



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I751154 B

(45)公告日：中華民國 111 (2022) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：106112759

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 04 月 17 日

(51)Int. Cl. : C07K14/53 (2006.01)

C12N15/70 (2006.01)

A61K38/19 (2006.01)

A61K47/50 (2017.01)

(30)優先權：2016/04/18 中國大陸

201610241276.8

(71)申請人：大陸商江蘇恆瑞醫藥股份有限公司(中國大陸) JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. (CN)

中國大陸

(72)發明人：喻馮 YU, KUI (CN)；王宏偉 WANG, HONGWEI (CN)；田靜 TIAN, JING (CN)；

曾翔 ZENG, XIANG (CN)；孔祥林 KONG, XIANGLIN (CN)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

CN 104689333A

CN 105273076A

付瑤，”人粒細胞集落刺激因子的基因合成、原核表達與活性研究”，吉林大學碩士學位論文，2011 年 6 月

審查人員：王顥棟

申請專利範圍項數：18 項 圖式數：5 共 34 頁

(54)名稱

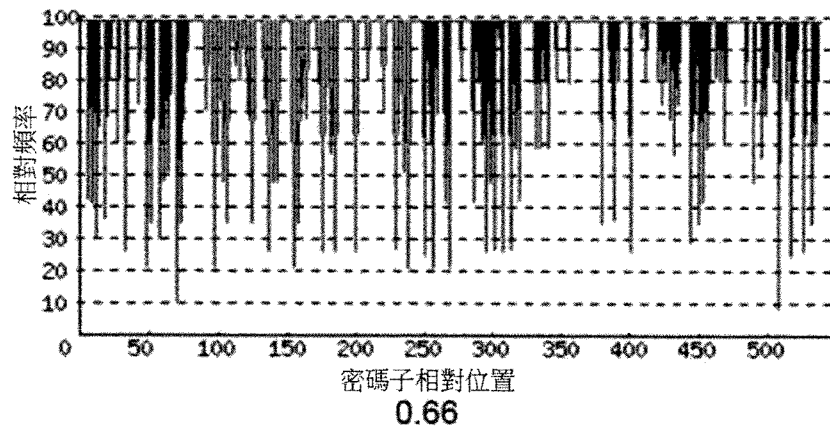
一種重組人粒細胞集落刺激因子的製備方法

(57)摘要

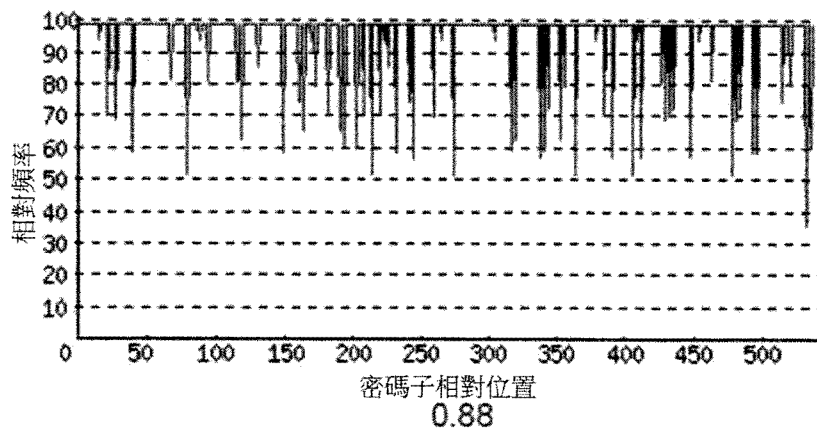
本發明涉及一種重組人粒細胞集落刺激因子的製備方法。具體而言，本發明所述方法採用的 cDNA 序列是由人源序列突變而成，採用本發明提供的方法，可以使得目的蛋白即重組人粒細胞刺激因子的表達量顯著提高。

The invention relates to a preparation method of recombinant human granulocyte colony stimulating factor. Specifically, the cDNA sequence with the method of the invention is formed by the human sequence mutation, the method provided by the invention can make the expression of protein (recombinant human granulocyte colony stimulating factor) increased significantly.

指定代表圖：

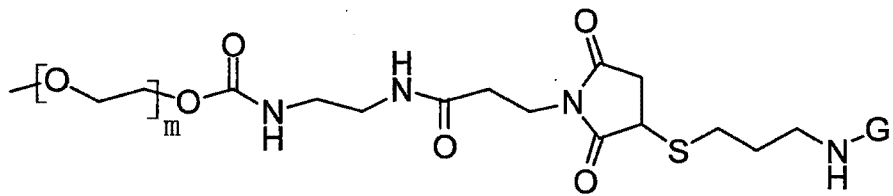


第1A圖



第1B圖

特徵化學式：



(I)

I751154

發明摘要

※ 申請案號：106112759

※ 申請日：106/04/17

※ I P C 分類：*C07K 14/53* (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

一種重組人粒細胞集落刺激因子的製備方法

A PREPARATION METHOD OF RECOMBINANT HUMAN
GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR

【中文】

本發明涉及一種重組人粒細胞集落刺激因子的製備方法。具體而言，本發明所述方法採用的 cDNA 序列是由人源序列突變而成，採用本發明提供的方法，可以使得目的蛋白即重組人粒細胞刺激因子的表達量顯著提高。

【英文】

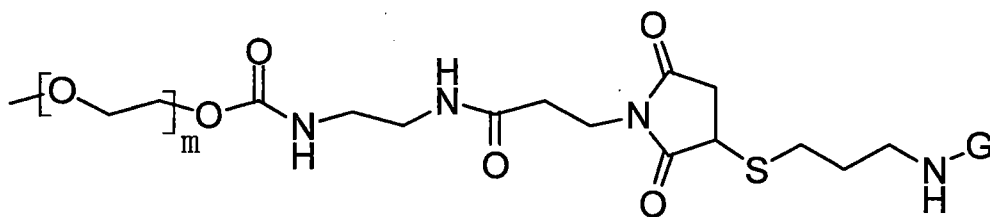
The invention relates to a preparation method of recombinant human granulocyte colony stimulating factor. Specifically, the cDNA sequence with the method of the invention is formed by the human sequence mutation, the method provided by the invention can make the expression of protein (recombinant human granulocyte colony stimulating factor) increased significantly.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第 1A 及 1B 圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



(I)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

一種重組人粒細胞集落刺激因子的製備方法

A PREPARATION METHOD OF RECOMBINANT HUMAN
GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR

【技術領域】

本發明涉及一種重組人粒細胞集落刺激因子的製備方法，屬於生物化學與分子生物學領域。

【先前技術】

人粒細胞集落刺激因子(hGCSF)是一種對刺激造血細胞包括成熟中性粒細胞，巨噬細胞和樹狀細胞的生長、分化和存活起重要作用的細胞因子。當受到微生物或者炎症細胞因子的刺激時，體內各種類型的細胞(例如：成纖維細胞，內皮細胞)都會產生人粒細胞集落刺激因子，人粒細胞集落刺激因子的活化在先天免疫反應中發揮重要作用。當受到特殊的抗原刺激時，T細胞也會分泌人粒細胞集落刺激因子。由於對造血細胞的促進作用，人粒細胞集落刺激因子常被用作對免疫低下個體治療的生物藥。

hGCSF的活化失控與諸如關節炎和多發性硬化等自發免疫症狀相關。自身抗體對hGCSF生物學活性的中和引起另一中自身免疫疾病---特發型肺泡蛋白沉積症，並且hGCSF可以治療這種症狀。目前，人粒細胞集落刺激因子主要應用於癌症放、化療等原因引起的白血球減少症，是腫瘤放、

