

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 EP0 (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 EP0 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应。

【0025】 本发明重组蛋白可更包括促血小板生成素 (Thrombopoietin, TP0) 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 TP0)”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 TP0 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 TP0 可与 EP0 (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 EP0 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 TP0。在另一个实施方案中, 可在 EP0 的 N 端或 CTP 的 C 端连接一个或多个相同或不同的 TP0。

【0029】 本发明 TP0 可作为蛋白质或肽的保护者, 抑制蛋白质或肽的分解。TP0 可延长重组蛋白的半衰期, 以及促进重组蛋白的效应。

【0030】 在本发明中, EP0、高糖基化片段、CTP 与 TP0 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 $\text{CH}_2\text{-NH}$ 、 $\text{CH}_2\text{-S}$ 、 $\text{CH}_2\text{-S=O}$ 、 O=C-NH 、 $\text{CH}_2\text{-O}$ 、 $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ 、 S=C-NH 、 CH=CH 或 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 (-CO-NH-) 可被取代，例如，可被 N-甲基键 ($\text{-N(CH}_3\text{)-CO-}$)、酯键 ($\text{-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-}$)、酮甲基 (ketomethylen) 键 ($\text{-CO-CH}_2\text{-}$)、 α -aza 键 (-NH-N(R)-CO-)，其中 R 为任意烷基、羟乙基键 ($\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-}$)、硫代酰胺 (thioamide) 键 (-CS-NH-)、烯双键 (-CH=CH-)、酰胺键 (-NH-CO-)、多肽衍生物 ($\text{-N(R)-CH}_2\text{-CO-}$) 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_{max}值、与更长的T_{max}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⁻)，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现, 选择表达量高的细胞株, 将细胞培养于 37℃, 5% CO₂ 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'-cctagggccaccatgggggtgcacgaatgtcctgcctggetgttgcttc tctgtccctgctgtcgtccctctgg-5')、LSP-N-S2 引物

(3'-ctgtccctgctgtcgtccctctgggcctcccagtcctgggcgaggccg agaatatcacgacgggcggtaac-5')与 ENNCT1-A 引物

(3'-ctcggtgtgcacagatgaggcgtgggtggggcccttcttgagacagatt ctgggagtggtgtaggatg-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 EP0-N1N2

【0055】 利用 PCR 及 E-S 引物

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

(3'-gtatacctacagctgcagagtctcgttcacctgggaagag-5') 由 PND/EP0-NNCT 质粒复制 EP0-N1N2 的 DNA 片段, 以获得 EP0-N1N2 片段, 如图 1 所示。将 EP0-N1N2 片段插入表达载体中, 获得 PPD/NNCT-EP0 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-EP0

【0057】 委托 GENEWIZ, Inc 合成 N1N2-EP0 的 DNA 片段 (如图 1 所示), 并插入表达载体中, 获得 PPD/ N1N2-EP0 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 EP0-N1

【0059】 利用 PCR 及 E-S 引物 (3'-cctaggggccaccatgggggtgcacgaatgtcctgcc-5') 与 ENNCT4-A 引物 (3'-gtatacctagctctgggacagtgatattctc-5') 由 PND/EP0-NNCT 质粒复制 EP0-N1 的 DNA 片段, 如图 1 所示。将 EP0-N1 片段插入表达载体中, 获得 PPD/EP0-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 EP0-N2

【0061】 利用 PCR 及 E-S 引物 (3'-cctaggggccaccatgggggtgcacgaatgtcctgcc-5') 与 ENNCT5-A 引物 (3'-gtatacctacagctgcagagtctcgttcacctgggaagagttgaccaacagtctgtccccctgtcctgcaggcctccc-5') 由 PND/EP0-NNCT 质粒复制 EP0-N2 的 DNA 片段, 以获得 EP0-N2 片段, 如图 1 所示。将 EP0-N2 片段插入表达载体中, 获得 PPD/EP0-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 3×10^6 细胞/ml。将 $200 \mu\text{l}$ 的细胞悬浮液 (6×10^5 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 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 ml 搅拌式培养槽, 接种 4×10^5 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 EP0-N1N2、N1N2-EP0、NNCT-EP0 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 EP0-N1 与 EP0-N2 的 T_{max} 为约 24 hr。由此可知，相较于市售 Eprex®，本发明 EP0-N1 与 EP0-N2 也具有较高的 T_{max}。

【0077】 表五、EP0-N1N2、N1N2-EP0、NNCT-EP0 药物动力学分析结果(皮下注射)

	半衰期 (hr)	AUC (ng·hr/ml)	C _{max} (ng/ml)	T _{max} (hr)
EP0-N1N2	21.76	370.47	11.77	24
N1N2-EP0	30.14	448.04	13.78	30
NNCT-EP0	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】

EP0：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。