包括上述重组蛋白，以及药学上可接受的载体或佐剂。

【0011】 为了让本发明的上述和其他目的、特征、和优点能更明显易懂，下文特举较佳实施例，并配合所附图示，作详细说明如下：

**【附图说明】****【0012】**

图 1 显示本发明 EPO-NNCT、NNCT-EPO、EPO-N1N2、N1N2-EPO、EPO-N1、EPO-N2 基因片段的设计。

图 2 显示本发明 EPO-NNCT 与市售 Eprex® 的活性比较。

图 3 显示本发明 EPO-NNCT 与市售 Eprex® 药物动力特性 (PK) 的比较 (静脉注射)。

图 4 显示本发明 EPO-NNCT 与市售 Eprex® 药物动力特性 (PK) 的比较 (皮下注射)。

图 5 显示本发明 EPO-N1N2、N1N2-EPO、NNCT-EPO 与市售 Eprex® 药物动力特性 (PK) 的比较 (皮下注射)。

**【实施方式】**

**【0013】** 本发明提供一种长效型红细胞生成素，及其制备与使用方法。

**【0014】** 在一个实施方案中，本发明提供一种重组蛋白，其包括红细胞生成素以及高糖基化片段。

**【0015】** 本发明所述的“红细胞生成素 (EPO)”包括任何来源的 EPO 蛋白，特别是指人类或动物 EPO。本发明的 EPO 不限于自然的 EPO 蛋白，也包括其衍生物、相似物、修饰物、突变物等，只要其具有自然 EPO 蛋白的活性即可。

**【0016】** 本发明也包括任何具有 EPO 活性的蛋白质，例如突变或其他修饰蛋白等。可藉由 DNA 重组技术在 CHO、BHK、COS、HeLa 或 PER.C6 或其他适合的细胞株中表达重组 EPO，相关内容可参考美国专利 US5,733,761、US5,641,670、US5,733,746、US5,994,122、US5,733,761、US5,641,670、US5,981,214 及 US5,272,071。EPO 的制备与治疗上应用可参考 US 5,547,933、US 5,621,080, Huang, S. L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 2708-2712, Lai, P. H. et al., J. Biol. Chem. 261 (1986) 3116-3121, Sasaki, H. et al., J. Biol. Chem. 262 (1987) 12059-12076。较佳的 EPO 种类为

人类 EPO。

**【0017】** 本发明所述的“高糖基化片段”系指具有至少一糖基的 10-30 个氨基酸片段。本发明的高糖基化片段具有一或多个 N-或 O-连接糖基化位置，可产生一个或多个糖基。例如，SEQ ID NO:1 及/或 2，或与 SEQ ID NO:1、2 所示序列相似度在 60%、65%、70%、80%，优选为 90%、95%、99% 以上的序列。

**【0018】** 高糖基化片段与 EPO 融合形成本发明的重组蛋白，高糖基化片段可位于 EPO 的氨基端(N 端)或羧基端(C 端)，且数目并无特别限制。例如，可于 EPO 的 N 端及/或 C 端连接一个或多个相同或不同的高糖基化片段。含有高糖基化片段的 EPO 具有较长的半衰期，以及较佳的活性。在一个实施方案中，高糖基化片段(SEQ ID NO: 1 及/或 2)可位于 EPO 的 N 端或 C 端，如第 1 图所示。

**【0019】** 高糖基化片段包括，但不限于，SEQ ID NO:1 及/或 2。可在 EPO 的 C 端连接一个或多个相同或不同的高糖基化片段。例如，在 EPO 的 C 端连接 SEQ ID NO:1 或 2，或连接 2 个以上的 SEQ ID NO:1 或 2；或在 EPO 的 C 端依次连接 SEQ ID NO:1 与 2，或依次连接 SEQ ID NO:2 与 1。在另一个实施方案中，EPO 的 C 端依次连接 SEQ ID NO:1 与 2。

**【0020】** 本发明重组蛋白可更包括人类绒毛膜促性腺激素(human Chorionic Gonadotropin, hCG)的羧基末端肽(carboxy terminal peptide)。

**【0021】** 本发明所述的“人类绒毛膜促性腺激素的羧基末端肽(以下简称 CTP)”系指人类绒毛膜促性腺激素第 112-118 至 145 位氨基酸的片段，或具有相同生物活性的变异体或类似物。因可分别从 hCG 的第 112、113、114、115、116、117 或 118 个氨基酸开始，因此 CTP 可为具有 28、29、30、31、32、33 或 34 个氨基酸的片段。

**【0022】** 本发明的 CTP 包括，但不限于，SEQ ID NO:3，或与 SEQ ID NO:3 所示序列相似度在 65%、70%、80%，90%，

优选为 95%以上的序列。

【0023】 本发明的 CTP 可与 EPO(N 端或 C 端)及/或高糖基化片段(N 端或 C 端)连接,且数目并无特别限制。例如,可在 EPO 的 N 端或高糖基化片段的 C 端连接一个或多个相同或不同的 hCG 的 CTP。

【0024】 本发明的 CTP 可作为蛋白质或肽的保护者,抑制蛋白质或肽的分解。在本发明中,hCG 的 CTP 可延长重组蛋白的半衰期,以及增进重组蛋白的效价。

【0025】 本发明重组蛋白可更包括促血小板生成素(Thrombopoietin, TPO)的羧基末端肽。

【0026】 本发明所述的“血小板生成素的羧基末端肽(以下简称 TpS)”系指促血小板生成素第 176 至 353 位氨基酸的片段,优选为第 337 至 353 位氨基酸的片段,或具有相同生物活性的变异体或类似物。

【0027】 本发明的 TpS 包括,但不限于,SEQ ID NO:4,或与 SEQ ID NO:4 所示序列相似度在 65%、70%、80%、90%,优选为 95%、99%以上的序列。

【0028】 本发明的 TpS 可与 EPO(N 端或 C 端)、高糖基化片段(N 端或 C 端)及/或 CTP(N 端或 C 端)连接,且数目并无特别限制。在一个实施方案中,可在 EPO 的 N 端或高糖基化片段的 C 端连接一个或多个相同或不同的 TpS。在另一个实施方案中,可在 EPO 的 N 端或 CTP 的 C 端连接一个或多个相同或不同的 TpS。

【0029】 本发明 TpS 可作为蛋白质或肽的保护者,抑制蛋白质或肽的分解。TpS 可延长重组蛋白的半衰期,以及促进重组蛋白的效价。

【0030】 在本发明中,EPO、高糖基化片段、CTP 与 TpS 的数目与排列并无特别限制。

【0031】 在一个实施方案中,本发明的重组蛋白包括 SEQ ID NO:1、2、3 与 4。

【0032】 在另一个实施方案中,本发明的重组蛋白可择自

于 SEQ ID NO: 5 (EPO-NNCT)、6 (NNCT-EPO)、7 (EPO-N1N2)、8 (N1N2-EPO)、9 (EPO-N1)、10 (EPO-N2)。

【0033】 本发明的高糖基化片段、CTP 与 TpS 也包括经修饰的高糖基化片段、CTP 与 TpS。熟悉此技术领域人士可以一般传统的技术对肽或 DNA 序列进行修饰。例如，蛋白质序列的修饰可包括改变、置换、取代、插入或删除编码序列中的一个或多个氨基酸。改变、置换、取代、插入或删除序列所使用的方法为一般所熟知的技术。序列在改变、置换、取代、插入或删除后，优选仍保有原本高糖基化片段、CTP 与 TpS 的活性。

