

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：96126612

C07K 16/46

※ 申請日期：96.7.20

※IPC 分類：

C07K 14/505

A61K 39/395

C12N 15/09

## 一、發明名稱：(中文/英文)

在活體中具有延長之半生期以及提高之紅血球生成活性的重組人類紅血球生成素 (EPO)-FC融合蛋白

RECOMBINANT HUMAN EPO-FC FUSION PROTEINS WITH PROLONGED HALF-LIFE AND ENHANCED ERYTHROPOIETIC ACTIVITY IN VIVO

## 二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

諾華健控股公司 / NOVAGEN HOLDING CORPORATION

代表人：(中文/英文)

劉龍斌 / LIU, LONGBIN

住居所或營業所地址：(中文/英文)

英屬開曼群島大開曼·喬治鎮北教堂街·史塔斯佛宅郵政信箱 484 GT 號

P.O. BOX 484 GT, Strathvale House, North Church Street, George Town, Grand Cayman, Cayman Islands

國籍：(中文/英文)

英屬開曼群島 / CAYMAN IS.

## 三、發明人：(共 5 人)

姓名：(中文/英文)

1. 王海濤 / WANG, HAITAO

2. 杜洋 / DU, YONG

3. 張魯 / ZHANG, RUI

4. 蕭晉 / XU, JING

5. 劉龍斌 / LIU, LONGBIN

國 籍：(中文/英文)

1.-4. 中國 / CHINA

5. 加拿大 / CANADA

#### 四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項  第一款或  第二款規定之事實，其事實發生日期為：。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國、 2006/01/27、 11/340,661

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

國 籍：(中文/英文)

1.-4. 中國 / CHINA

5. 加拿大 / CANADA

#### 四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項  第一款或  第二款規定之事實，其事實發生日期為：。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國、 2006/01/27、 11/340,661

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

## 九、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

相關申請案

本申請案係有關以及主張於2006年1月27日提申之美國專利申請案案號11/340,661的利益，其之全體係藉此被併入以作為參考資料。

發明領域

本申請案係有關人類紅血球生成素融合蛋白。

### 【先前技術】

10 發明背景

人類紅血球生成素(EPO)，造血的生長因子家族的一個成員，係主要於成人腎和胎兒肝中對於由於下降的血氧可利用性之組織缺氧反應而被合成[1]。EPO之主要的功能是直接地作用於骨髓中之某些紅血球(RBC)前驅體和前驅物以刺激血紅素和成熟的RBC的合成。其也控制RBC的增殖、分化，和成熟。具有天然存在的EPO的胺基酸序列之重組型EPO已經被生產以及被認可來治療與貧血關聯的腎功能衰竭、癌和其他病理上的病況[2]。除其之紅血球生成性質之外，最近的研究[3]表示EPO也作用於非骨髓細胞，如神經元，暗示EPO於中樞神經系統(CNS)和其他的器官/系統中之其他可能的生理的/病理上的功能。因EPO受體已經於許多不同的器官中被發現，EPO可能具有多重的生物的效力，例如：作用為一種抗細胞凋亡劑。

人類EPO是一種具有30.4千道爾頓的分子量之醣蛋

白。碳水化合物佔有其總質量的大概39%。該EPO基因係座落於染色體7q11-22以及橫跨一個具有5個外顯子和4個內含子的5.4kb區域[4]。EPO的前驅物係由193個胺基酸構成。藉由轉譯後修飾之前導序列和最後的胺基酸Arg之分裂係產生具有165個胺基酸之成熟的EPO。糖化作用，帶有在Asn 24、Asn38、Asn83之三個N連接位置和 Ser126之一個O連接位置，在生物合成、三級的結構和EPO之活體內的生物活性上扮演一個關鍵的角色[5]。EPO係藉由結合至一種紅血球生成素受體而作用，該受體係為一種具有72-78千道爾頓的分子量之經糖化且磷酸化的穿膜多肽。此結合觸發受體的同源二聚體化(homodimerization)，其導致數種信息傳導途徑的活化：JAK2/STAT5系統，G蛋白，鈣通道，以及激酶。需要EPO蛋白的2種分子同時地結合至1個受體分子以達到最佳的受體活化[6]。

15 作為人類療法認可的第一種造血的生長因子，重組型人類EPO(rHuEPO)已經被使用於起因於慢性腎衰竭、癌(主要化療關聯的貧血)、自體免疫疾病、AIDS、手術、骨髓移植和骨髓發育不良症候群，等等的貧血之治療。有趣地，近來的研究也已經觀察到rHuEPO具有非血液系統的功能以及顯示被使用作為大腦的局部缺血、腦部外傷、發炎疾病和神經退化性障礙之一種神經保護性藥物的潛力[7]。

20 現在，3種的rHuEPO或rHuEPO類似物是商業上可得的，即rHuEPO阿伐( $\alpha$ )、rHuEPO貝它( $\beta$ )，和達比波廷阿伐(darbepoetin alfa) [8]。此等3種重組型蛋白結合至相同的紅

血球生成素受體，但是於結構、糖化作用的程度、受體結合親和性以及活體內代謝上不同。因rHuEPO-阿伐( $\alpha$ )開始的引入是在1980s，臨床醫生迅速地認定該藥物的慣常劑量/注射要件為一種顯著的缺點。被靜脈內或皮下地投藥的

5 rHuEPO阿伐( $\alpha$ )和rHuEPO貝它( $\beta$ )之平均活體內的半生期各別地只有8.5和17小時[9, 10]。病人因而需要一種每日，每週2次或每週3次的注射時間表，其對病人和健康照顧提供者均是一種負擔。因此，對於發展具有一種較長的活體內半生期及/或提高之紅血球生成活性之重組型EPO類似物有

10 一種存在已久的需求。

於先前技藝中已經企圖在基因上改變或化學修飾天然的EPO蛋白的結構以減緩其之活體內代謝或者改良其之治療性質。舉例而言，介於EPO分子上的含有唾液酸之碳水化合物之量和其之活體內代謝與功能活性之間似乎有一種

15 直接的相關性。EPO分子之增加的碳水化合物含量因而導致一種活體內較長的半生期以及提高的活性[11, 12]。分子應用基因公司(Amgen)已經設計rHuEPO類似物達比波廷阿伐以包含5 N-連接碳水化合物鏈，比rHuEPO多2個。達比波廷阿伐也被知道為新型紅血球生成刺激蛋白(Novel

20 Erythropoiesis Stimulating Protein) (NESP) 以及以商標Aranesp<sup>TM</sup>予以販售。達比波廷阿伐與天然的人類EPO在5個位置上不同(Ala30Asn, His32Thr, Pro87Val, Trp88Asn, Pro90Thr)，其允許在天冬醯胺酸殘基位置30和88之2個額外的N連接寡糖的连接。達比波廷阿伐係以如同天然的EPO之

相同的方式而結合至EPO受體以引發涉及藉由JAK-2激酶以及相同的細胞內的分子Ras/MAP-k、P13-k和STAT-5之酪胺酸磷酸化的細胞內的訊息傳導。由於增加的碳水化合物含量，達比波廷阿伐於動物和人類2者體內的半生期幾乎是

5 3倍更長於rHuEPO-阿伐的半生期(25.3小時對8.5小時)[9]。達比波廷阿伐(Aranesp<sup>™</sup>)亦顯示展現出與活體內天然存在的或重組型人類EPO相比提高的生物活性[13]，以及已經由FDA認可為一種第二代rHuEPO藥物；此藥物只需要被每週1次予以投藥以達到rHuEPO的每週2-3次注射之完全相同的

10 治療效力[10, 14, 15]。

其他的要延長EPO的半生期之企圖已經集中在經由和聚乙二醇(聚乙二醇化)與類似物的化學共軛而增加EPO蛋白的分子量。聚乙二醇化-EPO(PEGylated-EPO)具有一個大得多的分子量且被保護不自循環清除以及因而具有一

15 種較長的血漿半生期[16]。然而，聚乙二醇化可能改變蛋白結構導致EPO部分的功能和特異性之未預料到的變化。也有藉由其他方法而增加EPO的分子量的報導，例如：連接EPO分子至一種載體蛋白(人類白蛋白)，或者藉由利用連接肽(3至17個胺基酸)或藉由化學交聯試劑而形成2個完整

20 的EPO分子之同源二聚體化[17,18, 19, 20]。雖然全部的此等方法在延長半生期和提高 EPO的活性上已經達到某些成功，如於本申請案中說明的組合EPO分子與一種融合蛋白內的人類免疫球蛋白(IgG)的Fc片段達到獨特的優點。

人類免疫球蛋白IgG係由藉著雙硫鍵而共價地連接的

之4種多肽組成(2個同樣的輕鏈和重鏈複本)。IgG分子藉由木瓜酶之蛋白質水解產生2個Fab片段和1個Fc片段。Fc片段係由藉著雙硫鍵而連接在一起的2個多肽構成。各多肽，自N至C端，係由一種樞紐區(hinge region)、一種CH2領域和一種CH3領域組成。Fc片段結構在人類免疫球蛋白之全部的亞型之中幾乎是相同的。IgG是人類血液中最大量的蛋白的其中一種以及組成人類血清中之70至75 %的總免疫球蛋白，IgG於循環中的半生期在全部的5種免疫球蛋白之中是最長的以及可以達到21天。

近代的生物工程技術已經成功地應用至由治療蛋白片段構成的融合蛋白的創造，例如：細胞激素和可溶的受體，以及人類IgG的Fc片段[21, 22, 23, 24]。此等融合蛋白具有一種顯著地較長的活體內半生期，同時保持其等之生物和治療性質。到目前為止，包含一個Fc片段之二種融合蛋白已經成功地被發展為生物性藥物以及被FDA認可作為風濕性關節炎和慢性斑塊型牛皮癬(chronic plaque psoriasis)的治療[25, 26]。

已經被顯示於先前技藝中的不論是藉由化學交聯或藉由一種多肽連接的2個EPO分子之二聚物展現出提高的活體內活性以及延長的半生期[17, 19]。提高的活性可能由於EPO二聚物對於一個受體之更有效的結合，以及延長的活體內半生期係由於該二聚物蛋白的更大的尺寸。然而，化學交聯方法不是有效的以及難以控制。並且，於EPO的二聚物內之連接肽可能改變EPO分子的三維結構以及該肽本



身可能刺激活體內免疫原性的反應。此等缺點削弱EPO二聚物的治療潛力，特別地因腎病人的EPO替代療法是終身的。

對於具有一種顯著地較長的活體內半生期和提高的紅血球生成活性，但不具有任何增加的免疫原性的性質之EPO類似物的需求因而升高。

## 【發明內容】

### 發明概要

依照本發明，一種包含一種被連接至一種免疫球蛋白肽部分的人類紅血球生成素肽部分之重組型融合蛋白係被說明。該融合蛋白與天然存在的或重組型天然的人類紅血球生成素相比具有一種活體內延長的半生期。於本發明的一個實施例中，該蛋白具有比天然的人類紅血球生成素更高至少3倍的活體內半生期。該融合蛋白與天然的人類紅血球生成素相比也可以展現出提高的紅血球生成生物活性。

於本發明的一個實施例中，免疫球蛋白肽部分是一種Fc片段，例如：一種IgG1片段。該Fc片段包括CH2和CH3領域以及一種樞紐區。EPO肽部分可以是被直接地連接至該樞紐區。較佳地，該樞紐區在長度上是至少9個胺基酸。於一個實施例中，EPO肽部分具有一個鄰近其之C端的半胱胺酸殘基以及該樞紐區包括一個座落於最接近該EPO肽部分的半胱胺酸殘基。較佳地，此等2個半胱胺酸殘基相距至少12個胺基酸。於一個實施例中，EPO肽部分可以包含一個直接地被連接至免疫球蛋白部分(換言之，沒有外部肽連

接子(peptide linker)被插入介於EPO和免疫球蛋白部分之間)的完整的EPO分子。

本發明也有關多聚體的蛋白建構物，其等包含本發明的融合蛋白之多重的單元。舉例而言，二種融合蛋白可以被總成為一種二聚物，其中該等蛋白的樞紐區係藉由雙硫鍵予以連結。該二聚物具有一種IgG分子的一般形狀以及比游離的EPO分子更安定。

本發明亦有關編碼該融合蛋白的核酸和胺基酸序列以及用於產生該融合蛋白的轉染的細胞株與方法。本發明進一步包括包含該融合蛋白的藥學組成物以及利用該融合蛋白及/或該等藥學組成物，舉例而言以刺激於需要治療的個體體內之紅血球生成的方法。

#### 圖式簡單說明

於圖示中闡釋本發明的各種實施例，但是不欲被解釋成為一種限制方式：

第1A圖是一個結構圖，其顯示本發明的重組型人類EPO-Fc融合蛋白(rHuEPO-Fc)的一般結構。

第1B圖是一個序列表，其顯示rHuEPO-Fc蛋白的核苷酸序列和演繹的胺基酸(aa)的序列。DNA的全長是1281bp。於演繹的蛋白序列中的426個胺基酸包括信息肽的27個aa以及完整的rHuEPO-Fc蛋白之399個aa。完整的rHuEPO-Fc蛋白係由人類EPO領域(166 aa)，人類IgG1的Fc片段之樞紐區(16aa，下面劃線的)，以及CH2和CH3領域(217aa)構成。成熟的rHuEPO-Fc融合蛋白的多肽之計算的分子量是

44.6kDa，由18.5kDa (41.4%)的EPO片段和26.1 kDa(58.6%)的IgG1 Fc片段組成。一種同源二聚物係藉由在樞紐區之內的2個半胱胺酸殘基(被框起的)之2個雙硫鍵予以形成。在成熟的融合蛋白之殘基172(換言之，樞紐區的第6個胺基酸)，

5 天然的半胱胺酸殘基已經被甘胺酸(粗體)取代。

第2圖是一種顯示哺乳動物表現質體pCD1的結構和特徵之結構圖，該質體係被使用來插入編碼rHuEPO-Fc融合蛋白的多肽之DNA序列，以及用來轉染表現rHuEPO-Fc融合蛋白的CHO細胞。

10 第3圖是一種SDS-PAGE影像，其顯示藉由SDS-PAGE分析、於非還原狀態中的純的rHuEPO-Fc蛋白之二聚體形式以及於還原狀態中的純的rHuEPO-Fc蛋白之單體形式的大小。來自表現rHuEPO-Fc之經培養的CHO細胞株的懸浮液之純化的rHuEPO-Fc蛋白主要地存在為二聚體形式，以及於

15 非還原狀態中的8% 雙三羥甲基氨基甲烷凝膠上具有大約180 kDa的分子量。於還原狀態中(100mM 二硫蘇糖醇, DTT)打破雙硫鍵，二聚體被分離成2個具有75 kDa的分子量之完全相同的單體單元。

第4A和4B圖是顯示以每週3次rHuEPO-Fc或rHuEPO的

20 皮下注射(s.c.)治療的正常小鼠內之血紅素(Hb)位準的劑量依賴性的增加的圖。各點代表該組(6隻小鼠)的Hb位準。第0天位準代表在治療之前的Hb位準。A：以rHuEPO-Fc治療的小鼠。B：以天然的rHuEPO治療的小鼠。

第5A和5B圖是顯示以每週1次的rHuEPOFc或rHuEPO

s.c.治療之正常小鼠內之血紅素(Hb)位準的劑量依賴性的增加的圖。各點代表該組(6隻小鼠)的平均Hb位準。第0天位準代表在治療之前的Hb位準。A：以rHuEPO-Fc治療的小鼠。B：以天然的rHuEPO治療的小鼠。

5 第6A和6B圖是顯示以12.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的rHuEPO-Fc或rHuEPO之靜脈內注射(i.v.)治療的正常小鼠內之血紅素(Hb)位準的增加的圖。各點代表該組(6隻小鼠)的平均Hb位準。第0天位準代表在治療之前的Hb位準。A：以一週一次治療的小鼠。B：以一週3次治療的小鼠。

10 第7圖是一個顯示於以每週1次s.c.的rHuEPO-Fc、rHuEPO或達比波廷阿伐(縮寫的Darbe.)治療的5/6腎切除的大鼠體內之血紅素(Hb)位準的劑量依賴性的增加的圖。各點代表該組的平均Hb位準。正常的對照是以載體溶液的注射之正常的大鼠。模式的對照是以載體溶液的注射之5/6腎  
15 切除的大鼠。第0週位準代表在治療之前的Hb位準。\*：在治療之後的週數。

第8圖是一個顯示以每2週1次s.c.的rHuEPO-Fc、rHuEPO或達比波廷阿伐(縮寫的Darbe.)治療的5/6腎切除的大鼠體內之血紅素(Hb)位準的劑量依賴性的增加的圖。各  
20 點代表該組的平均Hb位準。正常的對照是以載體溶液的注射之正常的大鼠。模式的對照是以載體溶液的注射之5/6腎切除的大鼠。第0週位準代表在治療之前的Hb位準。\*：在治療之後的週數。

