

研究报告

rhEPO-L-Fc 融合蛋白的表达、生物活性和初步药动学分析

祝强^{1,2}, 黄智华², 黄予良², 覃扬¹

1 四川大学华西基础医学与法医学院 生物化学与分子生物学教研室, 成都 610041

2 健能隆医药技术(上海)有限公司, 上海 201203

摘要: 为了延长人促红细胞生成素(hEPO)体内半衰期以达到更好的药效, 制备通过柔性接头相连接的重组人红细胞生成素-IgG1 Fc 融合蛋白(rhEPO-L-Fc), 并对其生物学活性和体内药动学进行初步研究。利用 PCR 技术构建 rhEPO-L-Fc 融合基因, 克隆至表达载体 pOptiVEC-TOPO[®], 在二氢叶酸还原酶缺陷型中国仓鼠卵巢细胞(CHO-dhfr⁻)表达。Protein A 亲和层析柱纯化融合蛋白, SDS-PAGE、质谱、Western blotting 鉴定表达产物, 细胞增殖实验检测融合蛋白的体外活性, 动物实验检测融合蛋白的体内活性和半衰期。成功构建 pOptiVEC-TOPO[®]-rhEPO-L-Fc 重组子, 实现了在 CHO 细胞表达, 纯化后的 rhEPO-L-Fc 融合蛋白经鉴定, 其分子量和特异性均与理论值相符, 能刺激体外培养的 EPO 依赖型细胞生长, ED₅₀ 为 2 ng/mL, 且明显增加大鼠外周血网织红细胞数, 体内消除半衰期达到 27 h。rhEPO-L-Fc 融合蛋白能延长 hEPO 体内半衰期, 为其临床研究奠定了基础。

关键词: rhEPO-L-Fc 融合蛋白, 半衰期, CHO 细胞表达

Expression of rhEPO-L-Fc Fusion Protein and Analysis of Its Bioactivity and Pharmacokinetics

Qiang Zhu^{1,2}, Zhihua Huang², Yuliang Huang², and Yang Qin¹

1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China

2 Generon Corporation, Shanghai 201203, China

Abstract: To prolong serum half-life of human Erythropoietin for better efficacy, a new form of recombinant human erythropoietin (rhEpo-L-Fc) was generated by fusion of a full length human erythropoietin gene and the Fc fragment of human IgG1 with flexible linker sequence. The fusion gene rhEPO-L-Fc was constructed by PCR, then inserted into expression vector pOptiVEC[™]-TOPO[®], and expressed in Chinese Hamster Ovary cells deficient in the DHFR enzyme(CHO-dhfr⁻). The chimeric protein was purified by Protein A affinity chromatography, showed expected molecular weight and demonstrated a similar bioactivity compared to that of the native recombinant human erythropoietin (rhEPO) in an EPO-dependent cell-based assay. *In vivo* pharmacokinetic studies showed that the rhEPO-L-Fc had an elimination half-life of 27 h. *In vivo* efficacy studies showed that a single dose administration of rhEPO-L-Fc in rats increased the reticulocyte number in the peripheral blood significantly. These results demonstrated that the new engineered rhEPO-L-Fc may become alternative therapeutic approach to extend the half-time of rhEPO to treat anemia.

Keywords: rhEPO-L-Fc fusion protein, half-life, CHO expression

Received: March 25, 2008; **Accepted:** May 28, 2008

Corresponding author: Yang Qin. Tel: +86-28-85501716; E-mail: qin_1@sina.com

促红细胞生成素(Erythropoietin, EPO)是一种刺激骨髓造血的高度糖基化蛋白类激素, 分子量为 30.4 kD, 由 166 个氨基酸组成, 含 3 条 N-连接寡糖链和 1 条 O-连接寡糖链, 约占分子量 40% 的糖链在 EPO 生物合成、三维结构维持、体内活性发挥中起着非常重要的作用^[1]。在胎儿 EPO 主要由肾脏和肝脏合成, 而在成人体内主要来源于肾脏, 正常人体内血液中 EPO 含量为 10~30 mIU/mL; 体内缺氧时, 其含量可提高 1000 倍以上^[2]。EPO 与骨髓红细胞前体细胞上的特异受体结合, 促进其增殖、分化并成熟为红细胞, 增加骨髓向循环血液中的红细胞释放量。EPO 已广泛应用于临床上各种贫血性疾病治疗, 其中最有效的是肾衰、尿毒症所伴随贫血的治疗, 对肿瘤相关性贫血、人类免疫缺陷病毒(HIV)相关性贫血、骨髓移植后贫血、早产儿和孕产妇贫血、围手术期减少异源性输血等方面也有良好的疗效^[3]。