化療過程中重要的輔助藥物。

1986 年人粒細胞集落刺激因子 cDNA 選殖成功，人粒細胞集落刺激因子基因全長 2.5kb，包括 5 個外顯子和 4 個內含子，人粒細胞集落刺激因子基因位於 17 號染色體。人類有兩種不同的 hGCSFcDNA，分別編碼含 207 和 204 個胺基酸的前體蛋白，均有 30 個胺基酸的先導序列，成熟蛋白分子分別為 177 和 174 個胺基酸，前者除了在成熟分子 N 端 35 位處插入了 3 個胺基酸外，其餘的序列與 174 胺基酸分子相同。174 胺基酸分子的生物學活性比 177 胺基酸分子的生物學活性高 20 倍。

通常而言，人粒細胞集落刺激因子使用哺乳動物細胞進行重組表達。但是，為了分離和純化 hGCSF，培養細胞並從培養上清液中分離 GCSF 蛋白，該方法存在 GCSF 產量低的缺點，因此不適於大量生產。已知糖基化 hGCSF 的糖鏈對於 hGCSF 的活性而言不是必需的，並且使用哺乳動物細胞產生糖基化 hGCSF 需要昂貴的材料和設備，因此，這樣的方法從經濟角度上來說不可行。1991 年，第一個藉由大腸桿菌表達系統生產的重組人粒細胞集落刺激因子藥物 Filgrastim (Neupogen, r-metHuGCSF, Amgen Inc) 在美國上市，此後國內外有多家公司的大腸桿菌表達系統生產的 rhGCSF 藥物上市。

目前報導的關於提高重組人粒細胞集落刺激因子產量的主要方法有以下幾種 (1) 藉由改變表達體系來提高表達量；(2) 改變發酵工藝，如高密度發酵、優化培養基、

優化培養條件等手段實現工程菌的高表達；(3) 優化復性條件，更改純化工藝。但是這些方法只是生產工藝方面的優化，並沒有在分子層級上提高人粒細胞集落刺激因子的重組表達產量。

如上文所述，糖基化 hGCSF 的糖鏈對於 hGCSF 的活性而言不是必需的，人粒細胞集落刺激因子可使用更加經濟和方便的大腸桿菌表達系統進行生產，中國專利 CN1156575C、CN1108303A、CN1088107C、CN101591660A 等都是直接採用人源 cDNA 序列在大腸桿菌表達系統中重組表達人粒細胞集落刺激因子，而大腸桿菌表達系統中真核蛋白的表達會出現稀有密碼子問題。儘管可以使用從 BL21 衍生而來的 Rosetta 宿主菌增強帶有大腸桿菌稀有密碼子的真核蛋白的表達。但是 Rosetta 宿主菌的篩選標記為氯黴素抗性，在藥物生產中該抗生素的使用具有較大的限制。如何提高重組人粒細胞集落刺激因子的產量，最大限度的降低成本，是個巨大的挑戰。

【發明內容】

本發明提供一種重組人粒細胞集落刺激因子的製備方法，該方法採用不同於重組人粒細胞集落刺激因子人源序列 SEQ ID NO.1 的 cDNA 在原核表達系統中表達，藉由本發明提供的方法可使目的蛋白即重組人粒細胞刺激因子的表達量顯著提高，解決了直接採用人源 cDNA 序列在原核生物表達體系中出現的稀有密碼子問題。

本發明提供了一種重組人粒細胞集落刺激因子的製

備方法，重組人粒細胞集落刺激因子的蛋白質序列見 SEQ ID NO.3，該蛋白序列對應的重組人粒細胞集落刺激因子的人源基因序列見 SEQ ID NO.1，該方法的特徵在於包含合成 cDNA 序列的步驟，該 cDNA 由人源 cDNA 序列突變而成，還包括重組表達載體的構建步驟以及重組表達載體在宿主細胞中誘導表達的步驟。

本發明中合成 cDNA 序列的步驟，採用全基因合成法，根據大腸桿菌密碼子偏好性，同時優化序列 GC 含量，mRNA 二級結構，消除剪接位元點，polyA 位點，Chi 位點和 RBS 位點，CpG 島，RNA 不穩定模體，重複序列以及可能干擾選殖的限制性酶切位點，優化重組人粒細胞集落刺激因子基因序列。為了便於載體構建，在兩端分別引入選殖重組所需的酶切位點。

在一個較佳的實施方案中，本發明提供的方法中合成的 cDNA 序列見 SEQ ID NO.2。

本發明提供的重組人粒細胞集落刺激因子的 cDNA 序列 SEQ ID NO.2 的合成是將重組人粒細胞集落刺激因子的人源基因序列中的 34 個鹼基替換得到，序列中所有的大腸桿菌低頻密碼子均被高頻密碼子所替換。合成的 cDNA 序列 SEQ ID NO.2 在大腸桿菌中的密碼子適應性增加（見第 1A 圖和第 1B 圖），密碼子使用頻率得到提升（見第 2A 圖和第 2B 圖），此外 GC 含量也有所改善（見第 3A 圖和第 3B 圖）。

本發明提供的重組人粒細胞集落刺激因子的製備方

法還包括重組表達載體的構建的步驟。

本發明提供的方法中涉及的重組表達載體選自溫度表達載體（例如 pBV220）和受質誘導載體（例如 pET9a），較佳為受質誘導表達載體，最佳為 pET 系列。

本發明提供的重組人粒細胞集落刺激因子的製備方法還包括重組表達載體在宿主細胞中誘導表達的步驟。

本發明提供的方法中涉及的宿主細胞為大腸桿菌，較佳為大腸桿菌 *Escherichia coli* DH5a、BL21(DE3)、Rosetta(DE3)、Origami (DE3)、JM109、HSM174 (DE3)。

具體來講，本發明提供的方法包含以下步驟：

（1）採用全基因合成法合成重組人粒細胞集落刺激因子基因；

（2）合成的 cDNA 序列與表達載體連接，構建重組表達載體。

（3）構建的表達載體在大腸桿菌中進行高效表達。

藉由本發明提供的 cDNA 序列的重組表達產量可以達到人源 cDNA 的 2 倍以上。

本發明還提供了一種根據上述全基因合成法合成的可編碼重組人粒細胞集落刺激因子的 cDNA 序列，見 SEQ ID NO.2。

本發明還提供了一種重組人粒細胞集落刺激因子基因的重組表達載體，該表達載體含有 SEQ ID NO.2。

本發明提供的重組表達載體選自溫度表達載體（例如 pBV220）和受質誘導載體（例如 pET9a），較佳為受質誘導

表達載體，最佳為 pET 系列。

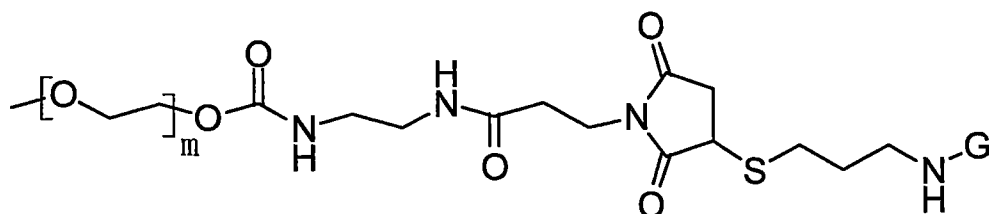
本發明還提供了一種可表達重組人粒細胞集落刺激因子的宿主細胞，該宿主細胞含有上述的重組表達載體。

本發明提供的宿主細胞為大腸桿菌，較佳為大腸桿菌 *Escherichia coli* DH5a、BL21(DE3)、Rosetta(DE3)、Origami (DE3)、JM109、HSM174 (DE3)。

本發明還提供了一種製備重組人粒細胞集落刺激因子的水溶性聚合物修飾的偶聯物的方法，該方法採用前述步驟得到如蛋白質序列 SEQ ID NO.3 所示的重組人粒細胞集落刺激因子後，進一步包含重組人粒細胞集落刺激因子與水溶性聚合物偶聯的步驟，具體操作方法可參考專利 CN101172161B。