【0034】 在一个实施方案中，修饰包括，但不限于，N-端修饰、C-端修饰、多肽链修饰，如  $\text{CH}_2\text{-NH}$ 、 $\text{CH}_2\text{-S}$ 、 $\text{CH}_2\text{-S=O}$ 、 $\text{O=C-NH}$ 、 $\text{CH}_2\text{-O}$ 、 $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ 、 $\text{S=C-NH}$ 、 $\text{CH=CH}$  或  $\text{CF=CH}$ 、骨架修饰 (backbone modifications) 与残基修饰 (residue modification)。肽化合物的制备方法已为熟知，例如，可参照 Quantitative Drug Design, C. A. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992)。

【0035】 在一个实施方案中，多肽中的肽键 ( $-\text{CO-NH}-$ ) 可被取代，例如，可被 N-甲基键 ( $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{-CO}-$ )、酯键 ( $-\text{C}(\text{R})\text{H-C-O-O-C}(\text{R})\text{-N}-$ )、酮甲基 (ketomethylen) 键 ( $-\text{CO-CH}_2-$ )、 $\alpha$ -aza 键 ( $-\text{NH-N}(\text{R})\text{-CO}-$ )，其中 R 为任意烷基、羟乙基键 ( $-\text{CH}(\text{OH})\text{-CH}_2-$ )、硫代酰胺 (thioamide) 键 ( $-\text{CS-NH}-$ )、烯双键 ( $-\text{CH=CH}-$ )、酰胺键 ( $-\text{NH-CO}-$ )、多肽衍生物 ( $-\text{N}(\text{R})\text{-CH}_2\text{-CO}-$ ) 取代。

【0036】 本发明另提供一种核苷酸序列，其编码本发明的重组蛋白。

【0037】 本发明的“核苷酸”系指单股或双股的核苷酸序列，其可由 RNA 序列、cDNA 序列、基因序列和/或上述的组合。

【0038】 在本发明的核苷酸序列可利用 PCR 技术或其它熟知的技术制备，相关技术可参考，例如，“Current Protocols in Molecular Biology”，eds. Ausubel et al., John Wiley

& Sons, 1992。

【0039】 本发明的核苷酸序列可插入表达载体以表达重组蛋白。在一个实施方案中，表达载体包括其它额外的多肽，使其可在原核或真核细胞中复制与重组。在另一个实施方案中，本发明的表达载体包括转录与转译的起始序列(如，启动子或增强子)以及转录与转译的终止序列(如，polyadenylation signals)。

【0040】 可使用各种真核或原核细胞作为宿主表达系统，以表达本发明的核苷酸序列。在一个实施方案中，此表达系统包括，但不限于，各种微生物，例如，细菌、真菌，植物细胞，真核细胞(例如，哺乳动物细胞，CHO细胞)等。

【0041】 本发明的表达载体可利用各种方法转染至细胞中。此方法可参考 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), in Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., *Somatic Gene Therapy*, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., *Gene Targeting*, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworths, Boston Mass. (1988)以及 Gilboa et al. [*Biotechniques* 4 (6): 504-512, 1986], 且包括，例如，稳定或暂时性转染、脂质体转染、电穿孔转染、或感染重组病毒载体。

【0042】 本发明另提供一种组合物，包括上述的重组蛋白，以及药学上可接受的载体或赋形剂。

【0043】 本发明所述的“药学上可接受的载体或赋形剂”系指不会刺激个体组织，且不会抑制给予药物或化合物的生物活性及特性的载体、赋形剂或佐剂。载体包括，但不限于，聚乙二醇(PEG)、或可溶于有机介质与水性介质的生物相容性聚合物。赋形剂包括，但不限于，碳酸钙、磷酸钙、各种糖类和淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油与聚乙二醇。



【0044】 本发明的组合物可用于治疗贫血患者。贫血患者包括，但不限于，慢性肾功能不全患者、终末期肾脏病患者、接受透析的患者、慢性肾功能衰竭患者、艾滋病患者，癌症患者、化疗患者，以及预定接受非心脏、非血管外科手术的贫血患者。

【0045】 在给予贫血患者治疗有效量的本发明组合物后，可有效地增加贫血患者的血球容积比，且于本发明的高糖基化红细胞生成素在个体中具有较长的半衰期。本发明的高糖基化红细胞生成素具有比市售红细胞生成素(如，Eprex®及Aranesp®)更长的半衰期，例如，本发明高糖基化红细胞生成素的半衰期是市售红细胞生成素的1倍以上，优选2倍以上，更优选3倍以上。在另一个实施方案中，本发明的高糖基化红细胞生成素具有比市售红细胞生成素(如，Eprex®及Aranesp®)更长的半衰期、更高的AUC值(area under curve)、C<sub>max</sub>值、与更长的T<sub>max</sub>值。

【0046】 本发明所述的“治疗有效量”一般系指约1至10000 I.U./个体重量 kg，优选约50至2000 I.U./个体重量 kg，更优选约50至600 I.U./个体重量 kg，最优选约50至300 I.U./个体重量 kg。本发明的组合物可在任何所需的频率或间隔给药。给药的方式，例如，可为每两周三次，每周一次，每两周一次，每三周一次，每月一次，每五周一次，每六周一次，或更频繁或不频繁的间隔，或在任何所需的频率，或任何的时间间隔组合。本发明的活性成份的剂量可依照个体的种类，个体的大小、疾病的严重性等做适当的调整。例如，若个体为接受化疗的癌症患者，则给药频率可为每三周一次，以配合化疗的时程。

### 【实施例】

【0047】 实施例 1. 宿主表达细胞

【0048】 本实施例的宿主表达细胞使用缺少二氢叶酸还原酶的中国仓鼠卵巢细胞(CHO dhfr<sup>-</sup>)，其购买自台湾食品工

业发展研究所的生物资源保存及研究中心(CCRC, 60133)。将 CHO dhfr-细胞培养于 IMDM 培养基(Isocoves Modified Dulbecco's Medium IMDM; Gibco Cat. 12200-36)中, 其中含有 10%的胎牛血清(Gibco Cat. 10091148)、次黄嘌呤与胸腺嘧啶(Gibco, Cat. 11067-030)、以及 2 mM 的 L-麸酰胺(Gibco Cat. 25030-081)。Dhfr(-)标志被用来表达及筛选。藉由使用二氢叶酸还原酶抑制剂“甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)”(Sigma Cat no. M8407)使 dhfr 基因表达。当 dhfr 基因表达时, 其他邻近基因也被一起表达, 选择表达量高的细胞株, 将细胞培养于 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中(Model 3326, Forma scientific)。