1989 年美国 Amgen 公司在国际上首次研制成功 rhEPO, 用于治疗肾性贫血, 取得了令人瞩目的疗效, 但 rhEPO 体内半衰期短, 给患者带来极大不便。IgG 类免疫球蛋白为人体血液中最丰富的蛋白之一, 半衰期达到 21 d, 其半衰期与 Fc 片段密切相关, 且已有报道将 IgG Fc 片段与其他蛋白融合可显著延长目的蛋白的半衰期, 提高体内生物活性, 目前已应用于临床上一些重要的细胞因子和可溶性受体并获得了成功, 如: IL-2、sTNF- α R、IFN- α 等^[4, 5]。本研究将 hEPO 和人 IgG1 Fc 进行融合表达, 希望该重组蛋白既能保留 hEPO 生物活性又能延长半衰期, 更适合于临床应用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

质粒 pBluescript、pBluescript-rhEPO、pGEM-T-Fc 为健能隆医药技术(上海)有限公司保存, pOptiVEC™-TOPO[®] 购自 Invitrogen, 感受态大肠杆菌 DH5 α 为健能隆医药技术(上海)有限公司制备。

1.1.2 动物细胞和培养基

CHO-dhfr⁻细胞、32D-EPOR 细胞为健能隆医药技术(上海)有限公司保存, FBS、IMDM、DMEM 均为 GIBCO 产品, EX-CELL™302 无血清培养基购自 SIGMA。

1.1.3 酶和试剂

高保真 *Pfu* DNA 聚合酶、*Taq* DNA 聚合酶、各种限制性内切酶(*Bam*H I、*Xba* I、*Hind* III、*Pvu* I) 均购自 MBI。质粒小量制备试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司; 质粒中量制备试剂盒(QIAGEN plasmid midikit)购自 QIAGEN; UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司; 引物合成及 DNA 测序由上海英骏生物技术有限公司完成; 羊抗人 IgG1 Fc-HRP 抗体为 KPL 公司产品; HT、MTX 购自 SIGMA; Lipofectamine™ 2000 Reagent 购自 Invitrogen; 重组人红细胞生成素(rhEPO)为沈阳三生制药有限责任公司产品; BCA Protein Assay Kit 为 Pierce 公司产品; Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 是日本株式会社同仁化学研究所产品; Quantikine[®] IVD[®] EPO Kit 购自 R & D systems。

1.2 方法

1.2.1 真核表达载体 pOptiVEC™-TOPO[®]-rhEPO-L-Fc 的构建

1) 克隆载体 pBluescript-Linker-Fc 构建: 以 1-F、2-F 为正向引物, 3-R 为反向引物, pGEM-T-Fc 为模板, 采用高保真 *Pfu* DNA 聚合酶合成融合基因 Linker-Fc, 将 16 个氨基酸(GSGGGSGGGSGGGGS) 的柔性多肽 Linker 与去掉 N 端 5 个氨基酸的 Fc 铰链(Hinge)相连。融合基因 5'端带有 *Bam*H I 酶切位点, 3'端含 *Hind* III 酶切位点, 反应条件: 94°C 预变性 4 min, 94°C 变性 1 min, 62°C 退火 30 s, 72°C 延伸 100 s, 循环 25 次, 72°C 延伸 10 min, PCR 产物和质粒 pBluescript 相应双酶切后胶回收, 连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 提取质粒, 酶切鉴定正确后送测序确认 cDNA 序列。引物序列如下:

1-F: 5'-GAGGCGGAAGCGGCGGTGGAGGATCAGACAAAACCTCACACATGCCAC-3'

2-F: 5'-CACGGATCCGGTGGCGGTTCCGGTGGAGG
*Bam*H I

CGGAAGCGGCGGTG-3'

3-R: 5'-CAGAAAGCTTTTATCATTACCCGGAGACA-3'
Hind III

2) 克隆载体 pBluescript-rhEPO-L-Fc 构建: 以 4-F 为正向引物, 5-R 为反向引物, pBluescript-rhEPO 为模板, 扩增 rhEPO cDNA 序列, 5'端含 *Xba* I 酶切位点和 Kozak 序列, 3'端含 *Bam*H I 酶切位点, 反应条件: 94°C 预变性 4 min, 94°C 变性 1 min, 65°C 退