本發明還提供了一種重組人粒細胞集落刺激因子的水溶性聚合物修飾的偶聯物，所述的水溶性聚合物選自聚乙二醇、聚丙二醇、聚乳酸等，較佳為聚乙二醇，聚乙二醇的分子量選自 2KD-100KD，較佳選自 5KD-100KD。

本發明提供的重組人粒細胞集落刺激因子的水溶性聚合物修飾物的偶聯物結構如式（I）所示：



(I)

m 選自 50-2500 的整數，較佳選自 400-500 的整數，G 為序列 SEQ ID NO.3 所示的蛋白序列。

【圖式簡單說明】

第 1A 圖和第 1B 圖：序列 SEQ ID NO.1（第 1A 圖）與序列 SEQ ID NO.2（第 1B 圖）密碼子適應指數（CAI）對比。

第 2A 圖和第 2B 圖：序列 SEQ ID NO.1（第 2A 圖）與序列 SEQ ID NO.2（第 2B 圖）密碼子使用頻率（FOP）對比。

第 3A 圖和第 3B 圖：序列 SEQ ID NO.1（第 3A 圖）與序列 SEQ ID NO.2（第 3B 圖）GC 含量對比。

第 4 圖：重組表達菌株的搖瓶誘導表達，其中電泳道 1：pET9a-GCSF-1/BL21（DE3），電泳道 2：pET9a-GCSF-2/BL21（DE3），電泳道 3：pET9a-GCSF-2/BL21（DE3），電泳道 4：pBV220-GCSF-3/DH5a，電泳道 5：pBV220-GCSF-4/DH5a，電泳道 6：pBV220-GCSF-4/DH5a，電泳道 7：空載體菌樣品，電泳道 8：空菌樣品，電泳道 M：蛋白標記（Protein Marker）。

第 5 圖：重組表達菌株 5L 發酵罐誘導表達產量測定，其中 1：發酵樣品稀釋 8 倍，2：發酵樣品稀釋 16 倍。

【實施方式】

以下結合實施例用於進一步描述本發明，但這些實施例並非限制本發明的範圍。

實施例 1：重組人粒細胞集落刺激因子受質誘導表達菌株的構建

1、基因合成

重組人粒細胞集落刺激因子基因序列由南京金斯瑞生物公司合成。

重組人粒細胞集落刺激因子人源序列 SEQ ID NO.1：

ATGACCCCCTTAGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCCAGA
GCTTCCTGCTCAAGTGCTTAGAGCAAGTGAGGAAGATCCA
GGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGTGTGCCACC
TACAAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGCTGCTCGGAC
ACTCTCTGGGCATCCCCTGGGCTCCCCTGAGCAGCTGCCCC
AGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACTCC
ATAGCGGCCTTTTCCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTG
GAAGGGATCTCCCCCGAGTTGGGTCCCACCTTGGACACACT
GCAGCTGGACGTCGCCGACTTTGCCACCACCATCTGGCAGC
AGATGGAAGAACTGGGAATGGCCCCTGCCCTGCAGCCCAC
CCAGGGTGCCATGCCGGCCTTCGCCTCTGCTTTCCAGCGCC
GGGCAGGAGGGGGTCCTGGTTGCCTCCCATCTGCAGAGCTTC
CTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCCCAGCC
CTAA

合成的重組人粒細胞集落刺激因子基因序列 GCSF-1 如下所示，在 SEQ ID NO.1 5' 端加了一個 Nde I 酶切位點，3' 端添加了一個 BamHI 酶切位點。

CATATGACCCCCTTAGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCCA
GAGCTTCCTGCTCAAGTGCTTAGAGCAAGTGAGGAAG
ATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGT
GTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGT

GCTGCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCCTGGGCTCCCC
TGAGCAGCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGG
CTGCTTGAGCCAACTCCATAGCGGCCTTTTCCTCTACC
AGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATCTCCCCCGA
GTTGGGTCCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGACGTC
GCCGACTTTGCCACCACCATCTGGCAGCAGATGGAAG
AACTGGGAATGGCCCCCTGCCCTGCAGCCCACCCAGGG
TGCCATGCCGGCCTTCGCCTCTGCTTTCCAGCGCCGGG
CAGGAGGGGGTCCTGGTTGCCTCCCATCTGCAGAGCTT
CCTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCCC
AGCCCTAATGAGGATCC

重組人粒細胞集落刺激因子 cDNA 序列 SEQ ID NO.2 :

ATGACCCCGCTGGGTCCGGCAAGCTCTCTGCCGCAGT
 CATTTCTGCTGAAATGCCTGGAACAGGTTCGTAAAATT
 CAAGGCGATGGTGCGGCCCTGCAGGAAAAACTGTGCG
 CCACGTATAAACTGTGTCATCCGGAAGAACTGGTCCT
 GCTGGGCCACAGTCTGGGTATCCCGTGGGCACCGCTG
 AGTTCCTGCCCCGTCCCAGGCACTGCAACTGGCAGGTT
 GTCTGTCACAGCTGCACTCGGGCCTGTTTCTGTACCAG
 GGTCTGCTGCAAGCGCTGGAAGGCATTAGCCCGGAAC
 TGGGTCCGACCCTGGACACGCTGCAGCTGGATGTGGC
 TGACTTCGCGACCACGATCTGGCAGCAAATGGAAGAA
 CTGGGTATGGCACCGGCTCTGCAGCCGACCCAAGGTG
 CTATGCCGGCGTTTTGCCTCTGCATTCCAGCGTCGCGCT

GGCGGTGTGCTGGTTGCGAGCCATCTGCAATCTTTCCT
GGAAGTCTCATATCGTGTGCTGCGCCACCTGGCCCAG
CCGTAA

合成的重組人粒細胞集落刺激因子基因序列 GCSF-2
如下所示，在 SEQ ID NO.2 5' 端加了一個 Nde I 酶切位
點，3' 端添加了一個 BamHI 酶切位點。

CATATGACCCCGCTGGGTCCGGCAAGCTCTCTGCCGC
AGTCATTTCTGCTGAAATGCCTGGAACAGGTTCGTAA
AATTCAAGGCGATGGTGCGGCCCTGCAGGAAAACTG
TGCGCCACGTATAAACTGTGTCATCCGGAAGAACTGG
TCCTGCTGGGCCACAGTCTGGGTATCCCGTGGGCACC
GCTGAGTTCCTGCCCCGTCCCAGGCACTGCAACTGGCA
GGTTGTCTGTACAGCTGCACTCGGGCCTGTTTCTGTA
CCAGGGTCTGCTGCAAGCGCTGGAAGGCATTAGCCCG
GAACTGGGTCCGACCCTGGACACGCTGCAGCTGGATG
TGGCTGACTTCGCGACCACGATCTGGCAGCAAATGGA
AGAACTGGGTATGGCACCGGCTCTGCAGCCGACCCAA
GGTGCTATGCCGGCGTTTGCCTCTGCATTCCAGCGTCG
CGCTGGCGGTGTGCTGGTTGCGAGCCATCTGCAATCTT
TCCTGGAAGTCTCATATCGTGTGCTGCGCCACCTGGCC
CAGCCGTAAGGGATCC

對應的蛋白序列如 SEQ ID NO.3 所示

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCA

YKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQ
LHSGFLFYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTI
WQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVA
SHLQSFLEVSYRVLRHLAQP

2、重組表達菌株 pET9a-GCSF-1/BL21(DE3)、 pET9a-GCSF-2/BL21(DE3)的構建

採用 NdeI 和 BamHI 內切酶 (Fermentas) 分別對重組選殖質體 (pUC57-GCSF-1、pUC57-GCSF-2) 和表達載體 pET9a 進行雙酶切消化。採用快速膠回收試劑盒 (Promega) 對目的基因片段 (GCSF-1、GCSF-2) 和表達載體 pET9a 酶切產物進行膠回收，用 T4 連接酶 (New England Biolabs) 對目的基因片段 (GCSF-1、GCSF-2) 和表達載體 pET9a 回收片段進行 DNA 連接。最後將連接產物轉化大腸桿菌 BL21(DE3)感受態細胞，塗布含終濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ Kana 的 LB 平板篩選重組子。

