

(19)



REPUBLIKA SLOVENIJA
Urad RS za intelektualno lastnino

(10) **SI 21273 A**

(12)

PATENT

(21) Številka prijave: **200200187**

(51) MPK: **C12P 21/02**, C12N 15/27,
C07K 14/535

(22) Datum prijave: **31.07.2002**

(45) Datum objave: **29.02.2004**

(72) Izumitelji: **Menart Viktor, 1370 Logatec, SI;**
Jevševar Simona, 2000 Maribor, SI;
Gaberc-Porekar Vladka, 1000 Ljubljana, SI

(73) Imetnik: **Lek farmacevtska družba d.d., Verovškova 57, 1526 Ljubljana, SI**

(54) **PRIPRAVA INKLUZIJSKIH TELES Z VISOKIM DELEŽEM PRAVILNO ZVITEGA PREKURZORJA
HETEROLOGNEGA PROTEINA**

(57) Izum se nanaša na nov postopek pridobivanja biološko aktivnega heterolognega proteina, ki vključuje vodenje biosinteze heterolognega proteina na tak način, da se izloča pravilno zvit prekursor hetero-

lognega proteina že v inkluzijskih telesih. Izum dodatno vključuje spiranje in raztapljanje inkluzijskih teles.

SI 21273 A

Naziv izuma

Priprava inkluzijskih teles z visokim deležem pravilno zvitega prekursorja heterolognega proteina

Področje tehnike

Predloženi izum se nanaša na nov postopek pridobivanja biološko aktivnega granulocitne kolonije stimulirajočega dejavnika (G-CSF), ki poteka na tak način, da se že v inkluzijskih telesih nahaja pravilno zvit prekursor G-CSF.

G-CSF uvrščamo med kolonije stimulirajoče dejavnike, ki regulirajo diferenciacijo in proliferacijo hematopoetskih celic sesalcev. Imajo odločilno vlogo pri tvorbi nevtrofilcev, zato so primerni za uporabo v medicini na področju hematologije in onkologije.

Za klinično uporabo sta danes na trgu dve obliki: lenograstim, ki je glikoziliran, in ga pridobivajo z ekspresijo v sesalski celični liniji, ter filgrastim, ki je neglikoziliran, in ga pridobivajo z ekspresijo v bakteriji *Escherichia coli* (*E. coli*).

Bistvo predloženega izuma

Bistvo predloženega izuma je postopek pridobivanja biološko aktivnega G-CSF, ki vključuje vodenje biosinteze G-CSF na tak način, da se izloča pravilno zvit prekursor G-CSF že v inkluzijskih telesih.

Tak način vodenja biosinteze vključuje enega ali več parametrov, ki so izbrani iz skupine, ki sestoji iz temperature gojenja, načina indukcije, principa vodenja fermentacije, sestave gojišča in ko-ekspresije pomožnih proteinov.

Postopek pridobivanja biološko aktivnega G-CSF, ki je predmet izuma, dodatno vključuje spiranje in raztapljanje inkluzijskih teles ter omogoča direktno izolacijo biološko aktivnega proteina brez uporabe denaturantov ali postopka renaturacije.

Stanje tehnike

Humani granulocitne kolonije stimulirajoči faktor (hG-CSF) uvrščamo med hematopoetske rastne dejavnike in ima odločilno vlogo pri tvorbi nevtrofilcev. Za

klinično uporabo sta danes na trgu dve obliki: lenograstim, ki je glikoziliran in ga pridobivajo s sesalsko celično linijo CHO (Holloway C.J. (1994) *Eur J Cancer* 30A Suppl 3:S2-S6., EP 169566), ter filgrastim, ki je neglikoziliran in ga pridobivajo z ekspresijo v bakteriji *E. coli* (EP 237545).

Pri intracelularni produkciji heterolognega G-CSF v bakteriji *E. coli* se protein vedno izloča v obliki netopnih inkluzijskih teles. Tudi pri poskusih sekrecije v periplazmo *E. coli* se je G-CSF ali izločil v obliki inkluzijskih teles (Lei S.P s sodelavci (1987) *J Bacteriol* 169:4379-4383; Chung B.H. s sodelavci (1998) *J.Ferment.Bioeng.* 85:443-446.) ali pa ni nobenih podatkov o biološki aktivnosti tako producirane G-CSF (Jeong K.J. in Lee S.Y. (2001) *Protein Expression and Purification* 23: 311-318).

Iz navedenega je jasno, da pri skoraj vseh doslej opisanih poskusih izolacije G-CSF iz bakterije *E. coli* izhajajo iz inkluzijskih teles.

Opisanih je tudi nekaj primerov, kjer dobimo inkluzijska telesa v kvasovkah, vendar o G-CSF nikjer ne poročajo.

Za pridobivanje pravilno zviti biološko aktivni protein iz netopnih inkluzijskih teles je potrebno inkluzijska telesa izolirati iz celice, jih sprati, raztopiti in nato izvajati *in vitro* renaturacijo. *In vitro* renaturacija predstavlja dodatne stopnje v procesu industrijske izolacije proteinov.

Postopki pridobivanja rekombinantnih proteinov iz inkluzijskih teles vključujejo zato lizo in razbitje celic, čemur sledi centrifugiranje. Pelet, ki vsebuje velik delež inkluzijskih teles, se navadno spere z detergenti. V primeru izolacije G-CSF navajajo kot primerno spiranje inkluzijskih teles z 1 % deoksiholatom (Zsebo K.M. s sodelavci (1986) *Immunobiology* 172:175-184. EP237545; US5849883) ali z raztopino 1,0 M NaCl z dodatkom 0,1% Tween 80 (Gelunaite L. s sodelavci (2000) *J Chromatogr A* 904:131-143).

Naslednjo stopnjo v pridobivanju rekombinantnih proteinov predstavlja raztapljanje inkluzijskih teles, kar zahteva navadno uporabo precej močnih denaturantov. Pri pridobivanju G-CSF je opisana uporaba 6 M GdHCl (Wingfield P s sodelavci (1988) *Biochem J* 256:213-218; Zink T. s sodelavci (1992) *FEBS Lett* 314:435-439.), 7 M uree pri pH 7,2 (Kuga T. s sodelavci (1989) *Biochem Biophys Res Commun* 159:103-111) ali 8 M uree pH 8,0 (Yamasaki M. s sodelavci (1998) *Biosci Biotechnol Biochem* 62:1528-1534.) 20 mM TrisHCl in dodatkov EDTA in DTT.

