(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
2017 年 10 月 26 日 (26.10.2017)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2017/181920 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/70 (2006.01) *C07K 1/107* (2006.01)
C12N 15/27 (2006.01) *C12R 1/19* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/080737

(22) 国际申请日: 2017 年 4 月 17 日 (17.04.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201610241276.8 2016年4月18日 (18.04.2016) CN

(71) 申请人: 江苏恒瑞医药股份有限公司 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号, Jiangsu 222047 (CN)。

(72) 发明人: 喻旭 (YU, Kui); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号, Jiangsu 222047 (CN)。 王宏伟 (WANG, Hongwei); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号, Jiangsu 222047 (CN)。 田静 (TIAN, Jing); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号, Jiangsu 222047 (CN)。 曾翔 (ZENG, Xiang); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号, Jiangsu 222047 (CN)。 孔祥林 (KONG, Xianglin); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号, Jiangsu 222047 (CN)。

(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司 (GE CHENG & CO., LTD.); 中国北京市东城区东长安街1号东方广场东三办公楼19层程伟, Beijing 100738 (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, DJ, 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, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, ST, 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))。

WO 2017/181920 A1

(54) **Title:** METHOD FOR PREPARING RECOMBINANT HUMAN GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR

(54) 发明名称: 一种重组人粒细胞集落刺激因子的制备方法

(57) **Abstract:** Provided is a method for preparing recombinant human granulocyte colony-stimulating factor; the cDNA used is obtained on the basis of a human source sequence modifed according to Escherichia coli codon preference, and has a high level of expression in Escherichia coli engineered bacteria.

(57) 摘要: 提供了一种重组人粒细胞集落刺激因子的制备方法，其中采用的cDNA是在人源序列基础上根据大肠杆菌密码子偏好性修改而得到的，其在大肠杆菌工程菌中表达量高。

一种重组人粒细胞集落刺激因子的制备方法

技术领域

本发明涉及一种重组人粒细胞集落刺激因子的制备方法，属于生物化学与分子生物学领域。

背景技术

人粒细胞集落刺激因子（hGCSF）是一种对刺激造血细胞包括成熟中性粒细胞，巨噬细胞和树状细胞的生长、分化和存活起重要作用的细胞因子。当受到微生物或者炎症细胞因子的刺激时，体内各种类型的细胞（例如：成纤维细胞，内皮细胞）都会产生人粒细胞集落刺激因子，人粒细胞集落刺激因子的活化在先天免疫应答中起重要作用。当受到特殊的抗原刺激时，T 细胞也会分泌人粒细胞集落刺激因子。由于对造血细胞的促进作用，人粒细胞集落刺激因子常被用作对免疫低下个体治疗的生物药。hGCSF 的活化失控与诸如关节炎和多发性硬化等自发免疫症状相关。自身抗体对 hGCSF 生物学活性的中和引起另一中自身免疫疾病---特发型肺泡蛋白沉积症，并且 hGCSF 可以治疗这种症状。目前，人粒细胞集落刺激因子主要应用于癌症放、化疗等原因引起的白细胞减少症，是肿瘤放、化疗过程中重要的辅助药物。

1986 年人粒细胞集落刺激因子 cDNA 克隆成功，人粒细胞集落刺激因子基因全长 2.5kb，包括 5 个外显子和 4 个内含子，人粒细胞集落刺激因子基因位于 17 号染色体。人类有两种不同的 hGCSFcDNA，分别编码含 207 和 204 个氨基酸的前体蛋白，均有 30 个氨基酸的先导序列，成熟蛋白分子分别为 177 和 174 个氨基酸，前者除了在成熟分子 N 端 35 位处插入了 3 个氨基酸外，其余的序列与 174 氨基酸分子相同。174 氨基酸分子的生物学活性比 177 氨基酸分子的生物学活性高 20 倍。

通常而言，人粒细胞集落刺激因子使用哺乳动物细胞进行重组表达。但是，为了分离和纯化 hGCSF，培养细胞并从培养上清液中分离 GCSF 蛋白，该方法存在 GCSF 产量低的缺点，因此不适于大量生产。已知糖基化 hGCSF 的糖链对于 hGCSF 的活性而言不是必需的，并且使用哺乳动物细胞产生糖基化 hGCSF 需要昂贵的材料和设备，因此，这样的方法从经济角度上来说不可行。1991 年，第一个通过大肠杆菌表达系统生产的重组人粒细胞集落刺激因子药物 Filgrastim（Neupogen，r-metHuGCSF，Amgen Inc）在美国上市，此后国内外有多家公司的大肠杆菌表达系统生产的 rhGCSF 药物上市。

目前报道的关于提高重组人粒细胞集落刺激因子产量的主要方法有以下几种（1）通过改变表达体系来提高表达量；（2）改变发酵工艺，如高密度发酵、

优化培养基、优化培养条件等手段实现工程菌的高表达；（3）优化复性条件，更改纯化工艺。但是这些方法只是生产工艺方面的优化，并没有在分子水平上提高人粒细胞集落刺激因子的重组表达产量。

如上文所述，糖基化 hGCSF 的糖链对于 hGCSF 的活性而言不是必需的，人粒细胞集落刺激因子可使用更加经济和方便的大肠杆菌表达系统进行生产，中国专利 CN1156575C、 CN1108303A、CN1088107C、 CN101591660A 等都是直接采用人源 cDNA 序列在大肠杆菌表达系统中重组表达人粒细胞集落刺激因子，而大肠杆菌表达系统中真核蛋白的表达会出现稀有密码子问题。尽管可以使用从 BL21 衍生而来的 Rosetta 宿主菌增强带有大肠杆菌稀有密码子的真核蛋白的表达。但是 Rosetta 宿主菌的筛选标记为氯霉素抗性，在药物生产中该抗生素的使用具有较大的限制。如何提高重组人粒细胞集落刺激因子的产量，最大限度的降低成本，是个巨大的挑战。

发明内容

本发明提供一种重组人粒细胞集落刺激因子的制备方法，该方法采用不同于重组人粒细胞集落刺激因子人源序列 SEQ ID NO.1 的 cDNA 在原核表达系统中表达，通过本发明提供的方法可使目的蛋白即重组人粒细胞刺激因子的表达量显著提高，解决了直接采用人源 cDNA 序列在原核生物表达体系中出现的稀有密码子问题。

本发明提供了一种重组人粒细胞集落刺激因子的制备方法，重组人粒细胞集落刺激因子的蛋白质序列见 SEQ ID NO.3，该蛋白序列对应的重组人粒细胞集落刺激因子的人源基因序列见 SEQ ID NO.1，该方法的特征在于包含合成 cDNA 序列的步骤，所述 cDNA 由人源 cDNA 序列突变而成，还包括重组表达载体的构建步骤以及重组表达载体在宿主细胞中诱导表达的步骤。

本发明中合成 cDNA 序列的步骤，采用全基因合成法，根据大肠杆菌密码子偏好性，同时优化序列 GC 含量，mRNA 二级结构，消除剪接位点，polyA 位点，Chi 位点和 RBS 位点，CpG 岛，RNA 不稳定模体，重复序列以及可能干扰克隆的限制性酶切位点，优化重组人粒细胞集落刺激因子基因序列。为了便于载体构建，在两端分别引入克隆重组所需的的酶切位点。

在一个优选的实施方案中，本发明提供的方法中合成的 cDNA 序列见 SEQ ID NO.2。

本发明提供的重组人粒细胞集落刺激因子的 cDNA 序列 SEQ ID NO.2 的合成是将重组人粒细胞集落刺激因子的人源基因序列中的 34 个碱基替换得到，序列中所有的大肠杆菌低频密码子均被高频密码子所替换。合成的 cDNA 序列 SEQ ID NO.2 在大肠杆菌中的密码子适应性增加（见图 1A 和图 1B），密码子使用频率得到提升（见图 2A 和图 2B），此外 GC 含量也有所改善（见图 3A 和图 3B）。