挑取陽性選殖株，抽提質體並由南京金斯瑞公司測序驗證，得到 pET9a-GCSF-1/BL21(DE3)、pET9a-GCSF-2/BL21(DE3)表達菌株。

3、重組表達菌株 pET9a-GCSF-1/BL21(DE3)、 pET9a-GCSF-2/BL21(DE3)的搖瓶誘導表達

將測序驗證的陽性選殖株接種至含 2ml LB ($50 \mu\text{g/ml}$ Kana) 培養基的 12ml 菌種培養管中， 37°C 恒溫搖床 225 rpm 振盪培養至 $\text{OD}_{600}=4$ 左右 (16-18 小時)。轉

接入 50ml LB(50 μ g/mlKana)培養基中，37℃ 恒溫搖床 220rpm 振盪培養約 1.5h 至 $OD_{600}=0.8$ 左右。在培養基中加入約 1mM IPTG，37℃ 恒溫搖床 220 rpm 振盪培養 4-5 小時，表達結束後，設置離心力為 5000g 離心 10 分鐘取沉澱，SDS-PAGE 電泳分析見第 4 圖。

4、重組表達菌株 pET9a-GCSF-1/BL21(DE3)、
pET9a-GCSF-2/BL21(DE3) 5L 發酵罐誘導表達
5L 規模發酵分如下 4 步進行：

1. 取 2 ml 甘油菌接種至裝有 200 mlLB 培養基(酵母粉 5 g/L，大豆蛋白胨 10 g/L，NaCl5 g/L)的 1 L 搖瓶中，37℃ 恒溫搖床 220 rpm 振盪培養約 9h，培養至菌種 $OD_{600}=2.5$ 左右。

2. 將培養好的種子液接種至 5 L 發酵罐中進行發酵，使用 3 L LB 培養基(其組分為：胰蛋白胨 10g/L，酵母粉 5g/L，NaCl 5g/L，泡敵 0.03%， $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 11g/L， KH_2PO_4 2.7g/L，121℃ 滅菌 30min。葡萄糖 5g/L， $MgSO_4$ 0.3g/L，115℃ 滅菌 30min)，培養溫度設定為 37℃，通氣量保持 6 L/min，用氨水控制 pH 在 7.0 左右，37℃ 培養，藉由攪拌和補料控制溶氧在 30%~110%。

3. OD_{600} 達到 25 左右時，加入約 1mM IPTG，誘導時間 4 h。

4. 產量測定

表 1

	菌株	誘導後 2h	誘導後 4h	誘導後 6h
優化前	pET9a-GCSF-1/BL21(DE3)	1.23(g/L)	1.51(g/L)	1.74(g/L)
優化後	pET9a-GCSF-2/BL21(DE3)	2.36(g/L)	3.04(g/L)	3.49(g/L)

由表 1 中結果可知：採用 SEQ ID NO.2 基因序列構建的工程菌的目的蛋白的表達量是採用人源的重組人粒細胞集落刺激因子基因序列 SEQ ID NO.1 構建的工程菌目的蛋白的表達量的 2 倍以上。

實施例 2：重組人粒細胞集落刺激因子溫度誘導表達菌株的構建

1.基因合成

重組人粒細胞集落刺激因子基因序列由南京金斯瑞生物公司合成。

合成的重組人粒細胞集落刺激因子基因序列 GCSF-3 如下所示，在 SEQ ID NO.15’ 端加了一個 EcoRI 酶切位點，3’ 端添加了一個 BamHI 酶切位點。

GAATTCATGACCCCCTTAGGCCCTGCCAGCTCCCTGCC
CCAGAGCTTCCTGCTCAAGTGCTTAGAGCAAGTGAGG
AAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGC
TGTGTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCT
GGTGCTGCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCCTGGGCTC
CCCTGAGCAGCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGC
AGGCTGCTTGAGCCAACTCCATAGCGGCCTTTTCCTCT
ACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATCTCCCC

CGAGTTGGGTCCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGAC
GTCGCCGACTTTGCCACCACCATCTGGCAGCAGATGG
AAGAACTGGGAATGGCCCCTGCCCTGCAGCCCACCCA
GGGTGCCATGCCGGCCTTCGCCTCTGCTTTCCAGCGCC
GGGCAGGAGGGGTCCTGGTTGCCTCCCATCTGCAGAG
CTTCCTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTG
CCCAGCCCTAATGAGGATCC

合成的重組人粒細胞集落刺激因子基因序列 GCSF-4
如下所示，在 SEQ ID NO.2 5' 端加了一個 EcoRI 酶切位
點，3' 端添加了一個 BamHI 酶切位點。

GAATTCATGACCCCGCTGGGTCCGGCAAGCTCTCTGC
CGCAGTCATTTCTGCTGAAATGCCTGGAACAGGTTCGT
AAAATTCAAGGCGATGGTGCGGCCCTGCAGGAAAAAC
TGTGCGCCACGTATAAACTGTGTCATCCGGAAGAACT
GGTCCTGCTGGGCCACAGTCTGGGTATCCCGTGGGCA
CCGCTGAGTTCCTGCCCGTCCCAGGCACTGCAACTGG
CAGGTTGTCTGTACAGCTGCACTCGGGCCTGTTTCTG
TACCAGGGTCTGCTGCAAGCGCTGGAAGGCATTAGCC
CGGAACTGGGTCCGACCCTGGACACGCTGCAGCTGGA
TGTGGCTGACTTCGCGACCACGATCTGGCAGCAAATG
GAAGAACTGGGTATGGCACCGGCTCTGCAGCCGACCC
AAGGTGCTATGCCGGCGTTTGCCTCTGCATTCCAGCGT
CGCGCTGGCGGTGTGCTGGTTGCGAGCCATCTGCAAT

CTTTCCTGGAAGTCTCATATCGTGTGCTGCGCCACCTG
GCCCAGCCGTAAGGATCC

對應的蛋白序列如 SEQ ID NO.3 所示

MTPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCA
YKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS
LHSGFLFYQGILLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATT
WQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVA
SHLQSFLEVSYRVLRHLAQ

2.重組表達菌株 pBV220-GCSF-3/DH5a、 pBV220-GCSF-4/DH5a 的構建

採用 EcoRI 和 BamHI 內切酶（Fermentas）分別對重組
選殖質體（pUC57-

GCSF-3、pUC57-GCSF-4）和表達載體 pBV220 進行雙
酶切消化。採用快速膠回收試劑盒（Promega）對目的基因
片段（GCSF-3、GCSF-4）和表達載體 pBV220 酶切產物進
行膠回收，用 T4 連接酶（New England Biolabs）對目的基
因片段（GCSF-3、GCSF-4）和表達載體 pBV220 回收片段
進行 DNA 連接。最後將連接產物轉化大腸桿菌 DH5a 感受
態細胞，塗布含終濃度 $100 \mu\text{g/ml}$ Amp 的 LB 平板篩選重組
子。

挑取陽性選殖株，抽提質體並由南京金斯瑞公司測序
驗證，得到 pBV220-

GCSF-3/DH5a、pBV220-GCSF-4/DH5a 表達菌株。

3.重組表達菌株 pBV220-GCSF-3/DH5a、 pBV220-GCSF-4/DH5a 的搖瓶誘導表達

將測序驗證的陽性選殖株接種至含 2mlLB(100 μ g/mlAmp)培養基的 12ml 菌種培養管中，30℃ 恒溫搖床 225 rpm 振盪培養至 OD₆₀₀=4 左右（16-18 小時）。轉接入 50ml LB(100 μ g/mlAmp)培養基中，30℃ 恒溫搖床 220rpm 振盪培養約 1.5h 至 OD₆₀₀=0.8 左右。升溫至 42℃ 恒溫搖床 220 rpm 振盪培養 4-5 小時，表達結束後，設置離心力為 5000g 離心 10 分鐘取沉澱，SDS-PAGE 電泳分析。