Kang S-H et al. so uspeli raztopiti inkluzijska telesa v 2 M urei v zelo alkalnem pH okoli 12 (Kang S.H. s sodelavci (1995) *Biotechnol.Lett.* 17:687-692). Podoben je postopek raztapljanja v 10 mM HEPES pufru s kratkotrajnim zvišanjem pH na 11,5 (Gelunaite L. s sodelavci (2000) *J Chromatogr A* 904:131-143.). Enako učinkoviti za raztapljanje so tudi močni detergenti v denaturirajočih koncentracijah npr. 1 % SDS z dodatki 5 % etanola v 50 mM TrisHCl pH 8.5 (Souza L.M. s sodelavci (1986) *Science* 232:61-65.). Večkrat uporabijo 2 % sarkozil (Lu H.S. s sodelavci (1992) *J Biol Chem* 267:8770-8777; Lu H.S. s sodelavci (1993) *Protein Expr Purif* 4:465-472.; Young DC s sodelavci (1997) *Protein Science* 6: 1228-1236; EP237545; US5849883) ali tudi samo 1% sarkozil (Zsebo K.M. s sodelavci (1986) *Immunobiology* 172:175-184.). Raztapljanje inkluzijskih teles v večini primerov zahteva uporabo močnih denaturantov, ki so strupeni in s tem škodljivi okolju, saj predstavljajo resno onesnaženje okolja. Njihova uporaba je tudi neekonomična, saj varna odstranitev po končanem procesu predstavlja dodaten strošek in je časovno zamudna.

Čeprav so opisani nekateri primeri, kjer v prvi kromatografski stopnji ločujejo protein pod denaturirajočimi pogoji, npr. na C4 RP HPLC (Souza L.M. s sodelavci (1986) *Science* 232:61-65.; Zsebo K.M. s sodelavci (1986) *Immunobiology* 172:175-184; EP237545) ali z gelsko filtracijo (Wingfield P. s sodelavci (1988) *Biochem J* 256:213-218; US4999291), poteka v večini primerov kromatografska separacija po predhodni *in vitro* renaturaciji.

Po raztapljanju inkluzijskih teles v močnih denaturantih sledi *in vitro* renaturacija proteinov. *In vitro* renaturacijo G-CSF dosežejo z dializo proti pufru z manjšo koncentracijo denaturanta (Wingfield P. s sodelavci (1988) *Biochem J* 256:213-218), z dializo proti pufru brez denaturanta (Kuga T. s sodelavci (1989) *Biochem Biophys Res Commun* 159:103-111), v pufru z dodatkom 0.8 M arginina (Zink T. s sodelavci (1992) *FEBS Lett* 314:435-439) ali z gelsko filtracijo (US4999291; D.C. Young et al. (1997) *Protein Science* 6: 1228-1236). Po raztapljanju v denaturirajočih koncentracijah sarkozila pa dosežejo oksidativno zvitje z dodatkom nizkih koncentracij CuSO₄ med dolgotrajnim mešanjem pri sobni temperaturi, čemur sledi odstranitev detergenta z močno bazičnim ionskim izmenjevalcem (US5849883). V primerih raztapljanja v ekstremno bazičnih pogojih se protein spontano renaturira z vzpostavitvijo nižjega pH (Kang S.H. s sodelavci

(1995) *Biotechnol. Lett.* 17:687-692). Vsi opisani postopki *in vitro* renaturacije so kompleksni in časovno zamudni. Dilucija v industrijskem merilu pa zahteva naprave velikih kapacitet, kar posledično pomeni večjo začetno investicijo (večji prostor, večje aparature...), pri obratovanju pa večje obratovalne stroške (energija, voda, pufri...).

Izboljšana *in vitro* renaturacija je bila dosežena pri fuzijskem proteinu, kjer je bil na N-terminusu dodan oligopeptidni hidrofilni podaljšek in cepitveno mesto za IgA proteazo (EP0500108).

V literaturi je bilo že večkrat opisano povečevanje deleža topnega proteina v citoplazmi (Weickert M.J. in sodelavci (1997), *Appl. and Environmental Microbiology*, 63:4313-4320; Bhandari P. in Gowrishankar J. (1997) *J. Bacteriol.*, 179: 4403-4406; Zhang Y. s sodelavci (1998) *Protein Expr. Purif.*, 12: 159-165; Thomas J.G. in Baneyx F. (1996) *J of Biological Chemistry*, 271:11141-11147; Kapust R.B. in Waugh D.S. (1999) *Protein Science*, 8: 1668-1674; Davis G.D. s sodelavci (1999) *Biotech. and Bioeng.* 65: 382-388), nikjer pa ni opisano, da bi se tudi G-CSF namesto v inkluzijskih telesih izločil v citoplazmi.

Ne v patentni ne v strokovni literaturi niso opisani pristopi, ki bi obravnavali povečanje deleža pravilno zvitega heterolognega proteina že v inkluzijskih telesih.

Prav v primeru G-CSF navajajo *in vitro* renaturacijo kot prvi pogoj in s tem edini možni način za pridobivanje biološko aktivnega proteina (Rudolph R. (1996) v *Protein Engineering: Principles and Practice* (Cleland JL and Craik CS eds) pp 283-298, Wiley-Liss, Inc., New York).

Opis slik

Slika 1: Sestava proteinov v inkluzijskih telesih

Metoda: poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS-PAGE) (4% zgoščevalni, 15% ločitveni gel, barvano s Coomassie brilliant blue).

Pogoji priprave inkluzijskih teles: temperatura gojenja 25°C, vodenje fermentacije po principu šaržnih fermentacij, indukcija z 0.4 mM izopropil-beta-D-tiogalaktopiranozidom (IPTG) pri $OD_{600nm} \approx 6.0$ oziroma z začetno indukcijo, spiranje z ohlajeno vodo ali ohlajenim 10 mM TrisHCl/pH=8.0 pufrom, raztapljanje v 0.2 % sarkozilu.

Nanos 1: hG-CSF standard 0.6 μg

Nanos 2: indukcija pri $\text{OD}_{600\text{nm}} \approx 6.0$, inkluzijska telesa sprana z vodo

Nanos 3: indukcija pri $\text{OD}_{600\text{nm}} \approx 6.0$, inkluzijska telesa sprana z 10 mM

TrisHCl/pH=8.0 pufrom.

Nanos 4: standardi molekulskih mas (LMW - BioRad)

Nanos 5: indukcija od začetka, inkluzijska telesa sprana z vodo

Nanos 6: indukcija od začetka, inkluzijska telesa sprana z 10 mM TrisHCl/pH=8.0 pufrom.

Slika 2: Primerjava topnosti inkluzijskih teles glede na temperaturo gojenja (25°C ali 37°C).

Metoda: SDS-PAGE (4% zgoščevalni, 15% ločitveni gel, barvano s Coomassie brilliant blue).