火 30 s, 72°C 延伸 80 s, 循环 25 次, 72°C 延伸 10 min, PCR 产物和质粒 pBluescript-Linker-Fc 经相应双酶切, 胶回收目的片段连接, 连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 抽提质粒, 酶切鉴定正确后送测序确认 cDNA 序列。引物序列如下:

4-F: 5'-CAGTCTAGAGCCGCCACCATGGGG GTGCA
Xba I
CGAATGTCCTG-3'
5-R: 5'-GTGGGATCCTCTGTCCCCTGTCCTGCAGG
BamH I
CCTC-3'

3) 重组真核表达载体 pOptiVEC™-TOPO®-rhEPO-L-Fc 的构建: Xba I、Hind III 双酶切重组克隆载体 pBluescript-rhEPO-Linker-Fc, 胶回收目的片段与经同样双酶切的真核表达载体 pOptiVEC™-TOPO®相连接, 酶切鉴定后测序分析。

1.2.2 细胞培养与质粒转染

CHO-dhfr 细胞培养于含次黄嘌呤及胸苷(HT)和 10%胎牛血清(FBS)的 IMDM 完全培养基中。QIAGEN plasmid midikit 提取 rhEPO-L-Fc 表达质粒。重组质粒经线性化后, 用 Lipofectamine™ 2000 Reagent 脂质体转染至细胞, 根据试剂盒说明书操作。转染 24 h 后 1:10 传代稀释, 48 h 后换成无 HT 的缺陷培养基筛选稳定转染细胞。

1.2.3 表达产物检测和细胞加压筛选

32D-EPOR 细胞为 IL-3 或 EPO 依赖型, 32D-EPOR 细胞增殖实验检测稳定转染细胞培养上清中是否有 rhEPO-L-Fc 融合蛋白表达, 以培养于完全培养基中的未转染 CHO-dhfr 细胞上清为对照。有限稀释稳定转染细胞以获得单克隆, 通过 32D-EPOR 细胞增殖实验比较各个单克隆细胞 rhEPO-L-Fc 融合蛋白表达水平, 挑选较高表达水平的单克隆进行甲氨喋呤(MTX)加压筛选以提高细胞蛋白表达量。

1.2.4 rhEPO-L-Fc 融合蛋白的表达、纯化

选择表达量高的单克隆扩大培养, 然后悬浮培养于无血清培养基, 收集上清, 0.45 μ m 滤膜过滤, 调节 pH 至 7.4, 用 HiTrap Protein-A Sepharose affinity column 纯化融合蛋白, 5 倍柱床体积的去离子水洗出保护剂溶液, 再用 5 倍柱床体积的起始缓冲液平衡柱子, 洗出液与起始缓冲液 pH 相同时进样, 收集流出液。用 10 倍体积磷酸缓冲液(0.02 mol/L, pH 7.4)洗涤除去杂蛋白, 5 倍体积的柠檬酸缓冲液

(0.1 mol/L, pH 3.2)洗脱, 中和洗脱液至 pH 7.0, BCA 法测定蛋白质浓度。

1.2.5 rhEPO-L-Fc 融合蛋白质量鉴定

1) SDS-PAGE 检测: 8% SDS-PAGE 电泳观察蛋白纯度和分子量大小; 2) MALDI-TOF-MS 精确测定分子量: 由复旦大学蛋白组研究中心完成; 3) Western blotting: 以羊抗人 IgG1 Fc-HRP 抗体进行 Western blotting 分析。

1.2.6 体外活性检测

将 rhEPO 按 0.0066 ng/mL、0.02 ng/mL、0.066 ng/mL、0.2 ng/mL、0.66 ng/mL、2 ng/mL、6.67 ng/mL、20 ng/mL、66.7 ng/mL、200 ng/mL 稀释于含有 10% FBS 的 DMEM 细胞培养基, 根据 EPO 肽链在整个 rhEPO-L-Fc 肽链分子中的比例, 计算等量的 rhEPO 所需的 rhEPO-L-Fc 融合蛋白量。接种对数生长期 32D-EPOR 细胞 1×10^4 /孔于 96 孔板, 100 μ L/孔, 16 h 后分别加入 rhEPO、rhEPO-L-Fc 融合蛋白, 每个稀释度做 3 个孔, 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h, 每孔再加入 10 μ L CCK-8 试剂, 37°C 培养 2.5 h 后测 450 nm 处吸光度, 参比波长 650 nm, 将浓度对数与吸光度(OD)作图。