本发明提供的重组人粒细胞集落刺激因子的制备方法还包括重组表达载体的构建的步骤。

本发明提供的方法中涉及的重组表达载体选自温度表达载体（例如 pBV220）和底物诱导载体（例如 pET9a），优选底物诱导表达载体，最优选 pET 系列。

本发明提供的重组人粒细胞集落刺激因子的制备方法还包括重组表达载体在宿主细胞中诱导表达的步骤。

本发明提供的方法中涉及的宿主细胞为大肠杆菌，优选大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5a、BL21(DE3)、Rosetta(DE3) 、Origami (DE3)、JM109、HSM174（DE3）。

具体来讲，本发明提供的方法包含以下步骤：

（1）采用全基因合成法合成重组人粒细胞集落刺激因子基因；

（2）合成的 cDNA 序列与表达载体连接，构建重组表达载体。

（3）构建的表达载体在大肠杆菌中进行高效表达。

通过本发明提供的 cDNA 序列的重组表达产量可以达到人源 cDNA 的 2 倍以上。

本发明还提供了一种根据上述全基因合成法合成的可编码重组人粒细胞集落刺激因子的 cDNA 序列，见 SEQ ID NO.2。

本发明还提供了一种重组人粒细胞集落刺激因子基因的重组表达载体，该表达载体含有 SEQ ID NO.2。

本发明提供的重组表达载体选自温度表达载体（例如 pBV220）和底物诱导载体（例如 pET9a），优选底物诱导表达载体，最优选 pET 系列。

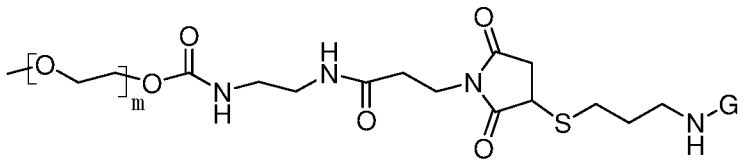
本发明还提供了一种可表达重组人粒细胞集落刺激因子的宿主细胞，该宿主细胞含有上述的重组表达载体。

本发明提供的宿主细胞为大肠杆菌，优选大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5a、BL21(DE3)、Rosetta(DE3) 、Origami (DE3)、JM109、HSM174（DE3）。

本发明还提供了一种制备重组人粒细胞集落刺激因子的水溶性聚合物修饰的偶联物的方法，该方法采用前述步骤得到如蛋白质序列 SEQ ID NO.3 所示的重组人粒细胞集落刺激因子后，进一步包含重组人粒细胞集落刺激因子与水溶性聚合物偶联的步骤，具体操作方法可参考专利 CN101172161B。

本发明还提供了一种重组人粒细胞集落刺激因子的水溶性聚合物修饰的偶联物，所述的水溶性聚合物选自聚乙二醇、聚丙二醇、聚乳酸等，优选聚乙二醇，聚乙二醇的分子量选自 2KD-100KD，优选 5KD-100KD。

本发明提供的重组人粒细胞集落刺激因子的水溶性聚合物修饰物的偶联物结构如式（Ⅰ）所示：



（Ⅰ）

m 选自 50-2500 的整数，优选自 400-500 的整数，G 为序列 SEQ ID NO.3 所示的蛋白序列。

附图说明

图 1A 和图 1B：序列 SEQ ID NO.1（图 1A）与序列 SEQ ID NO.2（图 1B）密码子适应指数（CAI）对比。

图 2A 和图 2B：序列 SEQ ID NO.1（图 2A）与序列 SEQ ID NO.2（图 2B）密码子使用频率（FOP）对比。

图 3A 和图 3B：序列 SEQ ID NO.1（图 3A）与序列 SEQ ID NO.2（图 3B）GC 含量对比。

图 4：重组表达菌株的摇瓶诱导表达，其中泳道 1：pET9a-GCSF-1/BL21（DE3），泳道 2：pET9a-GCSF-2/BL21（DE3），泳道 3：pET9a-GCSF-2/BL21（DE3），泳道 4：pBV220-GCSF-3/DH5a，泳道 5：pBV220-GCSF-4/DH5a，泳道 6：pBV220-GCSF-4/DH5a，泳道 7：空载体菌样品，泳道 8：空菌样品，泳道 M：蛋白标记（Protein Marker）。

图 5：重组表达菌株 5L 发酵罐诱导表达产量测定，其中 1：发酵样品稀释 8 倍，2：发酵样品稀释 16 倍。

具体实施方式

以下结合实施例用于进一步描述本发明，但这些实施例并非限制本发明的范围。

实施例 1: 重组人粒细胞集落刺激因子底物诱导表达菌株的构建

1、基因合成

重组人粒细胞集落刺激因子基因序列由南京金斯瑞生物公司合成。

重组人粒细胞集落刺激因子人源序列 SEQ ID NO.1：

ATGACCCCCTTAGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCCTGCTC
AAGTGCTTAGAGCAAGTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCA
GGAGAAGCTGTGTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGC
TGCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCCTGGGCTCCCCTGAGCAGCTGCCCCA
GCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACTCCATAGCGGCCTTT
TCCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATCTCCCCCGAGTTGG
GTCCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGACGTCGCCGACTTTGCCACCACCA

TCTGGCAGCAGATGGAAGAACTGGGAATGGCCCCTGCCCTGCAGCCCACC
CAGGGTGCCATGCCGGCCTTCGCCTCTGCTTTCCAGCGCCGGGCAGGAGG
GGTCCTGGTTGCCTCCCATCTGCAGAGCTTCCTGGAGGTGTCGTACCGCGT
TCTACGCCACCTTGCCCAGCCCTAA

合成的重组人粒细胞集落刺激因子基因序列 GCSF-1 如下所示，在 SEQ ID NO.1 5’端加了一个 Nde I 酶切位点，3’端添加了一个 BamHI 酶切位点。

CATATGACCCCCTTAGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCCTGC
TCAAGTGCTTAGAGCAAGTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCG
CTCCAGGAGAAGCTGTGTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCCGAGGA
GCTGGTGCTGCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCCTGGGCTCCCCTGAG
CAGCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACT
CCATAGCGGCCTTTTCCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGG
GATCTCCCCCGAGTTGGGTCCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGACGT
CGCCGACTTTGCCACCACCATCTGGCAGCAGATGGAAGAACTGGGAAT
GGCCCCTGCCCTGCAGCCCACCCAGGGTGCCATGCCGGCCTTCGCCTC
TGCTTTCCAGCGCCGGGCAGGAGGGGTCCTGGTTGCCTCCCATCTGCA
GAGCTTCCTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCCCAGCC
CTAATGAGGATCC

重组人粒细胞集落刺激因子 cDNA 序列 SEQ ID NO.2：

ATGACCCCGCTGGGTCCGGCAAGCTCTCTGCCGCAGTCATTTCTGCTG
AAATGCCTGGAACAGGTTCGTAAAATTCAAGGCGATGGTGCGGCCCTG
CAGGAAAAACTGTGCGCCACGTATAAACTGTGTCATCCGGAAGAACTG
GTCCTGCTGGGCCACAGTCTGGGTATCCCGTGGGCACCGCTGAGTTCC
TGCCCGTCCCAGGCACTGCAACTGGCAGGTTGTCTGTCACAGCTGCAC
TCGGGCCTGTTTCTGTACCAGGGTCTGCTGCAAGCGCTGGAAGGCATT
AGCCCGGAACTGGGTCCGACCCTGGACACGCTGCAGCTGGATGTGGCT
GACTTCGCGACCACGATCTGGCAGCAAATGGAAGAACTGGGTATGGCA
CCGGCTCTGCAGCCGACCCAAGGTGCTATGCCGGCGTTTGCCTCTGCAT
TCCAGCGTCGCGCTGGCGGTGTGCTGGTTGCGAGCCATCTGCAATCTTT
CCTGGAAGTCTCATATCGTGTGCTGCGCCACCTGGCCCAGCCGTAA