Pogoji priprave inkluzijskih teles: temperatura gojenja: 25°C (nanosi 4-10) in 37°C (nanosi 12-18, 20), vodenje fermentacije po principu šaržnih fermentacij, indukcija z 0.4 mM IPTG na začetku, spiranje z ohlajeno vodo ali ohlajenim 10 mM TrisHCl/pH=8.0 pufrom, 1 % Na-deoksiholat, 1 % Triton X-100, 2 M ureo ali 8M ureo.

Nanos 1: standardi molekulskih mas (LMW - BioRad)

Nanos 2: topna frakcija proteinov (supernatant homogenata)

Nanos 3: celotni proteini

Nanos 4: raztopljeni proteini po prvem spiranju inkluzijskih teles z vodo

Nanos 5: raztopljeni proteini po drugem spiranju inkluzijskih teles z vodo

Nanos 6: raztopljeni proteini po prvem spiranju inkluzijskih teles z 10 mM TrisHCl/pH=8.0

Nanos 7: raztopljeni proteini po drugem spiranju inkluzijskih teles z 10 mM TrisHCl/pH=8.0

Nanos 8: raztopljeni proteini po spiranju inkluzijskih teles z 1% Na-deoksiholatom

Nanos 9: raztopljeni proteini po spiranju inkluzijskih teles z 2 M ureo

Nanos 10: raztopljeni proteini po spiranju inkluzijskih teles z 1% Tritonom-X100

Nanos 11: standardi molekulskih mas (LMW - BioRad)

Nanos 12: raztopljeni proteini po prvem spiranju inkluzijskih teles z vodo

Nanos 13: raztopljeni proteini po drugem spiranju inkluzijskih teles z vodo

Nanos 14: raztopljeni proteini po prvem spiranju inkluzijskih teles z 10 mM TrisHCl/pH=8.0

Nanos 15: raztopljeni proteini po drugem spiranju inkluzijskih teles z 10 mM TrisHCl/pH=8.0

Nanos 16: raztopljeni proteini po spiranju inkluzijskih teles z 1% Na-deoksiholatom

Nanos 17: raztopljeni proteini po spiranju inkluzijskih teles z 2 M ureo

Nanos 18: raztopljeni proteini po spiranju inkluzijskih teles z 1% Tritonom-X100

Nanos 19: standard hG-CSF, 0.6 μ g

Nanos 20: raztopljeni proteini po spiranju inkluzijskih teles z 8 M ureo

Slika 3: Sestava proteinov v inkluzijskih telesih

Metoda: SDS-PAGE (4% zgoščevalni, 15% ločitveni gel, barvano s Coomassie brilliant blue).

Pogoji priprave inkluzijskih teles: produkcijski sev BL21-SI pET3a/P-Fopt5, temperatura gojenja 25°C, vodenje fermentacije v stresani kulturi, neinducirana kultura ali indukcija z 1.2 M NaCl pri OD_{600nm} $\approx$ 0.5 oziroma z začetno indukcijo.

Nanos 1: BL21 (SI) pET3a/P-Fopt5, neinducirana kultura

Nanos 2: BL21 (SI) pET3a/P-Fopt5, kultura inducirana z 1.2 M NaCl pri OD_{600nm} $\approx$ 0.5

Nanos 3: BL21 (SI) pET3a/P-Fopt5, kultura inducirana z 1.2 M NaCl pri OD_{600nm} $\approx$ 0.5

Nanos 4: BL21 (SI) pET3a/P-Fopt5, kultura inducirana z 1.2 M NaCl od začetka

Nanos 5: BL21 (SI) pET3a/P-Fopt5, kultura inducirana z 1.2 M NaCl od začetka

Nanos 6: rhG-CSF 0.6 μ g

Slika 4: Primerjava topnosti inkluzijskih teles glede na spiranje z različnimi topili

Metoda: SDS-PAGE (4% zgoščevalni, 15% ločitveni gel, barvano s Coomassie brilliant blue).

Pogoji priprave inkluzijskih teles: sev BL21(SI) pET3a/P-Fopt5, temperatura gojenja 25°C, vodenje fermentacije v stresani kulturi, indukcija z 1.2 M NaCl, spiranje z vodo, 10 mM TrisHCl/pH=8.0, 1 % Na-deoksiholat, 1 % Triton X-100 ali 2 M ureo.

Inkluzijska telesa so bila pripravljena v stresani kulturi pri 25°C, z indukcijo z 1.2 mM NaCl dodanim v medij na začetku.

Nanos 1: topna frakcija proteinov (supernatant homogenata)

Nanos 2: standardi molekulskih mas (LMW - BioRad)

Nanos 3: celotni proteini

Nanos 4: raztopljeni proteini po prvem spiranju inkluzijskih teles z vodo

Nanos 5: raztopljeni proteini po drugem spiranju inkluzijskih teles z vodo

Nanos 6: raztopljeni proteini po prvem spiranju inkluzijskih teles z 10 mM

TrisHCl/pH=8.0

Nanos 7: raztopljeni proteini po spiranju inkluzijskih teles z 1% Na-deoksiholatom

Nanos 8: raztopljeni proteini po spiranju inkluzijskih teles z 2 M ureo

Nanos 9: raztopljeni proteini po spiranju inkluzijskih teles z 1% Tritonom-X100

Opis izuma

Presenetljivo smo ugotovili, da lahko pri postopku pridobivanja biološko aktivnega G-CSF, ki je predmet izuma, vodimo biosintezo na tak način, da se izloča pravilno zvit prekursor G-CSF že v inkluzijskih telesih.

Čeprav so inkluzijska telesa, ki so opisana v patentni in strokovni literaturi, netopni kompaktni agregati nepravilno zviti in delno pravilno zviti proteinov, smo pri predloženem izumu dosegli, da se prav v inkluzijskih telesih nahaja že pravilno zvit prekursor G-CSF. Inkluzijska telesa, ki vsebujejo pravilno zvit prekursor G-CSF, so bistveno bolj topna od do sedaj znanih težko topnih inkluzijskih teles. Večja topnost inkluzijskih teles omogoča lažje in časovno manj zamudno pridobivanje G-CSF iz inkluzijskih teles. Izkoristki so pri takem načinu pridobivanja G-CSF veliki, kar je uporabno, praktično in ekonomično v industrijskem merilu.

Z izrazom 'pravilno zvit prekursor' proteina (G-CSF) je mišljen protein (G-CSF), ki ima pravilno konformacijo (trodimenzionalno strukturo), nima pa še vzpostavljenih disulfidnih vezi.