1.2.7 体内药代动力学初步检测

给 3 只 SD 大鼠以 100 μ g/kg 单次皮下注射 rhEPO-L-Fc 融合蛋白, 于给药后的 0.5 h、2 h、4 h、8 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h 尾静脉采血, 分离血浆, 夹心 ELISA 检测血浆中 rhEPO-L-Fc 融合蛋白含量, 采用 3p97 软件进行数据处理, 计算相关药代动力学参数。

1.2.8 体内活性初步检测

给 3 只 SD 大鼠以 100 μ g/kg 单次皮下注射 rhEPO-L-Fc 融合蛋白, 于给药后 0 d、7 d、14 d 尾静脉采血, 300 μ L/只, 4 h 内检测网织红细胞数。

2 结果

2.1 rhEPO-L-Fc 融合基因及表达载体鉴定

用 PCR 方法成功构建 rhEPO-L-Fc 融合基因, 测序结果表明, 融合基因序列与设计一致, 其中 hEPO 基因长 579 bp, 编码 27 个氨基酸的信号肽和 166 个氨基酸; Linker 基因长 48 bp, 编码 16 个氨基酸(GSGGGSGGGSGGGG), Fc 基因长 681 bp, 编码 227 个氨基酸, 将融合基因连入表达载体构建重组

质粒 pOptiVEC™-TOPO®-rhEPO-L-Fc。

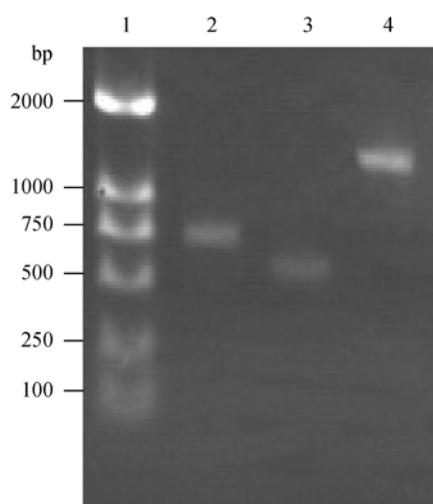


图 1a rhEPO-L-Fc PCR 产物 1%琼脂糖凝胶电泳
Fig. 1a Analysis of PCR products by 1% agarose gel electrophoresis

1: DL2000 DNA marker; 2: PCR product of Linker-Fc; 3: PCR product of rhEPO; 4: PCR product of rhEPO-L-Fc

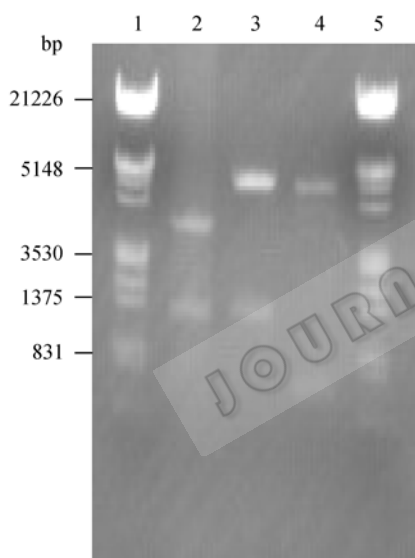


图 1b 重组质粒酶切分析

Fig. 1b Analysis of recombinant vectors

1, 5: DNA marker; 2: pBluescript-rhEPO-L-Fc digested with *Xba I/Hind III*; 3: pOptiVEC™-TOPO®-rhEPO-L-Fc digested with *Xba I/Hind III*; 4: pOptiVEC™-TOPO®-rhEPO-L-Fc digested with *BamH I/Hind III*

2.2 获得表达 rhEPO-L-Fc 融合蛋白的 CHO 细胞系

重组表达质粒转染细胞后, 经无 HT 的缺陷培养基筛选和有限稀释, 共获得了 30 个单克隆。32D-EPOR 细胞增殖实验比较各个单克隆细胞培养上清中目的蛋白表达水平, 选择 6 个表达水平相对较高的单克隆, 分别进行 MTX 加压筛选。MTX 浓度为 50 nmol/L 时, 将表达量最高的单克隆细胞悬