合成的重组人粒细胞集落刺激因子基因序列 GCSF-2 如下所示，在 SEQ ID NO.2 5’端加了一个 Nde I 酶切位点，3’端添加了一个 BamHI 酶切位点。

CATATGACCCCGCTGGGTCCGGCAAGCTCTCTGCCGCAGTCATTTCTG
CTGAAATGCCTGGAACAGGTTCGTAAAATTCAAGGCGATGGTGCGGC
CCTGCAGGAAAAACTGTGCGCCACGTATAAACTGTGTCATCCGGAAG
AACTGGTCCTGCTGGGCCACAGTCTGGGTATCCCGTGGGCACCGCTGA
GTTCCTGCCCGTCCCAGGCACTGCAACTGGCAGGTTGTCTGTCACAGC

TGCACTCGGGCCTGTTTCTGTACCAGGGTCTGCTGCAAGCGCTGGAAG
GCATTAGCCCGGAACTGGGTCCGACCCTGGACACGCTGCAGCTGGAT
GTGGCTGACTTCGCGACCACGATCTGGCAGCAAATGGAAGAACTGGG
TATGGCACCGGCTCTGCAGCCGACCCAAGGTGCTATGCCGGCGTTTGC
CTCTGCATTCCAGCGTCGCGCTGGCGGTGTGCTGGTTGCGAGCCATCT
GCAATCTTTCCTGGAAGTCTCATATCGTGTGCTGCGCCACCTGGCCCA
GCCGTAAGGATCC

对应的蛋白序列如 SEQ ID NO.3 所示

MTPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATYKLCHPEELVL
LGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGLFLYQGLLQALEGISPELG
PTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRA
GGVLVASHLQSFLEVSYRVLRHLAQP

2、重组表达菌株 pET9a-GCSF-1/BL21(DE3)、pET9a-GCSF-2/BL21(DE3)的构建

采用 NdeI 和 BamHI 内切酶（Fermentas）分别对重组克隆质粒（pUC57-GCSF-1、pUC57-GCSF-2）和表达载体 pET9a 进行双酶切消化。采用快速胶回收试剂盒（Promega）对目的基因片段（GCSF-1、GCSF-2）和表达载体 pET9a 酶切产物进行胶回收，用 T4 连接酶（New England Biolabs）对目的基因片段（GCSF-1、GCSF-2）和表达载体 pET9a 回收片段进行 DNA 连接。最后将连接产物转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞，涂布含终浓度 50μg/mlKana 的 LB 平板筛选重组子。

挑取阳性克隆，抽提质粒并由南京金斯瑞公司测序验证，得到 pET9a-GCSF-1/BL21(DE3)、pET9a-GCSF-2/BL21(DE3)表达菌株。

3、重组表达菌株 pET9a-GCSF-1/BL21(DE3)、pET9a-GCSF-2/BL21(DE3)的摇瓶诱导表达

将测序验证的阳性克隆接种至含 2mlLB(50μg/mlKana)培养基的 12ml 菌种培养管中，37℃恒温摇床 225 rpm 振荡培养至 OD_{600}=4 左右（16-18 小时）。转接入 50ml LB(50μg/mlKana)培养基中，37℃恒温摇床 220rpm 振荡培养约 1.5h 至 OD_{600}=0.8 左右。在培养基中加入约 1mM IPTG，37℃恒温摇床 220 rpm 振荡培养 4-5 小时，表达结束后，设置离心力为 5000g 离心 10 分钟取沉淀，SDS-PAGE 电泳分析见图 4。

4、重组表达菌株 pET9a-GCSF-1/BL21(DE3)、pET9a-GCSF-2/BL21(DE3) 5L 发酵罐诱导表达

5L 规模发酵分如下 4 步进行：

1. 取 2 ml 甘油菌接种至装有 200 mlLB 培养基(酵母粉 5 g/L，大豆蛋白胨 10 g/L，NaCl5 g/L)的 1 L 摇瓶中，37℃恒温摇床 220 rpm 振荡培养约 9h，培养

至菌种 OD_{600}=2.5 左右。

2. 将培养好的种子液接种至 5 L 发酵罐中进行发酵，使用 3 L LB 培养基(其组分为：胰蛋白胨 10g/L，酵母粉 5g/L，NaCl 5g/L，泡敌 0.03%，$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 11g/L，KH_2PO_4 2.7g/L，121℃灭菌 30min。葡萄糖 5g/L，$MgSO_4$ 0.3g/L，115℃灭菌 30min) ，培养温度设定为 37℃，通气量保持 6 L/min，用氨水控制 pH 在 7.0 左右，37℃培养，通过搅拌和补料控制溶氧在 30%~110%。

3. OD_{600} 达到 25 左右时，加入约 1mM IPTG，诱导时间 4 h。

4. 产量测定

表 1

	菌株	诱导后 2h	诱导后 4h	诱导后 6h
优化前	pET9a-GCSF-1/BL21(DE3)	1.23(g/L)	1.51(g/L)	1.74(g/L)
优化后	pET9a-GCSF-2/BL21(DE3)	2.36(g/L)	3.04(g/L)	3.49(g/L)

由表 1 中结果可知：采用 SEQ ID NO.2 基因序列构建的工程菌的目的蛋白的表达量是采用人源的重组人粒细胞集落刺激因子基因序列 SEQ ID NO.1 构建的工程菌目的蛋白的表达量的 2 倍以上。

实施例 2: 重组人粒细胞集落刺激因子温度诱导表达菌株的构建

1.基因合成

重组人粒细胞集落刺激因子基因序列由南京金斯瑞生物公司合成。

合成的重组人粒细胞集落刺激因子基因序列 GCSF-3 如下所示，在 SEQ ID NO.15’端加了一个 EcoRI 酶切位点，3’端添加了一个 BamHI 酶切位点。

GAATTCATGACCCCCTTAGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCC
TGCTCAAGTGCTTAGAGCAAGTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCA
GCGCTCCAGGAGAAGCTGTGTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCCGAG
GAGCTGGTGCTGCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCCTGGGCTCCCCTG
AGCAGCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCA
ACTCCATAGCGGCCTTTTCCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGA
AGGGATCTCCCCCGAGTTGGGTCCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGA
CGTCGCCGACTTTGCCACCACCATCTGGCAGCAGATGGAAGAACTGGG
AATGGCCCCTGCCCTGCAGCCCACCCAGGGTGCCATGCCGGCCTTCGC
CTCTGCTTTCCAGCGCCGGGCAGGAGGGGTCCTGGTTGCCTCCCATCT
GCAGAGCTTCCTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCCCA
GCCCTAATGAGGATCC

合成的重组人粒细胞集落刺激因子基因序列 GCSF-4 如下所示，在 SEQ ID

NO.2 5’端加了一个 EcoRI 酶切位点，3’端添加了一个 BamHI 酶切位点。

GAATTCATGACCCCGCTGGGTCCGGCAAGCTCTCTGCCGCAGTCATTT
CTGCTGAAATGCCTGGAACAGGTTCGTAAAATTCAAGGCGATGGTGC
GGCCCTGCAGGAAAAACTGTGCGCCACGTATAAACTGTGTCATCCGG
AAGAACTGGTCCTGCTGGGCCACAGTCTGGGTATCCCGTGGGCACCGC
TGAGTTCCTGCCCGTCCCAGGCACTGCAACTGGCAGGTTGTCTGTCAC
AGCTGCACTCGGGCCTGTTTCTGTACCAGGGTCTGCTGCAAGCGCTGG
AAGGCATTAGCCCGGAACTGGGTCCGACCCTGGACACGCTGCAGCTG
GATGTGGCTGACTTCGCGACCACGATCTGGCAGCAAATGGAAGAACT
GGGTATGGCACCGGCTCTGCAGCCGACCCAAGGTGCTATGCCGGCGTT
TGCCTCTGCATTCCAGCGTCGCGCTGGCGGTGTGCTGGTTGCGAGCCA
TCTGCAATCTTTCCTGGAAGTCTCATATCGTGTGCTGCGCCACCTGGCC
CAGCCGTAAGGATCC