Domnevamo, da se pravilno zvit prekursor G-CSF nekako ujame v ostale netopne agregate, ki tvorijo inkluzijska telesa, in ga je zato potrebno le izločiti iz teh agregatov. Izločanje poteka s spiranjem in raztapljanjem inkluzijskih teles. Za tako izločanje potrebujemo blaga topila in ne močnih denaturantov, kot je to običajno potrebno v primeru raztapljanja inkluzijskih teles. Ob izločanju pravilno zvitega prekursorja G-CSF iz inkluzijskih teles poteče spontana oksidacija (prisotnost

zraka...) in s tem spontan nastanek intramolekularnih disulfidnih vezi. Na ta način pridobimo biološko aktivni G-CSF.

Z izrazom 'biološko aktivni G-CSF' je mišljen G-CSF z biološko aktivnostjo, ki je enaka ali večja od 1×10^8 IU/mg, in se meri z uporabo metode proliferacije na celični liniji, kot je opisano v primeru 12.

V primerjavi z že znanimi postopki pridobivanja heterolognih proteinov, ki se po ekspresiji nahajajo v netopnih inkluzijskih telesih, je postopek, ki je predmet izuma, bolj ekonomičen. Namesto spiranja z detergenti namreč zadostuje že spiranje s pufrom ali vodo, raztapljanje poteka v blagih pogojih namesto v prisotnosti močnih denaturantov in detergentov v visokih koncentracijah. Izognemo se tudi postopkom *in vitro* renaturacije, ki so potrebni za ponovno vzpostavljanje pravilne trodimenzionalne strukture.

Z izrazom 'heterologni protein' je mišljen tisti protein, ki je tuj organizmu, v katerem poteka ekspresija.

Z izrazom 'renaturacija' je mišljena pretvorba denaturiranih proteinov v konformacijo, ki so jo ti proteini imeli pred denaturacijo.

Z izrazom '*in vitro* renaturacija' je mišljena renaturacija, ki je izvedena izven organizma.

Z izrazom 'denaturacija' je mišljen proces, pri katerem se konformacija proteina (trodimenzionalna struktura) spremeni, primarna struktura (aminokislinska veriga, peptidne vezi) proteina pa ostane nespremenjena.

Z izrazom 'denaturant' je mišljena raztopina, v kateri se konformacija proteinov ne ohrani. Biološka aktivnost proteinov se v prisotnosti denaturanta spreminja in se ne ohrani.

Z izrazom 'agregat' je mišljen skupek molekul, ki so med seboj povezane predvsem s hidrofobnimi, pa tudi z drugimi vezmi (kot npr. disulfidnimi). Take molekule niso biološko aktivne.

Postopek pridobivanja biološko aktivnega G-CSF, ki je predmet izuma in omogoča nastanek pravilno zvitega prekursorja G-CSF že v inkluzijskih telesih in pridobivanje biološko aktivnega G-CSF direktno iz inkluzijskih teles, vključuje način vodenja biosinteze, ki vključuje enega ali kombinacijo več parametrov, ki so izbrani iz skupine, ki sestoji iz:

- temperature gojenja,
- načina indukcije,
- principa vodenja fermentacije,
- sestave gojišča in
- ko-ekspresije pomožnih proteinov.

Z izrazom 'biosinteza' je mišljena produkcija heterolognega proteina s pomočjo mikroorganizmov.

Z izrazom 'gojenje' je mišljena rast mikroorganizmov pod kontroliranimi pogoji submeržno ali na trdnih nosilcih, kjer zagotovimo vir substratov, potrebnih za rast mikroorganizma.

Z izrazom 'fermentacija' je mišljeno gojenje mikroorganizmov v submerznih pogojih v bioreaktorju (fermentorju) ali v stresanih kulturah.

Postopek pridobivanja biološko aktivnega G-CSF, ki je predmet izuma, dodatno vključuje spiranje in raztapljanje inkluzijskih teles ter omogoča izolacijo biološko aktivnega G-CSF brez uporabe denaturantov ali postopka *in vitro* renaturacije.

Bistveno za postopek pridobivanja biološko aktivnega G-CSF, ki je predmet izuma je, da način vodenja biosinteze vključuje parametre, ki omogočajo regulacijo sestave inkluzijskih teles tako, da se poveča delež pravilno zvitih proteinskih molekul G-CSF (prekurzor G-CSF). Visoka akumulacija G-CSF ne pomeni hkrati tudi visokega deleža pravilno zvitega prekursorja G-CSF. Postopek za pridobivanje biološko aktivnega G-CSF, ki je predmet izuma, omogoča tudi, da se najde optimalno razmerje med akumulacijo G-CSF in deležem pravilno zvitega prekursorja G-CSF.

To omogoča pridobivanje biološko aktivnega G-CSF z visokimi izkoristki v industrijskem merilu.

Z izrazom 'akumulacija G-CSF' je mišljen delež G-CSF, ki ga dobimo po heterologni ekspresiji gena za G-CSF glede na celotne proteine, ki so prisotni po ekspresiji.

Z izrazom 'heterologna ekspresija' je mišljena ekspresija tistih genov, ki so tuji organizmu, v katerem poteka ekspresija.

Z izrazom 'delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF' je mišljen delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF glede na celotne proteine G-CSF (pravilno, delno pravilno, nepravilno zvite).

Z izrazom 'delež biološko aktivnega G-CSF' je mišljen delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF po spiranju in raztapljanju inkluzijskih teles. Pravilno zviti prekursor G-CSF po raztapljanju postane biološko aktiven, kajti poteče spontana oksidacija in s tem spontan nastanek disulfidnih vezi.

Postopek pridobivanja biološko aktivnega G-CSF, ki je predmet izuma, omogoča pripravo G-CSF, ki je primeren za klinično uporabo v medicini in veterini.

Uporablja se za pripravo humanega G-CSF in ostalih sesalskih G-CSF in tudi v primeru priprave derivatiziranih oblik G-CSF, kot so: metionil G-CSF (Met-G-CSF), encimsko in kemijsko modificirani (kot npr. pegilirani) G-CSF, G-CSF analogi in fuzijski proteini, ki vsebujejo G-CSF.

Postopek pridobivanja biološko aktivnega G-CSF, ki je predmet izuma, se lahko uporablja tudi v primeru pridobivanja drugih biološko aktivnih heterolognih proteinov, ki se po ekspresiji nahajajo v inkluzijskih telesih. Taki proteini so izbrani iz skupine, ki zajema: interferone (IFN), kot so INF-beta 1b, IFN-beta 2b, IFN-gama 1b, interleukine (IL), kot sta IL-2 in IL-4, granulocitni makrofagni kolonije stimulirajoči dejavnik (GM-CSF), makrofagni kolonije stimulirajoči dejavnik (M-CSF), epidermalni rastni faktor (EGF), humani serumski albumin (HSA), deoksiribonukleazo (DNAza), fibroblastni rastni faktor (FGF), dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF alfa) in dejavnik tumorske nekroze beta (TNF-beta). Dodatno lahko zajema vse ostale delno hidrofobne proteine z ne prevelikim številom disulfidnih vezi, ki se v veliki meri spontano zvijejo v pravilno zvito strukturo.