浮培养于 EX-CELL™302 无血清培养基中, 细胞培养上清中目的蛋白表达量达到 150 μg/mL。将继续提高 MTX 浓度加压筛选, 以进一步提高表达水平。



图 2 rhEPO-L-Fc 融合基因结构图

Fig. 2 General structure of fusion gene rhEPO-L-Fc

2.3 rhEPO-L-Fc 融合蛋白初步纯化与质谱鉴定

经 Protein A 亲和层析柱纯化的样品, 8% SDS-PAGE 显示有一条清晰蛋白条带, 非还原分子量约为 185 kD, 还原型约为 70 kD, 以羊抗人 IgG1 Fc-HRP 抗体为直标抗体进行免疫印迹分析表明, 分子量约为 185 kD 的蛋白条带能与羊抗人 IgG1 Fc-HRP 抗体特异结合(图 3), 质谱检测分子量为 108549.9922 D, 与理论分子质量大小相符, rhEPO-L-Fc 融合蛋白含有 10 个糖基化位点, SDS-PAGE 显示的表观分子量大于其理论分子量, 这与文献报道一致^[6], 说明该蛋白条带确实为表达的 rhEPO-L-Fc 融合蛋白。

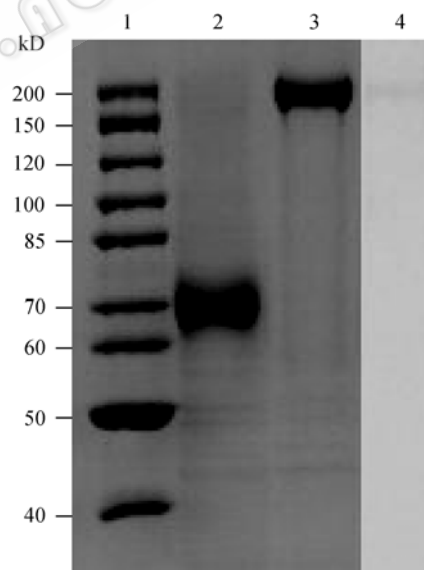


图 3 纯化的 rhEPO-L-Fc 融合蛋白 SDS-PAGE、Western blotting 图谱

Fig. 3 SDS-PAGE, Western blotting analysis of the purified rhEPO-L-Fc fusion protein

1: high weight protein marker; 2: monomeric form of rhEPO-L-Fc fusion protein in reduced condition; 3: chimeric form of rhEPO-L-Fc fusion protein in non-reduced condition; 4: Western blotting band

2.4 体外活性检测

32D-EPOR 细胞增殖实验显示, rhEPO 和 rhEPO-L-Fc 分别在 0.0066 ng/mL ~ 20 ng/mL 与

0.066 ng/mL ~ 66.7 ng/mL 范围内, 体外活性随浓度的升高而增强, 两者均表现出明显的量效关系, rhEPO ED₅₀ 为 0.86 ng/mL, rhEPO-L-Fc ED₅₀ 为 2 ng/mL(图 4)。

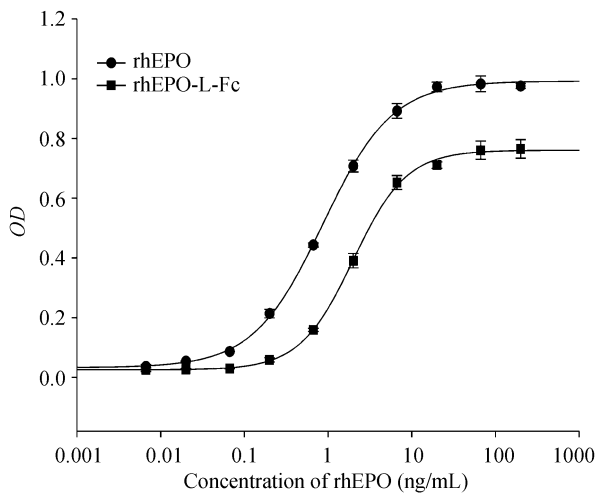


图 4 rhEPO-L-Fc 融合蛋白体外活性分析
Fig. 4 Biological activity analysis of fusion protein rhEPO-L-Fc in vitro

2.5 体内药代动力学初步检测

ELISA 检测给药后不同时间点大鼠血浆中 rhEPO-L-Fc 融合蛋白含量(图 5), 经 3p97 软件计算, 100 μg/kg 单次皮下给予 rhEPO-L-Fc 后, 达峰时间 (t_{max}) 为 27 h, 达峰浓度(C_{max})为 9.2 ng/mL, 药-时曲线下面积(AUC₀₋₁₂₀)为 923 ng/(mL·h), 消除半衰期 ($t_{1/2\beta}$)为 27 h。