对应的蛋白序列如 SEQ ID NO.3 所示

MTPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATYKLCHPEELVL
LGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGLFLYQGLLQALEGISPELG
PTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRA
GGVLVASHLQSFLEVSYRVLRHLAQP

2.重组表达菌株 pBV220-GCSF-3/DH5a、pBV220-GCSF-4/DH5a 的构建

采用 EcoRI 和 BamHI 内切酶（Fermentas）分别对重组克隆质粒（pUC57-GCSF-3、pUC57-GCSF-4）和表达载体 pBV220 进行双酶切消化。采用快速胶回收试剂盒（Promega）对目的基因片段（GCSF-3、GCSF-4）和表达载体 pBV220 酶切产物进行胶回收，用 T4 连接酶（New England Biolabs）对目的基因片段（GCSF-3、GCSF-4）和表达载体 pBV220 回收片段进行 DNA 连接。最后将连接产物转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞，涂布含终浓度 100μg/mlAmp 的 LB 平板筛选重组子。

挑取阳性克隆，抽提质粒并由南京金斯瑞公司测序验证，得到 pBV220-GCSF-3/DH5a、pBV220-GCSF-4/DH5a 表达菌株。

3.重组表达菌株 pBV220-GCSF-3/DH5a、pBV220-GCSF-4/DH5a 的摇瓶诱导表达

将测序验证的阳性克隆接种至含 2mlLB(100μg/mlAmp)培养基的 12ml 菌种培养管中，30℃恒温摇床 225 rpm 振荡培养至 OD_{600}=4 左右（16-18 小时）。转接入 50ml LB(100μg/mlAmp)培养基中，30℃恒温摇床 220rpm 振荡培养约 1.5h 至 OD_{600}=0.8 左右。升温至 42℃恒温摇床 220 rpm 振荡培养 4-5 小时，表达结束后，设置离心力为 5000g 离心 10 分钟取沉淀，SDS-PAGE 电泳分析。

4.重组表达菌株 pBV220-GCSF-3/DH5a、pBV220-GCSF-3/DH5a 5L 发酵罐诱导表

达

5L 规模发酵分如下 4 步进行：

1.取 2 ml 甘油菌接种至装有 200 mlLB 培养基(酵母粉 5 g/L，大豆蛋白胨 10 g/L，NaCl 5 g/L)的 1 L 摇瓶中，30℃恒温摇床 220 rpm 振荡培养约 9h，培养至菌种 OD_{600}=2.5 左右。

2.将培养好的种子液接种至 5 L 发酵罐中进行发酵，使用 3 L LB 培养基(其组分为：胰蛋白胨 10g/L，酵母粉 5g/L，NaCl 5g/L，泡敌 0.03%，$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 11g/L，KH_2PO_4 2.7g/L，121℃灭菌 30min。葡萄糖 5g/L，$MgSO_4$ 0.3g/L，115℃灭菌 30min)，培养温度设定为 30℃，通气量保持 6 L/min，用氨水控制 pH 在 7.0 左右，30℃培养，通过搅拌和补料控制溶氧在 30%~110%。

3.OD_{600} 达到 25 左右时，升温至 42℃，诱导时间 4 h。

4.产量测定

表 2

	菌株	诱导后 2h	诱导后 4h	诱导后 6h
优化前	pBV220-GCSF-3/DH5a	0.53(g/L)	0.81(g/L)	1.24(g/L)
优化后	pBV220-GCSF-4/DH5a	1.56(g/L)	2.18(g/L)	2.52(g/L)

由表 2 中结果可知：采用 SEQ ID NO.2 基因序列构建的工程菌的目的蛋白的表达量是采用人源的重组人粒细胞集落刺激因子基因序列 SEQ ID NO.1 构建的工程菌目的蛋白的表达量的 2 倍以上。

实施例 3:重组表达菌株 5L 发酵罐诱导表达产量的测定

1、取对照品 30 μl，用纯化水稀释配制 0.20g/L 对照品溶液，进一步用纯化水稀释成浓度梯度。取 1ml 混合均匀的发酵液，12000rpm 离心 5 分钟，弃上清，沉淀中加入 1ml 纯化水混匀。取 52μl 稀释样品，加入 20μl NuPAGE® LDS Sample Buffer（4×）和 8μl NuPAGE® Reducing Agent（10×），混匀，70℃水浴 10 分钟，12000rpm 离心 1 分钟备用。

2、选择 NuPAGE® Novex® 4-12%Bis-Tris Gel 与 NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer（20×）与 200V 恒压电泳约 50 分钟至溴酚蓝迁移至胶底，停止电泳。电泳完毕，取出胶片，置约 100ml 纯化水中，摇床振荡 5min，重复三次，弃去纯化水。加入约 100ml 染色液，摇床振荡染色 1h 直到出现清晰的蛋白条带；弃去染色液，加入约 100ml 纯化水，摇床振荡脱色过夜至凝胶背景透明。

3、将电泳后的凝胶置凝胶成像仪中，拍照分析见图 5。

实施例 4: 重组人粒细胞集落刺激因子 cDNA 序列筛选

1、基因合成

重组人粒细胞集落刺激因子基因序列由南京金斯瑞生物公司合成。

重组人粒细胞集落刺激因子 cDNA 序列 SEQ ID NO.4：

ATGACACCATTAGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCCTGCTC
AAGTGCTTAGAGCAAGTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCA
GGAGAAGCTGTGTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGC
TGCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCCTGGGCTCCCCTGAGCAGCTGCCCCA
GCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACTCCATAGCGGCCTTT
TCCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATCTCCCCCGAGTTGG
GTCCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGACGTCGCCGACTTTGCCACCACCA
TCTGGCAGCAGATGGAAGAACTGGGAATGGCCCCTGCCCTGCAGCCCACC
CAGGGTGCCATGCCGGCCTTCGCCTCTGCTTTCCAGCGCCGGGCAGGAGG
GGTCCTGGTTGCCTCCCATCTGCAGAGCTTCCTGGAGGTGTCGTACCGCGT
TCTACGCCACCTTGCCCAGCCCTAA

合成的重组人粒细胞集落刺激因子基因序列 GCSF-5 如下所示，在 SEQ ID NO.4 5’端加了一个 Nde I 酶切位点，3’端添加了一个 BamHI 酶切位点。

CATATGACACCATTAGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCCTGC
TCAAGTGCTTAGAGCAAGTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCG
CTCCAGGAGAAGCTGTGTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCCGAGGA
GCTGGTGCTGCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCCTGGGCTCCCCTGAG
CAGCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACT
CCATAGCGGCCTTTTCCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGG
GATCTCCCCCGAGTTGGGTCCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGACGT
CGCCGACTTTGCCACCACCATCTGGCAGCAGATGGAAGAACTGGGAAT
GGCCCCTGCCCTGCAGCCCACCCAGGGTGCCATGCCGGCCTTCGCCTC
TGCTTTCCAGCGCCGGGCAGGAGGGGTCCTGGTTGCCTCCCATCTGCA
GAGCTTCCTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCCCAGCC
CTAATGAGGATCC