Postopek pridobivanja biološko aktivnega G-CSF, ki je predmet izuma, se uporablja v primeru nastanka inkluzijskih teles po ekspresiji, ne glede na to, kateri organizem se uporablja kot gostitelj za ekspresijo. Lahko se uporabljajo gostiteljski organizmi, ki so izbrani iz skupine, ki zajema predvsem bakterije in kvasovke. Med bakterijskimi sistemi se najbolj pogosto uporabljajo *E. coli* in *Streptomyces* sp., med kvasovkami pa klasične kvasovke, kot je *Saccharomyces cerevisiae*, ter nekovencionalne kvasovke, kot so: *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Candida utilis* in druge.

Način vodenja biosinteze G-CSF, ki je predmet izuma vključuje parametre, ki so izbrani iz skupine: temperatura gojenja, sestava gojišča, način indukcije, princip vodenja fermentacije in ko-ekspresija pomožnih proteinov. Že z optimizacijo posameznega parametra izmed naštetih parametrov je možno bistveno povečati delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF, še večji delež pa omogoča kombinacija več parametrov.

Temperatura gojenja

Presenetljivo smo ugotovili, da lahko z nižanjem temperature gojenja, omogočimo, da se pravilno zvit prekursor G-CSF nahaja že v inkluzijskih telesih. Normalna optimalna temperatura gojenja bakterijskih celic je 37°C. V predloženem izumu smo ugotovili, da je prednostna temperatura za pridobivanje pravilno zvitega prekursorja G-CSF že v inkluzijskih telesih bistveno nižja od 37°C in sicer med 20°C in 30°C. Najbolj prednostna je temperatura okoli 25°C.

Načini indukcije

Presenetljivo smo ugotovili, da je delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF v inkluzijskih telesih odvisen tudi od načina indukcije. Indukcija je možna z dodatkom induktorja, ki je izbran iz skupine: IPTG, laktoza in NaCl. Prednostna je indukcija z IPTG. Delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF v inkluzijskih telesih je odvisen tudi od koncentracije induktorja. Pri dodajanju IPTG je koncentracija izbrana v območju od 0.1 mM do 1 mM. Prednostna je koncentracija okoli 0.4 mM. V primeru uporabe NaCl je koncentracija izbrana v območju od 0.3 M do 1.3 M. Prednostna je koncentracija okoli 1.2 M. V primeru uporabe laktoze je koncentracija izbrana v območju med 1 in 10 g/l, najbolj prednostna je koncentracija v območju med okoli 2 in okoli 4 g/l. Delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF v inkluzijskih telesih je odvisen tudi od načina indukcije (v času gojenja). Induktor lahko dodamo na začetku fermentacije (takoj), kar je prednostno tako v primeru IPTG kot tudi NaCl in laktoze. IPTG in NaCl lahko dodajamo tudi v kasnejših stopnjah fermentacije pri OD_{600nm} okoli 6.0 (OD je merilo za število bakterij).

Princip vodenja fermentacije

Presenetljivo smo ugotovili, da je delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF v inkluzijskih telesih odvisen tudi od principa vodenja fermentacije. Ta je izbran iz skupine, ki obsega: vodenje fermentacije v bioreaktorju in vodenje fermentacije v

stresani kulturi. Prednostno je vodenje fermentacije v bioreaktorju, ki zajema vodenje fermentacije po principu šaržnih fermentacij in vodenje fermentacije po principu šaržnih fermentacij z dohranjevanjem. Prednosten princip vodenja fermentacije je vodenje fermentacije po principu šaržnih fermentacij, kjer se doseže visoka produktivnost biomase z dobro topnimi inkluzijskimi telesi.

Ko-ekspresija pomožnih proteinov

Ugotovili smo tudi, da je delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF v inkluzijskih telesih odvisen tudi od dodatkov, ki delujejo stresno. Ti dodatki sprožijo ko-ekspresijo stresnih proteinov in so izbrani iz skupine, ki obsega različne koncentracije etanola in propanola v območju od 1% do 5% (v/v). Najbolj prednostno se uporabljata etanol in propanol v koncentraciji 3% (v/v).

Sestava gojišča

Prav tako smo presenetljivo ugotovili, da je delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF v inkluzijskih telesih odvisen tudi od sestave gojišča. Gojišča so izbrana iz skupine, ki sestoji iz: GYST/amp100 (20 g/l tripton, 5g/l kvasni ekstrakt, 10 g/l NaCl, 10 g/l glukoze, kovine v sledovih, 100 mg/L ampicilina), GYSP/amp100 (20 g/l fiton, 5g/l kvasni ekstrakt, 10 g/l NaCl, 10 g/l glukoze, kovine v sledovih, 100 mg/L ampicilina) in LYSP/amp100 (20 g/l fiton, 5g/l kvasni ekstrakt, 10 g/l NaCl, 6 g/l glicerola, 2 g/l oziroma 4 g/l laktoze, kovine v sledovih, 100 mg/L ampicilina), LYST/amp100 (20 g/l tripton, 5g/l kvasni ekstrakt, 10 g/l NaCl, 6 g/l glicerola, 2 g/l oziroma 4 g/l laktoze, kovine v sledovih, 100 mg/L ampicilina), LBON/amp100 (10 g/l phyton, 5 g/l yeast extract, 100 mg/ml ampicilina), GYSPON/amp100 (20 g/l phyton, 5g/l kvasni ekstrakt, 10 g/l glukoze, kovine v sledovih, 100 mg/L ampicilina) (Kovine v sledovih: ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$: 40 mg/l, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$: 40 mg/l, $\text{MnSO}_4 \times \text{nH}_2\text{O}$: 10 mg/l, $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$: 10 mg/l, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$: 4 mg/l, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$: 2 mg/l, $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$: 2 mg/l, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$: 1 mg/l, H_3BO_3 : 0,5 mg/l)). Prednostno se uporablja gojišče GYST/amp 100.

Spiranje inkluzijskih teles

Ob povečanju deleža biološko aktivnega proteina v inkluzijskih telesih se bistveno izboljša topnost inkluzijskih teles, kar več ne dovoljuje spiranja z detergenti, ker se preveč pravilno zvitega prekursorja G-CSF izgubi v izpirku. Spiranje se lahko zato izvede z različnimi pripravki, izbranimi iz skupine: voda in različni pufri v zelo

nizkih koncentracijah (od 1 do 10 mM), kot so npr. pufer Tris/HCl, fosfatni pufer, acetatni pufer, citratni pufer. Najbolj prednostno je spiranje z vodo.