**【0049】** 实施例 2. 表现载体的构建

**【0050】** 2.1 EPO-NNCT

**【0051】** 利用组合式 PCR(assembly PCR), 将 EPO-NNCT 基因片段(SEQ ID NO:5)插入 pcDNA3.1/Neo (+)/DHFR 载体, 形成 pND/EPO-NNCT 载体。此表达载体包含作为筛选标志的抗新霉素基因(neomycin-resistance gene)。EPO-NNCT 的基因片段如图 1 所示, 其中 EPO 为红细胞生成素, N1 为高糖基化片段 1(SEQ ID NO:1), N2 为高糖基化片段 2(SEQ ID NO:2), CTP 为人类绒毛膜促性腺激素的羧基末端肽(SEQ ID NO:3), TpS 为促血小板生成素的羧基末端肽(SEQ ID NO:4)。

**【0052】** 2.2 NNCT-EPO

**【0053】** 利用 PCR 及 LSP-N-S1 引物

(3'-cctagggccaccatgggggtgcacgaatgtcctgcctggctgtggcttcctctgctgctgctgctcctctgg-5')、LSP-N-S2 引物

(3'-ctgtccctgctgctgctcctctgggcctcccagtcctgggcgaggccgagaatatacgaacgggcggtaac-5')与 ENNCT1-A 引物

(3'-ctcggtgtgacagatgaggcgtgggtggggccccttctgagacagattctgggagtggtgtaggatg-5')由 pND/EPO-NNCT 质粒复制 NNCT 的 DNA 片段, 以获得 NNCT-EPO 片段, 如图 1 所示。将 NNCT-EPO 片段插入表达载体, 获得 PPD/NNCT-EPO 载体。此表达载体包

含作为筛选标志的抗新霉素基因 (puromycin-resistance gene)。

**【0054】** 2.3 EPO-N1N2

**【0055】** 利用 PCR 及 E-S 引物

(3'-cctagggccaccatgggggtgcacgaatgtcctgcc-5') 与 ENNCT2-A 引物

(3'-gtatacctacagctgcagagtctcgttcacctgggaagag-5') 由 PND/EPO-NNCT 质粒复制 EPO-N1N2 的 DNA 片段, 以获得 EPO-N1N2 片段, 如图 1 所示。将 EPO-N1N2 片段插入表达载体中, 获得 PPD/NNCT-EPO 载体。此表达载体包含作为筛选标志的抗新霉素基因 (puromycin-resistance gene)。

**【0056】** 2.4 N1N2-EPO

**【0057】** 委托 GENEWIZ, Inc 合成 N1N2-EPO 的 DNA 片段 (如图 1 所示), 并插入表达载体中, 获得 PPD/ N1N2-EPO 载体。此表达载体包含作为筛选标志的抗新霉素基因 (puromycin-resistance gene)。

**【0058】** 2.5 EPO-N1

**【0059】** 利用 PCR 及 E-S 引物 (3'-cctagggccaccatgggggtgcacgaatgtcctgcc-5') 与 ENNCT4-A 引物 (3'-gtatacctagtagtctgggacagtgatattctc-5') 由 PND/EPO-NNCT 质粒复制 EPO-N1 的 DNA 片段, 如图 1 所示。将 EPO-N1 片段插入表达载体中, 获得 PPD/EPO-N1 载体。此表达载体包含作为筛选标志的抗新霉素基因 (puromycin-resistance gene)。

**【0060】** 2.6 EPO-N2

**【0061】** 利用 PCR 及 E-S 引物 (3'-cctagggccaccatgggggtgcacgaatgtcctgcc-5') 与 ENNCT5-A 引物 (3'-gtatacctacagctgcagagtctcgttcacctgggaagagttgaccaacagttctgtcccctgtcctgcaggectccc-5') 由 PND/EPO-NNCT 质粒复制 EPO-N2 的 DNA 片段, 以获得 EPO-N2 片段, 如图 1 所示。将 EPO-N2 片段插入表达载体中, 获得 PPD/EPO-N1 载体。此表达载体包含作为筛选标志的抗新霉素基因 (puromycin-resistance gene)。

**【0062】** 3. 重组细胞株的建立

**【0063】** 将含有人类 EPO-NNCT 基因的载体以电脉冲法 (PA4000 PulseAgile® electroporator, Cyto Pulse Sciences) 转染至 CHO dhfr-细胞内。首先将细胞以胰蛋白酶处理后, 将细胞悬浮于 CP-T 缓冲液 (Cyto pluse Cat. CP-T) 中使细胞密度为  $3 \times 10^6$  细胞/ml。将  $200 \mu\text{l}$  的细胞悬浮液 ( $6 \times 10^5$  细胞) 与  $10 \mu\text{g}$  的 pND/BMP2 混合后进行电脉冲处理, 将经电脉冲处理的细胞培养于不含筛选物质的完全培养基 (含 10% 胎牛血清及 HT 补充物 (HT Supplement) 的 IMDM) 使细胞恢复成长。培养于不含筛选物质的培养基 48 小时后, 将细胞移至含有 IMDM、10% 胎牛血清、L-麸酰胺及  $5 \text{ nM}$  甲氨蝶呤的含筛选物质的完全培养基中。在培养 2 周后, 将细胞株移至 96 孔盘中, 并利用 ELISA 定量分析筛选出高表达 rhBMP-2 的细胞株。将筛选出的细胞培养于筛选培养基中。将细胞稀释至 1 细胞/ $100 \mu\text{l}$  的浓度后移至 96 孔盘中培养至生长成细胞丛。利用 ELISA 检测并定量 BMP-2 蛋白, 再依据 ELISA 的结果筛选出高产量细胞并逐步增加 MTX 浓度从  $0.005$ 、 $0.01$ 、 $0.02$  至  $0.05 \mu\text{M}$ 。

**【0064】** 4. 批次培养

**【0065】** 将实施例 3 所获得的高产量细胞进行批次培养。使用  $50 \text{ ml}$  搅拌式培养槽, 接种  $4 \times 10^5$  细胞/ml 的细胞在无血清的培养基中培养一个批次, 且每天记录细胞生长状况及收集培养基以进行定量, 在给予  $0.02 \mu\text{M}$  MTX 的条件下, 其产量可达  $140.69 \mu\text{g/ml}$ , 如表一所示。

**【0066】** 表一、批次培养结果

最高产量 ( $\mu\text{g/ml}$ )	140.9
最大细胞浓度 ( $10^6$ 细胞/ml)	2.42
IVC ( $10^6$ 细胞-天)	14.60
q (pg/细胞/天)	9.63