重组人粒细胞集落刺激因子 cDNA 序列 SEQ ID NO.5：

ATGACCCCGCTGGGCCCGGCGAGCTCTCTGCCGCAGTCTTTCCTGCTG
AAATGCCTGGAACAGGTTCGTAAAATTCAAGGCGATGGTGCGGCCCTG
CAGGAAAAACTGTGCGCAACGTATAAACTGTGTCATCCGGAAGAACTG
GTTCTGCTGGGCCACAGTCTGGGCATTCCGTGGGCGCCGCTGAGCTCA
TGCCCGTCTCAGGCGCTGCAACTGGCAGGCTGTCTGTCTCAGCTGCAC
TCTGGCCTGTTTCTGTATCAGGGTCTGCTGCAAGCGCTGGAAGGCATTA
GCCCGGAACTGGGTCCGACCCTGGATACCCTGCAGCTGGATGTGGCTG
ACTTTGCGACCACGATCTGGCAGCAAATGGAAGAACTGGGTATGGCAC
CGGCACTGCAGCCGACCCAAGGTGCTATGCCGGCGTTTGCGTCTGCAT
TCCAGCGTCGCGCAGGCGGTGTGCTGGTTGCGAGCCATCTGCAATCTT
TCCTGGAAGTCTCATATCGTGTGCTGCGCCACCTGGCCCAGCCGTAA

合成的重组人粒细胞集落刺激因子基因序列 GCSF-6 如下所示，在 SEQ ID NO.5 5’端加了一个 Nde I 酶切位点，3’端添加了一个 BamHI 酶切位点。

CATATGACCCCGCTGGGCCCGGCGAGCTCTCTGCCGCAGTCTTTCCTG
CTGAAATGCCTGGAACAGGTTCGTAAAATTCAAGGCGATGGTGCGGCC
CTGCAGGAAAAACTGTGCGCAACGTATAAACTGTGTCATCCGGAAGAA
CTGGTTCTGCTGGGCCACAGTCTGGGCATTCCGTGGGCGCCGCTGAGC
TCATGCCCGTCTCAGGCGCTGCAACTGGCAGGCTGTCTGTCTCAGCTG
CACTCTGGCCTGTTTCTGTATCAGGGTCTGCTGCAAGCGCTGGAAGGC
ATTAGCCCGGAACTGGGTCCGACCCTGGATACCCTGCAGCTGGATGTG
GCTGACTTTGCGACCACGATCTGGCAGCAAATGGAAGAACTGGGTATG
GCACCGGCACTGCAGCCGACCCAAGGTGCTATGCCGGCGTTTGCGTCT
GCATTCCAGCGTCGCGCAGGCGGTGTGCTGGTTGCGAGCCATCTGCAA
TCTTTCCTGGAAGTCTCATATCGTGTGCTGCGCCACCTGGCCCAGCCGT
AATGAGGATCC

对应的蛋白序列如 SEQ ID NO.3 所示

2、重组表达菌株 pET9a-GCSF-5/BL21(DE3)、pET9a-GCSF-6/BL21(DE3)的构建

采用 NdeI 和 BamHI 内切酶（Fermentas）分别对重组克隆质粒（pUC57-GCSF-5、pUC57-GCSF-6）和表达载体 pET9a 进行双酶切消化。采用快速胶回收试剂盒（Promega）对目的基因片段（GCSF-5、GCSF-6）和表达载体 pET9a 酶切产物进行胶回收，用 T4 连接酶（New England Biolabs）对目的基因片段（GCSF-5、GCSF-6）和表达载体 pET9a 回收片段进行 DNA 连接。最后将连接产物转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞，涂布含终浓度 50μg/ml Kana 的 LB 平板筛选重组子。

挑取阳性克隆，抽提质粒并由南京金斯瑞公司测序验证，得到 pET9a-GCSF-5/BL21(DE3)、pET9a-GCSF-6/BL21(DE3)表达菌株。

3、重组表达菌株 pET9a-GCSF-1/BL21(DE3)、pET9a-GCSF-2/BL21(DE3)、pET9a-GCSF-5/BL21(DE3)、pET9a-GCSF-6/BL21(DE3)的摇瓶诱导表达

将测序验证的阳性克隆接种至含 2mlLB(50μg/ml Kana)培养基的 12ml 菌种培养管中，37℃恒温摇床 225 rpm 振荡培养至 OD_{600}=4 左右（16-18 小时）。转接入 50ml LB(50μg/ml Kana)培养基中，37℃恒温摇床 220rpm 振荡培养约 1.5h 至 OD_{600}=0.8 左右。在培养基中加入约 1mM IPTG，37℃恒温摇床 220 rpm 振荡培养 4-5 小时，表达结束后，设置离心力为 5000g 离心 10 分钟取沉淀，SDS-PAGE 电泳分析，按实施例 3 所示方法进行定量，结果见下表：

表 3：

	菌株	诱导后 4h
人源序列	pET9a-GCSF-1/BL21(DE3)	78.35(mg/L)
优化后	pET9a-GCSF-2/BL21(DE3)	173.94(mg/L)
	pET9a-GCSF-5/BL21(DE3)	78.40(mg/L)
	pET9a-GCSF-6/BL21(DE3)	95.68(mg/L)

权利要求书：

1. 一种重组人粒细胞集落刺激因子的制备方法，所述的重组人粒细胞集落刺激因子的蛋白质序列见 SEQ ID NO.3，其特征在于所述的制备方法包括合成 cDNA 序列的步骤，所述 cDNA 由是人源 cDNA 突变而成，还包括重组表达载体的构建步骤以及重组表达载体在宿主细胞中诱导表达的步骤。

2. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于所述的 cDNA 序列的合成依据选自：密码子偏好性、GC 含量、CpG 二核苷酸含量、mRNA 二级结构、剪接位点、polyA 位点、Chi 位点、核糖体结合位点、CpG 岛、RNA 不稳定模体、重复序列、干扰克隆的限制性酶切位点。

3. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于所述 cDNA 的序列为 SEQ ID NO.2。

4. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于所述重组表达载体选自温度表达载体和底物诱导表达载体，优选底物诱导表达载体，最优选 pET 系列。

5. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于所述的宿主细胞为大肠杆菌，优选大肠杆菌 *Escherichia coli*DH5a、BL21(DE3)、Rosetta(DE3) 、Origami (DE3)、JM109、HSM174（DE3）。

6. 一种可编码重组人粒细胞集落刺激因子的 cDNA 序列，其特征在于所述序列为 SEQ ID NO.2。

7. 一种重组人粒细胞集落刺激因子基因的重组表达载体，其特征在于所述表达载体含有权利 6 所述的 cDNA 序列。

8. 根据权利要求 7 所述的重组表达载体，其特征在于所述表达载体选自温度表达载体和底物诱导载体，优选底物诱导表达载体，最优选 pET 系列。

9. 一种可表达重组人粒细胞集落刺激因子的宿主细胞，所述的宿主细胞含有权利要求 7、8 任一项所述的表达载体。

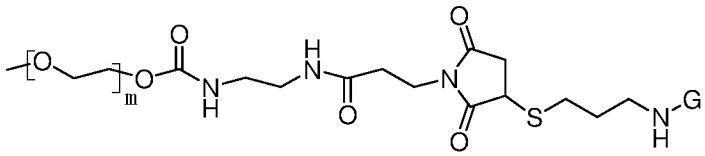
10. 根据权利要求 8 所述的宿主细胞，其特征在于所述的宿主细胞为大肠杆

菌，优选为大肠杆菌，优选 *Escherichia coli* DH5a、BL21(DE3)、Rosetta(DE3) 、Origami (DE3)、JM109、HSM174（DE3）。

11. 一种重组人粒细胞集落刺激因子的水溶性聚合物修饰的偶联物的制备方法：其特征在于所述方法包括权利要求 1-5 任一项所述的重组人粒细胞集落刺激因子的制备方法，还包括重组人粒细胞集落刺激因子与水溶性聚合物偶联的步骤。