Raztapljanje inkluzijskih teles

Ob povečanju topnosti inkluzijskih teles, ki nastane kot posledica povečanja topnosti pravilno zvitega prekursorja heterolognega proteina v inkluzijskih telesih, tudi raztapljanje poteka pri blagih pogojih, torej brez dodatka močnih denaturantov ali denaturirajočih koncentracij detergentov. Za raztapljanje inkluzijskih teles se uporabljajo topila izbrana iz skupine, ki sestoji iz uree v nedenaturirajočih koncentracijah (1 - 2 M), N-lauroil sarkozina v nedenaturirajočih koncentracijah (0.05 - 0.25% (m/v)), nizkih koncentracij Zwittergentov, različnih non-detergent sulfobetainov (NDSB), betaina, sarkozina, karbamoil sarkozina, taurina, dimetilsulfoksida (DMSO) in višjih koncentracij nekaterih pufrov, kot so HEPES, HEPPS, MES, ACES, MES. Prednostno se uporabljajo N-lauroil sarkozin, non-detergent sulfobetaini in dimetilsulfoksid (DMSO). Najbolj prednostno se uporablja N-lauroil sarkozin s koncentracijo v območju med 0.1% in 0.25% (m/v).

Temperatura gojenja pri okoli 25°C, vodenje fermentacije po principu šaržnih fermentacij, sestava gojišča GYST/amp100, način indukcije začetna indukcija, indukcija z IPTG s koncentracijo okoli 0.4 mM, spiranje z vodo in raztapljanje inkluzijskih teles v N-lauroil sarkozinu s koncentracijo okoli 0.2% so parametri, pri katerih sta delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF (in s tem delež biološko aktivnega G-CSF) in akumulacija G-CSF visoka. Prav tako je sestava proteinov pri teh parametrih takšna, da lahko na na način pridobljeni G-CSF uporabimo direktno v nadaljnjih izolacijskih postopkih, predvsem za direkten nanos na kovinsko kelatno afinitetno kromatografijo - IMAC. Na tak način je možno industrijsko pridobivati G-CSF z visokimi izkoristki.

Primeri

Primer 1: Vpliv temperature gojenja na delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF v inkluzijskih telesih in na koncentracijo celotnih raztopljenih proteinov po raztapljanju inkluzijskih teles v 0.2% sarkozilu

Humani gen za G-CSF je bil modificiran za visoko ekspresijo v bakteriji *E. coli* (Fopt5). V ekspresijskem sistemu *E. coli* BL21 (DE3) s plazmidom pET3a dosegamo nivo akumulacije, ki lahko predstavlja tudi preko 50 % vseh celičnih proteinov. Kulturo *E. coli* BL21(DE3) pET3a-Fopt5 iz banke sevov -70°C smo nacepili v razmerju 1:100 v LBG/amp medij (10 g/l tripton, 5g/l kvasni ekstrakt, 10 g/l NaCl, 2.5 g/l glukoze, 100 mg/L ampicilina) in gojili 10 ur na stresalniku 25°C , 160 rpm. 2 do 4 ml tako pripravljene kulture smo precepili v 40 ml GYST/amp100 medija, kateremu smo že na začetku dodali induktor IPTG do končne koncentracije 0.4 mM, (začetni $\text{OD}_{\lambda 600\text{nm}}$ kulture je znašal 0.385). Kulturo smo nato gojili na stresalniku (stresana kultura) pri treh različnih temperaturah in 160 rpm do eksponencialne faze rasti:

- pri 25°C : 22 ur, končni $\text{OD}_{\lambda 600\text{nm}}$ kulture je znašal 15.2 ± 0.5 ;
- pri 37°C : 15 ur, končni $\text{OD}_{\lambda 600\text{nm}}$ kulture je znašal 12.2 ± 0.4 ;
- pri 42°C : 15 ur, končni $\text{OD}_{\lambda 600\text{nm}}$ kulture je znašal 6.75 ± 0.2 .

Tako pripravljene kulture smo po koncu gojenja centrifugirali 10 minut na 5000 rpm, sprali z 4-5 kratnim volumnom 10 mM TrisHCl/pH=8.0 ter biomaso prenesli v nove centrifugirke ter ponovno centrifugirali 10 minut na 5000 rpm. Biomaso smo resuspendirali v 5 kratnem volumnu 10 mM TrisHCl/pH=8.0 pufra in sonicirali 12 krat po 1 minuto s potopno sondo (duty cycle: 60%, moč: 7, pulzi: 2 s^{-1}). Po soniciranju smo razbite celice ponovno centrifugirali 30 minut na 5000 rpm. Pelet z inkluzijskimi telesi smo raztopili pri nedenaturirajočih pogojih v 50 kratnem volumnu 0,2 % N-lauroil sarkozina v 40 mM TrisHCl/pH=8.0, raztapljanje je potekalo prekonočno 16 do 18 ur na sobni temperaturi pri stresanju 50 rpm. Po raztapljanju smo zmerili koncentracijo proteinov po Bradfordu na standard čistega hMet-G-CSF. Koncentracije so znašale okrog 1 mg/ml za 42°C in 37°C ter med 2 in 3 mg/ml za 25°C . Koncentracija celotnih proteinov po raztapljanju inkluzijskih teles v 0.2% N-lauroil sarkozina in delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF oz biološko aktivnega G-CSF, pripravljenega iz biomase gojene pri različnih temperaturah je prikazan v tabeli 1.

Delež pravilno zvitega zvitega prekursorja G-CSF oz. biološko aktivnega G-CSF (po izločitvi iz inkluzijskih teles) je bil določen z merjenjem biološke aktivnosti raztopljenih inkluzijskih teles brez odstranitve N-lauroil sarkozina (pri taki diluciji vzorcev sarkozil ne moti).

Temperatura gojenja	Koncentracija celotnih proteinov po raztapljanju inkluzijskih teles v 0,2 % N-lauroil sarkozinu	Delež biološko aktivnega G-CSF
25°C	2.7 mg/ml	> 30 %
37°C	1.1 mg/ml	> 20 %
42°C	1.0 mg/ml	< 1 %

Tabela 1: Koncentracija celotnih proteinov po raztapljanju inkluzijskih teles v 0,2 % N-lauroil sarkozina in delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF oz. biološko aktivnega G-CSF, pripravljenega iz biomase gojene pri različnih temperaturah.