第9圖是一個顯示以每2週1次i.v.的62.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之

rHuEPO-Fc，或達比波廷阿伐(縮寫的Darbe.)治療的5/6腎切除的大鼠體內之血紅素(Hb)位準的劑量依賴性的增加的圖。各點代表該組的平均Hb位準。正常的對照是以載體溶液的注射之正常的大鼠。模式的對照是以載體溶液的注射之5/6腎切除的大鼠。第0週位準代表在治療之前的Hb位準。\*：在治療之後的週數。

第10A-10C圖顯示用於刺激以不同的劑量和時間表治療的5/6腎切除的大鼠體內之CFU-E和BFU-E的群落形成的rHuEPO-Fc、rHuEPO和達比波廷阿伐之潛力的比較。

10 rHuEPO-Fc和達比波廷阿伐(縮寫的Darbe.)治療顯示出刺激CFU-E和BFU-E 的群落形成之相似的劑量依賴性潛力，然而rHuEPO是較不有效力的。A，每週1次s.c.。B，每2週1次s.c.。C，每2週1次i.v.。

第11圖是一個顯示在5 $\mu$ g/kg的rHuEPO-Fc或rHuEPO之靜脈內注射至恆河猴之後，rHuEPO-Fc和rHuEPO的血清位準的圖(5隻猴的平均位準)。

第12圖是一個序列表，其顯示一種野生型rHuEPO-FcC蛋白的核苷酸序列和演繹的胺基酸(aa)的序列。該序列特點係與第1圖中所顯示的相同，除了一種天然的、野生型的半胱胺酸殘基係存在於成熟的融合蛋白的殘基172 (換言之，樞紐區的第6個胺基酸)之外。

第13圖是一個圖，其顯示以每週3次的rHuEPO-Fc(本發明的突變的融合蛋白)、rHuEPO FcC(野生型融合蛋白)和rHuEPO之皮下注射(s. c.)治療的正常小鼠體內之血紅素

(Hb)位準的劑量依賴性的增加。各點代表該組(8)的平均Hb位準。正常的對照是以載體溶液的注射之正常的小鼠。第0天位準代表在治療之前的Hb位準。

第14圖是一個圖，其顯示以每週1次的rHuEPO-Fc、  
5 rHuEPO-FcC和rHuEPO之皮下注射(s. c.)治療的正常小鼠體內之血紅素(Hb)位準的劑量依賴性的增加。各點代表該組(8)的平均Hb位準。正常的對照是以載體溶液的注射之正常的小鼠。第0天位準代表在治療之前的Hb位準。

### 【實施方式】

#### 10 較佳實施例之詳細說明

在下列的各處中，明確的細節被提出俾以提供本發明的更徹底的瞭解。然而，本發明可以沒有此等細節予以實施。於其他的例子中，熟知的元件沒有被顯示或被詳盡地說明以避免不必要的混淆本發明。於是，說明書和圖示要  
15 被視為一種闡釋的，而非一種限制的意思。

本申請案係有關一種具有紅血球生成性質之新穎的融合蛋白。該融合蛋白，於本文中被提及為rHuEPO-Fc，包含一種被重組地連接至一種免疫球蛋白Fc片段的紅血球生成素(EPO)分子。如以下進一步被討論的，該融合蛋白可以是  
20 以由2個完全相同的多肽次單元構成之一種二聚物的形式。於被結構地顯示於第1A圖中的實施例中，各多肽次單元，自N端至C端，係由人類EPO分子的多肽序列和人類免疫球蛋白IgG1的Fc片段之樞紐區、CH2領域和CH3領域的多肽序列構成。2個多肽次單元係藉由介於各別的樞紐區之間

的雙硫鍵而被連接在一起以形成二聚體結構。該二聚體因而具有如一種IgG分子相同的一般形狀以及如於以下的實施例中所討論的展現出比游離的EPO分子更好的安定性。

如同對於本技藝中具有技術的一個人是明顯的，一種  
5 完整無缺的免疫球蛋白之樞紐區提供蛋白有效的抗原抗體結合之充分的可撓性。同樣地，於本發明中，該樞紐區係被包括於rHuEPO-Fc融合蛋白的設計中以維持其之可撓性，尤其當該融合蛋白係於二聚體形式時。如下說明的，此允許rHuEPO-Fc融合蛋白的EPO部分正常的結合至EPO  
10 受體以活化EPO的生物功能。據信rHuEPO-FC融合蛋白的二聚體形式，藉由提供2個EPO分子，能夠誘導EPO受體之最佳的活化(舉例而言，藉由促進受體交聯)。

如於以下提出的實施例中所顯示的，rHuEPO-Fc融合蛋白已經成功地利用重組DNA技術予以合成。該融合蛋白  
15 已經被顯示於小鼠、大鼠和靈長類動物的研究中以展現出活體內延長的半生期和提高的紅血球生成性質，與天然存在的或重組型天然的人類EPO相比。如被使用於本專利申請案中的，術語"天然的人類紅血球生成素"和"天然的人類EPO"意指具有一種未經修飾的野生型結構之EPO。如會被  
20 本技藝中具有技術的一個人瞭解的，天然的人類EPO可以是天然存在的或重組地生產的(例如rHuEPO阿伐( $\alpha$ ))。術語"天然的人類EPO"不包括rHuEPO類似物，例如：EPO結構已經被顯著地修飾，例如：藉由高糖化作用(hyperglycosylation)，之達比波廷阿伐( $\alpha$ )。

本發明的rHuEPO-Fc融合蛋白的核酸序列係被顯示於序列辨識編號：1內。對應的演繹的胺基酸序列係被顯示於序列辨識編號：2內。完整的rHuEPO-Fc融合蛋白在長度上是399個胺基酸。如第1B圖中所顯示的，完整的rHuEPO-Fc融合蛋白係由EPO領域(166個胺基酸)、樞紐區(16個胺基酸，下面劃線的)以及CH2和CH3領域(217個胺基酸)所構成。一種由27個胺基酸所構成的信息或前導肽序列也被顯示於第1B圖內。該信息肽係在rHuEPO-Fc的合成期間被分裂開。包括該信息或前導肽之rHuEPO-Fc的核酸和胺基酸序列係各別地被顯示於序列辨識編號：3和序列辨識編號：4內。

如最佳被顯示於第1B圖中以及序列辨識編號：2的，該EPO領域在胺基酸號碼161、接近其之C端具有一個半胱胺酸殘基。樞紐區包括2個半胱胺酸殘基，在第1B圖中被框起的胺基酸號碼178和181。樞紐區半胱胺酸殘基如上討論的形成介於同源二聚物的多肽次單元之間的雙硫鍵。一個人類IgG 1片段之天然存在的樞紐區也在樞紐區部分的殘基號碼6(自N端測量)具有一個半胱胺酸。於本發明中，樞紐部分的半胱胺酸殘基6已經被一個非半胱胺酸殘基予以取代。特別地，於第1B圖和序列辨識編號：2的實施例中，胺基酸半胱胺酸已經由甘胺酸予以取代(在rHuEPO-Fc的胺基酸殘基172，其係對應於樞紐區的殘基6)。對於本技藝中具有技術的一個人會是明顯的，其他的非半胱胺酸殘基也能取代在此位置的半胱胺酸以避免一個雙硫鍵的形成。



在殘基172的胺基酸取代的結果，樞紐區的第一個半胱胺酸殘基(在殘基178)與上述的EPO領域的半胱胺酸殘基(在殘基161)相距17個胺基酸。本發明人相信介於EPO領域的半胱胺酸殘基161和樞紐區的第一個半胱胺酸殘基之間的最小間隔應該是至少12個胺基酸，以使得rHuEPO-Fc之一種同源二聚物成功的總成及/或EPO受體的結合。也就是，設若殘基172是一個半胱胺酸殘基，一種非所欲的雙硫鍵可以有目的地形成，例如：介於半胱胺酸殘基161和172之間。此可以改變EPO分子的三維結構，導致生物的不活化或降低的生物活性。

於本發明的一個實施例中，EPO領域係被直接地連接至融合蛋白的Fc片段部分。藉由避免提供一種外部連接肽，rHuEPO-Fc融合肽之較佳的三維結構被維持以及觸發一種非所欲的免疫原性反應的風險係被最小化。Fc片段的樞紐區在長度上較佳地是至少9個胺基酸，以及在長度上較佳地落在大約10 - 20個胺基酸的範圍內。

### 實施例

下列的實施例將進一步更詳盡地闡釋本發明，儘管會明瞭本發明不被限制於特定的5個實施例。

#### 20 1.編碼HuEPO-Fc的融合蛋白之重組型質體pCdEpo-Fc的建構

編碼rHuEPO-Fc多肽的胺基酸序列之全長的DNA分子係藉由利用下列的寡引子(QIAGEN Inc., US)之重疊PCR予以產生：

EF5: 5'-ccggaattcgccaccatgggggtgcacgaatgtcctgcct-3' ;

EF3: 5' -tttcttttgcggccgcttatttaccggagacagggagag-3' ;

EFL5: 5'-aggcctgcaggacaggggacagagttgagcccaaacttggtgaca-3' ;

EFL3: 5'-tgtcaccagattgggctcaactctgtcccctgtcctgcaggcct-3' ;

5 以上提及的引子的序列係各別地被列於序列辨識編號：5-8中。

EcoR I和Not I位址係各別地被導入於EF5和EF3中。為了HuEPO-Fc蛋白於哺乳動物細胞內之最佳的表現，Kozak的序列(GCCACCATGG)也被導入於EF5中。EFL5和EFL3是  
10 互補序列，其等係由Epo的3'端DNA序列(23bp)和IgG1樞紐的5'端DNA序列(22bp)所構成。

首先，一種0.6 kb 的EPO DNA片段係以來自含有全長的人類EPO cDNA之質體p9E、以引子EF5和EFL3，0.7 kb的Fc片段係由來自含有全長的人類IgG1  
15 cDNA序列之質體pD、以引子EF3和EFL5，藉由PCR (Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity)各別地予以擴增(p9E和pD係來自本發明人自己的實驗室)。2個片段接而被純化以及以相等的量予以混合。利用該混合物作為模版，全長1.3 kb的rHuEPO-Fc DNA係藉由引  
20 子 EF5和EF3予以擴增。經純化的1.3 kb片段係藉由EocR I和Not I (New England Biolab Inc. US)予以水解以及接而被選殖至EcoR I/Not I-水解的哺乳動物表現載體pCD 1(第2圖)之內。形成的重組型載體被命名為pCdEpo-Fc，以及編碼HuEPO-Fc蛋白的胺基酸序列之

被插入的核酸序列係藉由DNA定序予以確認。

## 2. rHuEPO-Fc表現細胞株的建立

帶有二氫葉酸還原酶(dhFr)不全之中國倉鼠卵巢細胞(CHO/dhFr<sup>-</sup>, ATCC號碼CRL-9096), 其已經被FDA認可作為  
5 生物物質的生產, 係被使用作為rHuEPO-Fc表現的宿主細胞。

CHO-dhFr<sup>-</sup>細胞係利用脂質體轉染試劑(LipoFectamine)(Gibco, 目錄編號: 18292-037, USA)而以重組型載體pCdEpo-Fc予以轉染。來自被選擇的純系的培養物之懸浮液  
10 係藉由ELISA(Roche, 目錄編號: 1-693417, 加拿大)予以分析EPO的活性。陽性的純系係於增加的甲氨蝶呤(Methotrexate)(MTX)壓力下予以進一步地篩選。一種具有最高的rHuEPO-Fc蛋白表現之細胞株係被選擇為表現rHuEPO-Fc的CHO細胞株, 以及逐漸地適應無血清的培養  
15 液(CD CHO培養液, Gibco, 目錄編號: 10743 -029, USA)。此表現rHuEPO-Fc的CHO細胞株被使用於rHuEPOFc蛋白的生產。

## 3. rHuEPO-Fc蛋白的純化

rHuEPO-Fc蛋白分子, 其等係被包含於自培養表現  
20 rHuEPO-Fc的CHO細胞收集的無血清的培養液之懸浮液內, 係首先藉由蛋白A親和色譜法(Amersham, 目錄編號: 17-040201, 加拿大)予以單離。經單離的蛋白係藉由於HiLoad 16/60 Superdex 200pg管柱(Amersham, 目錄編號: 17-1069-01, 加拿大)之凝膠過濾予以進一步地純

化。rHuEPO-Fc蛋白的純度係多於98%，當藉由電泳決定時。

#### 4.純的rHuEPO-Fc蛋白的大小的決定

首先，SDS-PAGE被進行以決定純的rHuEPO-Fc蛋白的大小。如第3圖中所顯示的，於非還原條件，其測量在雙硫鍵的存在下之蛋白的全部的大小，之下的8%雙三羥甲基氨基甲烷(Bis-Tris)凝膠內見到一種具有大約180 kDa的分子量之單一的電泳帶。此指示多數的rHuEPO-Fc蛋白分子係以二聚體形式被生產，如融合蛋白的設計所預期的。當SDS-PAGE分析係於還原條件(100mM 二硫蘇糖醇，DTI)下被實施以打斷雙硫鍵時，只有具有75Kda的分子量之電泳帶被辨識出，與HuEPO-樞紐區-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>的單一多肽鏈之估計的分子量一致。

帶有糖化作用，其係藉由質譜(MALDI-TOF-MS)決定，之純的rHuEPO-Fc融合蛋白之準確的分子量是111099道爾頓(111.1 Kda)。於此分析中，只有一種單一的蛋白峰被觀察到，其指示經純化的rHuEPO-Fc蛋白是幾乎100%純的。純的rHuEPO-Fc蛋白的N端之15個胺基酸係藉由蛋白序列分析而決定為：APRLICDSRVLERY。此與天然的人類EPO多肽之最前面的15個胺基酸的序列一致，以及確認經純化的rHuEPO-Fc蛋白不具有正確且完整的EPO分子序列，如由編碼rHuEPO-Fc融合蛋白的胺基酸序列之DNA序列所預測的一樣。

#### 5. rHuEPO-Fc 於正常小鼠內之提高的紅血球生成活性

小鼠體內之活體內實驗係被實施以確認rHuEPO-Fc  
蛋白之紅血球生成活性的保持，以及決定其之相較於  
rHuEPO和達比波廷-阿伐( $\alpha$ )的效力。為了比較的目的，  
被使用於本發明說明的動物實驗中之3種EPO：吾人的  
5 rHuEPO-Fc、rHuEPO(換言之，天然的人類EPO)以及達  
比波廷-阿伐( $\alpha$ )，的全部劑量是以克分子根據為基礎之  
EPO分子部分單獨的量。關於rHuEPO-Fc蛋白，EPO部分  
提供總rHuEPO-Fc的分子量的41.4%，當藉由EPO的胺基  
酸的重量於全部的rHuEPO-Fc分子的總胺基酸的重量中  
10 的比率予以計算時(在399個aa之中的166個aa)。  
rHuEPO-Fc之EPO的量接而被決定為rHuEPO-Fc蛋白的  
總量之41.4%。

rHuEPO-Fc(存貨濃度：0.5mg/ml，98.6%的純度)和天  
然的人類rHuEPO(換言之，具有天然的人類EPO結構)(6000  
15 IU/0.5ml，由Kirin Brewery Co.，日本，所製造)係被稀釋  
於載體溶液(2.5mg/ml的人類血清白蛋白、5.8mg/ml的檸檬  
酸鈉、0.06mg/ml的檸檬酸和5.8mg/ml的氯化鈉，pH5.5-5.6)  
內。rHuEPO的劑量的量係依據其之活性/量之配給量來計  
算。BALB/c小鼠(6至8週大，稱重18-22g，等量的雄性與雌  
20 性，其等係購自於中國，AMMS，實驗動物中心)以6隻被  
隨機地分組於各組中。各組小鼠係以一個劑量(0.1, 0.5,  
2.5,12.5, 62.5  $\mu$ g/kg)，一種注射途徑(經由尾靜脈之i.v.或者  
s. c.)以及一種注射時間表(每週3次或每週1次)的一種組合  
予以治療。小鼠的對照組係以等體積的載體溶液予以注

射。該治療持續歷時3週以及總計的觀察時間是5週。供測量之周邊血液樣本(尾靜脈)係於治療之前、於每週的第4天和第7天歷時5週取得。Hb係藉由測量儀而被測量為指數。平均值±SD係由來自各組的數據予以計算以及t 檢定(t test)

5 係在不同組之中實施。

每週3次的EPO的投藥至小鼠，但有條件是該等EPO具有正常的紅血球生成活性，會誘導飽和的紅血球生成的刺激。如第4圖中所顯示的，以每週3次s.c.治療的2組具有顯著地Hb位準的提升，即使在2.5µg/kg的劑量。此實驗顯示  
10 出rHuEPO-Fc展現出一種像rHuEPO一樣有效的活體內的紅血球生成活性。於治療組中的Hb位準的提升是劑量依賴性的。然而，Hb位準飽和的提升係在12.5 µg/kg的rHuEPO-Fc之劑量於小鼠體內被誘導，反之相似的Hb位準飽和的提升只在62.5µg/kg的rHuEPO之劑量達到。由2.5µg/kg的  
15 rHuEPO-Fc誘導的Hb位準的提升亦大於由2.5 µg/kg的rHuEPO誘導的。此等結果暗示比起rHuEPO、藉由rHuEPOFc之更有效力的紅血球生成刺激。

rHuEPO-Fc的紅血球生成潛力進一步地藉由降低注射時間至每週1次皮下地方式予以探究。如第5圖中所顯示  
20 的，rHuEPO-Fc-治療組在12.5，或62.5µg/kg的劑量顯示出Hb位準之劑量依賴性的提升。12.5和62.5µg/kg的rHuEPO的劑量二者亦誘導Hb位準的提升至相似的程度，其係大大地低於由62.5µg/kg的rHuEPO-Fc誘導的。此強烈地指出rHuEPO-Fc具有活體內提高之紅血球生成活性。據推測係由