12. 一种根据权利要求 11 所述的制备方法制得的重组人粒细胞集落刺激因子的水溶性聚合物修饰的偶联物，其特征在于所述水溶性聚合物为聚乙二醇。

13. 一种权利要求 12 所述的重组人粒细胞集落刺激因子的水溶性聚合物修饰的偶联物，其结构如式 I 所示



（ I ）

m 选自 50-2500 的整数，优选自 400-500 的整数，G 为 SEQ ID NO.3 所示的蛋白序列。

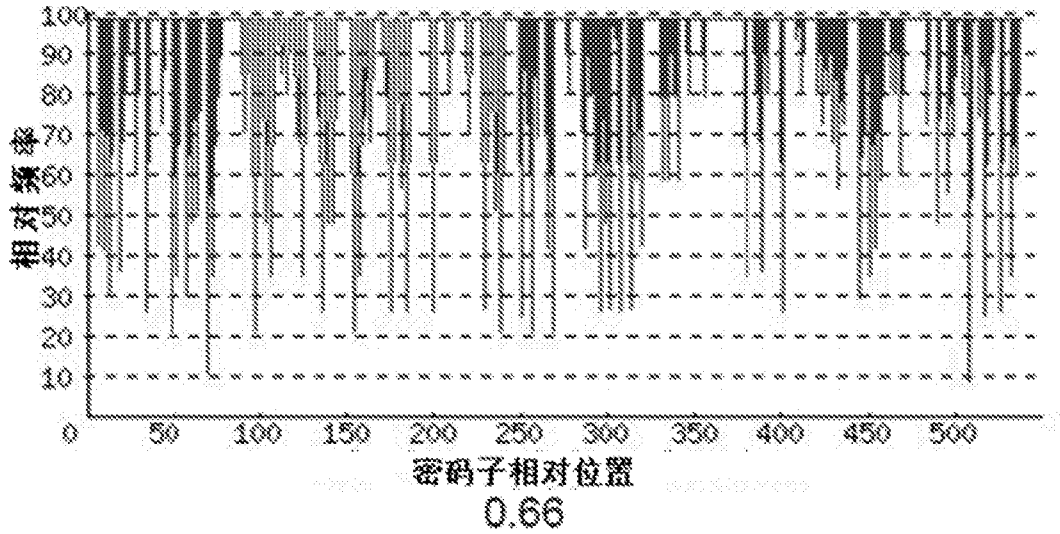


图 1A

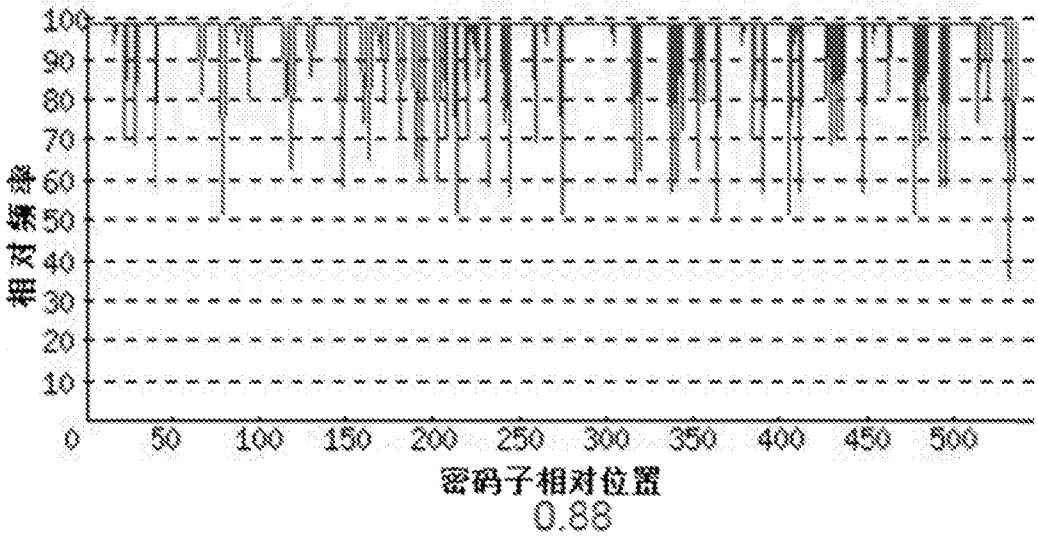


图 1B

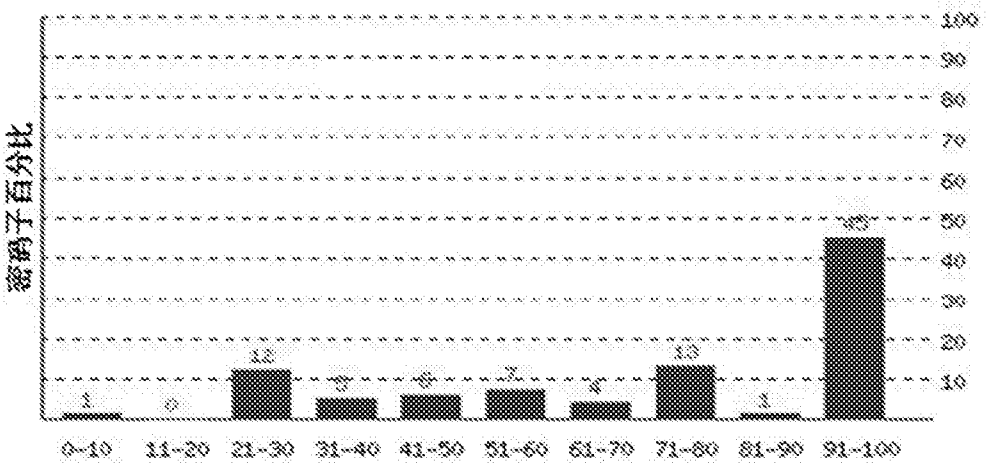

突码子百分比
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
1
0
12
7
5
7
4
13
1
45
0-10
11-20
21-30
31-40
41-50
51-60
61-70
71-80
81-90
91-100

图 2A

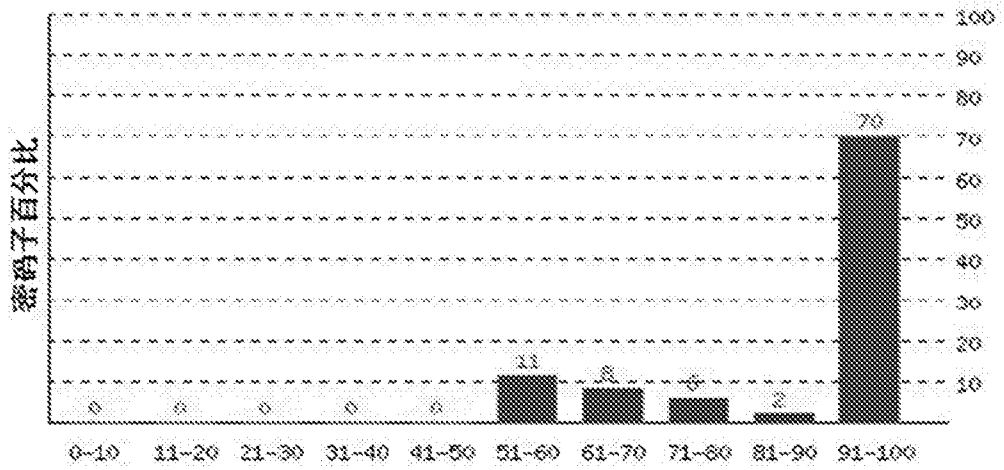

突码子百分比
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
0
0
0
11
8
4
2
70
0-10
11-20
21-30
31-40
41-50
51-60
61-70
71-80
81-90
91-100