4.重組表達菌株 pBV220-GCSF-3/DH5a、 pBV220-GCSF-3/DH5a 5L 發酵罐誘導表達

5L 規模發酵分如下 4 步進行：

1. 2 ml 甘油菌接種至裝有 200 mlLB 培養基(酵母粉 5 g/L，大豆蛋白胨 10 g/L，NaCl 5 g/L)的 1 L 搖瓶中，30℃ 恒溫搖床 220 rpm 振盪培養約 9h，培養至菌種 OD₆₀₀=2.5 左右。

2. 將培養好的種子液接種至 5 L 發酵罐中進行發酵，使用 3 L LB 培養基(其組分為：胰蛋白胨 10g/L，酵母粉 5g/L，NaCl 5g/L，泡敵 0.03%，Na₂HPO₄·12H₂O 11g/L，KH₂PO₄ 2.7g/L，121℃ 滅菌 30min。葡萄糖 5g/L，MgSO₄ 0.3g/L，115℃ 滅菌 30min)，培養溫度設定為 30℃，通氣量保持 6 L/min，用氨水控制 pH 在 7.0 左右，30℃ 培養，藉由攪拌

和補料控制溶氧在 30%~110%。

3. OD₆₀₀ 達到 25 左右時，升溫至 42℃，誘導時間 4 h。

4. 產量測定

表 2

	菌株	誘導後 2h	誘導後 4h	誘導後 6h
優化前	pBV220-GCSF-3/DH5a	0.53(g/L)	0.81(g/L)	1.24(g/L)
優化後	pBV220-GCSF-4/DH5a	1.56(g/L)	2.18(g/L)	2.52(g/L)

由表 2 中結果可知：採用 SEQ ID NO.2 基因序列構建的工程菌的目的蛋白的表達量是採用人源的重組人粒細胞集落刺激因子基因序列 SEQ ID NO.1 構建的工程菌目的蛋白的表達量的 2 倍以上。

實施例 3:重組表達菌株 5L 發酵罐誘導表達產量的測定

1、取對照品 30 μ l，用純化水稀釋配製 0.20g/L 對照品溶液，進一步用純化水稀釋成濃度梯度。取 1ml 混合均勻的發酵液，12000rpm 離心 5 分鐘，棄上清，沉澱中加入 1ml 純化水混勻。取 52 μ l 稀釋樣品，加入 20 μ l NuPAGE® LDS Sample Buffer (4 $\times$) 和 8 μ l NuPAGE® Reducing Agent (10 $\times$)，混勻，70℃ 水浴 10 分鐘，12000rpm 離心 1 分鐘備用。

2、選擇 NuPAGE® Novex® 4-12%Bis-Tris Gel 與 NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20 $\times$) 與 200V 恒壓電泳約 50 分鐘至溴酚藍遷移至膠底，停止電泳。電泳完

畢，取出膠片，置約 100ml 純化水中，搖床振盪 5min，重複三次，棄去純化水。加入約 100ml 染色液，搖床振盪染色 1h 直到出現清晰的蛋白條帶；棄去染色液，加入約 100ml 純化水，搖床振盪脫色過夜至凝膠背景透明。

3、將電泳後的凝膠置凝膠成像儀中，拍照分析見第 5 圖。

實施例 4: 重組人粒細胞集落刺激因子 cDNA 序列篩選

1、基因合成

重組人粒細胞集落刺激因子基因序列由南京金斯瑞生物公司合成。

重組人粒細胞集落刺激因子 cDNA 序列 SEQ ID NO.4:

```
ATGACACCATTAGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCCAGA
GCTTCCTGCTCAAGTGCTTAGAGCAAGTGAGGAAGATCCA
GGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGTGTGCCACC
TACAAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGCTGCTCGGAC
ACTCTCTGGGCATCCCCTGGGCTCCCCTGAGCAGCTGCCCC
AGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCA ACTCC
ATAGCGGCCTTTTCCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTG
GAAGGGATCTCCCCCGAGTTGGGTCCACCTTGACACACT
GCAGCTGGACGTCGCCGACTTTGCCACCACCATCTGGCAGC
AGATGGAAGAACTGGGAATGGCCCCTGCCCTGCAGCCCAC
CCAGGGTGCCATGCCGGCCTTCGCCTCTGCTTTCCAGCGCC
GGGCAGGAGGGGTCCTGGTTGCCTCCCATCTGCAGAGCTTC
CTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCCCAGCC
```

CTAA

合成的重組人粒細胞集落刺激因子基因序列 GCSF-5 如下所示，在 SEQ ID NO.4 5' 端加了一個 Nde I 酶切位點，3' 端添加了一個 BamHI 酶切位點。

CATATGACACCATTAGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCCA
GAGCTTCCTGCTCAAGTGCTTAGAGCAAGTGAGGAAG
ATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGT
GTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGT
GCTGCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCCTGGGCTCCCC
TGAGCAGCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGG
CTGCTTGAGCCAACTCCATAGCGGCCTTTTCCTCTACC
AGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATCTCCCCCGA
GTTGGGTCCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGACGTC
GCCGACTTTGCCACCACCATCTGGCAGCAGATGGAAG
AACTGGGAATGGCCCCTGCCCTGCAGCCCACCCAGGG
TGCCATGCCGGCCTTCGCCTCTGCTTTCAGCGCCGGG
CAGGAGGGGTCCTGGTTGCCTCCCATCTGCAGAGCTT
CCTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCCC
AGCCCTAATGAGGATCC

重組人粒細胞集落刺激因子 cDNA 序列 SEQ ID NO.5：
ATGACCCCGCTGGGCCCCGGCGAGCTCTCTGCCGCAGT
CTTTCCTGCTGAAATGCCTGGAACAGGTTCGTAAAATT
CAAGGCGATGGTGCGGCCCTGCAGGAAAACTGTGCG
CAACGTATAAACTGTGTCATCCGGAAGAACTGGTTCT

GCTGGGCCACAGTCTGGGCATTCCGTGGGCGCCGCTG
 AGCTCATGCCCCGTCTCAGGCGCTGCAACTGGCAGGCT
 GTCTGTCTCAGCTGCACTCTGGCCTGTTTCTGTATCAG
 GGTCTGCTGCAAGCGCTGGAAGGCATTAGCCCGGAAC
 TGGGTCCGACCCTGGATACCCTGCAGCTGGATGTGGC
 TGACTTTGCGACCACGATCTGGCAGCAAATGGAAGAA
 CTGGGTATGGCACCGGCCTGCAGCCGACCCAAGGTG
 CTATGCCGGCGTTTGCGTCTGCATTCCAGCGTCGCGCA
 GGCGGTGTGCTGGTTGCGAGCCATCTGCAATCTTTCCT
 GGAAGTCTCATATCGTGTGCTGCGCCACCTGGCCCAG
 CCGTAA

合成的重組人粒細胞集落刺激因子基因序列 GCSF-6
 如下所示，在 SEQ ID NO.5 5' 端加了一個 Nde I 酶切位
 點，3' 端添加了一個 BamHI 酶切位點。