於活體內 rHuEPO-Fc 之延長的半生期或藉由在 rHuEPO-Fc 蛋白內的二聚物 EPO 分子而被改良的 EPO 受體結合/活化，或者藉由二者之組合效力。

當相同劑量 (12.5 μg/kg) 的 rHuEPO-Fc 或 rHuEPO 被靜脈  
5 內地投藥每週 3 次或每週 1 次時，Hb 位準的提升係於全部的治療組中觀察到 (第 6 圖)。然而，每週 1 次的 rHuEPO-Fc 之 i.v. 投藥誘導更大、更持續的 Hb 位準的提升，其在該治療結束之後持續較長久。此數據提供進一步地支持 rHuEPO-Fc 蛋白之提高的紅血球生成性質，與具有天然存在的 EPO 蛋白的  
10 結構之 rHuEPO 相比之下。

#### 6. 於 5/6 腎切除的大鼠體內之 rHuEPO-Fc 的提高了的紅血球生成活性

於正常小鼠內之實驗證實活體內 rHuEPO-Fc 之提高的紅血球生成活性。為了進一步觀察 rHuEPO-Fc 刺激紅血球生  
15 成的效力，藥物動力學研究係被實施於藉由 5/6 腎切除術而造成的實驗性腎貧血之大鼠體內。rHuEPO-Fc 的效力係與 rHuEPO 和達比波廷-阿伐 (α) (60 μg/ml，批號 N079，由日本 Kirin Brewery Co. 所製造的) 的效力相比較。

威斯達 (Wistar) 大鼠 (等量的雄性與雌性，稱重  
20 160-180g，購自於 Vitalriver Experiment Animal Inc.，北京，中國，執照號碼 SCXK11-00-0008) 係被使用於本發明中以創造由於藉由一種 2 個步驟的腎切除術之腎功能衰竭的貧血模式 [27]。大鼠係以一般麻醉進行 5/6 腎切除術，其係於無菌狀態下、藉由 2 個獨立的手術完成。在 2/3 的左腎被切除

之後，允許大鼠復原歷時20天。右腎接而小心地被切除。抗生素係在各手術之後被投藥以預防感染。總計最終腎臟組織的5/6被切除。腎切除的大鼠逐漸地發展腎功能不充分(dissufficiency)和貧血。該等大鼠在腎切除術50天之後進入安定的貧血狀態，以及接而被隨機地分組(9隻/組)以開始EPO的投藥。各組的大鼠係以一個劑量(2.5, 12.5, 62.5 $\mu$ g/kg)，一種注射途徑(經由尾靜脈之i.v.或s. c.)以及一種注射時間表(每週1次或每2週1次)的一種組合予以治療。對照組和模式組的大鼠係以等體積的載體溶液予以注射。治療持續歷時4週以及總計的觀察時間是6週。

被每週1次皮下投藥之rHuEPO-Fc的全部的劑量(2.5, 12.5, 62.5  $\mu$ g/kg)係誘導Hb位準的劑量依賴性的提升，相較於沒有接受EPO治療之模式對照組。12.5和62.5 $\mu$ g/kg的rHuEPO 2者或者達比波廷，其等係被每週1次皮下地投藥，亦誘導Hb位準的提升。以12.5或62.5  $\mu$ g/kg的rHuEPO-Fc治療的2組之Hb增加的位準係各別地比以12.5或62.5 $\mu$ g/kg的rHuEPO治療的顯著地更高。62.5  $\mu$ g/kg的rHuEPO-Fc-治療組之Hb位準也比62.5 $\mu$ g/kg的達比波廷-治療組的Hb位準稍為地高。在停止治療之後，62.5 $\mu$ g/kg的rHuEPO-Fc-治療組之Hb位準的下降係緩慢的多以及該等Hb位準維持在比正常對照和模式對照組2組的Hb位準更高直到觀察的終了為止(在治療之後2週)，其指示一種更強的及/或一種延長的紅血球生成的刺激(總結於第7圖中)。

關於每2週1次的皮下注射治療，只有12.5或62.5 $\mu$ g/kg



的3種 EPO被投藥(第8圖)。12.5 $\mu$ g/kg的rHuEPO相較於模式對照組幾乎沒有增加的Hb位準，以及於62.5 $\mu$ g/kg的rHuEPO治療組的較弱的紅血球生成反應無法使Hb位準回到與正常對照組相比之正常位準。在12.5或62.5 $\mu$ g/kg的劑量之不論

5 rHuEPO-Fc或是達比波廷的治療誘導Hb位準顯著的提升，其係更高於正常對照組的位準，指示藉由rHuEPO-Fc和達比波廷二者之有效的貧血狀態之修正。在效力方面的沒有顯著的差異在相同劑量的rHuEPO-Fc和達比波廷之間被觀察到。62.5 $\mu$ g/kg的高劑量導致紅血球生成的持續的增加直到

10 觀察的終止(治療之後2週)。此進一步地暗示rHuEPO-Fc和達比波廷展現出活體內持久的刺激紅血球生成的性質，其依次能被轉換成臨床上對病人之投藥頻率的降低。

縱然達比波廷已經被認可為具有較少頻率的注射之臨床的應用以增加病人依從以及降低健康照顧提供者的工作

15 負擔，此等實驗數據強烈地指出於本發明中揭示的rHuEPO-Fc具有至少相似的潛在好處如以上討論的，達比波廷，作為人類EPO分子之一種含有額外的糖化合物(增加的糖化作用)之突變的類似物，可能由於改變的三維結構而具有活體內誘導免疫發生(immunogenesis)之增加的風險。只

20 有接受達比波廷治療的病人之長期觀察會對於達比波廷的免疫原性的風險提供一種決定性的答案。相對地，rHuEPO-Fc，沒有EPO分子部分的修飾，具有與天然的人類EPO完全相同的或者緊密地相似的一種碳水化合物含量。於本發明人之純的rHuEPO-Fc蛋白內之唾液酸的量是將近

10.0 mmol/mmol EPO，與rHuEPO之報告的參數一致。  
rHuEPO-Fc的Fc部分，其不具有任何外來的胺基酸/連接  
肽，代表人類IgG1的一般結構，以及理論上將不導致一種  
免疫原性的反應。設若臨床上被認可，rHuEPO-Fc可以提供  
5 病人比現在可得的rHuEPO和EPO類似物之一種更好的選  
擇，尤其該等需要長期投藥的病人。

每2週1次靜脈內地注射1次，rHuEPO-Fc和達比波廷  
(62.5 $\mu$ g/kg)能夠誘導具有腎貧血的大鼠體內之Hb位準的完  
全相同的增加，遠在正常的對照大鼠之正常的Hb位準之上  
10 (第9圖)。此進一步顯示出由rHuEPO-Fc之紅血球生成的持  
續的刺激，如同達比波廷的效力已經在臨床上被證實一樣。

衍生自骨髓細胞，其等係收集自治療(每週1次或每2  
週，s.c.或i.v.)之後的5/6腎切除的大鼠體內，的細胞培養實  
驗之數據顯示出rHuEPO-Fc、rHuEPO以及達比波廷全部刺  
15 激CFU-E和BFU-E的形成。rHuEPO-Fc和達比波廷的潛力是  
相像的以及比rHuEPO的潛力更強(第10圖)。

於治療組和模式對照組中的血液尿素氮(BUN)和Crea  
的位準是相似的。於全部的治療組中的血清的Fe的位準是  
比模式對照組的更高。病理上的檢查觀察到於全部的EPO-  
20 治療的大鼠的骨髓和脾臟中之紅血球(RBC)相關的細胞的  
分佈之增加。

### 7. 恆河猴體內之rHuEPO-Fc的藥物動力學研究

如以上討論的，本發明人已經以此方式設計  
rHuEPO-Fc，融合蛋白的EPO部分保持天然的EPO之功能性

質，例如：刺激紅血球生成，以及人類IgG1的Fc片段允許融合蛋白於循環中安定的存在，從而延長其之活體內半生期。以上的動物研究已經顯示出rHuEPO-Fc的紅血球生成活性與rHuEPO相比是提高的。本發明人也已經實施藥物動力學研究以決定rHuEPO-Fc的活體內半生期，與rHuEPO的相比。靈長類動物係被使用以產生數據，因其等是生物學上非常相似於人類的。

研究設計係以文獻報告為基礎以及實驗係依據藥物動力學的一般指導方針予以實施。各組具有5隻猴(3-5kg，其等係購自於中國，AMMS，實驗動物中心)的2組恆河猴係各別地被靜脈內注射以5  $\mu$ g/kg的rHuEPO-Fc或rHuEPO。血液樣本係在注射之前以及在注射後0.017, 0.167, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 96, 168, 240 h取得。血清係藉由離心予以收集，以及血清的rHuEPO-Fc或rHuEPO位準係藉由利用紅血球生成素酵素連結免疫吸附分析分析(ELISA)套組(購自於R&D Systems, Minneapolis, MN)予以決定。靜脈內注射的rHuEPO-Fc和rHuEPO之平均的半生期( $t_{1/2}$ )各別地是35.24 $\pm$ 5.15 h和8.72 $\pm$ 1.69 h(總結於第11圖中)。

為了觀察rHuEPO-Fc之生物可利用性，5  $\mu$ g/kg的rHuEPO-Fc係被皮下地注射至5隻恆河猴。血液樣本係在注射之前以及在注射後1, 2, 5, 8, 10, 12, 15, 24, 48, 72, 96, 168, 240 h予以取得，以及rHuEPO-Fc的血清位準係藉由R&D套組予以決定。皮下注射之生物可利用性指數被計算為35.71 $\pm$ 5.37%。此與具有慢性腎衰竭的病人體內之達比

波廷-阿伐( $\alpha$ )(Aranesp<sup>TM</sup>)的被報告的生物可利用性圖是完全相同的[9, 15]。

此數據顯示出rHuEPO-Fc於靈長類動物體內具有一種顯著地延長的半生期，以及rHuEPO-Fc的活體內半生期是由日本的Kirin Beer Brewing Co. 所製造的rHuEPO的活體內半生期至少4倍更長。延長的半生期活體內很可能促成rHuEPO-Fc之提高的紅血球生成活性。

#### 8. 於長尾猴(Macaca fascicularis)體內之rHuEPO-Fc的免疫原性

如以上指示的，注意力被放在rHuEPO-Fc融合蛋白的設計以有意地避免或最小化rHuEPO-Fc融合蛋白的免疫原性的性質之變化。本發明人避免包括/加入任何外部的胺基酸或連接肽的序列於該融合蛋白內。第1B圖的實施例之發明的HuEPO-Fc融合蛋白只含有天然的EPO蛋白以及人類IgG1的Fc片段(樞紐區，CH2，CH3)的多肽序列，以及理論上不會誘導對抗rHuEPO-Fc蛋白之一種免疫原性的反應以及抗體的產生。如同本技藝中具有技術的一個人會明瞭的，具有任擇的結構之其他的實施例也被本發明所包含。

下列的靈長類動物研究係被實施以觀察rHuEPO-Fc蛋白的免疫原性。10隻食蟹獼猴(crab-eating macaque)(長尾猴(Macaca fascicularis))(雄性/雌性=5/5，5歲大，雄性的平均重量 $4.0 \pm 0.3$ kg，雌性是 $2.9 \pm 0.4$ kg，購自於中國，AMMS，動物中心實驗室)係每週3次被皮下地注射 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$  的純化的rHuEPO-Fc歷時4週，以及2隻係以等體積的載體溶液予以注

射作為對照動物。一週一次收集血清歷時5週(治療後1週)以及被測試對抗rHuEPO-Fc的專一性抗體,其係藉由利用經純化的rHuEPO-Fc(51 $\mu$ g/ml)作為塗覆抗原之ELISA。另外,周邊血液內的RBC計數和Hb位準也於實驗期間之內決定。

- 5 結果的數據顯示,儘管於rHuEPO-Fc-治療的獼猴內之經刺激的紅血球生成被觀察到(平均的RBC數目係自 $4.74 \times 10^9$ /ml增加至 $6.67 \times 10^9$ /ml以及平均的Hb位準係自12.2g/dl至13.7g/dl),rHuEPO-Fc無法誘導可偵測的對抗該融合蛋白之專一性抗體。此等結果指出rHuEPO-Fc融合蛋白
- 10 不造成靈長類動物體內的免疫原性。

#### 9. 於正常小鼠內之rHuEPO-Fc的急性毒性研究

為了評估rHuEPO-Fc融合蛋白的安全性,急性毒性研究係於動物體內實施。

- 2組的BALB/c小鼠(n=20,等量的雄性與雌性,5-6週
- 15 大,雌性的平均重量是 $15.8 \pm 0.4$ g,雄性是 $15.9 \pm 0.6$ g,購自於Chinese Academy of Medicine,中國)各別地經由其等之尾靜脈被靜脈內注射一次過量的純化的rHuEPO-Fc(雄性=13.3mg/kg,雌性=13.2mg/kg)或者等體積的載體溶液。在注射後除了觀察立即的反應之外,一般行為和狀態、活動、
- 20 飲食和排便形態與變化被監測且被每天記錄歷時14天。全部的小鼠也在第7天和第14天稱重。在注射後第15天,小鼠之主要器官的解剖的檢查係被實施。設若器官之任何不尋常的變化或可疑的變化被觀察到時,病理學檢查會被實施。

2 組中的全部的小鼠在注射後沒有任何立即的反應。

於14天的期間內，沒有任何明顯的行為、活動、飲食和  
 排便形態之變化被觀察到。並且，2組中小鼠的重量在測  
 試的期間中是穩定地增加的，以及於注射後第7天或第14  
 天，2組之間沒有任何明顯的差異。於腦、肺、心、肝和  
 5 腎的組織內沒有偵測到任何不正常或病理的變化。此等  
 結果指出過量的rHuEPO-Fc的投藥，遠多於需要用於展  
 現正常紅血球生成功能的量，是安全的以及沒有任何明  
 顯的毒性效力。

#### 10. 野生型和突變的EPO融合蛋白之比較

10 比較野生型和突變的形式之EPO蛋白的研究變化也被  
 實施。如上所說明的，於本發明的一個實施例中包括在胺  
 基酸殘基172之一種單一的胺基酸突變(C172G)。為了比較  
 的目的，一種野生型融合蛋白也被製備以在殘基172具有一  
 個半胱胺酸胺基酸(第12圖)。野生型融合蛋白係以如同以上  
 15 的實施例1- 3相同的方式予以製備。有關重組型質體的建  
 構，下列的寡引子(QIAGEN Inc.,US)被使用(於EFL5w和  
 EFL3w中改變的胺基酸被粗體化，與實施例 1的引子相  
 比)：

EF5: 5'-ccggaattcgccaccatgggggtgcacgaatgtcctgect-3'；

20 EF3: 5'-ttttccttttgcggccgcttatttaccgagacagggagag-3'；

EFL5w: 5'-aggcctgcaggacaggggacagagttgagcccaatcttgaca-3'；

EFL3w: 5'-tgtcacaagattgggctcaactctgtcccctgtcctgcaggect-3'。

EFL5w和EFL3w的引子序列各別地被列於序列辨識編  
 號：9-10中。

小鼠體內之活體內實驗係被實施以比較野生型融合蛋白(本文中被提及為rHuEPO- FcC)與突變的融合蛋白(換言之，如上說明的本發明的rHuEPO-Fc蛋白)以及與重組型人類EPO(rHuEPO)之紅血球生成活性。為了比較的目的，被

5 使用於本實驗中之3種EPO，即rHuEPO-Fc、rHuEPO-FcC和rHuEPO，的全部劑量是以克分子根據為基礎之EPO分子部分單獨的量。關於rHuEPO-Fc和rHuEPO-FcC蛋白，EPO部分提供總分子量的41.4%，當藉由EPO的胺基酸的重量對於全部的rHuEPO-Fc和rHuEPO-FcC分子的總胺基

10 酸的重量中的比率予以計算時(換言之，在399個aa之中的166個aa)。

rHuEPO-Fc(存貨濃度：300 $\mu$ g/ml)、rHuEPO-FcC(存貨濃度：90 $\mu$ g/ml)和具有天然的人類EPO結構之rHuEPO(6000 IU/0.5ml，由Kirin Brewery Co.，日本，所製造)係被稀釋

15 於載體溶液(2.5mg/ml的人類血清白蛋白、5.8mg/ml的檸檬酸鈉、0.06mg/ml的檸檬酸和5.8mg/ml的氯化鈉，pH5.5-5.6)內。rHuEPO的劑量的量係依據其之活性/量之比率來計算。BALB/c小鼠(9至10週大，稱重18-22g，等量的雄性與雌性，購自於中國，AMMS，實驗動物中心)以8隻被隨機地分組