图 2B

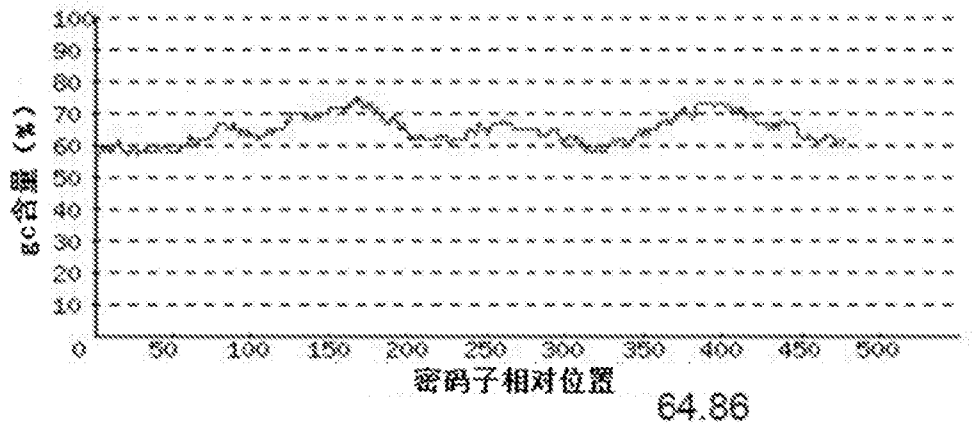

gc含量（%）
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
密码子相对位置
64.86

图 3A

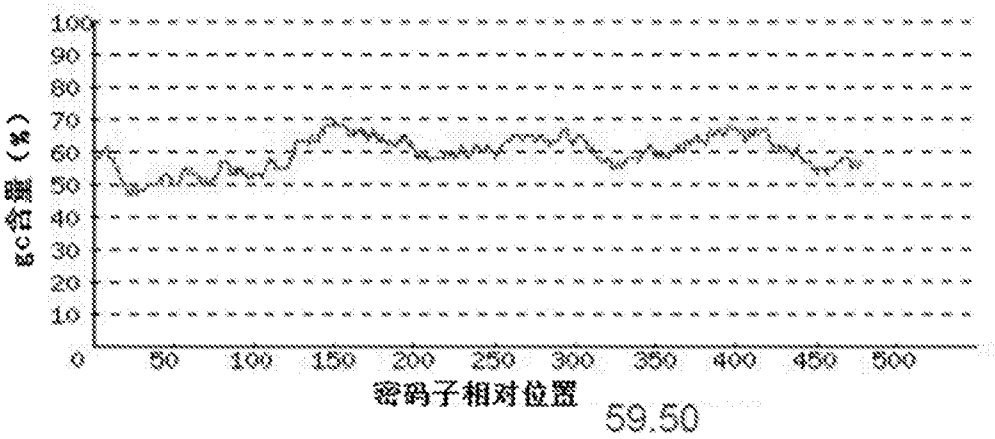

gc含量（%）
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
密码子相对位置
59.50

图 3B

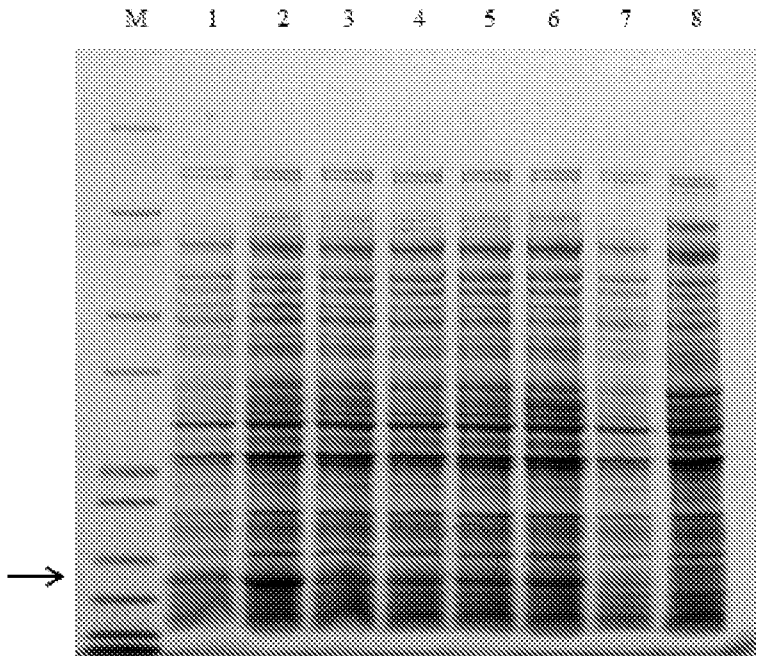

M
1
2
3
4
5
6
7
8

图 4

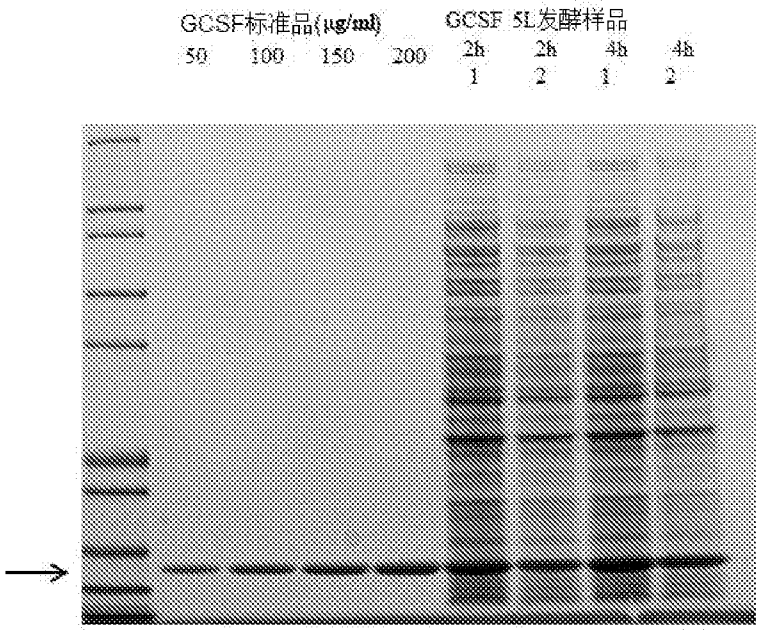

GCSF标准品(μg/ml)
50
100
150
200
GCSF 5L发酵样品
2h 1
2h 2
4h 1
4h 2

图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/080737

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/70 (2006.01) i; C12N 15/27 (2006.01) i; C12N 1/21 (2006.01) i; C07K 1/107 (2006.01) i; C12R 1/19 (2006.01) n
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)
C12N; C07K; C12R

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)
DATABASES: CNABS, CPRSABS, CNMED, TWABS, TWMED, HKABS, MOABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, TWTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science, Genbank+EMBL, NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT: codon, optimization, recombinant, human granulocyte colony stimulating factor, G-CSF, E. coli, Codon optimization, express+, sequence research on SEQ ID NO: 2 and 3

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FU, Yao; "Study on the gene synthesis, prokaryotic expression and activity of human granulocyte colony-stimulating factor", CHINA MASTER'S THESES FULL-TEXT DATABASE, no. 10, 15 October 2011 (15.10.2011), ISSN: 1674-0246, see abstract, and page 16, paragraph 2 to page 25, paragraph 2	1-13
Y	CN 105273076 A (JIANGSU AOSAIKANG PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 27 January 2016 (27.01.2016), see abstract, and sequence 1	1-13
Y	CN 104689333 A (RATIOPHARM GMBH), 10 June 2015 (10.06.2015), see claims 1-11, description, paragraph 4, and sequence 1	1-10
A	CN 104540846 A (RICHTER GEDEON NYRT), 22 April 2015 (22.04.2015), see the whole document	1-13
A	CN 101766810 A (BEIJING SL PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 07 July 2010 (07.07.2010), see the whole document	1-13
A	CN 105349578 A (ZHAOQING DAHUANONG BIOLOGIC PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al.), 24 February 2016 (24.02.2016), see the whole document	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
05 July 2017 (05.07.2017)	**20 July 2017 (20.07.2017)**
Name and mailing address of the ISA/CN: 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 **XING, Yunlong** Telephone No.: (86-10) **62411094**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/080737

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101198357 A (CJ CHEILJEDANG CORP.), 11 June 2008 (11.06.2008), see the whole document	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/080737