CATATGACCCCGCTGGGCCCCGGCGAGCTCTCTGCCGC
 AGTCTTTCCTGCTGAAATGCCTGGAACAGGTTCGTAA
 AATTCAAGGCGATGGTGCGGCCCTGCAGGAAAACTG
 TGCGCAACGTATAAACTGTGTCATCCGGAAGAACTGG
 TTCTGCTGGGCCACAGTCTGGGCATTCCGTGGGCGCC
 GCTGAGCTCATGCCCCGTCTCAGGCGCTGCAACTGGCA
 GGCTGTCTGTCTCAGCTGCACTCTGGCCTGTTTCTGTA
 TCAGGGTCTGCTGCAAGCGCTGGAAGGCATTAGCCCG
 GAACTGGGTCCGACCCTGGATACCCTGCAGCTGGATG
 TGGCTGACTTTGCGACCACGATCTGGCAGCAAATGGA

AGAACTGGGTATGGCACCGGCACTGCAGCCGACCCAA
GGTGCTATGCCGGCGTTTGCCTCTGCATTCCAGCGTCG
CGCAGGCGGTGTGCTGGTTGCGAGCCATCTGCAATCT
TTCCTGGAAGTCTCATATCGTGTGCTGCGCCACCTGGC
CCAGCCGTAATGAGGATCC

對應的蛋白序列如 SEQ ID NO.3 所示

2、重組表達菌株 pET9a-GCSF-5/BL21(DE3)、
pET9a-GCSF-6/BL21(DE3)的構建

採用 NdeI 和 BamHI 內切酶 (Fermentas) 分別對重組選殖質體 (pUC57-GCSF-5、pUC57-GCSF-6) 和表達載體 pET9a 進行雙酶切消化。採用快速膠回收試劑盒 (Promega) 對目的基因片段 (GCSF-5、GCSF-6) 和表達載體 pET9a 酶切產物進行膠回收，用 T4 連接酶 (New England Biolabs) 對目的基因片段 (GCSF-5、GCSF-6) 和表達載體 pET9a 回收片段進行 DNA 連接。最後將連接產物轉化大腸桿菌 BL21(DE3)感受態細胞，塗布含終濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ Kana 的 LB 平板篩選重組子。

挑取陽性選殖株，抽提質體並由南京金斯瑞公司測序驗證，得到 pET9a-GCSF-5/BL21(DE3)、
pET9a-GCSF-6/BL21(DE3)表達菌株。

3、重組表達菌株 pET9a-GCSF-1/BL21(DE3)、
pET9a-GCSF-2/BL21(DE3)、pET9a-GCSF-5/BL21(DE3)、
pET9a-GCSF-6/BL21(DE3)的搖瓶誘導表達

將測序驗證的陽性選殖株接種至含 2ml LB($50 \mu\text{g/ml}$

Kana)培養基的 12ml 菌種培養管中，37℃ 恒溫搖床 225 rpm 振盪培養至 OD₆₀₀=4 左右（16-18 小時）。轉接入 50ml LB(50 μ g/ml Kana)培養基中，37℃ 恒溫搖床 220rpm 振盪培養約 1.5h 至 OD₆₀₀=0.8 左右。在培養基中加入約 1mM IPTG，37℃ 恒溫搖床 220 rpm 振盪培養 4-5 小時，表達結束後，設置離心力為 5000g 離心 10 分鐘取沉澱，SDS-PAGE 電泳分析，按實施例 3 所示方法進行定量，結果見下表：

表 3：

	菌株	誘導後 4h
人源序列	pET9a-GCSF-1/BL21(DE3)	78.35(mg/L)
優化後	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)

【符號說明】

無。

【序列表】

<110> 江蘇恆瑞醫藥股份有限公司 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.)

<120> 一種重組人粒細胞集落刺激因子的製備方法

<130> 770027CPCT

<150> CN201610241276.8

<151> 2016-04-18

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 528

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

```

atgacccct taggcctgc cagctccctg cccagagct tcctgctcaa gtgcttagag      60
caagtgagga agatccagg cgatggcgca gcgtccagg agaagctgtg tgccacctac      120
aagctgtgcc accccgagga gctggtgctg ctgggacact ctctgggcat cccctgggct      180
cccctgagca gctgccccag ccaggccctg cagctggcag gctgcttgag ccaactccat      240
agcggccttt tcctctacca ggggtcctg caggccctgg aagggatctc ccccgagttg      300
ggtccacact tggacacact gcagctggac gtgcgcgact ttgccaccac catctggcag      360
cagatggaag aactgggaat ggcccctgcc ctgcagcca cccagggtgc catgccggcc      420
ttgcctctg cttccagcg ccgggcagga ggggtcctgg ttgcctcca tctgcagagc      480
ttcctggagg tgcgtaccg cgttctacgc caccttgccc agccctaa      528

```

<210> 2

<211> 528

<212> DNA

<213> 突變

<400> 2

```

atgacccgc tgggtccggc aagctctctg ccgcagtcac ttctgctgaa atgcctggaa      60
caggttcgta aaattcaagg cgatggtgcg gccctgcagg aaaaactgtg cgccacgtat      120
aaactgtgtc atccggaaga actggtcctg ctgggccaca gtctgggtat cccgtgggca      180
ccgtgagtt cctgcccgtc ccaggcactg caactggcag gttgtctgtc acagctgcac      240
tcgggcctgt ttctgtacca gggctctctg caagcgttg aaggcattag cccggaactg      300
ggtccgaccc tggacacgct gcagctggat gtggtgact tcgcgaccac gatctggcag      360
caaatggaag aactgggtat ggcaccggct ctgcagcca cccaagggtc tatgccggcg      420
tttgctctg cattccagcg tcgcgtggc ggtgtgctgg ttgcagcca tctgcaatct      480
ttcctggaag tctcatatcg tgtgctgcgc cacctggccc agccgtaa      528

```

<210> 3

<211> 175

<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 3

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
1 5 10 15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu
20 25 30

Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
35 40 45

Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser
50 55 60

Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His
65 70 75 80

Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile
85 90 95

Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala
100 105 110

Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala
115 120 125

Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala
130 135 140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser
145 150 155 160

Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
165 170 175

<210> 4
<211> 528
<212> DNA
<213> 突變

<400> 4

atgacacat taggcctgc cagtcctcg cccagagct tctgctcaa gtgcttagag	60
caagtgagga agatccagg cgatggcgca gcgtccagg agaagctgtg tgccacctac	120
aagctgtgcc accccgagga gctggtgctg ctgggacct ctctgggcat cccctgggct	180
cccctgagca gctgccccag ccaggccctg cagctggcag gctgcttgag ccaactccat	240
agcgcccttt tctctacca ggggtctctg caggccctgg aagggatctc ccccgagttg	300
gggtccacct tggacacact gcagctggac gtcgccgact ttgccaccac catctggcag	360
cagatggaag aactgggaat ggccccctgcc ctgcagccca cccaggtgac catgccggcc	420

ttcgccctctg ctttccagcg ccgggcagga ggggtcctgg ttgcctccca tctgcagagc 480
ttcctggagg tgcgtaccg cgttctacgc caccttgccc agccctaa 528

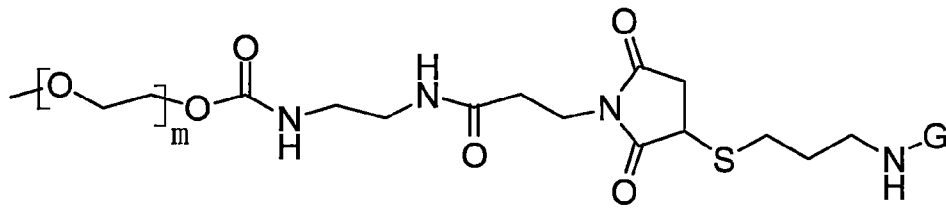
<210> 5
<211> 528
<212> DNA
<213> 突變

<400> 5
atgaccccg c tgggcccggc gagctctctg ccgcagcttt tctgctgaa atgcctggaa 60
caggttcgta aaattcaagg cgatggtgcg gccctgcagg aaaaactgtg cgcaacgtat 120
aaactgtgtc atccggaaga actggttctg ctgggccaca gtctgggcat tccgtgggcg 180
ccgctgagct catgcccgtc tcaggcgctg caactggcag gctgtctgtc tcagctgcac 240
tctggcctgt ttctgtatca ggtctctctg caagcgttg aaggcattag cccggaactg 300
ggtccgaccc tggataccct gcagctggat gtggtgact ttgcgaccac gatctggcag 360
caaatggaag aactgggtat ggcaccggca ctgcagccga cccaaggtgc tatgccggcg 420
tttgcgtctg cattccagcg tcgcgcaggc ggtgtgctgg ttgcgagcca tctgcaatct 480
ttcctggaag tctcatatcg tgtgctgcgc cacctggccc agccgtaa 528