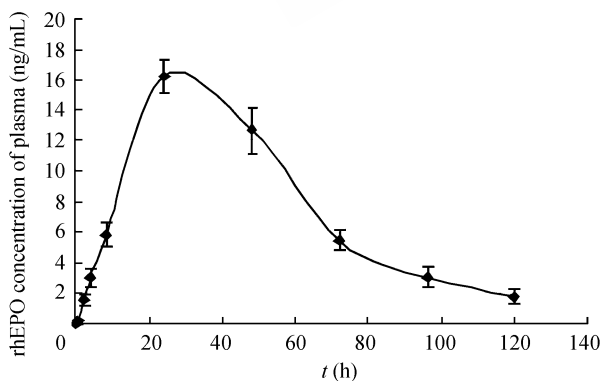


图 5 rhEPO-L-Fc 单次皮下注射大鼠血浆浓度-时间曲线
Fig. 5 Concentration-time curve of rhEPO-L-Fc after sc administration to rat

2.6 体内活性初步检测

网织红细胞计数显示, 给药后第 7 d 网织红细胞明显增加, 到 14 d 时基本降到基础水平, 说明

rhEPO-L-Fc 融合蛋白具有体内活性。

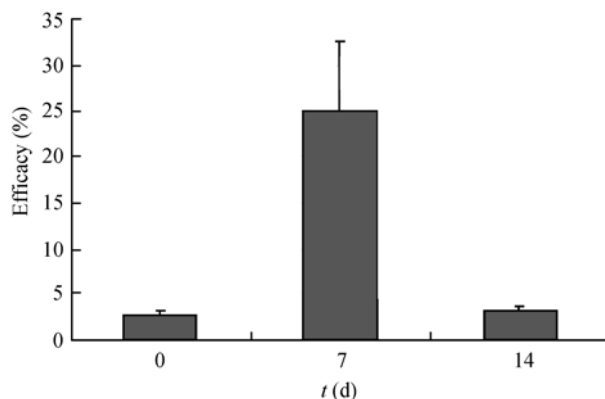


图 6 网织红细胞计数检测 rhEPO-L-Fc 融合蛋白体内活性
Fig. 6 In vivo efficacy of rhEPO-L-Fc was tested by reticulocyte count

3 讨论

延长药物的体内半衰期是提高药物疗效的一个重要途径, hEPO 人体静脉注射的消除半衰期约为 3 h~14 h, 皮下注射的出峰时间为 5 h~24 h, 消除半衰期约为 17 h^[7,8], 为了维持疗效, 病人需每周注射 2 或 3 次, 因此延长 EPO 体内半衰期可以提高病人生活质量, 降低治疗费用。目前已有多种策略用于延长 EPO 的体内半衰期, 提高其体内生物活性。一种方法是增加 EPO 分子量: EPO 分子聚乙二醇修饰(PEG 化)或 EPO 分子与载体蛋白——人白蛋白连接, 或通过多肽(3 至 17 个氨基酸)连接成为同源二聚体; 另一种方法是采用基因工程技术提高 EPO 分子糖基化程度: Amgen 公司生产的第二代重组人 EPO(AranespTM), 在 EPO 分子原有基础上另外增加 2 条 N-连接糖链, 增加含糖量^[7]。尽管这些方法都在一定程度上延长了 EPO 半衰期, 但有可能改变了 EPO 的分子结构和功能, 带来免疫原性, 降低其活性。

Fc 片段是 IgG 保持体内较长半衰期的主要原因, 同时具有稳定蛋白的作用, 因此本研究将 hEPO 与 IgG1 Fc 融合表达。IgG1 Fc 片段包括铰链区(Hinge)和重链恒定区(C_{H2}、C_{H3}), 铰链区有 3 个半胱氨酸(C₂₂₀、C₂₂₆、C₂₂₉), C₂₂₀ 与 IgG1 轻链二硫键的形成有关, C₂₂₆ 和 C₂₂₉ 在 2 条重链间形成两对链间二硫键构成 Fc 片段。将 rhEPO 与 Fc 融合表达, 使