**【0067】** 5. 生物活性分析

**【0068】** 本实施例参照欧洲药典 5.2 (Erythropoietini

solution concentrata)的规定进行。将 8-10 周龄 BALB/c 母鼠分为 2 组，分别以皮下注射的方式给予不同剂量(21、42、84、168、336、672 ng/ml)的本发明 EPO-NNCT 与市售 Eprex®。注射后，抽取 0.25 ml 的全血，将细胞染色后，以细胞流式仪及 CellQuest Pro 软件进行分析，结果如表二所示。由图 2 可知，在相同剂量下，给予本发明 EPO-NNCT 的小鼠的平均网状红细胞数高于给予 Eprex®。

【0069】 表二、注射后网状红细胞的含量

	剂量 (ng/ml)	网状红细胞 (平均%)
EPO-NNCT	672	23.15
	336	19.45
	168	16.14
	84	13.17
	42	11.47
	21	10.52
Eprex®	672	15.50
	336	14.05
	168	11.57

【0070】 将 25 只 8 周龄的 BALB/c 小鼠分成 5 组，并分别给予 336 ng/ml 的 EPO-NNCT 与 Eprex®。在注射后，采集第 4-9、13 天的血液。以流式细胞仪计数网状红细胞的数目，并利用 CellQuest Pro 软件进行分析，结果如表三所示。由表三可知，在第 7 天时，本发明 EPO-NNCT 的小鼠的平均网状红细胞数达到最高，且远高于控制组 Eprex 的效果。

【0071】 表三、注射后不同天数网状红细胞的比率

	天数	网状红细胞 (平均 %)	S. D.	CV
EPO-NNCT	5	20.33	2.38	11.70
	6	27.26	1.99	7.29
	7	28.12	2.11	7.51

	8	25.42	2.17	8.55
	9	16.37	3.09	18.89
	13	5.21	0.53	10.19
Eprex®	5	11.28	1.56	13.86
	6	7.42	0.81	10.97
	7	6.35	1.16	18.22
	8	11.11	1.22	10.95
	9	10.76	2.40	22.31
	13	8.61	0.92	10.67

**【0072】** 6. 药物动力学分析

**【0073】** 将 14 只 8 周龄大鼠分为 4 组，分别以静脉与皮下注射的方式给予本发明的 EPO-NNCT、市售 Eprex®及市售 Aranesp®, 给予剂量为 2000 IU/kg。注射后，分别于第 5 分钟、10 分钟、15 分钟、30 分钟、1、2、5、8、24、30、48、72、96、120、168、216、264、336 小时采血，经离心取得血清，保存于-70℃。以 Quantikine® IVD® Epo ELISA 套组进行分析，读取 450 与 600 nm 的吸光值，并以 SoftMax® Pro 5 软件进行分析，结果如表四所述。参照图 3-4，相较于市售 Eprex®及 Aranesp®, 本发明的 EPO-NNCT 具有较高的半衰期 (25-26 小时)，以及较高的 AUC (Area under the Curve) 值 (8387-4502 ng·hr/ml)。

**【0074】** 表四、EPO-NNCT 药物动力学分析结果

	半衰期 (hr)	AUC (ng·hr/ml)	Cmax (ng/ml)	Tmax (hr)
静脉注射				
EPO-NNCT (n=2)	25.03	8387.44	-	-
Aranesp® (n=2)	17.89	5694.75	-	-
Eprex® (n=3)	6.35	269.96	-	-
皮下注射				
EPO-NNCT (n=2)	26.53	4502.90	68.19	24

Aranesp® (n=2)	17.78	2547.34	58.16	24
Eprex® (n=3)	7.14	169.55	6.88	10

【0075】 同样地，相较于市售 Eprex®，本发明的 EPO-N1N2、N1N2-EPO、NNCT-EPO 也具有较高的半衰期(21-30 小时)，以及较高的 AUC(Area under the Curve)值(370-981 ng·hr/ml)，如表五所示。

【0076】 另外，本发明 EPO-N1 与 EPO-N2 的 T<sub>max</sub> 为约 24 hr。由此可知，相较于市售 Eprex®，本发明 EPO-N1 与 EPO-N2 也具有较高的 T<sub>max</sub>。

【0077】 表五、EPO-N1N2、N1N2-EPO、NNCT-EPO 药物动力学分析结果(皮下注射)

	半衰期 (hr)	AUC (ng·hr/ml)	C <sub>max</sub> (ng/ml)	T <sub>max</sub> (hr)
EPO-N1N2	21.76	370.47	11.77	24
N1N2-EPO	30.14	448.04	13.78	30
NNCT-EPO	25.50	981.63	26.18	24
Eprex®	7.14	169.55	6.88	10

【0078】 虽然本发明已以优选实施例揭露如上，然其并非用以限定本发明，任何本领域的普通技术人员，在不脱离本发明的精神和范围内，当可作些许的更动与修改，因此本发明的保护范围当视后附的权利要求所界定者为准。

#### 【符号说明】

EPO：红细胞生成素

N1：高糖基化片段 1

N2：高糖基化片段 2

CTP：人类绒毛膜促性腺激素的羧基末端肽

TpS：促血小板生成素的羧基末端肽

## 权利要求书

1. 一种重组蛋白，包括红细胞生成素，以及高糖基化片段。
2. 权利要求 1 所述的重组蛋白，其中所述高糖基化片段包括与 SEQ ID NO: 1 及/或 2 所示序列相似度在 90%以上的序列。
3. 权利要求 1 所述的重组蛋白，其中所述高糖基化片段为 SEQ ID NO: 1、2 及/或其组合。
4. 权利要求 1 所述的重组蛋白，其中所述红细胞生成素的羧基末端连接所述高糖基化片段。
5. 权利要求 1 所述的重组蛋白，其中所述红细胞生成素的氨基末端连接所述高糖基化片段。
6. 权利要求 1 所述的重组蛋白，还包括人类绒毛膜促性腺激素的羧基末端肽。
7. 权利要求 6 所述的重组蛋白，其中所述人类绒毛膜促性腺激素羧基末端肽包括与 SEQ ID NO:3 所示序列相似度在 90%以上的序列。
8. 权利要求 7 所述的重组蛋白，其中所述高糖基化片段的羧基末端连接所述人类绒毛膜促性腺激素羧基末端肽。
9. 权利要求 1 或 6 所述的重组蛋白，还包括促血小板生成素的羧基末端肽。
10. 权利要求 9 所述的重组蛋白，其中所述促血小板生成素羧基末端肽包括与 SEQ ID NO:4 所示序列相似度在 90%以上的序列。
11. 权利要求 9 所述的重组蛋白，其中所述人类绒毛膜促性腺激素羧基末端肽的羧基末端连接所述促血小板生成素的羧基末端肽。
12. 权利要求 1 所述的重组蛋白，其中所述重组蛋白为 SEQ ID NO:5 或其序列相似度在 90%以上的序列。
13. 一种核苷酸序列，其编码权利要求 1 所述的重组蛋白。