20 於各組中。各組小鼠係以一個劑量(2.5,12.5, 62.5  $\mu$ g/kg)，一種注射途徑(s. c.)以及一種注射時間表(每週3次或每週1次)的一種組合予以治療。小鼠的對照組係以等體積的載體溶液予以注射。治療持續歷時26天。供測量之周邊血液樣本(尾靜脈)係於治療之前、於治療的第2、6、9、13、16、

19、22和26天取得。Hb係藉由測量儀而被測量為指數。平均值±SD係由來自各組的數據予以計算以及t 檢定係在不同組之中實施。

如第13圖中所顯示的，全部3種EPO蛋白以每週3次的間隔的投藥刺激紅血球生成。不論是2.5 µg/kg或12.5 µg/kg的劑量，rHuEPO-Fc誘導比rHuEPO更高的Hb位準的提升。Hb位準之最高的提升係由12.5 µg/kg劑量的rHuEPO-Fc達到。2.5 µg/kg和12.5 µg/kg劑量的rHuEPO-FcC均比等價劑量的rHuEPO和rHuEPO-Fc誘導微弱得多的紅血球生成，如藉由於rHuEPO-FcC-治療組中的Hb位準之顯著較低的提升所指出的。事實上，12.5 µg/kg的rHuEPO-FcC係誘導比2.5 µg/kg的rHuEPO更低的Hb位準提升。此等結果暗示rHuEPO-FcC具有活體內受損的紅血球生成活性，與具有天然的EPO分子序列之rHuEPO相比。相比之下，本發明的rHuEPO-Fc融合蛋白展現出更有效力的紅血球生成功能。3種EPO蛋白以每週3次的間隔的投藥大大地排除蛋白的半生期上的差異之影響。

rHuEPO-Fc和rHuEPO-FcC的紅血球生成潛力係藉由降低注射次數至皮下每週1次而予以進一步地評估。如第14圖中所顯示的，rHuEPO-Fc-治療組在12.5 µg/kg或62.5 µg/kg的劑量顯示出比rHuEPO-治療的個體更高的Hb位準的提升。相對地，rHuEPO-FcC係誘導比由rHuEPO所誘導的為更弱的Hb位準的提升。舉例而言，在多數的時間點，12.5µg/kg的rHuEPO係誘導比由62.5 µg/kg的rHuEPO-FcC



所誘導的為更高的Hb位準的提升。此進一步指出藉由降低投藥次數以包括半生期的效力，rHuEPO-FcC展現出微弱得多的活體內紅血球生成功能，與具有天然的EPO分子序列之rHuEPO相比，以及與本發明的rHuEPO-Fc融合蛋白相比。

總之，此等結果顯示出rHuEPO-FcC，其係藉由人類EPO和人類Fc片段(樞紐，CH2和CH3)2者之天然的分子序列的融合形成的，展現出微弱得多的活體內紅血球生成功能，與具有天然的EPO分子序列之rHuEPO相比。特別地，rHuEPO-FcC融合蛋白的紅血球生成活性係低於1/5的天然EPO分子的紅血球生成活性。此指出EPO分子和人類Fc片段的天然序列之間的融合削弱EPO分子的功能性質。藉由在Fc片段的樞紐區之第一個半胱胺酸殘基的單一的胺基酸取代，包含天然的EPO分子序列和突變的Fc片段之本發明的rHuEPO-Fc融合蛋白顯示出相較於天然的EPO分子為更有效力的活體內的紅血球生成功能。此數據暗示野生型Fc片段的樞紐區之第一個半胱胺酸殘基以某種方式干擾EPO分子，很可能藉由對EPO分子造成結構性的變化，以及依序削弱EPO分子於刺激紅血球生成的功能性質。

按照前述的揭示對於本技藝中具有技術的那些人將是明顯的，許多改變和修飾在本發明的實施上是可能的，而不背離其之精神與範疇。

圖式簡單說明

第1A圖是一個結構圖，其顯示本發明的重組型人類EPO-Fc融合蛋白(rHuEPO-Fc)的一般結構。

第1B圖是一個序列表，其顯示rHuEPO-Fc蛋白的核苷酸序列和演繹的胺基酸(aa)的序列。DNA的全長是1281bp。

5 於演繹的蛋白序列中的426個胺基酸包括信息肽的27個aa以及完整的rHuEPO-Fc蛋白之399個aa。完整的rHuEPO-Fc蛋白係由人類EPO領域(166 aa)，人類IgG1的Fc片段之樞紐區(16aa，下面劃線的)，以及CH2和CH3領域(217 aa)構成。

10 成熟的rHuEPO-Fc融合蛋白的多肽之計算的分子量是44.6kDa，由18.5kDa (41.4%)的EPO片段和26.1 kDa(58.6%)的IgG1 Fc片段組成。一種同源二聚物係藉由在樞紐區之內的2個半胱胺酸殘基(被框起的)之2個雙硫鍵予以形成。在成熟的融合蛋白之殘基172 (換言之，樞紐區的第6個胺基酸)，天然的半胱胺酸殘基已經被甘胺酸(粗體)取代。

15 第2圖是一種顯示哺乳動物表現質體pCD1的結構和特徵之結構圖，該質體係被使用來插入編碼rHuEPO-Fc融合蛋白的多肽之DNA序列，以及用來轉染表現rHuEPO-Fc融合蛋白的CHO細胞。

第3圖是一種SDS-PAGE影像，其顯示藉由SDS-PAGE

20 分析、於非還原狀態中的純的rHuEPO-Fc蛋白之二聚體形式以及於還原狀態中的純的rHuEPO-Fc蛋白之單體形式的大小。來自表現rHuEPO-Fc之經培養的CHO細胞株的懸浮液之純化的rHuEPO-Fc蛋白主要地存在為二聚體形式，以及於非還原狀態中的8% 雙三羥甲基氨基甲烷凝膠上具有大約

180 kDa的分子量。於還原狀態中(100mM 二硫蘇糖醇, DTT)打破雙硫鍵, 二聚體被分離成2個具有75 kDa的分子量之完全相同的單體單元。

第4A和4B圖是顯示以每週3次rHuEPO-Fc或rHuEPO的皮下注射(s.c.)治療的正常小鼠內之血紅素(Hb)位準的劑量依賴性的增加的圖。各點代表該組(6隻小鼠)的Hb位準。第0天位準代表在治療之前的Hb位準。A: 以rHuEPO-Fc治療的小鼠。B: 以天然的rHuEPO治療的小鼠。

第5A和5B圖是顯示以每週1次的rHuEPOFc或rHuEPO s.c.治療之正常小鼠內之血紅素(Hb)位準的劑量依賴性的增加的圖。各點代表該組(6隻小鼠)的平均Hb位準。第0天位準代表在治療之前的Hb位準。A: 以rHuEPO-Fc治療的小鼠。B: 以天然的rHuEPO治療的小鼠。

第6A和6B圖是顯示以12.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的rHuEPO-Fc或rHuEPO之靜脈內注射(i.v.)治療的正常小鼠內之血紅素(Hb)位準的增加的圖。各點代表該組(6隻小鼠)的平均Hb位準。第0天位準代表在治療之前的Hb位準。A: 以一週一次治療的之小鼠。B: 以一週3次治療的小鼠。

第7圖是一個顯示於以每週1次s.c.的rHuEPO-Fc、rHuEPO或達比波廷阿伐(縮寫的Darbe.)治療的5/6腎切除的大鼠體內之血紅素(Hb)位準的劑量依賴性的增加的圖。各點代表該組的平均Hb位準。正常的對照是以載體溶液的注射之正常的大鼠。模式的對照是以載體溶液的注射之5/6腎切除的大鼠。第0週位準代表在治療之前的Hb位準。\*: 在

治療之後的週數。

第8圖是一個顯示以每2週1次 s.c.的 rHuEPO-Fc、rHuEPO或達比波廷阿伐(縮寫的Darbe.)治療的5/6腎切除的大鼠體內之血紅素(Hb)位準的劑量依賴性的增加的圖。各點代表該組的平均Hb位準。正常的對照是以載體溶液的注射之正常的大鼠。模式的對照是以載體溶液的注射之5/6腎切除的大鼠。第0週位準代表在治療之前的Hb位準。\*：在治療之後的週數。

第9圖是一個顯示以每2週1次 i.v.的 62.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之 rHuEPO-Fc，或達比波廷阿伐(縮寫的Darbe.)治療的5/6腎切除的大鼠體內之血紅素(Hb)位準的劑量依賴性的增加的圖。各點代表該組的平均Hb位準。正常的對照是以載體溶液的注射之正常的大鼠。模式的對照是以載體溶液的注射之5/6腎切除的大鼠。第0週位準代表在治療之前的Hb位準。\*：在治療之後的週數。

第10A-10C圖顯示用於刺激以不同的劑量和時間表治療的5/6腎切除的大鼠體內之CFU-E和BFU-E的群落形成的 rHuEPO-Fc、rHuEPO和達比波廷阿伐之潛力的比較。rHuEPO-Fc和達比波廷阿伐(縮寫的Darbe.)治療顯示出刺激CFU-E和BFU-E 的群落形成之相似的劑量依賴性潛力，然而rHuEPO是較不有效力的。A，每週1次s.c.。B，每2週1次s.c.。C，每2週1次i.v.。

第11圖是一個顯示在5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 rHuEPO-Fc或 rHuEPO之靜脈內注射至恆河猴之後，rHuEPO-Fc和rHuEPO的血清位

準的圖(5隻猴的平均位準)。

第12圖是一個序列表，其顯示一種野生型rHuEPO-FcC蛋白的核苷酸序列和演繹的胺基酸(aa)的序列。該序列特點係與第1圖中所顯示的相同，除了一種天然的、野生型的半胱胺酸殘基係存在於成熟的融合蛋白的殘基172 (換言之，  
5 脘胺酸殘基係存在於成熟的融合蛋白的殘基172 (換言之，  
樞紐區的第6個胺基酸)之外。

第13圖是一個圖，其顯示以每週3次的rHuEPO-Fc(本發明的突變的融合蛋白)、rHuEPO- FcC(野生型融合蛋白)和rHuEPO之皮下注射(s. c.)治療的正常小鼠體內之血紅素  
10 (Hb)位準的劑量依賴性的增加。各點代表該組(8)的平均Hb位準。正常的對照是以載體溶液的注射之正常的小鼠。第0天位準代表在治療之前的Hb位準。

第14圖是一個圖，其顯示以每週1次的rHuEPO-Fc、rHuEPO-FcC和rHuEPO之皮下注射(s. c.)治療的正常小鼠體  
15 內之血紅素(Hb)位準的劑量依賴性的增加。各點代表該組(8)的平均Hb位準。正常的對照是以載體溶液的注射之正常的小鼠。第0天位準代表在治療之前的Hb位準。

## 參考資料

1. Cohen J, et al. Erythropoietin and its receptor: signaling and clinical manifestations. *IMAJ* 4, pp1072-1076(2002)
- 5 2. Blackwell K, et al. rHuEPO and improved treatment outcomes: potential modes of action. *The Oncologist* 9(suppl 5), pp41-47(2004).
- 10 3. Lappin TR, et al. EPO's alter ego: erythropoietin has multiple actions. *Stem Cells* 20,pp485-492(2002).
4. Maiese K, et al. New avenues of exploration for erythropoietin. *JAMA* 293(1), pp90-95(2005).
- 15 5. Fisher JW. Erythropoietin: physiologic and pharmacologic aspects. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 216, pp358-369(1997).
6. Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Internal Med.* 43(8), pp649-659(2004).
- 20 7. Ng T, et al. Recombinant erythropoietin in clinical practice. *Postgrad. Med.* 179, pp367-376(2005).
8. Weiss G, et al. Anemia of chronic disease. *N. Engl. J. Med.* 352(10), pp1011-1023(2005).
- 25 9. Macdougall IC. An overview of the efficacy and safety of novel erythropoiesis stimulating protein(NESP). *Nephrol. Dial. Transplant.* 16(suppl 3), pp 14-21(2001).
- 30 10. Joy MS. Darbepoetin-alfa: a novel erythropoiesis-stimulating protein. *Ann. Pharmacother.* 36,pp1183-1192(2002).
11. Ellitt S, et al. Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. *Nature Biotechnology* 21, pp414-421(2003).
- 35 12. Elliott S, et al. Control of rHuEPO biological activity: the role of carbohydrate. *Experimental Hematology* 32, pp1146-1155(2004).
- 40 13. Egrie JC, et al. Darbepoetin-alfa has a longer circulating half-life and greater in vivo potency than recombinant human erythropoietin. *Exp. Hematol.* 31, pp290-299(2003).
- 45 14. Egrie JC, et al. Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein(NESP). *British J. Cancer.* 84(suppl 1), pp3-10(2001).
- 50 15. Macdougall IC, et al. Pharmacokinetics of novel erythropoiesis stimulating protein compared with epoetin alfa in dialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 50 10,pp2392-2395(1999).

- 5 16. Jolting K, et al. Population pharmacokinetic analysis of peglated human erythropoietin in rats. *J. Pharm. Sci.* 93(12), pp3027-3038(2004)
17. Dalle B, et al. Dimeric erythropoietin fusion protein with enhanced erythropoietic activity in vitro and in vivo. *Blood* 97(12), pp3776-3782(2001).
- 10 18. Kochendoerfer GG, et al. Design and chemical synthesis of a homogeneous polymer-modified erythropoiesis protein. *Science* 299 pp884-887(2003).
- 15 19. Sytkowski AS, et al. Human erythropoietin dimers with markedly enhanced in vivo activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, pp1184-1188(1998).
- 20 20. Sytkowski AT, et al. An erythropoietin fusion protein comprised of identical repeating domains exhibits enhanced biological properties. *J. Biol. Chem.* 274(35), pp24773-24778(1999).
- 25 21. Jones TD, et al. The development of a modified human IFN- $\alpha$ 2b linked to the Fc portion of human IgG1 as a novel potential therapeutic for the treatment of hepatitis C virus infection. *J. Interferon. Cytokine. Res.* 24, pp560-572(2004).
- 30 22. Lo KM, et al. High level expression and secretion of Fc-X fusion proteins in mammalian cells. *Protein engineering* 11(6), pp495-500(1998).
- 35 23. Mohler KM, et al. Soluble tumor necrosis factor(TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J. Immunol.* 151(3), pp1548-1561(1993).
- 40 24. Way JC, et al. Improvement of Fc-erythropoietin structure and pharmacokinetics by modification at a disulfide bond. *Protein Engineering, Design & Selection* 18(3), pp 111-118(2005).
- 45 25. Goldenberg MM. Etanercept, a novel drug for the treatment of patients with severe, active rheumatoid arthritis. *Clin. Ther.* 21(1), pp75-87(1999)
26. Wong VK, et al. The use of alefacept in the treatment of psoriasis. *Skin Therapy Lett.* 8(6), pp1-2(2003)
- 50 27. Chanutin A, et al. Experimental renal insufficiency produced by partial 40 nephrectomy. *Arch. Intern. Med.* 49, pp767-787 (1932).