其分子结构与 IgG 分子结构相似, EPO 分子将变得更加稳定; 而去掉 Fc 铰链 N 端最开始 5 个氨基酸 (E216-C220), 可以防止 C220 形成干扰融合蛋白分子构相的非特异性二硫键; 另外, hEPO 分子 C 端第 161 位为半胱氨酸, 该半胱氨酸与铰链区的第一个半胱氨酸至少应间隔 12 个氨基酸^[6], 因此我们将 hEPO 与 Fc 铰链通过 Linker 相连接(Linker 由 10-20 个选自甘氨酸, 丝氨酸, 丙氨酸, 苏氨酸的氨基酸组成, 本研究采用 16 个氨基酸 Linker—GSGGGSG GGGSGGGGS^[9]), 一方面使 hEPO 与 Fc 不能形成干扰分子结构的二硫键, 另一方面避免 hEPO 分子之间以及 hEPO 与 Fc 之间形成空间位阻, 使整个分子具有更大的柔性, 促使 hEPO 能有效与其受体 (EPO-Rc) 结合; 根据本试验的设计, hEPO 与 Fc 形成融合蛋白使 hEPO 分子量增加了约 3.5 倍, Fc 与 neonatal Fc (FcRn) 受体结合^[10], 动物实验表明 rhEPO-L-Fc 融合蛋白体内半衰期达到 27 h, 根据文献报道^[11-13], 大鼠静脉注射 rhEPO 的消除半衰期约为 2.5 h~3 h, 大鼠单次剂量皮下注射后出峰时间 t_{\max} 为 8 h~12 h, 消除半衰期 $t_{1/2\beta}$ 约为 10 h, 因此 rhEPO-L-Fc 融合蛋白能延长 hEPO 体内半衰期, 同时具有体内活性, 为系统性的动物药动学实验和药效实验奠定了基础, 有可能减少注射次数或降低注射剂量就能达到相应的治疗效果, 带来广阔的市场前景。

致谢 感谢健能隆医药技术(上海)有限公司对本研究的资助。

REFERENCES

- [1] Fisher JW. Erythropoietin: physiologic and pharmacologic aspects. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1997, **216**(3): 358-369.
- [2] Cohen J, Supino-Rosin L, Barzilay E, *et al.* Erythropoietin and its receptor: signaling and clinical manifestations. *IMAJ*, 2002, **4**(11): 1072-1076.
- [3] Blackwell K, Gascon P, Siqounas G, *et al.* rhEPO and improved treatment outcomes: potential modes of action. *Oncologist*, 2004, **9**(suppl 5): 41-47.
- [4] Jones TD, Halon M, Smith BJ, *et al.* The development of a modified human IFN- α 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*, 2004, **24**(9): 560-572.
- [5] Lo KM, Sudo Y, Chen J, *et al.* High level expression and secretion of Fc-X fusion proteins in mammalian cells. *Protein Eng*, 1998, **11**(6): 495-500.
- [6] Wang HT, Du Y, Zhang R, *et al.* Recombinant human EPO-Fc fusion proteins with prolonged half-life and enhanced erythropoietic activity *in vivo*: PCT, WO 2007/085084 A1.
- [7] Macdougall IC. An overview of the efficacy and safety of novel erythropoiesis stimulating protein(NESP). *Nephrol Dial Transplant*, 2001, **16**(suppl 3): 14-21.
- [8] Joy MS. Darbepoetin-alfa: a novel erythropoiesis-stimulating protein. *Ann Pharmacother*, 2002, **36**(7-8): 1183-1192.
- [9] Sytkowski AJ, Sytkowski, Lunn ED, *et al.* An erythropoietin fusion protein comprised of identical repeating domains exhibits enhanced biological properties. *J Biol Chem*, 1999, **274**(35): 24773-24778.
- [10] Hinton PR, Xiong JM, Johlfs MG, *et al.* An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life. *J Immunol*, 2006, **176**(1): 346-356.
- [11] Egrie JC, Dwyer E, Browne JK, *et al.* Darbepoetin-alfa has a longer circulating half-life and greater *in vivo* potency than recombinant human erythropoietin. *Exp Hematol*, 2003, **31**(4): 290-299.
- [12] Egrie JC, Browne JK. Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Nephrol Dial Transplant*, 2001, **16**(suppl 3): 3-13.
- [13] Kato M, Miura K, Kamiyama H, *et al.* Immunological response to repeated administration of recombinant human erythropoietin in rats. *Drug Metab Dispos*, 1997, **25**(9): 1039-1044.