申請專利範圍

1. 一種重組人粒細胞集落刺激因子的製備方法，該重組人粒細胞集落刺激因子的蛋白質序列見 SEQ ID NO.3，該製備方法包括合成 cDNA 序列的步驟，該 cDNA 由是人源 cDNA 突變而成，還包括重組表達載體的構建步驟以及重組表達載體在宿主細胞中誘導表達的步驟，其中，該 cDNA 的序列為 SEQ ID NO.2。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述的製備方法，其中，該重組表達載體選自溫度表達載體和受質誘導表達載體。
3. 如申請專利範圍第 2 項所述的製備方法，其中，該重組表達載體為受質誘導表達載體。
4. 如申請專利範圍第 3 項所述的製備方法，其中，該重組表達載體為 pET 系列。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述的製備方法，其中，該宿主細胞為大腸桿菌。
6. 如申請專利範圍第 1 項所述的製備方法，其中，該宿主細胞為大腸桿菌 *Escherichia coli* DH5a、BL21(DE3)、Rosetta(DE3)、Origami (DE3)、JM109、HSM174(DE3)。
7. 一種可編碼重組人粒細胞集落刺激因子的 cDNA，該 cDNA 的序列為 SEQ ID NO.2。
8. 一種重組人粒細胞集落刺激因子基因的重組表達載體，該表達載體含有申請專利範圍第 7 項所述的 cDNA。
9. 如申請專利範圍第 8 項所述的重組表達載體，其中，該表達載體選自溫度表達載體和受質誘導載體。

10. 如申請專利範圍第 9 項所述的重組表達載體，其中，該表達載體為受質誘導表達載體。
11. 如申請專利範圍第 10 項所述的重組表達載體，其中，該表達載體為 pET 系列。
12. 一種可表達重組人粒細胞集落刺激因子的宿主細胞，該宿主細胞含有申請專利範圍第 8 至 11 項中任一項所述的表達載體。
13. 如申請專利範圍第 12 所述的宿主細胞，其中，該宿主細胞為大腸桿菌。
14. 如申請專利範圍第 13 所述的宿主細胞，其中，該宿主細胞為大腸桿菌 *Escherichia coli* DH5a、BL21(DE3)、Rosetta(DE3)、Origami (DE3)、JM109、HSM174(DE3)。
15. 一種重組人粒細胞集落刺激因子的水溶性聚合物修飾的偶聯物的製備方法，該方法包括申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所述的重組人粒細胞集落刺激因子的製備方法，還包括重組人粒細胞集落刺激因子與水溶性聚合物偶聯的步驟。
16. 一種如申請專利範圍第 15 項所述的製備方法製得的重組人粒細胞集落刺激因子的水溶性聚合物修飾的偶聯物，其中，該水溶性聚合物為聚乙二醇。
17. 一種申請專利範圍第 16 項所述的重組人粒細胞集落刺激因子的水溶性聚合物修飾的偶聯物，其結構如式 I 所示

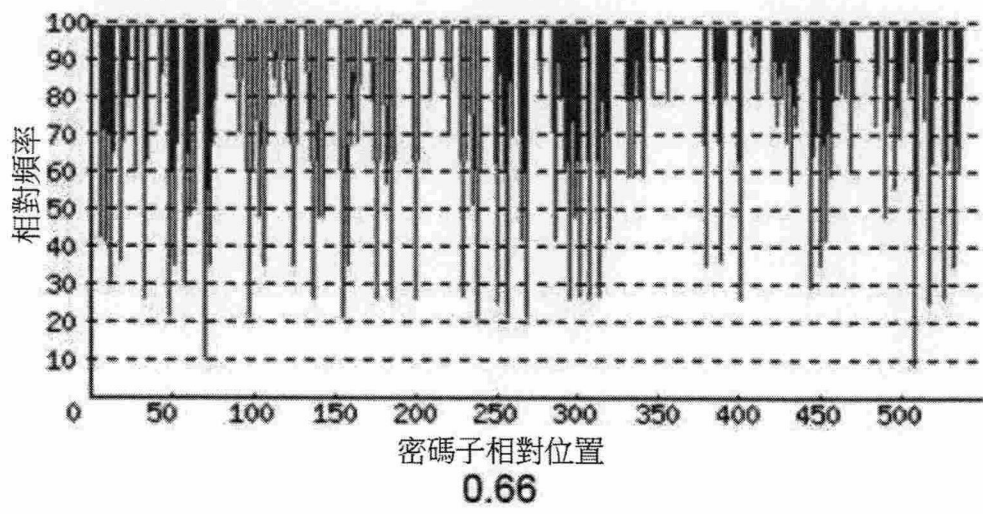


(I)

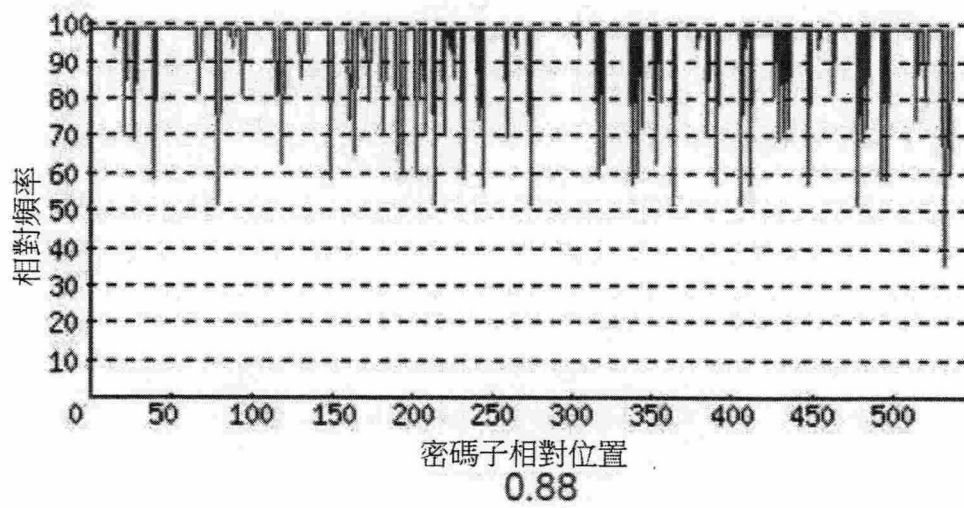
m 選自 50 至 2500 的整數，G 為序列如 SEQ ID NO.3 所示的蛋白。