## 序列表

<110> 諾華健控股公司

5 <120> 在治體中具有延長之半生期以及提高之紅血球生成治性的重組人類  
EPO-FC 融合蛋白

<130> N240 0002

10 <150> US 11/340,661  
<151> 2006-01-27

<160> 10

15 <170> PatentIn 版本 3.3

<210> 1  
<211> 1200  
<212> DNA

20 <213> 人造的

<220>  
<223> 編碼 rHuEPO-Fc 融合蛋白之 DNA

25 <400> 1  
gccccaccac gcctcatctg tgacagccga gtcctggaga ggtacctctt ggaggccaag 60  
gaggccgaga atatcacgac gggctgtgct gaacactgca gcttgaatga gaatatcact 120  
30 gtcccagaca ccaaagttaa tttctatgcc tggaagagga tggaggtcgg gcagcaggcc 180  
gtagaagtct ggcagggcct ggccctgctg tcggaagetg tcttgcgggg ccaggccctg 240  
ttggtcaact cttcccagcc gtgggagccc ctgcagctgc atgtggataa agccgtcagt 300  
35 ggccttcgca gcctcaccac tctgcttcgg gctctgagcag cccagaagga agccatctcc 360  
cctccagatg cggcctcagc tgctccactc cgaacaatca ctgctgacac tttccgcaaa 420  
40 ctettccgag tctactcaa tttcctccgg ggaaagctga agctgtacac aggggaggcc 480  
tgcaggacag gggacagagt tgagccaaa tctggtgaca aaactagtag atgccaccg 540  
tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag 600  
45 gacaccctca tgatctccc gaccctgag gtcacatgag tgggtggtgga cgtgagccac 660  
gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggagggtgca taatgccaag 720  
50 acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtoagcgt cctcaccgtc 780  
ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctcaa caaagccctc 840  
ccagccccc tgcagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacagggtg 900  
55 tacaccctgc cccatcccg ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgctg 960  
gtcaaaggct tctatcccag cgacatgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1020  
60 aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgagc gcccttctt cctctacagc 1080



aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 1140  
 catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct cctgtctcc gggtaaataa 1200

5  
 <210> 2  
 <211> 399  
 <212> PRT  
 <213> 人造的

10  
 <220>  
 <223> rHuEPO-Fc 融合蛋白之氨基酸序列

<400> 2

15  
 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu  
 1 5 10 15

20  
 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His  
 20 25 30

25  
 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe  
 35 40 45

30  
 Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gin Gin Ala Val Glu Val Trp  
 50 55 60

35  
 Gin Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gin Ala Leu  
 65 70 75 80

40  
 Leu Val Asn Ser Ser Gin Pro Trp Glu Pro Leu Gin Leu His Val Asp  
 85 90 95

45  
 Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu  
 100 105 110

50  
 Arg Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala  
 115 120 125

55  
 Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val  
 130 135 140

60  
 Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala  
 145 150 155 160

65  
 Cys Arg Thr Gly Asp Arg Val Glu Pro Lys Ser Gly Asp Lys Thr Ser  
 165 170 175

70  
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 180 185 190

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 195 200 205  
 5 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 210 215 220  
 10 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 225 230 235 240  
 15 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 245 250 255  
 20 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 260 265 270  
 25 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 275 280 285  
 30 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 290 295 300  
 35 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 305 310 315 320 325 330 335  
 40 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 340 345 350  
 45 Asp Gly Pro Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 355 360 365  
 50 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 370 375 380  
 55 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 385 390 395  
 <210> 3  
 <211> 1281  
 <212> DNA  
 <213> 人造的  
 <220>  
 <223> 編碼具有27個胺基酸信息肽的rHuEPO-Fc融合蛋白之DNA  
 60

peptide

<400> 3  
 5 atgggggtgc acgaatgtcc tgctggctg tggettctcc tgtccctgct gtogctccct 60  
 ctgggcctcc cagtcctggg cgcaccacca cgctcatct gtgacagccg agtcctggag 120  
 aggtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacga cgggctgtgc tgaacctgct 150  
 10 agcttgaatg agaatatcac tgtcccagac accaaagtta atttctatgc ctggaagagg 240  
 atggaggtcg ggcagcaggc cgtagaagtc tggcagggcc tggccctgct gtcggaagct 300  
 15 gtctgcggg gccaggccct gttggtcaac tcttcccagc cgtgggagcc cctgcagctg 360  
 catgtggata aagccgtcag tggccttcgc agcctcacca ctctgcttcg ggctctgoga 420  
 gccagaagg aagccatctc ccctccagat gcggcctcag ctgctccact ccgaacaatc 480  
 20 actgctgaca ctttccgcaa actcttcoga gtctactcca atttcctccg gggaaagctg 540  
 aagctgtaca caggggaggc ctgcaggaca ggggacagag ttgagcccaa atctggtgac 600  
 25 aaaactagta catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc 660  
 ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 720  
 gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 780  
 30 gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 840  
 gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 900  
 35 aaggtctcca acaaagccct ccagccccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg 960  
 cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1020  
 caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1080  
 40 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac 1140  
 ggccccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1200  
 45 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1260  
 tcctgtctc cgggtaaata a 1281

50 <210> 4  
 <211> 426  
 <212> PRT  
 <213> 人造的

55 <220>  
 <223> 具有27個胺基酸信息肽的 rHuEPO-Fc 融合蛋白之胺基酸序列

<400> 4  
 60 Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu  
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu  
                           20                          25                          30  
 5  
 Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu  
                           35                          40                          45  
 10  
 Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu  
           50                          55                          60  
 15  
 Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg  
   65                          70                          75                          80  
 20  
 Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu  
                           85                          90                          95  
 Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser  
                           100                          105                          110  
 25  
 Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly  
                           115                          120                          125  
 30  
 Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Arg Ala Gln Lys Glu  
   130                          135                          140  
 35  
 Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile  
   145                          150                          155                          160  
 40  
 Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu  
                           165                          170                          175  
 Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp  
                           180                          185                          190  
 45  
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Gly Asp Lys Thr Ser Thr Cys Pro Pro Cys  
                           195                          200                          205  
 50  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
   210                          215                          220  
 55  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
   225                          230                          235                          240  
 60  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
                           245                          250                          255

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
                   260                  265                  270

5 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
                   275                  280                  285

10 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
           290                  295                  300

15 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
   305                  310                  315                  320

20 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
                   325                  330                  335

25 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
                   340                  345                  350

30 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
                   355                  360                  365

35 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Pro Phe Phe  
   370                  375                  380

40 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
   385                  390                  395                  400

45 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
                   405                  410                  415

50 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
                   420                  425

45     <210> 5  
        <211> 40  
        <212> DNA  
        <213> 人造的

50     <220>  
        <223> 寡核苷酸引子

55     <400> 5  
        ccggaattcg ccaccatggg ggtgcacgaa tgtcctgcct

60     <210> 6  
        <211> 42  
        <212> DNA  
        <213> 人造的

	<220>		
	<223>	寡核苷酸引子	
5	<400>	6	
		ttttcctttt gcggccgctt atttaccgag agacagggag ag	42
10	<210>	7	
	<211>	45	
	<212>	DNA	
	<213>	人造的	
15	<220>		
	<223>	寡核苷酸引子	
	<400>	7	
		aggcctgcag gacaggggac agagttgagc ccaaactctgg tgaca	45
20	<210>	8	
	<211>	45	
	<212>	DNA	
	<213>	人造的	
25	<220>		
	<223>	寡核苷酸引子	
30	<400>	8	
		tgtcaccaga tttgggctca actctgtccc ctgtcctgca ggcct	45
35	<210>	9	
	<211>	45	
	<212>	DNA	
	<213>	人造的	
40	<220>		
	<223>	寡核苷酸引子	
	<400>	9	
		aggcctgcag gacaggggac agagttgagc ccaaactcttg tgaca	45
45	<210>	10	
	<211>	45	
	<212>	DNA	
	<213>	人造的	
50	<220>		
	<223>	寡核苷酸引子	
	<400>	10	
		tgtcacaaga tttgggctca actctgtccc ctgtcctgca ggcct	45

**【圖式簡單說明】**

第1A圖是一個結構圖，其顯示本發明的重組型人類EPO-Fc融合蛋白(rHuEPO-Fc)的一般結構。

第1B圖是一個序列表，其顯示rHuEPO-Fc蛋白的核苷酸序列和演繹的胺基酸(aa)的序列。DNA的全長是1281bp。於演繹的蛋白序列中的426個胺基酸包括信息肽的27個aa以及完整的rHuEPO-Fc蛋白之399個aa。完整的rHuEPO-Fc蛋白係由人類EPO領域(166 aa)，人類IgG1的Fc片段之樞紐區(16aa，下面劃線的)，以及CH2和CH3領域(217aa)構成。

成熟的rHuEPO-Fc融合蛋白的多肽之計算的分子量是44.6kDa，由18.5kDa (41.4%)的EPO片段和26.1 kDa(58.6%)的IgG1 Fc片段組成。一種同源二聚物係藉由在樞紐區之內的2個半胱胺酸殘基(被框起的)之2個雙硫鍵予以形成。在成熟的融合蛋白之殘基172(換言之，樞紐區的第6個胺基酸)，天然的半胱胺酸殘基已經被甘胺酸(粗體)取代。

第2圖是一種顯示哺乳動物表現質體pCD1的結構和特徵之結構圖，該質體係被使用來插入編碼rHuEPO-Fc融合蛋白的多肽之DNA序列，以及用來轉染表現rHuEPO-Fc融合蛋白的CHO細胞。

第3圖是一種SDS-PAGE影像，其顯示藉由SDS-PAGE分析、於非還原狀態中的純的rHuEPO-Fc蛋白之二聚體形式以及於還原狀態中的純的rHuEPO-Fc蛋白之單體形式的大小。來自表現rHuEPO-Fc之經培養的CHO細胞株的懸浮液之純化的rHuEPO-Fc蛋白主要地存在為二聚體形式，以及於

非還原狀態中的8% 雙三羥甲基氨基甲烷凝膠上具有大約180 kDa的分子量。於還原狀態中(100mM 二硫蘇糖醇,DTT)打破雙硫鍵,二聚體被分離成2個具有75 kDa的分子量之完全相同的單體單元。

- 5 第4A和4B圖是顯示以每週3次rHuEPO-Fc或rHuEPO的皮下注射(s.c.)治療的正常小鼠內之血紅素(Hb)位準的劑量依賴性的增加的圖。各點代表該組(6隻小鼠)的Hb位準。第0天位準代表在治療之前的Hb位準。A:以rHuEPO-Fc治療的小鼠。B:以天然的rHuEPO治療的小鼠。
- 10 第5A和5B圖是顯示以每週1次的rHuEPOFc或rHuEPO s.c.治療之正常小鼠內之血紅素(Hb)位準的劑量依賴性的增加的圖。各點代表該組(6隻小鼠)的平均Hb位準。第0天位準代表在治療之前的Hb位準。A:以rHuEPO-Fc治療的小鼠。B:以天然的rHuEPO治療的小鼠。
- 15 第6A和6B圖是顯示以12.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的rHuEPO-Fc或rHuEPO之靜脈內注射(i.v.)治療的正常小鼠內之血紅素(Hb)位準的增加的圖。各點代表該組(6隻小鼠)的平均Hb位準。第0天位準代表在治療之前的Hb位準。A:以一週一次治療的之小鼠。B:以一週3次治療的小鼠。
- 20 第7圖是一個顯示於以每週1次s.c.的rHuEPO-Fc、rHuEPO或達比波廷阿伐(縮寫的Darbe.)治療的5/6腎切除的大鼠體內之血紅素(Hb)位準的劑量依賴性的增加的圖。各點代表該組的平均Hb位準。正常的對照是以載體溶液的注射之正常的大鼠。模式的對照是以載體溶液的注射之5/6腎



切除的大鼠。第0週位準代表在治療之前的Hb位準。\*：在治療之後的週數。

第8圖是一個顯示以每2週1次 s.c.的 rHuEPO-Fc、rHuEPO或達比波廷阿伐(縮寫的Darbe.)治療的5/6腎切除的大鼠體內之血紅素(Hb)位準的劑量依賴性的增加的圖。各點代表該組的平均Hb位準。正常的對照是以載體溶液的注射之正常的大鼠。模式的對照是以載體溶液的注射之5/6腎切除的大鼠。第0週位準代表在治療之前的Hb位準。\*：在治療之後的週數。

第9圖是一個顯示以每2週1次 i.v.的 62.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之 rHuEPO-Fc，或達比波廷阿伐(縮寫的Darbe.)治療的5/6腎切除的大鼠體內之血紅素(Hb)位準的劑量依賴性的增加的圖。各點代表該組的平均Hb位準。正常的對照是以載體溶液的注射之正常的大鼠。模式的對照是以載體溶液的注射之5/6腎切除的大鼠。第0週位準代表在治療之前的Hb位準。\*：在治療之後的週數。

第10A-10C圖顯示用於刺激以不同的劑量和時間表治療的5/6腎切除的大鼠體內之CFU-E和BFU-E的群落形成的 rHuEPO-Fc、rHuEPO和達比波廷阿伐之潛力的比較。rHuEPO-Fc和達比波廷阿伐(縮寫的Darbe.)治療顯示出刺激CFU-E和BFU-E 的群落形成之相似的劑量依賴性潛力，然而rHuEPO是較不有效力的。A，每週1次s.c.。B，每2週1次s.c.。C，每2週1次i.v.。

第11圖是一個顯示在5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 rHuEPO-Fc或 rHuEPO之

靜脈內注射至恆河猴之後，rHuEPO-Fc和rHuEPO的血清位準的圖(5隻猴的平均位準)。

第12圖是一個序列表，其顯示一種野生型rHuEPO-FcC蛋白的核苷酸序列和演繹的胺基酸(aa)的序列。該序列特點  
5 係與第1圖中所顯示的相同，除了一種天然的、野生型的半胱胺酸殘基係存在於成熟的融合蛋白的殘基172 (換言之，樞紐區的第6個胺基酸)之外。

第13圖是一個圖，其顯示以每週3次的rHuEPO-Fc(本發明的突變的融合蛋白)、rHuEPO FcC(野生型融合蛋白)和  
10 rHuEPO之皮下注射(s. c.)治療的正常小鼠體內之血紅素(Hb)位準的劑量依賴性的增加。各點代表該組(8)的平均Hb位準。正常的對照是以載體溶液的注射之正常的小鼠。第0天位準代表在治療之前的Hb位準。

第14圖是一個圖，其顯示以每週1次的rHuEPO-Fc、  
15 rHuEPO-FcC和rHuEPO之皮下注射(s. c.)治療的正常小鼠體內之血紅素(Hb)位準的劑量依賴性的增加。各點代表該組(8)的平均Hb位準。正常的對照是以載體溶液的注射之正常的小鼠。第0天位準代表在治療之前的Hb位準。

### 【主要元件符號說明】

(無)

## 五、中文發明摘要：

一種包含一種被連接至一種免疫球蛋白Fc部分的人類紅血球生成素Fc部分之重組型融合蛋白係被說明。該融合蛋白與天然存在的或重組型天然的人類紅血球生成素相比具有一種活體內延長的半生期。於本發明的一個實施例中，該蛋白具有比天然的人類紅血球生成素更高至少3倍的活體內半生期。該融合蛋白與天然的人類紅血球生成素相比也可以展現出提高的紅血球生成生物活性。於一個實施例中，該融合蛋白包含一個紅血球生成素(EPO)分子的完整的Fc序列以及人類免疫球蛋白IgG1的一種Fc片段的Fc序列。於該融合蛋白內之Fc片段包括人類免疫球蛋白IgG1的樞紐區、CH2和CH3領域。該EPO分子可以被直接地連接至該Fc片段以避免外來的Fc連接子，以及當被投藥於活體內時，減輕一種免疫原性的反應的風險。於一個實施例中，該樞紐區是一種人類Fc片段變異體，其在胺基酸6具有一個非半胱胺酸殘基。本發明亦有關編碼該融合蛋白的核酸和胺基酸序列以及用於產生該融合蛋白的轉染的細胞株和方法。本發明進一步地包括包含該融合蛋白的藥學組成物以及利用該融合蛋白及/或該等藥學組成物，舉例而言，以於需要治療的個體體內刺激紅血球生成的方法。

## 六、英文發明摘要：

A recombinant fusion protein comprising a human erythropoietin peptide portion linked to an immunoglobulin peptide portion is described. The fusion protein has a prolonged half-life in vivo in comparison to naturally occurring or recombinant native human erythropoietin. In one embodiment of the invention, the protein has a half-life in vivo at least three fold higher than native human erythropoietin. The fusion protein also exhibits enhanced erythropoietic bioactivity in comparison to native human erythropoietin. In one embodiment, the fusion protein comprises the complete peptide sequence of a human erythropoietin (EPO) molecule and the peptide sequence of an Fc fragment of human immunoglobulin IgG1. The Fc fragment in the fusion protein includes the hinge region, CH2 and CH3 domains of human immunoglobulin IgG1. The EPO molecule maybe linked directly to the Fc fragment to avoid extraneous peptide linkers and lessen the risk of an immunogenic response when administered in vivo. In one embodiment the hinge region is a human Fc fragment variant having a non-cysteine residue at amino acid 6. The invention also relates to nucleic acid and amino acid sequences encoding the fusion protein and transfected cell lines and methods for producing the fusion protein. The invention further includes pharmaceutical compositions comprising the fusion protein and methods of using the fusion protein and/or the pharmaceutical compositions, for example to stimulate erythropoiesis in subjects in need of therapy.