Iz Tabele 1 je razvidno, da smo delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF v inkluzijskih telesih z gojenjem pri nižani temperaturi bistveno povečali. Prav tako smo pri nižani temperaturi dobili do 2.5 krat višje koncentracije celotnih proteinov po raztapljanju inkluzijskih teles v 0,2 % N-lauroil sarkozina, kar pomeni, da so tako pripravljena inkluzijska telesa bistveno bolj topna.

Primer 2: Vpliv načina indukcije IPTG na akumulacijo G-CSF

Indukcija z 0.4 mM IPTG na začetku fermentacije

Predhodni poskusi z različnimi koncentracijami IPTG (0.05 mM - 0.4 mM) so pokazali, da je dovolj visoka in skoraj enaka akumulacija G-CSF dosežena v področju 0.1 - 0.4 mM za biomase s končnim $OD_{\lambda 600nm} = 20-30$.

Kulturo *E. coli* BL21(DE3) pET3a-Fopt5 iz banke sevov -70°C smo nacepili v razmerju 1:500 v LBG/amp medij in gojili 14-18 ur na stresalniku 25°C, 150 rpm. Tako pripravljeno kulturo smo uporabili kot vcepek za fermentor v razmerju 1:20 v produkcijskem mediju GYST/amp, kateremu smo že na začetku dodali induktor IPTG do končne koncentracije 0.4 mM. Fermentacijo smo vodili po principu šaržnih

fermentacij 20-23 ur pri 25°C, 500 rpm in pretoku zraka 1 vvm (7 L Chemap fermentor). Po koncu procesa je $OD_{\lambda 600nm}$ kulture znašal približno 25.

Biomaso smo centrifugirali 5 minut na 5000 rpm (Beckman centrifuga) in zamrznili za nadaljno obdelavo. Po SDS-PAGE in barvanju s Coomassie barvilom smo s profilno denzitometrično analizo določili delež G-CSF v celokupnih proteinih, ki je znašal med 30% in 40%.

Indukcija z 0.4 mM IPTG pri $OD_{600nm} \approx 6.0$

Fermentacijo smo izvedli na podoben način kot pri indukciji z 0.4 mM IPTG od začetka, le da smo induktor IPTG do končne koncentracije 0.4 mM v medij dodali šele, ko je kultura dosegla $OD_{600nm} \approx 6.0$. Fermentacijo smo vodili po principu šaržnih fermentacij 18-20 ur pri 25°C, 500 rpm in pretoku zraka 1 vvm (7 L Chemap fermentor). Po koncu procesa je $OD_{\lambda 600nm}$ kulture znašal približno 30. Biomaso smo centrifugirali 5 minut na 5000 rpm (Beckman centrifuga) in zamrznili za nadaljno obdelavo. Po SDS-PAGE in barvanju s Coomassie barvilom smo s profilno denzitometrično analizo določili delež G-CSF v celokupnih proteinih, ki je znašal med 30% in 40%. Iz biomase smo izolirali inkluzijska telesa, kot je opisano v Primeru 3. Pelet z inkluzijskimi telesi smo sprali z ohlajeno vodo ali ohlajenim 10 mM TrisHCl/pH=8 pufrom, ponovno centrifugirali 30 minut na 10000 rpm in raztopili pri nadenaturirajočih pogojih v 50 kratnem volumnu 0,2 % N-lauroil sarkozina v 40 mM TrisHCl/pH=8.0. Raztapljanje je potekalo prekonočno 16 do 18 ur na sobni temperaturi pri stresanju 100 - 150 rpm. Po raztapljanju smo zmerili koncentracijo proteinov po Bradfordu na standard čistega hMet-G-CSF.

Koncentracija celotnih raztopljenih proteinov po obeh načinih indukcije je bila med 2 in 4 mg/ml.

Primerjava deleža hG-CSF v inkluzijskih telesih, ko dodamo IPTG na začetku fermentacije (indukcija takoj) ali ko OD_{600nm} kulture znaša okoli 6.0

Ko dodamo IPTG v medij že na začetku, dobimo inkluzijska telesa z zelo visoko vsebnostjo G-CSF in zelo malo primesi drugih *E. coli* proteinov. V primeru indukcije pri $OD_{600nm} \approx 6.0$, je vsebnost G-CSF v inkluzijskih telesih sicer še vedno visoka, vendar je vsebnost drugih *E. coli* proteinov višja in lahko moti v nadaljnjih stopnjah izolacije. (Slika 1)

Primer 3: Vpliv temperature gojenja na topnost inkluzijskih teles

Topnost inkluzijskih teles se po gojenju celic pri 25°C bistveno izboljša. Zato spiranje inkluzijskih teles ni dovoljeno z detergenti, ker se preveč pravilno zvitega prekursorja G-CSF izgubi v izpirku. Vendar je spiranje, vsaj z vodo, nujno zaradi odstranitve nekaterih proteinov, ki bi sicer lahko motili pri kromatografiji.

Priprava biomase: Kulturo *E. coli* BL21(DE3) pET3a/P-Fopt5 iz banke sevov –70°C smo nacepili v razmerju 1:500 v LBG/amp medij in gojili 14-18 ur na stresalniku 25°C, 150 rpm. Tako pripravljeno kulturo smo uporabili kot vcepek za fermentor v razmerju 1:20 v produkcijskem mediju GYST/amp, kateremu smo že na začetku dodali induktor IPTG do končne koncentracije 0.4 mM. Fermentacijo smo vodili po principu šaržnih fermentacij pri 500 rpm in pretoku zraka 1 vvm (7 L Chemap fermentor) pri dveh različnih temperaturah:

pri 25°C 18-25 ur, po koncu procesa je OD_{λ,600nm} kulture znašal približno 25.

pri 37°C 8.25 ur, po koncu procesa je OD_{λ,600nm} kulture znašal približno 28.

Izolacija inkluzijskih teles: Po končani fermentaciji smo bakterijski pelet ločili od gojišča s centrifugiranjem pri +4°C in 5000 rpm. Mokri bakterijski pelet smo resuspendirali v 4-kratnim volumnu pufru X (10 mM Tris/HCl, pH=8,0). Homogenizacijo vzorca smo izvedli z ultraturaksom, nato pa smo bakterijske celice razbili s homogenizatorjem EmulsiFlex C-5 firme AVESTIN v eni pasaži pri razliki tlakov med 10000 – 15000 psi (70 – 110 MPa). Po 30-minutnem centrifugiranju pri 10000 rpm smo supernatant, ki vsebuje topne proteine bakterije *E. coli*, zavrgli, pelet (inkluzijska tlesa) pa smo zamrznili na –20°C in ga uporabili za poskuse spiranja in raztapljanja inkluzijskih teles.