18. 如申請專利範圍第 17 項所述的重組人粒細胞集落刺激因子的水溶性聚合物修飾的偶聯物，其中，m 選自 400 至 500 的整數。

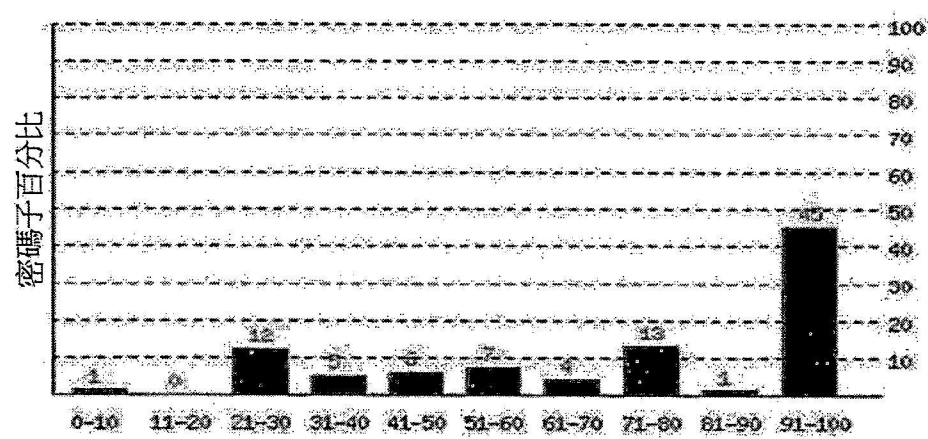
圖式



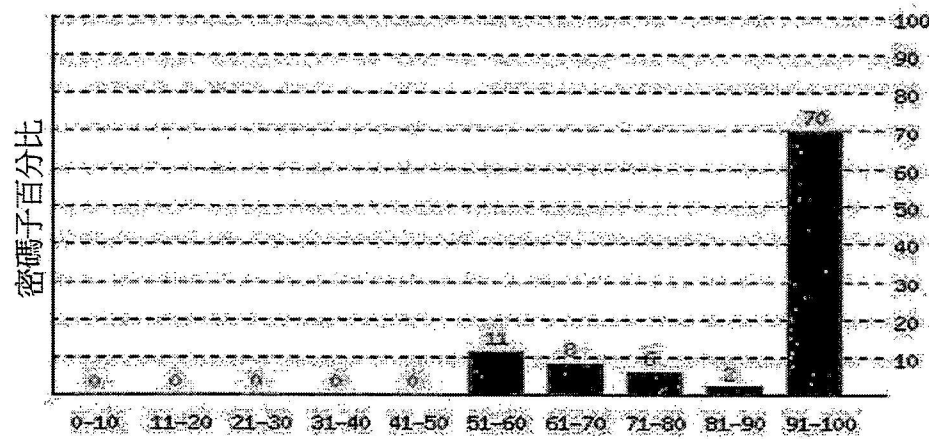
第1A圖



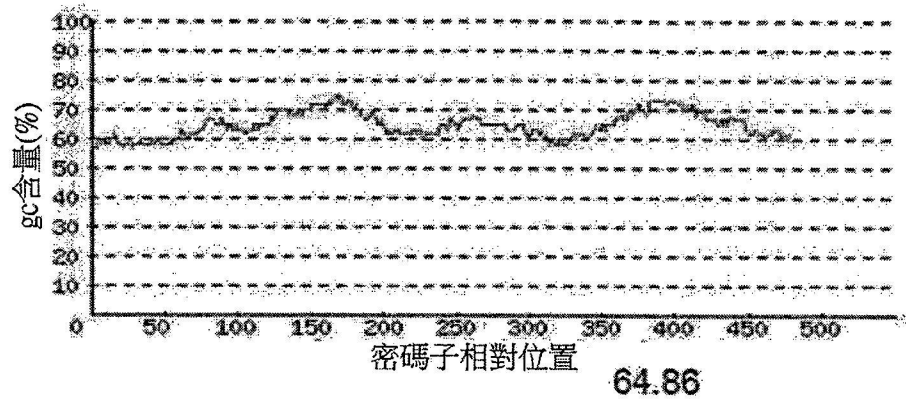
第1B圖



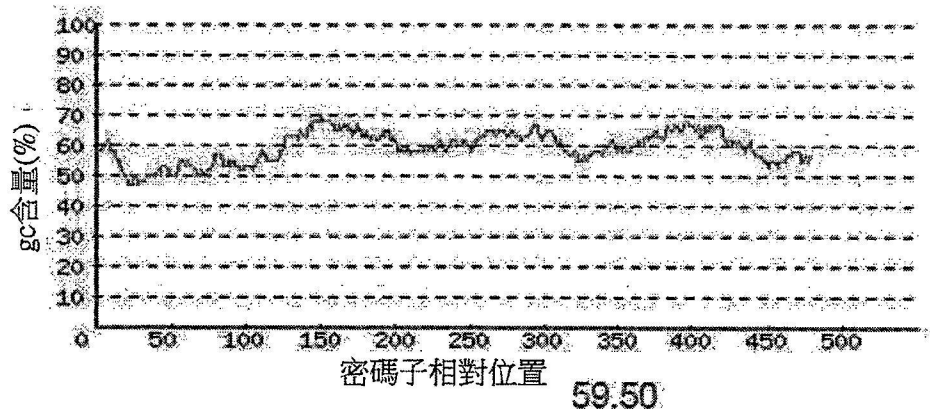
第2A圖



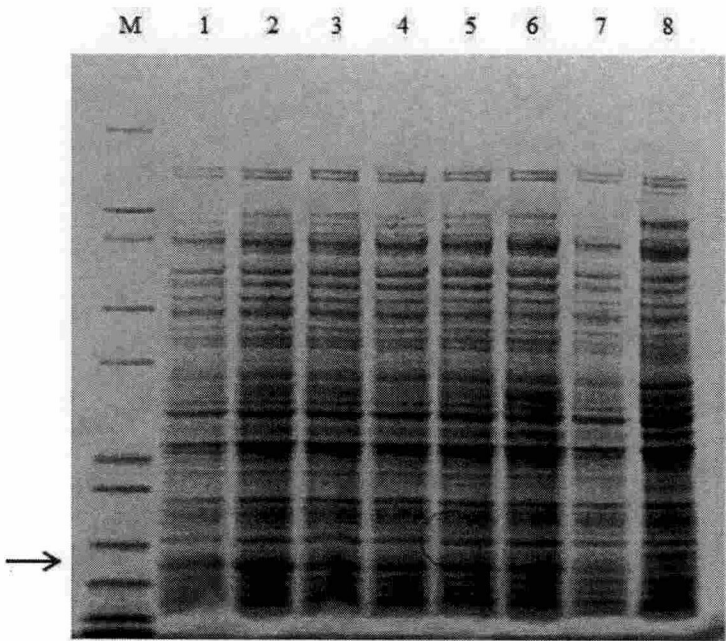
第2B圖



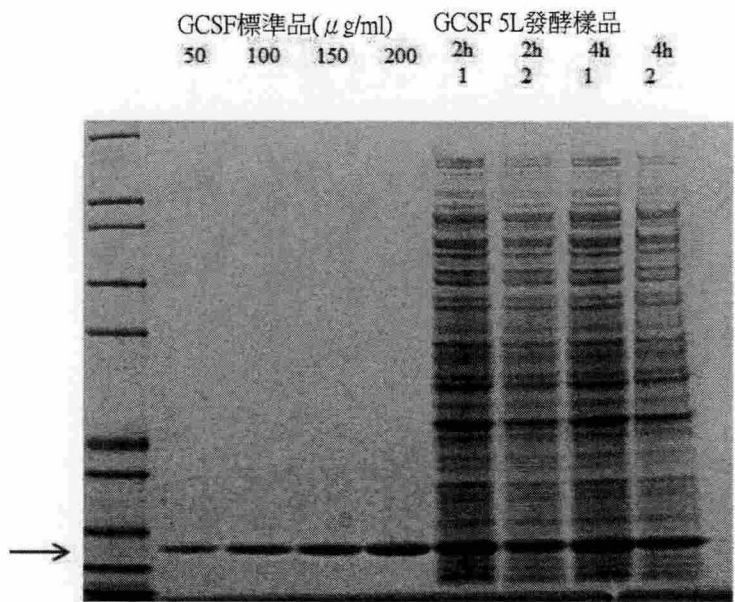
第3A圖



第3B圖



第4圖



第5圖