## 十、申請專利範圍：

1. 一種重組型融合蛋白，其包含一種被直接地連接至一個人類IgG Fc片段的人類紅血球生成素分子，其中與天然存在的或重組型天然的人類紅血球生成素相比，該融合蛋白具有活體內延長的半生期。  
5
2. 如申請專利範圍第1項之蛋白，其中該蛋白的半生期是比該天然的人類紅血球生成素更高至少3倍。
3. 如申請專利範圍第2項之蛋白，其中該蛋白的半生期是比該天然的人類紅血球生成素更高至少4倍。
- 10 4. 如申請專利範圍第2項之融合蛋白，其中該融合蛋白與該天然的人類紅血球生成素相比具有提高的紅血球生成生物活性。
5. 如申請專利範圍第1項之融合蛋白，其中該Fc片段是一種IgG1片段。
- 15 6. 如申請專利範圍第5項之融合蛋白，其中該Fc片段包含一種樞紐區(hinge region)以及CH2和CH3領域。
7. 如申請專利範圍第6項之融合蛋白，其中該樞紐區在長度上是至少9個胺基酸。
8. 如申請專利範圍第1項之融合蛋白，其中該蛋白具有存在於序列辨識編號：2之內的胺基酸序列或者一種其之實質同系的序列。  
20
9. 一種多聚體的蛋白建構物，其包含複數個如申請專利範圍第1項之融合蛋白。
10. 如申請專利範圍第9項之多聚體的蛋白建構物，其中該

建構物是一種二聚物。

11. 一種包含複數個多肽的多聚體的蛋白，其各具有存在於序列辨識編號：2之內的胺基酸序列或者一種其之實質同系的序列。
- 5 12. 如申請專利範圍第11項之蛋白，其中該蛋白是一種二聚物。
13. 如申請專利範圍第12項之蛋白，其中該二聚物包含介於該等多肽的樞紐領域(hinge domain)之間的雙硫鍵。
14. 如申請專利範圍第11項之蛋白，其中該等多肽的各個具有大約75 kDa的一分子量。
- 10 15. 如申請專利範圍第12項之蛋白，其中該二聚物具有大約180 kDa的一分子量。
16. 一種藥學組成物，其包含一種如申請專利範圍第1項之蛋白連同一種藥學上可接受的載體，佐劑或稀釋劑。
- 15 17. 一種核酸序列，其編碼一種具有與序列辨識編號：2之至少90%的胺基酸序列同一性之多肽，其中該多肽與天然的人類紅血球生成素相比具有一種活體內延長的半生期。
18. 一種重組型DNA分子，其包含存在於序列辨識編號：1
- 20 之內的核酸序列或者一種其之實質同系的序列。
19. 一種細胞株，其係以一種如申請專利範圍第18項之重組型DNA分子予以轉染。
20. 如申請專利範圍第19項之細胞株，其中該細胞株是一種CHO細胞株。

21. 一種生產如申請專利範圍第1項之蛋白的方法，其包含培養一種以如申請專利範圍第18項之DNA分子予以轉染的細胞株以及藉此純化被編碼的多肽。
22. 一種於一種哺乳動物體內刺激紅血球生成的方法，其包含投藥一種如申請專利範圍第1項之蛋白至該哺乳動物體內。
23. 如申請專利範圍第22項之方法，其中該哺乳動物是一種靈長類動物。
24. 如申請專利範圍第23項之方法，其中該靈長類動物是一個人類。
25. 一種於一種哺乳動物體內刺激紅血球生成的方法，其包含：  
投藥一種如申請專利範圍第16項之藥學組成物至該哺乳動物體內。
26. 如申請專利範圍第25項之方法，其中該哺乳動物是一種靈長類動物。
27. 如申請專利範圍第26項之方法，其中該靈長類動物是一個人類。
28. 如申請專利範圍第22項之方法，其中於該哺乳動物體內之該蛋白的半生期是比天然的人類EPO更高至少3倍，當被靜脈內或皮下地投藥時。
29. 如申請專利範圍第28項之方法，其中於該哺乳動物體內之該蛋白的半生期是比天然的人類EPO更高至少4倍，當被靜脈內或皮下地投藥時。

30. 一種重組型融合蛋白，其包含：

(a) 一種具有一個鄰近其之C端的半胱胺酸殘基之紅血球生成素肽部分；以及

5 (b) 一種包含一種樞紐區的免疫球蛋白肽部分，其中座落於最接近該紅血球生成素肽部分之該樞紐區的一個半胱胺酸殘基與該紅血球生成素肽部分的半胱胺酸殘基相距至少12個胺基酸。

31. 如申請專利範圍第30項之融合蛋白，其中紅血球生成素肽部分是一個完整的人類紅血球生成素分子。

10 32. 如申請專利範圍第30項之融合蛋白，其中該免疫球蛋白肽部分是一個人類IgG Fc片段，其包含該樞紐區以及CH2和CH3領域。

33. 如申請專利範圍第32項之融合蛋白，其中該IgG Fc片段是一種IgG1片段。

15 34. 如申請專利範圍第32項之融合蛋白，其中該樞紐區係被直接地耦合至該紅血球生成素肽部分。

35. 如申請專利範圍第32項之融合蛋白，其包含一種介於該樞紐區和該紅血球生成素肽部分之間的肽連接子(peptide linker)。

20 36. 如申請專利範圍第30項之融合蛋白，其中該樞紐區在長度上是至少9個胺基酸。

37. 如申請專利範圍第36項之融合蛋白，其中該樞紐區在自該樞紐區的N端測量的胺基酸 6之處具有一個非半胱胺酸殘基。

38. 如申請專利範圍第37項之融合蛋白，其中該非半胱胺酸殘基是一個中性胺基酸。
39. 如申請專利範圍第38項之融合蛋白，其中該非半胱胺酸殘基是甘胺酸。
- 5 40. 如申請專利範圍第36項之融合蛋白，其中該樞紐區是一個人類Fc片段變異體，其在自該樞紐區的N端測量的胺基酸6之處具有一個非半胱胺酸殘基。
41. 如申請專利範圍第34項之融合蛋白，其中該樞紐區具有存在於序列辨識編號：5之內的胺基酸序列，或者一種  
10 序列，其具有其之至少90%的序列同一性，以及在自該樞紐區的N端測量的胺基酸 6之處具有一個非半胱胺酸殘基。
42. 如申請專利範圍第30項之融合蛋白，其中該蛋白的半生期，當係被投藥至一種哺乳動物體內時，係比藉由相同的手段予以投藥至該哺乳動物體內的天然的人類紅血  
15 球生成素的半生期更高至少3倍。
43. 如申請專利範圍第42項之融合蛋白，其中該蛋白的半生期，當係被投藥至一種哺乳動物體內時，係比藉由相同的手段予以投藥至該哺乳動物體內的天然的人類紅血  
20 球生成素的半生期更高至少4倍。
44. 如申請專利範圍第42項之融合蛋白，其中該哺乳動物是一個人類。
45. 一種二聚物，其包含各如申請專利範圍第30項之第一與第二融合蛋白，其中該第一融合蛋白的該樞紐區係藉由

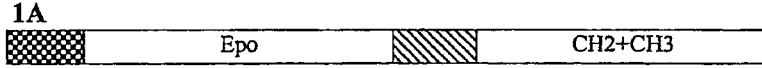


雙硫鍵而被結合至該第二融合蛋白的該樞紐區。

46. 一種多聚體的蛋白建構物，其包含複數個各如申請專利範圍第30項之被連接的融合蛋白。

47. 一種重組型DNA分子，其包含存在於序列辨識編號：1  
5 之內的核酸序列。

48. 一種二聚物，其包含各具有存在於序列辨識編號：2之內的胺基酸序列之一對多肽。



第1A圖

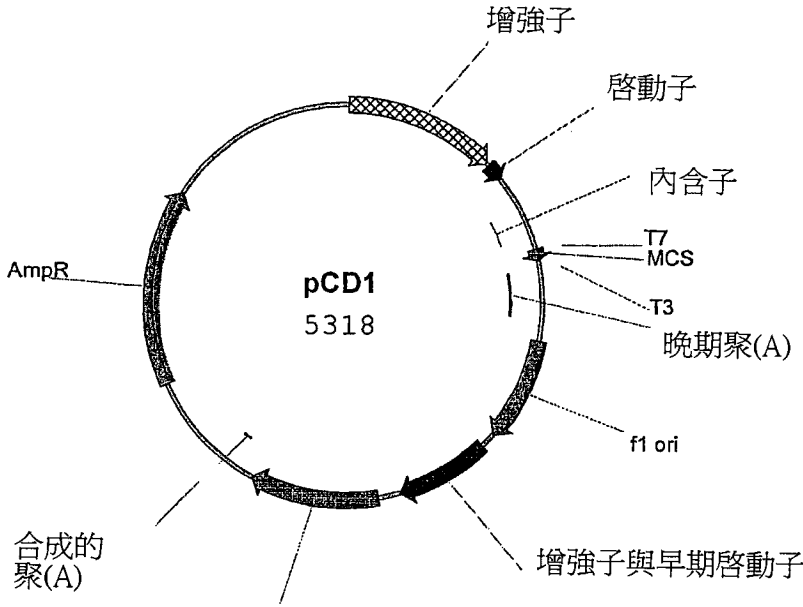
信息狀

樞紐

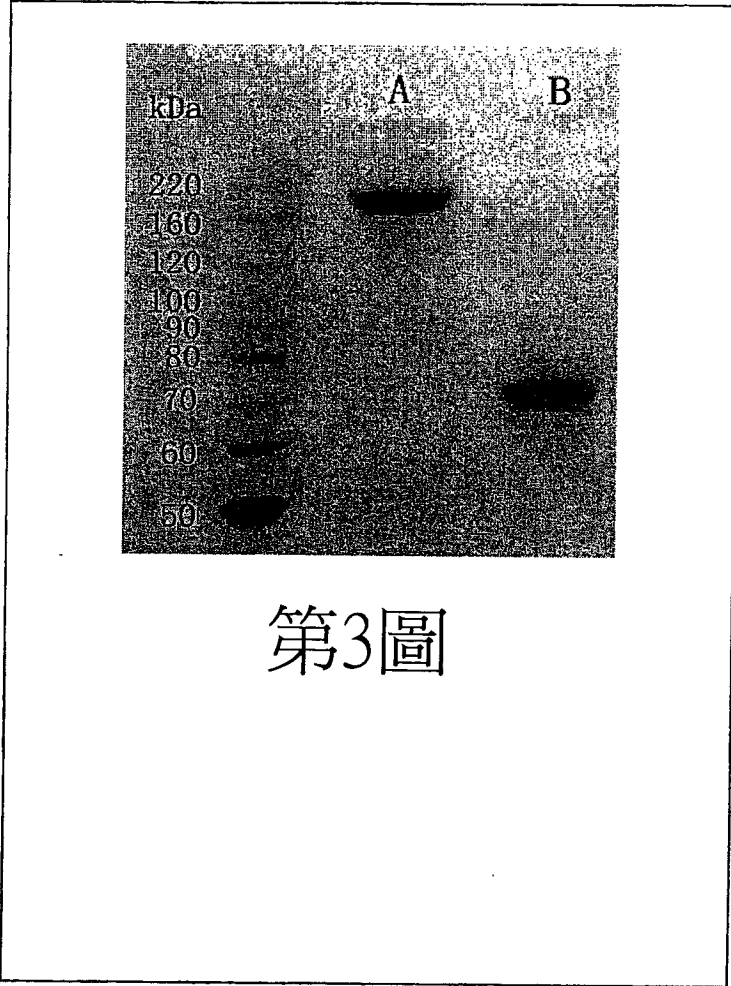
1B

ATGGGGGTGCACGAATGTCCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCTGCTGTGCTCCCT 60  
 M G V H E C P A W L W L L L S L L S L P  
 CTGGGCCTCCCAGTCTGGGCGCCCCACCACGCCTCATCTGTGACAGCCGAGTCTGGAG 120  
 L G L P V L G A P P R L I C D S R V L E  
 AGGTACCTCTGGAGGCCAAGGAGGCCGAGAATATCAGACGGGCTGTGCTGAACACTGC 180  
 R Y L L E A K E A E N I T T G C A E H C  
 AGCTTGAATGAGAATATCACTGTCCCAGACACCAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGG 240  
 S L N E N I T V P D T K V N F Y A W K R  
 ATGGAGGTCGGGCAGCAGGCCGTAGAAGTCTGGCAGGGCCTGGCCCTGCTGTGCGAAAGCT 300  
 M E V G Q Q A V E V W Q G L A L L S E A  
 GTCCTGCGGGCCAGGCCCTGTTGGTCAACTCTTCCCAGCCGTGGGAGCCCCTGCAGCTG 360  
 V L R G Q A L L V N S S Q P W E P L Q L  
 CATGTGGATAAAGCCGTAGTGGCCTTCGCAGCCTCACCCTGCTTTCGGGCTCTGCGA 420  
 H V D K A V S G L R S L T T L L R A L R  
 GCCCAGAAGGAAGCCATCTCCCCTCCAGATGCGGCCTCAGCTGCTCCACTCCGAACAATC 480  
 A Q K E A I S P P D A A S A A P L R T I  
 ACTGCTGACACTTTCCGCAAACCTTCCGAGTCTACTCCAATTTCTCCGGGAAAGCTG 540  
 T A D T F R K L F R V Y S N F L R G K L  
 AAGCTGTACACAGGGGAGGCCTGCAGGACAGGGGACAGAGTTGAGCCCAAATCTGGTGAC 600  
 K L Y T G E A C R T G D R V E P K S G D  
AAAATAGTACATGCCACCCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCCTGAGTCTTC 660  
K T S T P P P P A P E L L G G P S V F  
 CTCTCCCCCAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGC 720  
 L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C  
 GTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGG 780  
 V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G  
 GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGT 840  
 V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R  
 GTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC 900  
 V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C  
 AAGGTCTCAAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGG 960  
 K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G  
 CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC 1020  
 Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N  
 CAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG 1080  
 Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W  
 GAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGAC 1140  
 E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D  
 GGCCCTTCTTCTTACAGCAAGTCAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC 1200  
 G P F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N  
 GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGACCTC 1260  
 V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L  
 TCCCTGTCTCCGGGTAATAA 1320  
 S L S P G K \*

第1B圖

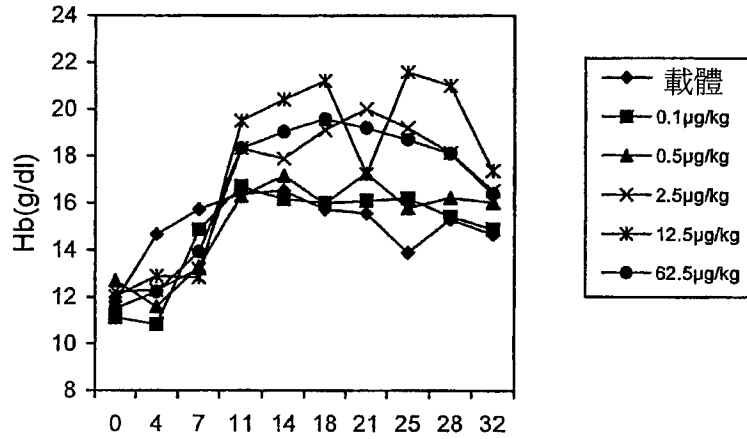


第2圖



第3圖

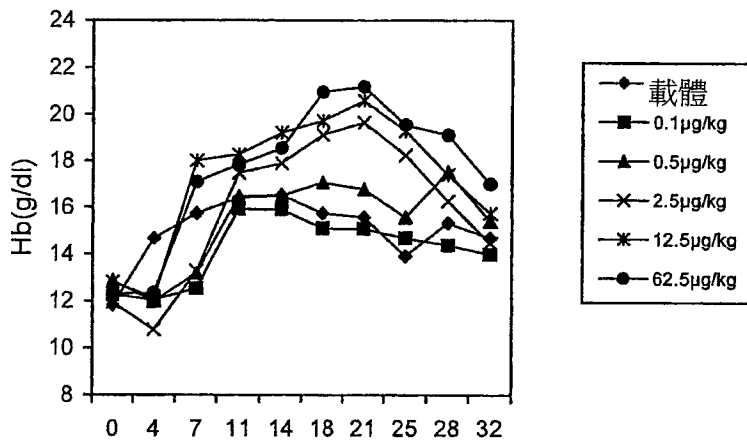
4A



天(自第一次注射)