14. 一种细胞，其转染权利要求 13 所述的核苷酸序列以表达权利要求 1 所述的重组蛋白。
15. 一种组合物，包括权利要求 1 所述的重组蛋白，以及药学上可接受的载体或佐剂。

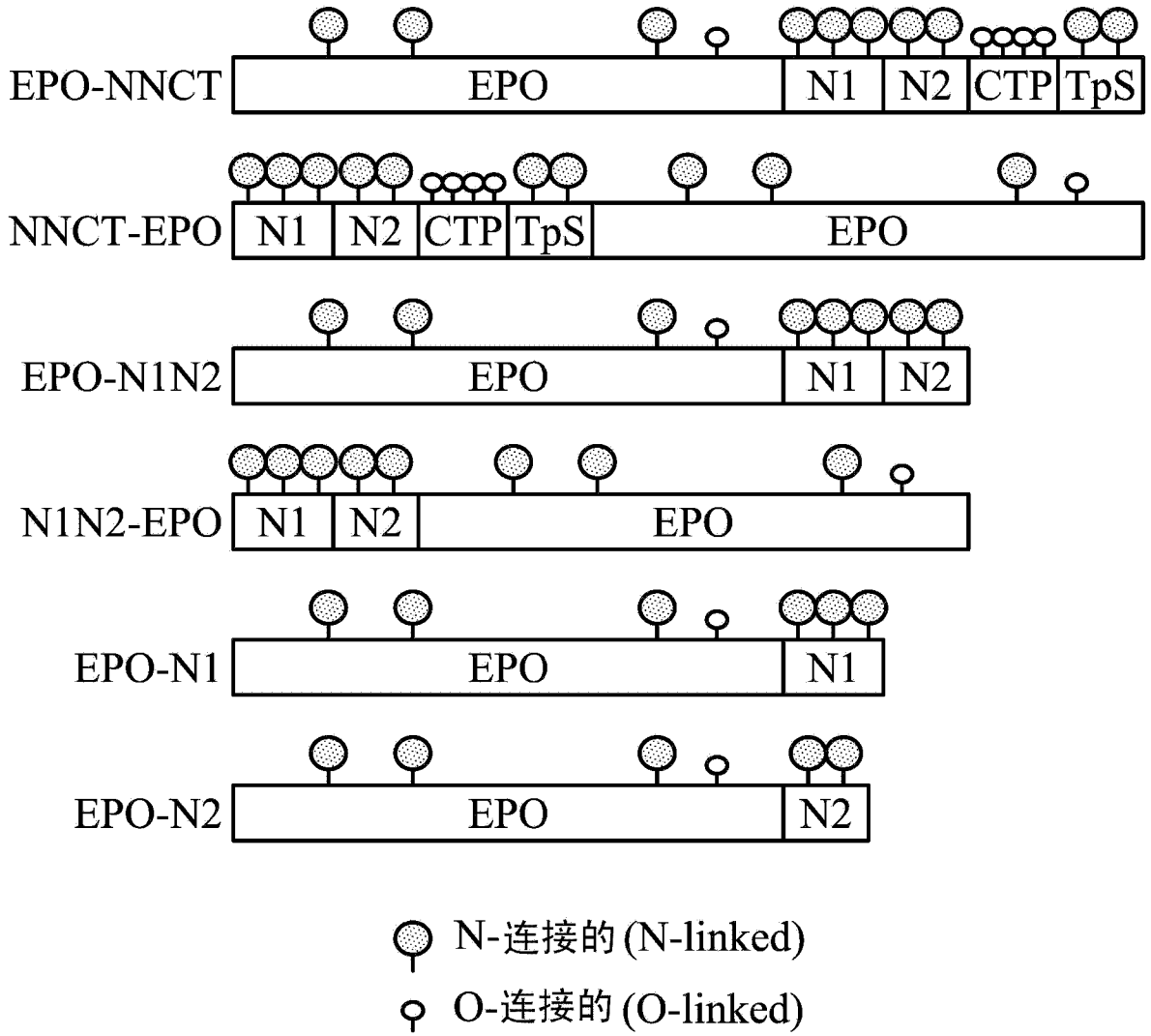


图 1

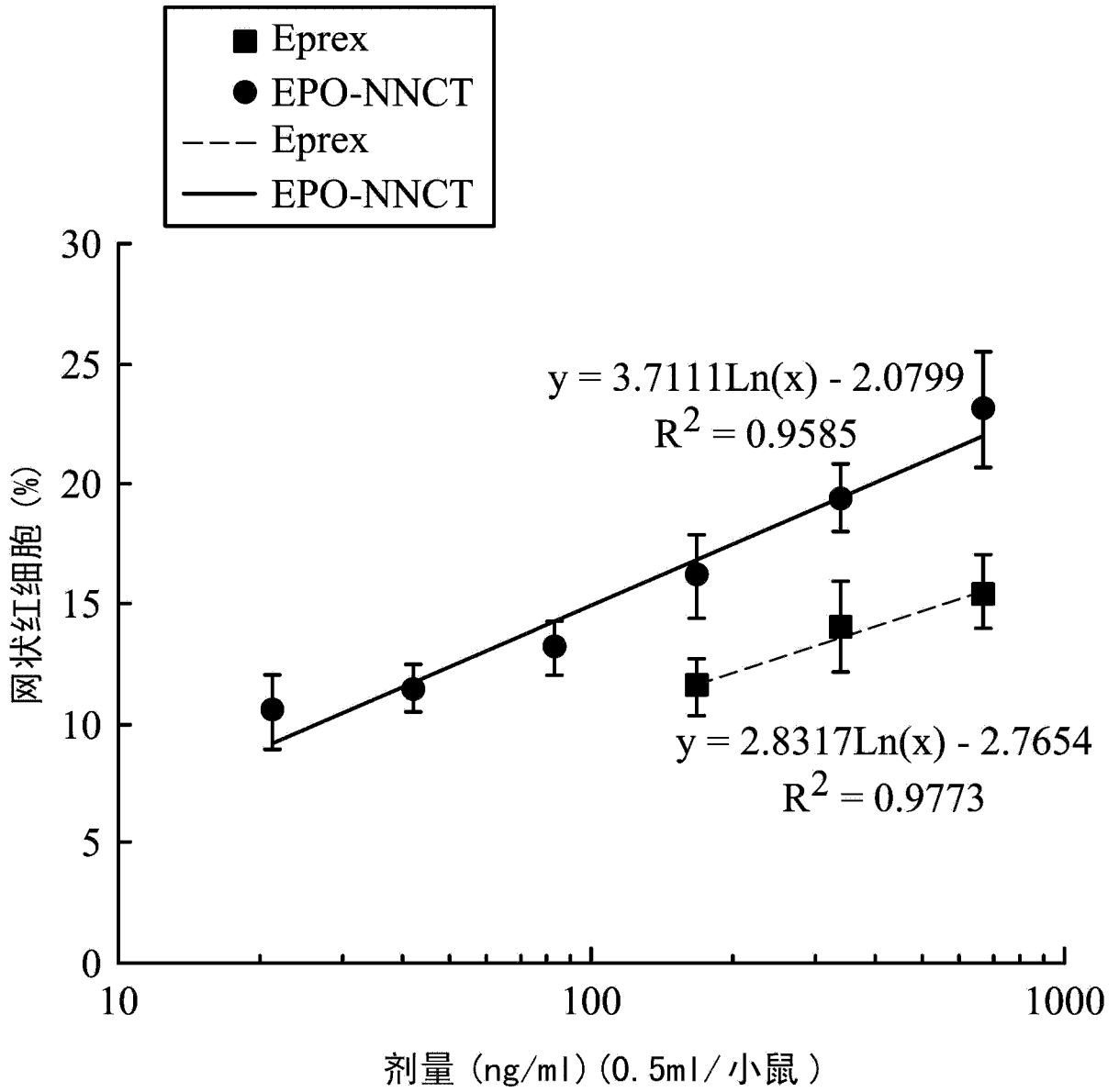


图 2

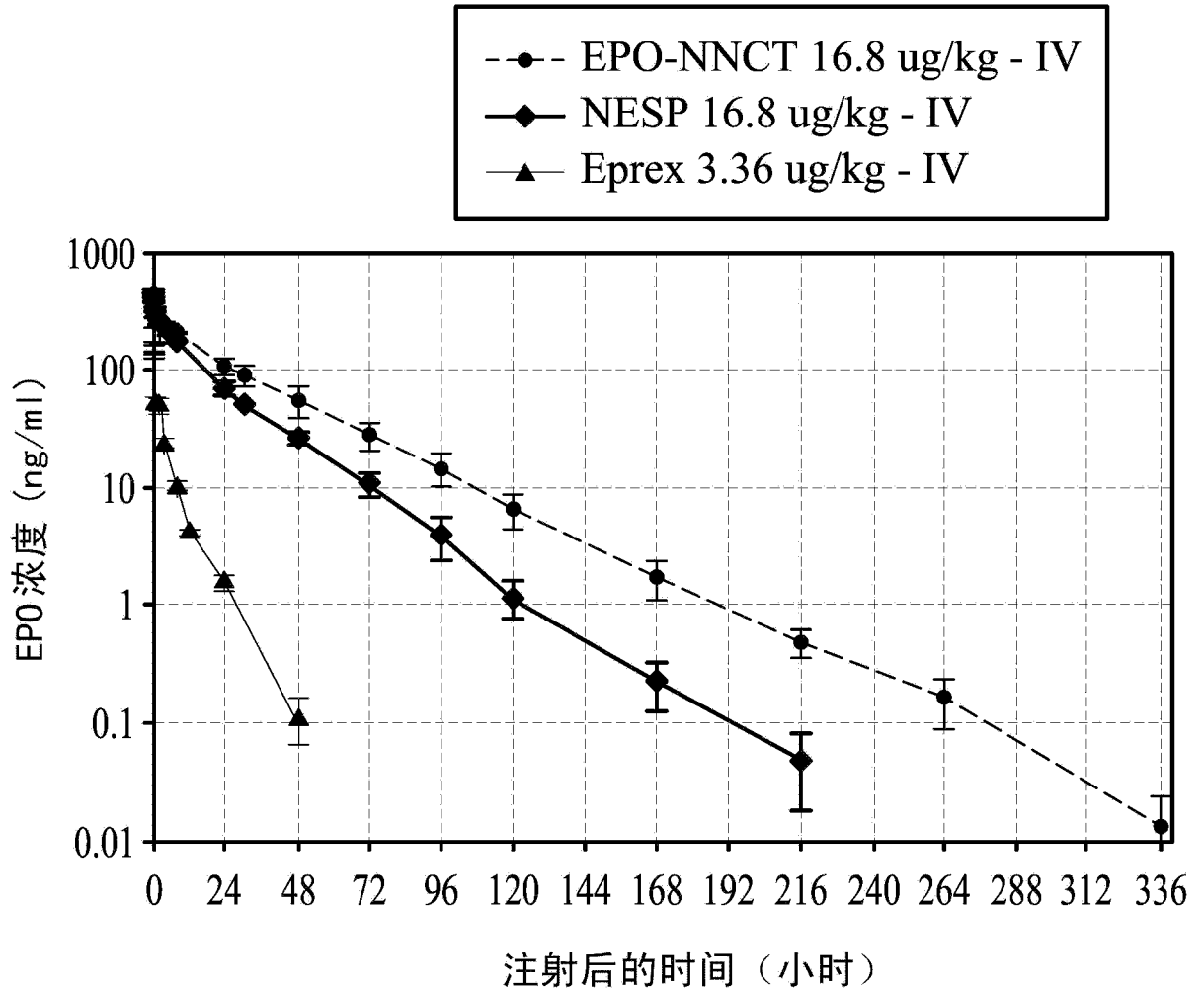


图 3

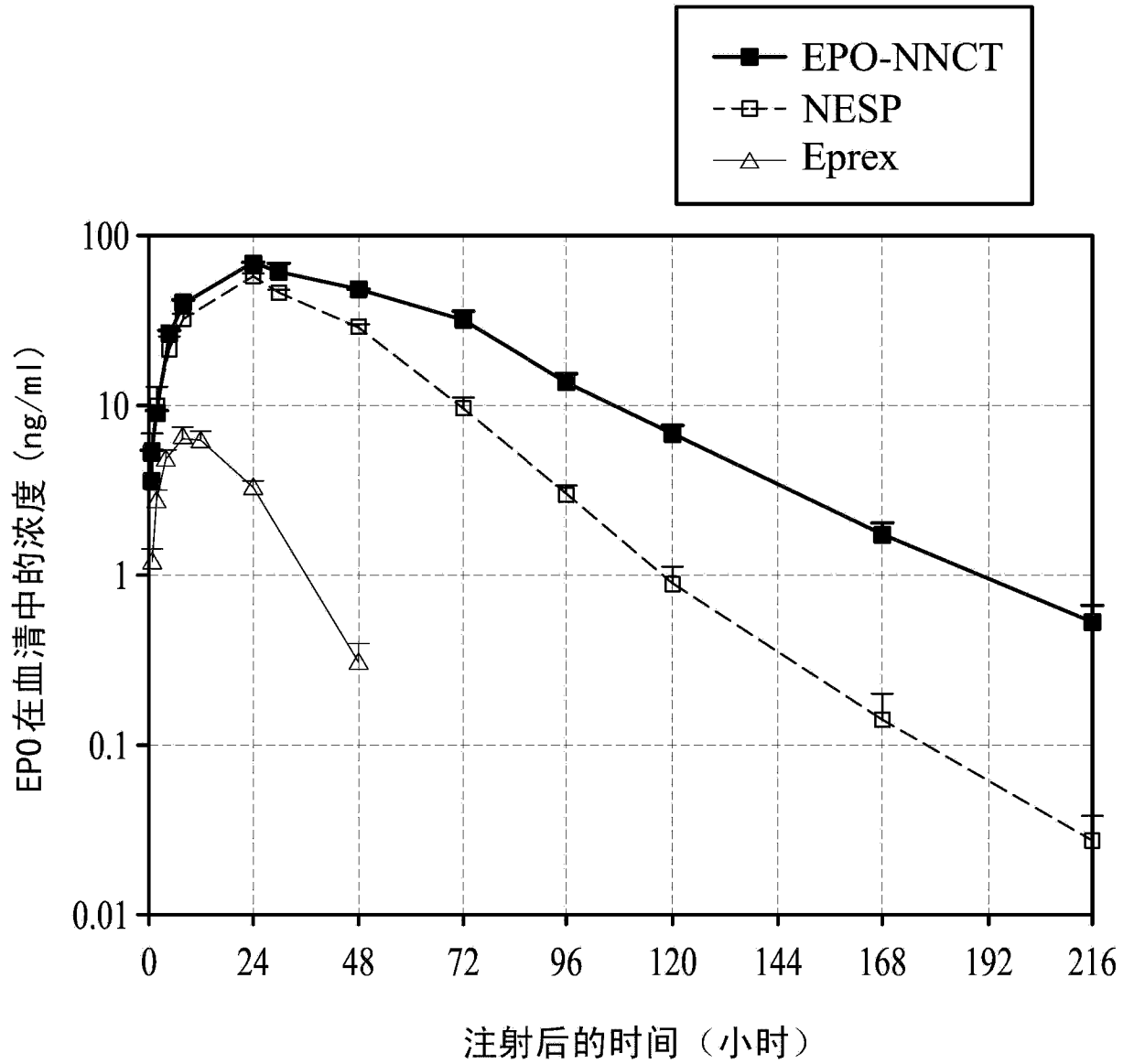


图 4

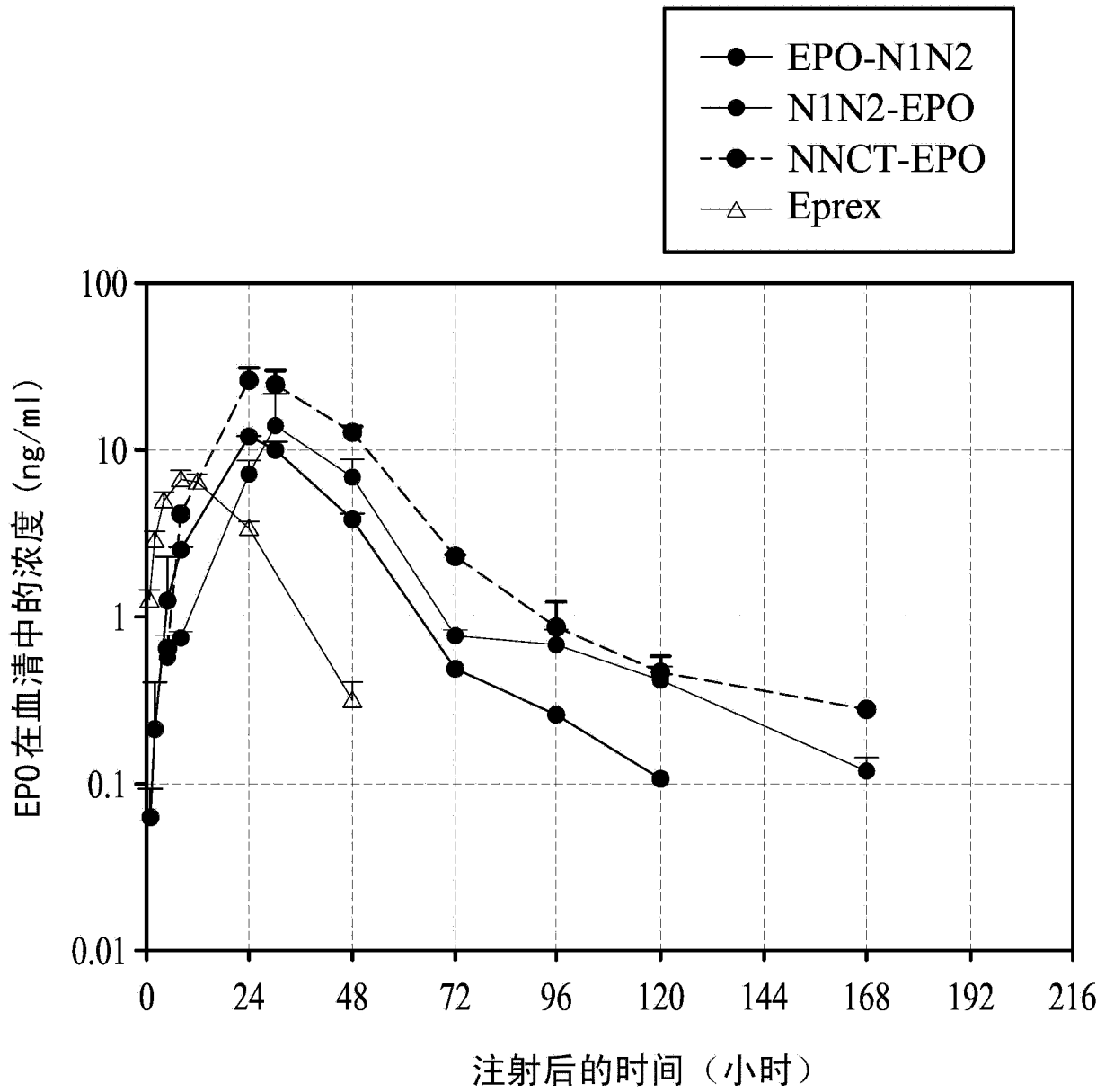


图 5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/089544

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07K; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CPRSABS, CNTXT, CNKI, DWPI, SIPOABS, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, ISI web of knowledge, Retrieving System for Biological Sequence of Chinese Patent, Genbank, EMBL and searched terms: glycosylat+, epo, erythropoietin, human chorionic gonadotropin, hcg, thrombopoietin, tpo, recombin+, fus+, SEQ ID NOs: 1-5

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101678079 A (HANALL PHARM CO LTD) 24 March 2010 (24.03.2010) the abstract, description, page 6, paragraph [0002], page 23, paragraphs [0005] and [0006], page 90, the last paragraph to page 94, the first paragraph, page 100, paragraph [0002], sequence 228 of sequence listing, claims 1-18, 121, 130 and 139	1-8, 13-15
Y		9-11
Y	CN 1421461 A (CHEILJEDANG CORP.) 04 June 2003 (04.06.2003) the abstract, description, page 4, lines 20-30 and claims 1 and 3	9-11

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search  
10 March 2014 (10.03.2014)