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105273076 A	27 January 2016	None	
CN 104689333 A	10 June 2015	EA 020069 B1	29 August 2014
		CY 1115908 T1	25 January 2017
		ZA 201000798 B	27 October 2010
		NZ 583276 A	29 June 2012
		ES 2476915 T3	15 July 2014
		CA 2696594 A1	05 March 2009
		WO 2009027437 A1	05 March 2009
		MX 2010002448 A	04 October 2010
		PT 2197919 E	17 July 2014
		AU 2008292186 B9	03 July 2014
		CN 101827864 A	08 September 2010
		HR P20140590 T1	15 August 2014
		EP 2197919 B1	09 April 2014
		IL 204190 A	29 January 2015
		DK 2197919 T3	07 July 2014
		JP 5570988 B2	13 August 2014
		JP 2010536929 A	02 December 2010
		AU 2008292186 A1	05 March 2009
		UA 98001 C2	10 April 2012
		EA 201070315 A1	30 August 2010
		BR PI0815975 A2	18 February 2015
		KR 20100052501 A	19 May 2010
		US 8546328 B2	01 October 2013
		DE 202008017456 U1	27 August 2009
		JP 2014101362 A	05 June 2014
		JP 5836351 B2	24 December 2015
		EP 2578235 A3	28 August 2013
		SI 2197919 T1	30 September 2014
		EP 2197919 A1	23 June 2010
		EP 2578235 A2	10 April 2013
		AU 2008292186 B2	27 February 2014
		US 2011053844 A1	03 March 2011
		ZA 201000798 A	27 October 2010
		RS 53404 B	31 October 2014
CN 104540846 A	22 April 2015	JP 2015512377 A	27 April 2015
		WO 2013068603 A2	16 May 2013
		WO 2013068603 A3	29 August 2013
		HU 1200172 A2	28 October 2013
		EP 2828287 A2	28 January 2015
		KR 20140142724 A	12 December 2014
		US 2015057439 A1	26 February 2015
		US 9458207 B2	04 October 2016
		CN 104540846 B	24 May 2017
		CA 2867796 A1	16 May 2013
CN 101766810 A	07 July 2010	None	
CN 105349578 A	24 February 2016	None	
CN 101198357 A	11 June 2008	US 2010143288 A1	10 June 2010
		EP 1896081 A1	12 March 2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/080737

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		US 8088899 B2	03 January 2012
		KR 20060129889 A	18 December 2006
		BR PI0613332 A2	04 January 2011
		WO 2006135176 A1	21 December 2006
		KR 100694994 B1	14 March 2007
		JP 2008543304 A	04 December 2008
		EP 1896081 A4	25 May 2011

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2017/080737

A. 主题的分类

C12N 15/70(2006.01)i；C12N 15/27(2006.01)i；C12N 1/21(2006.01)i；C07K 1/107(2006.01)i；C12R 1/19(2006.01)n

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. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N；C07K；C12R

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））

数据库：CNABS，CPRSABS，CNMED，TWABS，TWMED，HKABS，MOABS，DWPI，SIPOABS，CNTXT，TWTXT，WOTXT，USTXT，EPTXT，JPTXT，CNKI，Web of Science，Genbank+EMBL，中国专利生物序列检索系统；重组，人粒细胞集落刺激因子，大肠杆菌，密码子，优化，表达，recombinant，human granulocytecolony stimulating factor，G-CSF，E.coli，Codon optimization，express+，对SEQ ID NO：2、3的序列检索

C. 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
Y	付瑶. "人粒细胞集落刺激因子的基因合成、原核表达与活性研究" 中国优秀硕士学位论文全文数据库，第10期，2011年 10月 15日 (2011-10-15)，ISSN：1674-0246，参见摘要，第16页第2段-第25页第2段	1-13
Y	CN 105273076 A (江苏奥赛康药业股份有限公司) 2016年 1月 27日 (2016-01-27) 参见摘要，序列1	1-13
Y	CN 104689333 A (拉蒂奥法姆有限责任公司) 2015年 6月 10日 (2015-06-10) 参见权利要求1-11，说明书第4段，序列1	1-10
A	CN 104540846 A (吉瑞工厂) 2015年 4月 22日 (2015-04-22) 参见全文	1-13
A	CN 101766810 A (北京双鹭药业股份有限公司) 2010年 7月 7日 (2010-07-07) 参见全文	1-13
A	CN 105349578 A (肇庆大华农生物药品有限公司等) 2016年 2月 24日 (2016-02-24) 参见全文	1-13

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 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	国际检索报告邮寄日期
2017年 7月 5日	2017年 7月 20日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 邢云龙 电话号码 (86-10)62411094

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2017/080737

C. 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
A	CN 101198357 A (CJ第一制糖株式会社) 2008年 6月 11日 (2008 - 06 - 11) 参见全文	1-13

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2017/080737

检索报告引用的专利文件			公布日（年/月/日）	同族专利			公布日（年/月/日）
CN	105273076	A	2016年 1月 27日	无			
CN	104689333	A	2015年 6月 10日	EA	020069	B1	2014年 8月 29日
				CY	1115908	T1	2017年 1月 25日
				ZA	201000798	B	2010年 10月 27日
				NZ	583276	A	2012年 6月 29日
				ES	2476915	T3	2014年 7月 15日
				CA	2696594	A1	2009年 3月 5日
				WO	2009027437	A1	2009年 3月 5日
				MX	2010002448	A	2010年 10月 4日
				PT	2197919	E	2014年 7月 17日
				AU	2008292186	B9	2014年 7月 3日
				CN	101827864	A	2010年 9月 8日
				HR	P20140590	T1	2014年 8月 15日
				EP	2197919	B1	2014年 4月 9日
				IL	204190	A	2015年 1月 29日
				DK	2197919	T3	2014年 7月 7日
				JP	5570988	B2	2014年 8月 13日
				JP	2010536929	A	2010年 12月 2日
				AU	2008292186	A1	2009年 3月 5日
				UA	98001	C2	2012年 4月 10日
				EA	201070315	A1	2010年 8月 30日
				BR	PI0815975	A2	2015年 2月 18日
				KR	20100052501	A	2010年 5月 19日
				US	8546328	B2	2013年 10月 1日
				DE	202008017456	U1	2009年 8月 27日
				JP	2014101362	A	2014年 6月 5日
				JP	5836351	B2	2015年 12月 24日
				EP	2578235	A3	2013年 8月 28日
				SI	2197919	T1	2014年 9月 30日
				EP	2197919	A1	2010年 6月 23日
				EP	2578235	A2	2013年 4月 10日
				AU	2008292186	B2	2014年 2月 27日
				US	2011053844	A1	2011年 3月 3日
				ZA	201000798	A	2010年 10月 27日
				RS	53404	B	2014年 10月 31日
CN	104540846	A	2015年 4月 22日	JP	2015512377	A	2015年 4月 27日
				WO	2013068603	A2	2013年 5月 16日
				WO	2013068603	A3	2013年 8月 29日
				HU	1200172	A2	2013年 10月 28日
				EP	2828287	A2	2015年 1月 28日
				KR	20140142724	A	2014年 12月 12日
				US	2015057439	A1	2015年 2月 26日
				US	9458207	B2	2016年 10月 4日
				CN	104540846	B	2017年 5月 24日
				CA	2867796	A1	2013年 5月 16日
CN	101766810	A	2010年 7月 7日	无			
CN	105349578	A	2016年 2月 24日	无			
CN	101198357	A	2008年 6月 11日	US	2010143288	A1	2010年 6月 10日
				EP	1896081	A1	2008年 3月 12日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2017/080737

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
		US	8088899	B2	2012年 1月 3日
		KR	20060129889	A	2006年 12月 18日
		BR	PI0613332	A2	2011年 1月 4日
		WO	2006135176	A1	2006年 12月 21日
		KR	100694994	B1	2007年 3月 14日
		JP	2008543304	A	2008年 12月 4日
		EP	1896081	A4	2011年 5月 25日