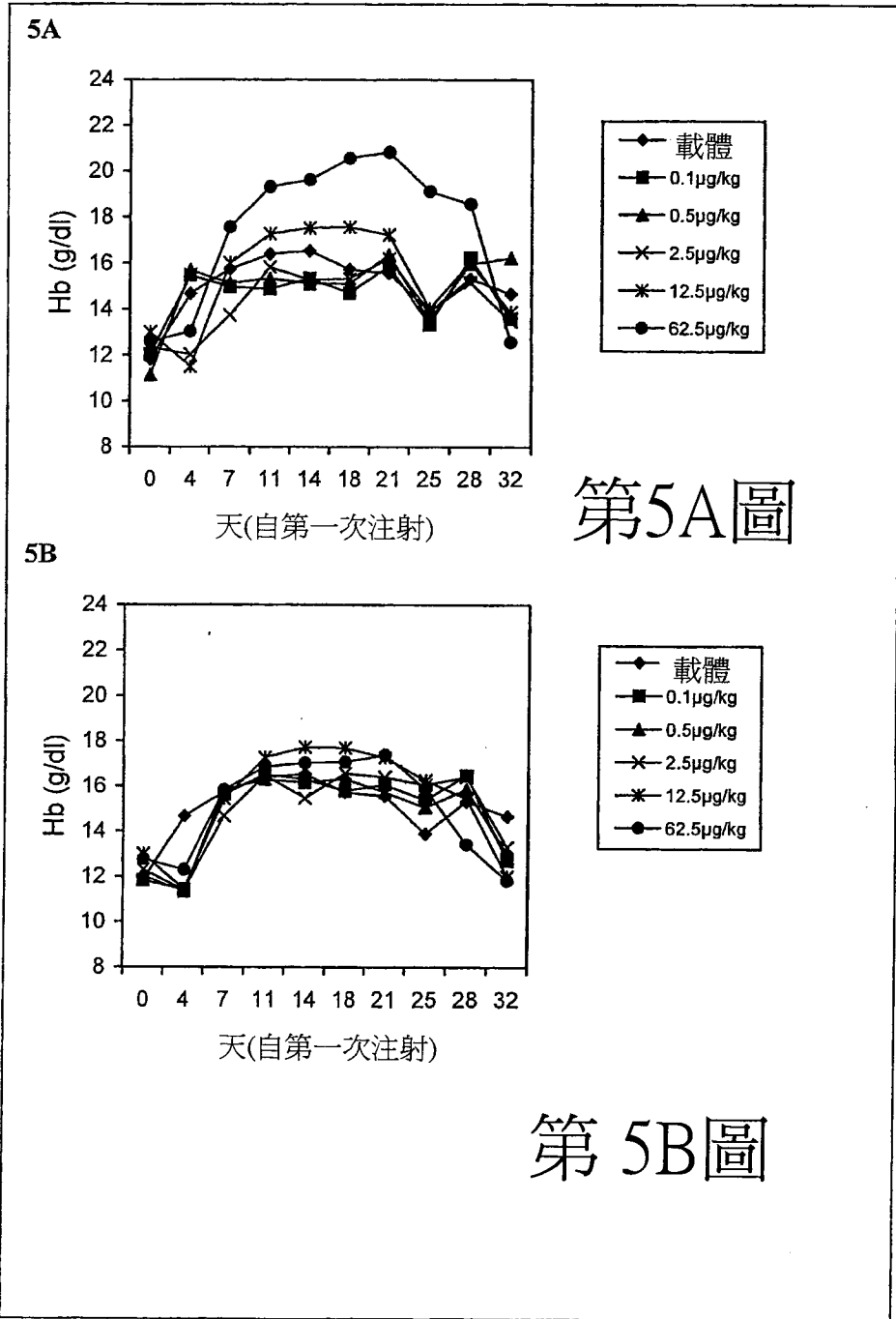
第4A圖

4B

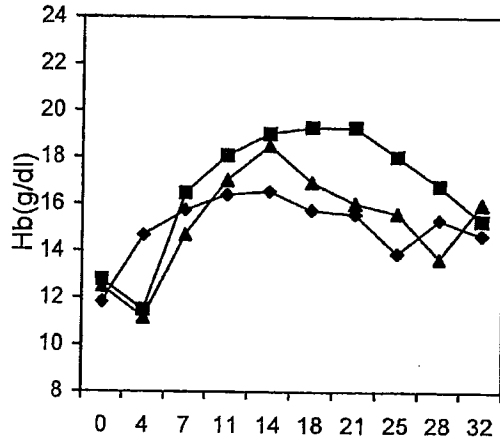


天(自第一次注射)

第4B圖



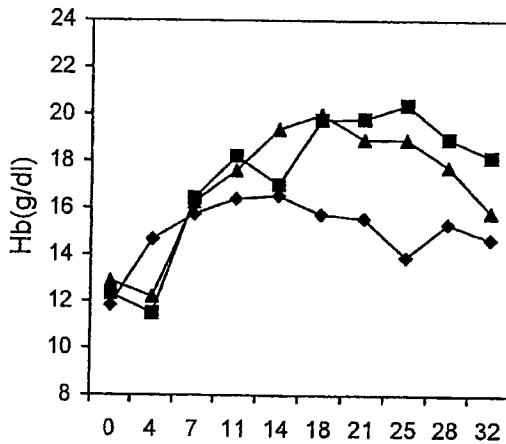
6A



天(自第一次注射)

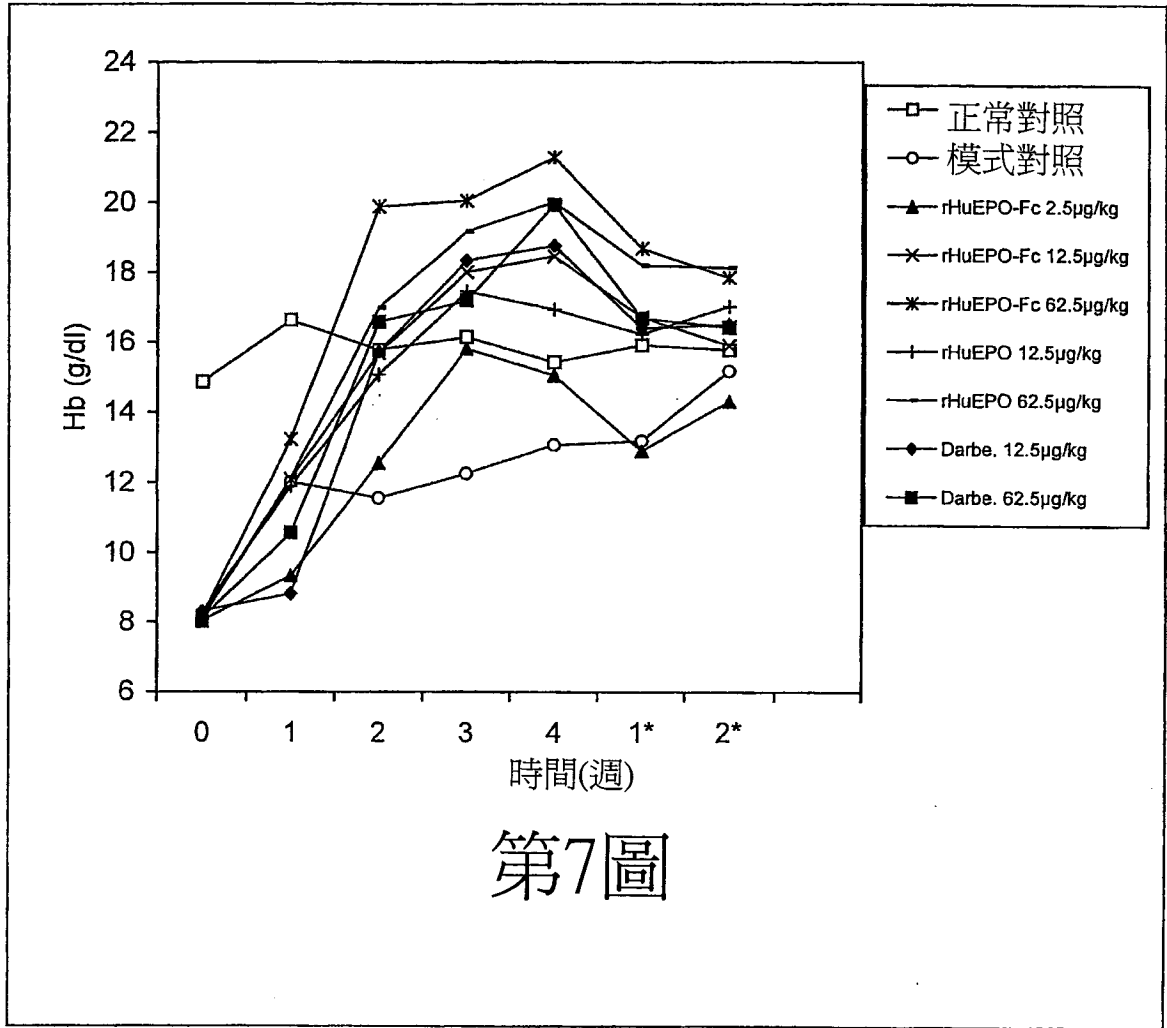
第6A圖

6B



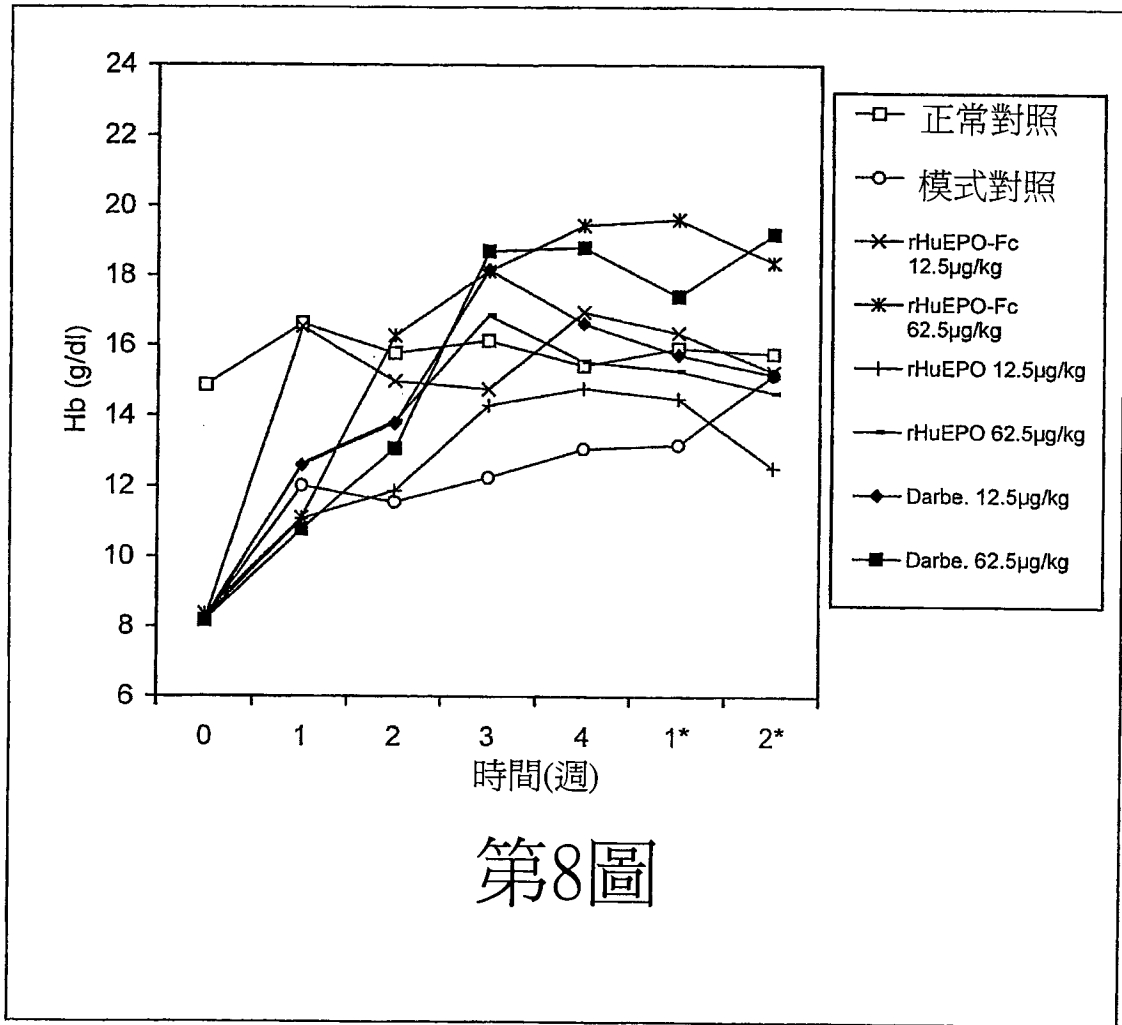
天(自第一次注射)