Date of mailing of the international search report  
20 March 2014 (20.03.2014)

Name and mailing address of the ISA  
State Intellectual Property Office of the P. R. China  
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao  
Haidian District, Beijing 100088, China  
Facsimile No. (86-10) 62019451

Authorized officer  
WANG, Xiangyu  
Telephone No. (86-10) 62411992

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/CN2013/089544

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GenBank Accession No. AC113658, Version AC113658.1, 27 January 2009 (27.01.2009), [retrieved on 10.03.2014], Retrieved from NCBI [online]: <URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>	12



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN2013/089544

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101678079 A	24.03.2010	US 2009238789 A1	24.09.2009
		EP 2120998 A2	25.11.2009
		WO 2008065372 A3	23.10.2008
		JP 2010510794 A	08.04.2010
		EP 2120998 B1	07.08.2013
		KR 1248252 B1	27.03.2013
		WO 2008065372 A2	05.06.2008
		US 8252743 B2	28.08.2012
		KR 20100014291 A	10.02.2010

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN2013/089544

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1421461 A	04.06.2003	BR 0203394 A	11.05.2004
		JP 3860097 B2	20.12.2006
		IN 248554 B	29.07.2011
		JP 2003169671 A	17.06.2003
		AU 2002300359 B2	23.12.2004
		IN 200200813 I1	11.03.2005
		US 7098318 B2	29.08.2006
		NZ 520442 A	31.10.2003
		CN 100390201 C	28.05.2008
		DE 10235248 A1	12.06.2003
		EP 1319712 A2	18.06.2003
		ZA 200206172 A	25.06.2003
		SG 117416 A1	29.12.2005
		SG 117416 B	28.02.2006
		CA 2394572 A1	29.05.2003
		AU 2002300359 A1	12.06.2003
		KR 100467750 B1	24.01.2005
		GB 2382580 A	04.06.2003
		IT 1341783 B	18.10.2007
		PH 1200200559 B1	19.10.2007
MX 248872 B	10.09.2007		
WO 03046013 A1	05.06.2003		
KR 20030044272 A	09.06.2003		
EP 1319712 B1	10.03.2010		
ES 2339426 T3	20.05.2010		
FR 2832716 A1	30.05.2003		
GB 2382580 B	08.10.2003		
MX 2002008131 A1	01.12.2004		

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN2013/089544

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		DE 60235603 D1	22.04.2010
		US 2003124115 A1	03.07.2003
		RU 2225220 C1	10.03.2004
		DE 10235248 B4	23.12.2004
		TWI 237056 B	01.08.2005
		CA 2394572 C	14.08.2007

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/089544

Continuation of : CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 19/00 (2006.01) i  
C07K 14/505 (2006.01) i  
C12N 15/62 (2006.01) i  
C12N 5/10 (2006.01) i  
A61K 38/18 (2006.01) i  
A61P 7/06 (2006.01) i

<b>A. 主题的分类</b>		
见附加页		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
<b>B. 检索领域</b>		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC:C07K, A61K, A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CNABS, CNTXT, CNKI 和检索词: 糖基, epo, 红细胞生成素, 人类绒毛膜促性腺激, 促血小板生成素, 重组, 融合, hcg, tpo 等;		
DWPI, SIPOABS, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, ISI web of knowledge 和检索词: glycosylat+, epo, erythropoietin, human chorionic gonadotropin, hcg, thrombopoietin, tpo, recombin+, fus+ 等		
中国专利生物序列检索系统, Genbank, EMBL 和检索的序列: SEQ ID NOs:1-5		
<b>C. 相关文件</b>		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 101678079 A (韩元制药株式会社) 24.3 月 2010 (24.03.2010) 摘要, 说明书第 6 页第 2 段, 第 23 页第 5-6 段, 第 90 页最后一段到第 94 页第一段, 第 100 页第 2 段, 序列表中的序列 228, 权利要求 1-18、121、130 和 139	1-8,13-15
Y		9-11
Y	CN 1421461 A (第一制糖株式会社) 04.6 月 2003 (04.06.2003) 摘要, 说明书第 4 页第 20-30 行, 权利要求 1 和 3	9-11
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件
国际检索实际完成的日期 10.3 月 2014 (10.03.2014)		国际检索报告邮寄日期 20.3 月 2014 (20.03.2014)
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		授权官员  王翔宇  电话号码: (86-10) 62411992

C(续). 相关文件		
类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	GenBank 登录号 ACI13658, 版本号 ACI13658.1, 27.1 月 2009(27.01.2009), [检索于 10.03.2014], 检索自 NCBI [联机]: <URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>	12

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号  
**PCT/CN2013/089544**

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 101678079 A	24.03.2010	US 2009238789 A1	24.09.2009
		EP 2120998 A2	25.11.2009
		WO 2008065372 A3	23.10.2008
		JP 2010510794 A	08.04.2010
		EP 2120998 B1	07.08.2013
		KR 1248252 B1	27.03.2013
		WO 2008065372 A2	05.06.2008
		US 8252743 B2	28.08.2012
		KR 20100014291 A	10.02.2010

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号  
**PCT/CN2013/089544**

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 1421461 A	04.06.2003	BR 0203394 A	11.05.2004
		JP 3860097 B2	20.12.2006
		IN 248554 B	29.07.2011
		JP 2003169671 A	17.06.2003
		AU 2002300359 B2	23.12.2004
		IN 200200813 I1	11.03.2005
		US 7098318 B2	29.08.2006
		NZ 520442 A	31.10.2003
		CN 100390201 C	28.05.2008
		DE 10235248 A1	12.06.2003
		EP 1319712 A2	18.06.2003
		ZA 200206172 A	25.06.2003
		SG 117416 A1	29.12.2005
		SG 117416 B	28.02.2006
		CA 2394572 A1	29.05.2003
		AU 2002300359 A1	12.06.2003
		KR 100467750 B1	24.01.2005
		GB 2382580 A	04.06.2003
		IT 1341783 B	18.10.2007
		PH 1200200559 B1	19.10.2007
		MX 248872 B	10.09.2007
		WO 03046013 A1	05.06.2003
		KR 20030044272 A	09.06.2003
		EP 1319712 B1	10.03.2010
		ES 2339426 T3	20.05.2010
		FR 2832716 A1	30.05.2003
		GB 2382580 B	08.10.2003
		MX 2002008131 A1	01.12.2004
		DE 60235603 D1	22.04.2010
		US 2003124115 A1	03.07.2003
RU 2225220 C1	10.03.2004		
DE 10235248 B4	23.12.2004		
TW I237056 B	01.08.2005		
CA 2394572 C	14.08.2007		



续: A.主题的分类

C07K 19/00(2006.01) i

C07K 14/505 (2006.01) i

C12N 15/62 (2006.01) i

C12N 5/10 (2006.01) i

A61K 38/18 (2006.01) i

A61P 7/06 (2006.01) i