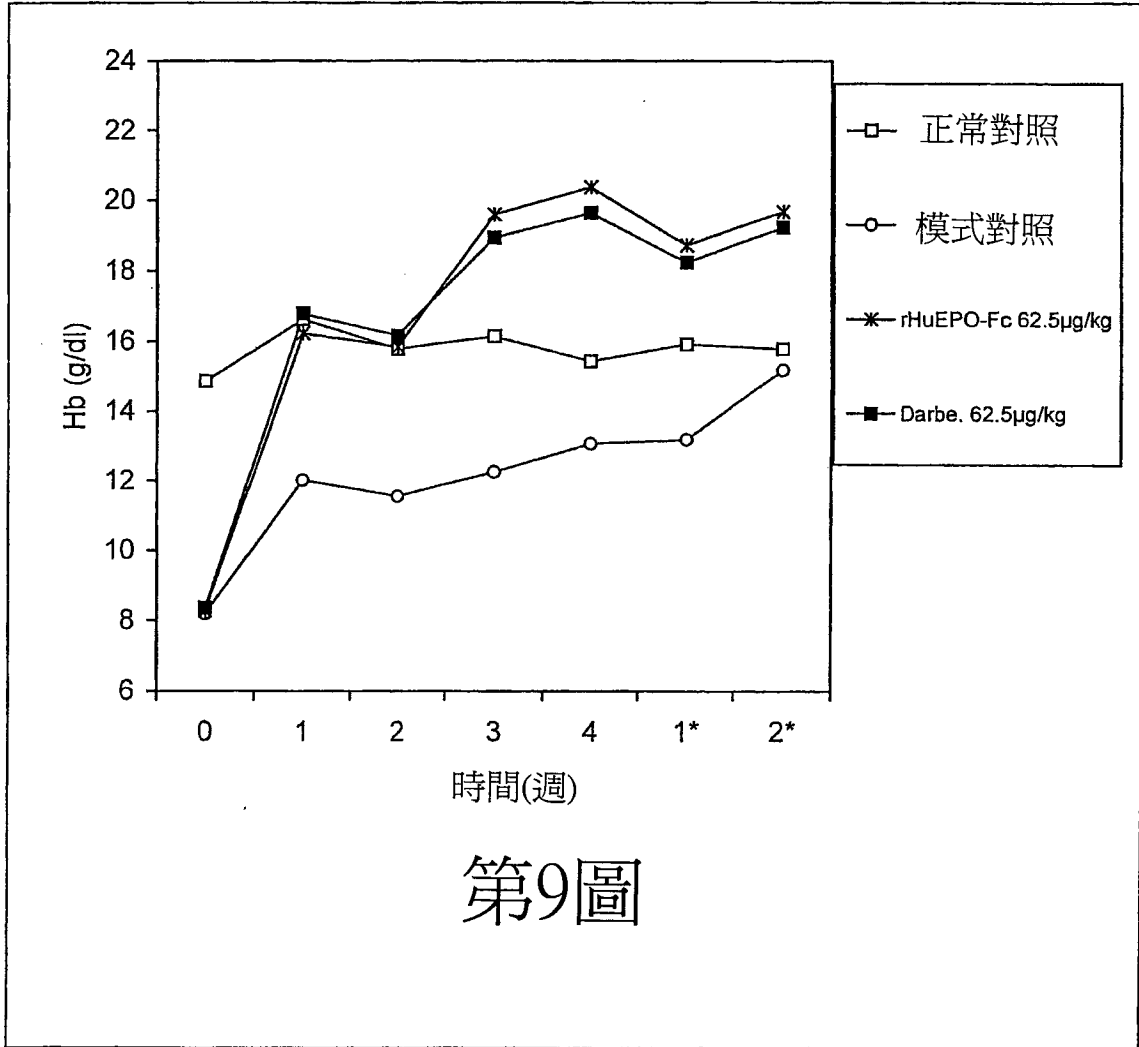
第6B圖



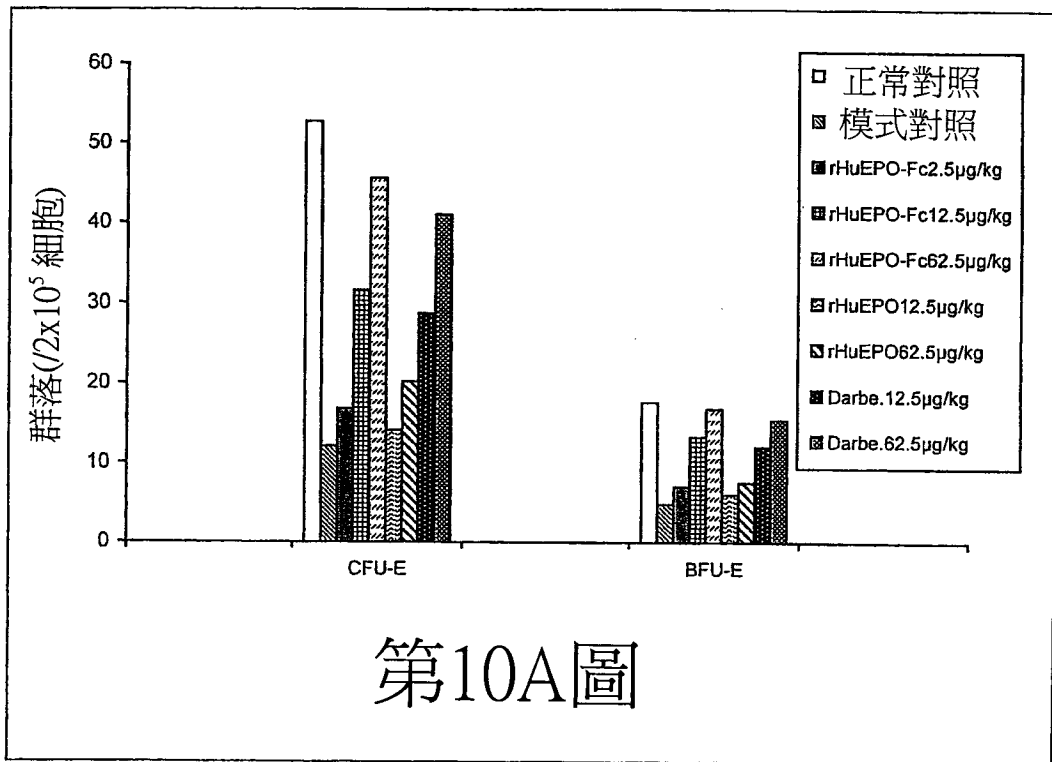
第7圖

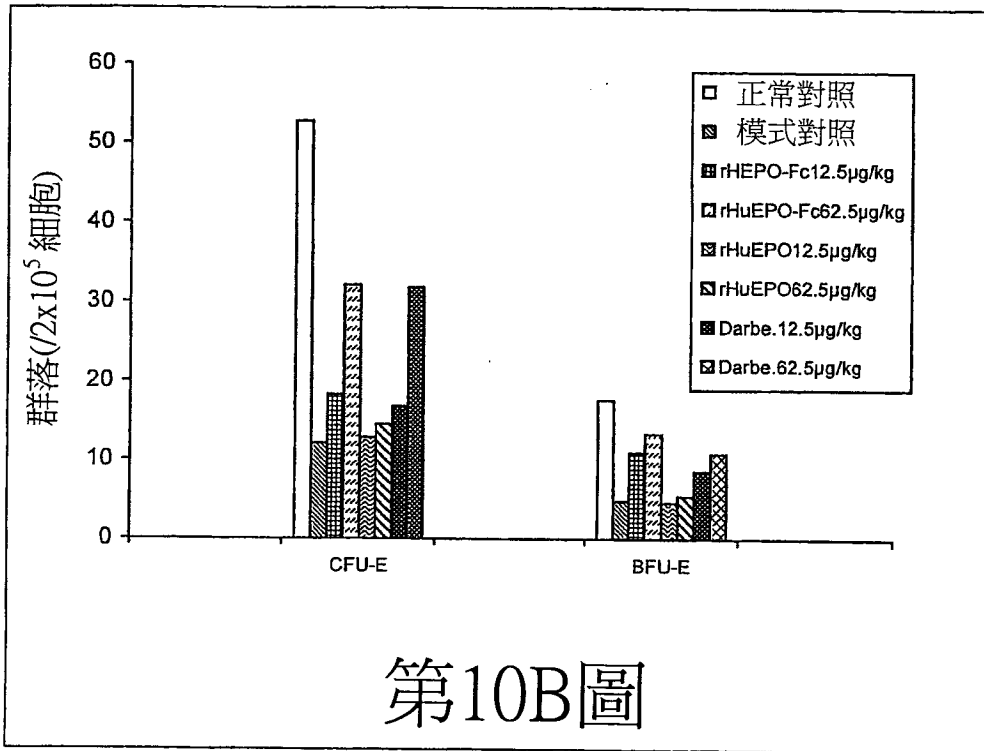


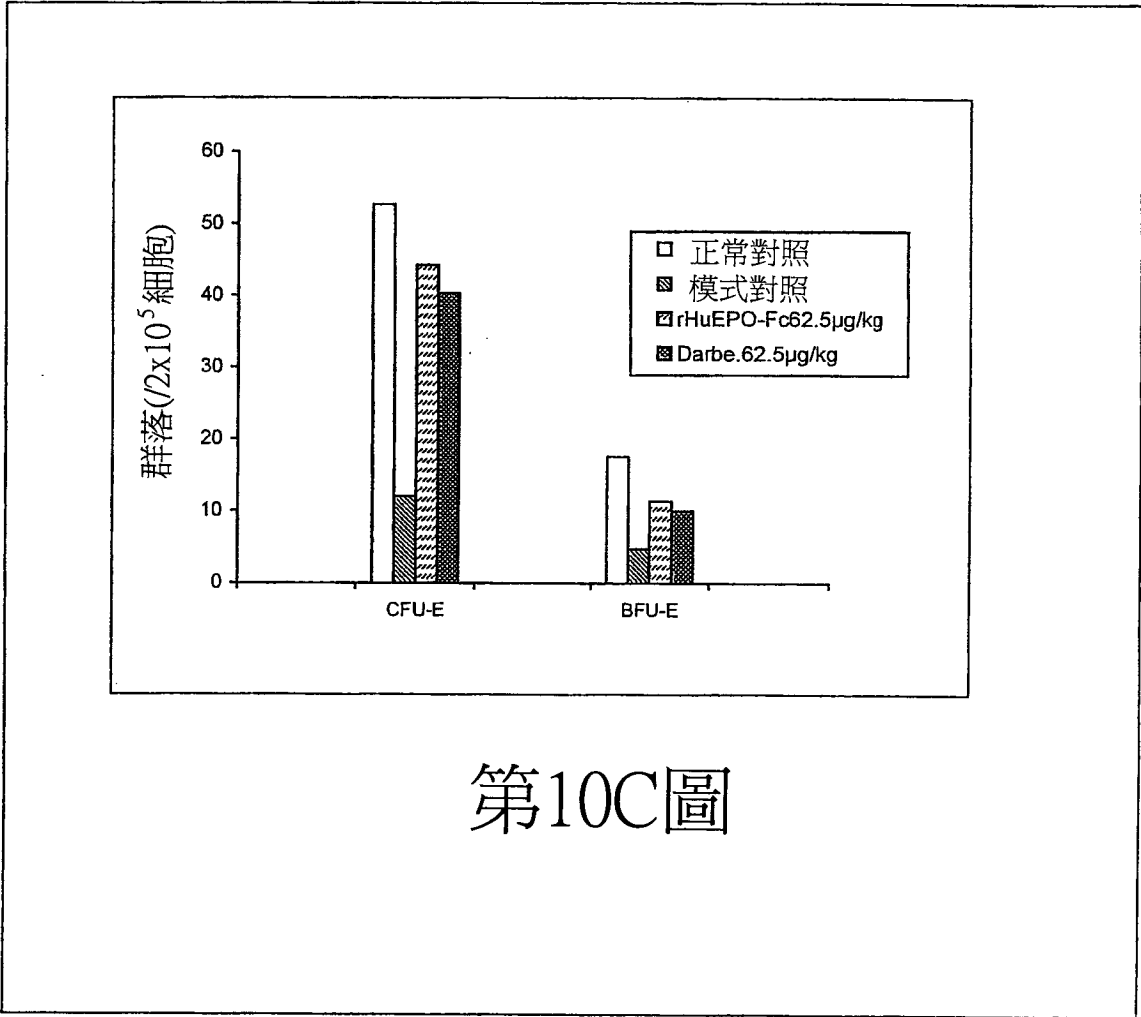




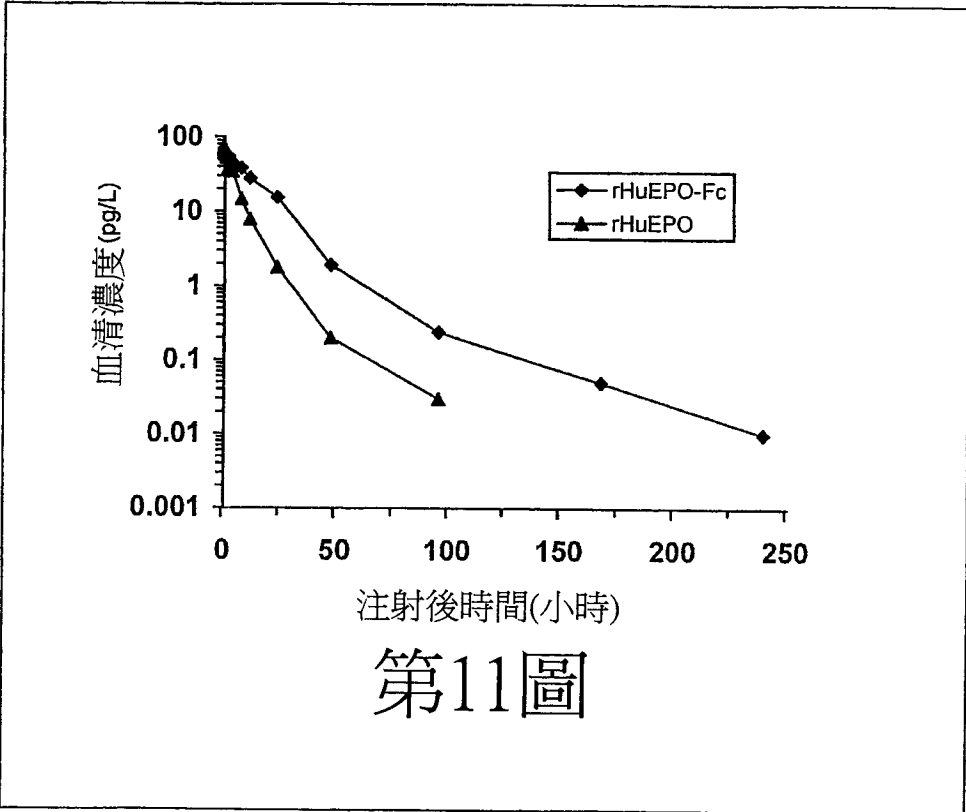
第9圖





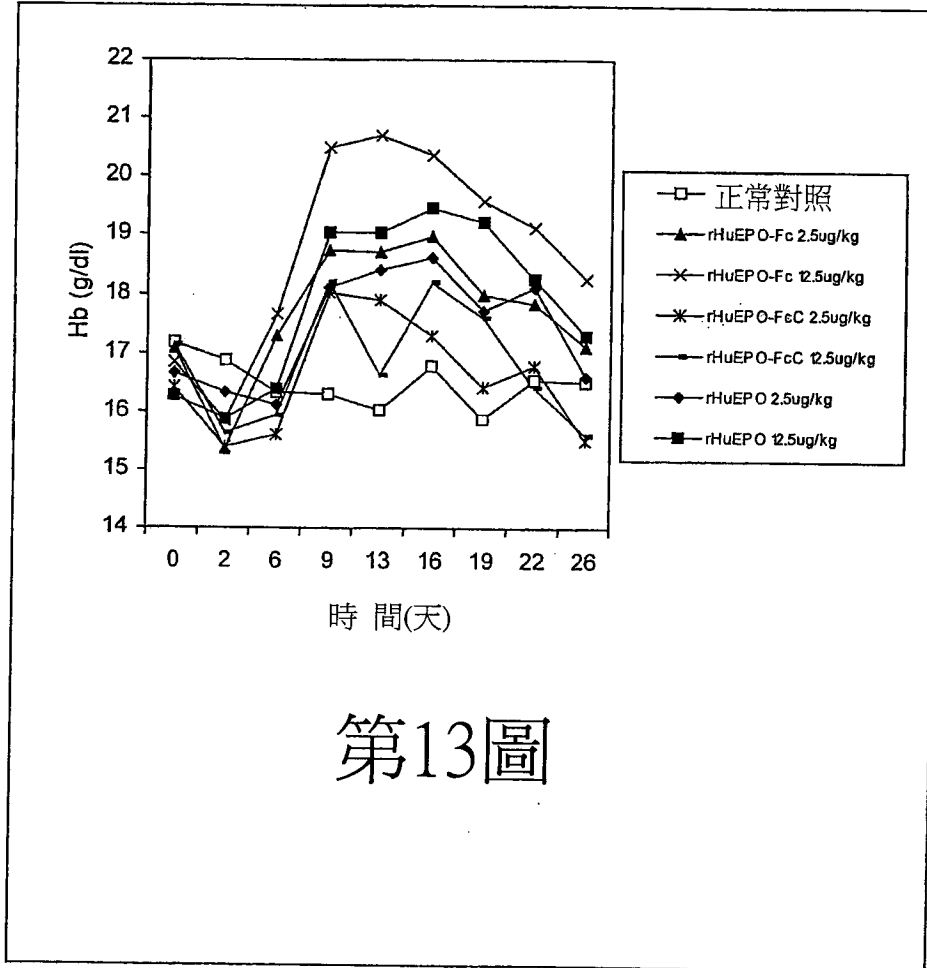


第10C圖



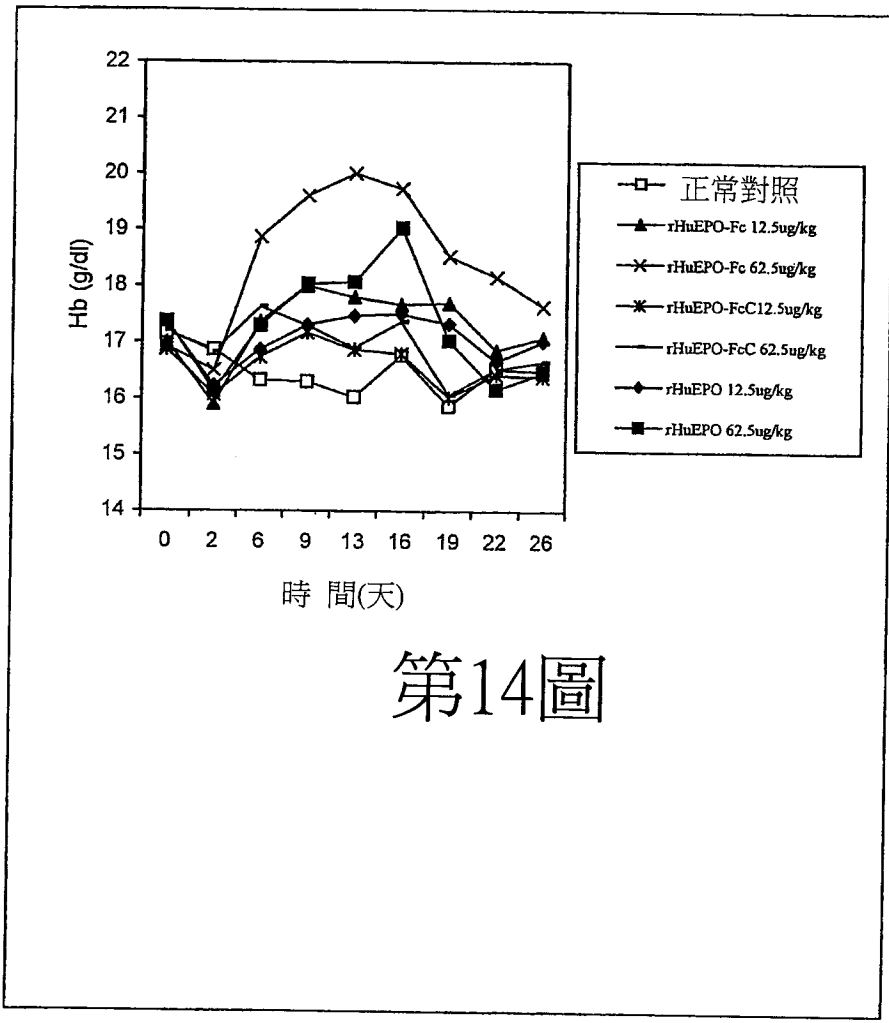
ATGGGGGTGCACGAATGTCCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTGCTGTGCTCCCT 60  
 M G V H E C P A W L W L L L S L L S L P  
 CTGGGCCTCCCAGTCCTGGGCGCCACCACGCCTCATCTGTGACAGCCGAGTCCTGGAG 120  
 L G L P V L G A P P R L I C D S R V L E  
 AGGTACCTCTTGGAGGCCAAGGAGGCCGAGAATATCACGACGGCTGTGCTGAACACTGC 180  
 R Y L L E A K E A E N I T T G C A E H C  
 AGCTTGAATGAGAATATCACTGTCCCAGACACCAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGG 240  
 S L N E N I T V P D T K V N F Y A W K R  
 ATGGAGGTCGGGCAGCAGGCCGTAGAAGTCTGGCAGGGCCTGGCCCTGCTGTGCGAAGCT 300  
 M E V G Q Q A V E V W Q G L A L L S E A  
 GTCCTGCGGGGCCAGGCCCTGTTGGTCAACTTCCCAGCCGTGGGAGCCCCTGCAGCTG 360  
 V L R G Q A L L V N S S Q P W E P L Q L  
 CATGTGGATAAAGCCGTCAAGTGGCTTCGCAGCCTCACCACCTGCTTCGGGCTCTGCGA 420  
 H V D K A V S G L R S L T T L L R A L R  
 GCCCAGAAGGAAGCCATCTCCCTCCAGATGCGGCCTCAGCTGCTCCACTCCGAACAATC 480  
 A Q K E A I S P P D A A S A A P L R T I  
 ACTGCTGACACTTTCCGCAAACCTCTCCGAGTCTACTCCAATTTCTCCGGGAAAGCTG 540  
 T A D T F R K L F R V Y S N F L R G K L  
 AAGTGTACACAGGGGAGCCCTGCAGGACAGGGGACAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC 600  
 K L Y T G E A C R T G D R V E P K S C D  
 AAAACTAGTACATGCCACCGTGCCACGACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC 660  
 K T S T P P P P A P E L L G G P S V F  
 CTCTCCCCCAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTCACATGC 720  
 L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C  
 GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC 780  
 V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G  
 GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT 840  
 V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R  
 GTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC 900  
 V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C  
 AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG 960  
 K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G  
 CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC 1020  
 Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N  
 CAGTACGCTGACCTGGTCAAAGGCTTCTATCCACGACATCGCCGTGGAGTGG 1080  
 Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W  
 GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGAC 1140  
 E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D  
 GGCCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC 1200  
 G P F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N  
 GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC 1260  
 V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L  
 TCCCTGTCTCCGGGTAATAA 1320  
 S L S P G K \*

第12圖



第13圖





第14圖

**七、指定代表圖：**

(一)本案指定代表圖為：第 ( 9 ) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無)

**八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：**