Izvedeni so bili naslednji poskusi spiranja inkluzijskih teles (Slika 2):

A. Spiranje inkluzijskih teles z vodo

Zatehtano količino inkluzijskih teles smo resuspendirali v 10-kratni količini ohlajene vode (+4°C), centrifugirali 10 minut pri 10000 rpm na +4°C in postopek ponovili z enako količino ohlajene vode. V supernatantih po obeh spiranjih smo določili količino proteinov po Bradfordu (glede na goveji serumski albumin (BSA) kot standard) in analizirali proteinsko sestavo s SDS-PAGE.

Kvaliteta vode: voda je pripravljena z aparaturo Milli-Q RG (Millipore).

B. Spiranje inkluzijskih teles s pufrom Y (10mM Tris/HCl, pH 8,0)

Zatehtano količino inkluzijskih teles smo resuspendirali v 10-kratni količini ohlajenega pufra Y (10 mM Tris/HCl, pH 8,0) (+4°C), centrifugirali 10 minut pri 10000 rpm na +4°C in postopek ponovili z enako količino ohlajene vode. V supernatantih po obeh spiranjih smo določili količino proteinov po Bradfordu (glede na BSA kot standard) in analizirali proteinsko sestavo s SDS-PAGE.

C. Spiranje inkluzijskih teles z 1 % Na-deoksiholatom

Zatehtano količino inkluzijskih teles smo resuspendirali v 10-kratni količini ohlajenega (+4°C) pufra W (50 mM Tris/HCl, pH 9,0 z dodatkom 1% Na deoksiholata, 5 mM ditiotreitola (DTT) in 5 mM EDTA, pustili 30 minut na ledu in centrifugirali 10 minut pri 10000 rpm na +4°C. V supernatantih smo določili količino proteinov po Bradfordu (glede na BSA kot standard) in analizirali proteinsko sestavo s SDS-PAGE.

D. Spiranje inkluzijskih teles z 1 % Triton X-100

Zatehtano količino inkluzijskih teles smo resuspendirali v 10-kratni količini ohlajenega (+4°C) pufra X (10 mM Tris/HCl, pH=8,0) z dodatkom 1 % Triton X-100, pustili 30 minut na ledu in centrifugirali 10 minut pri 10000 rpm na +4°C. V supernatantih smo določili količino proteinov po Bradfordu (glede na BSA kot standard) in analizirali proteinsko sestavo s SDS-PAGE.

E. Spiranje inkluzijskih teles z 2 M ureo

Zatehtano količino inkluzijskih teles smo resuspendirali v 10-kratni količini ohlajenega (+4°C) pufra X (10 mM Tris/HCl, pH=8,0) z dodatkom 2M uree, pustili 30 minut na ledu in centrifugirali 10 minut pri 10000 rpm na +4°C. V supernatantih smo določili količino proteinov po Bradfordu (glede na BSA kot standard) in analizirali proteinsko sestavo s SDS-PAGE.

F. Spiranje z 8 M ureo

Zatehtano količino inkluzijskih teles smo resuspendirali v 10-kratni količini ohlajenega (+4°C) pufra X (10 mM Tris/HCl, pH=8,0) z dodatkom 8 M uree, pustili 30 minut na ledu in centrifugirali 10 minut pri 10000 rpm na +4°C. V supernatantih smo določili količino proteinov po Bradfordu (glede na BSA kot standard) in analizirali proteinsko sestavo s SDS-PAGE.

Iz slike 2 je razvidno, da so inkluzijska telesa, ki smo jih dobili pri temperaturi gojenja 25°C (nanosi 4-10) bistveno bolj topna, kot so inkluzijska telesa, ki smo jih

dobili pri temperaturi gojenja 37°C (nanosi 12-18, 20). V primeru gojenja pri 25°C spiranje z detergenti (1% deoksiholat, 1% Triton-X100) in z 2 M ureo ni več mogoče, kajti večino heterolognega proteina se izgubi v izpirku (nanosi 8, 9, 10), v primeru gojenja pri 37°C pa je spiranje z detergenti (1% deoksiholat, nanos 16), 2 M ureo (nanos 17) in 1% Tritonom-X100 (nanos 18) še vedno mogoče. Vidimo tudi, da je inkluzijska telesa, ki smo jih dobili pri temperaturi gojenja 37°C možno raztopiti šele z 8 M ureo (nanos 20).

Primer 4: Vpliv principa vodenja fermentacije na akumulacijo G-CSF in na delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF v inkluzijskih telesih

Visok delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF v inkluzijskih telesih lahko dobimo z vodenjem po principu šaržnih fermentacij in po principu šaržnih fermentacij z dohranjevanjem

Vodenje fermentacije po principu šaržnih fermentacij

Kulturo *E. coli* BL21(DE3) pET3a-Fopt5 iz banke sevov -70°C smo nacepili v razmerju 1:500 v LBG/amp medij in gojili 14-18 ur na stresalniku 25°C, 150 rpm. Tako pripravljeno kulturo smo uporabili kot vcepek za fermentor v razmerju 1:20 v produkcijskem mediju GYST/amp, kateremu smo že na začetku ali v zgodnji eksponentni fazi, ko je OD_{λ600nm} kulture znašal 6, dodali induktor IPTG do končne koncentracije 0.4 mM. Fermentacijo smo vodili po principu šaržnih fermentacij 18-25 ur pri 25°C, 500 rpm in pretoku zraka 1 vvm (7 L Chemap fermentor). Po koncu procesa je OD_{λ600nm} kulture znašal približno 25 v primeru začetne indukcije in 30 v primeru kasnejše indukcije. Biomaso smo centrifugirali 5 minut na 5000 rpm (Beckman centrifuga) in zamrznili za nadaljno obdelavo. Po SDS-PAGE in barvanju s Coomassie barvilom smo s profilno denzitometrično analizo določili akumulacijo G-CSF, ki je znašala med 30% in 40%.

Vodenje fermentacije po principu šaržnih fermentacij z dohranjevanjem

Fermentacijo smo vodili po principu šaržnih fermentacij z dohranjevanjem 25.5-30 ur pri 25°C, 500 rpm in pretoku zraka 1 vvm (7 L Chemap fermentor). Po izrabi glukoze v mediju, t.j. po koncu šaržnega procesa, (vodenega kot opisano prej), ko je pH vrednost medija narasla, smo začeli z dohranjevanjem z raztopino 20 % glukoze z 100 mg/l ampicilina, da je bila specifična hitrost rasti μ med 0.05 in 0.1 hr⁻¹.

Proces smo zaključili po 7-7.5 urah dohranjevanja (skupaj 25.5-30 ur), ko je $OD_{\lambda 600nm}$ kulture znašal približno 42. Biomaso smo centrifugirali 5 minut na 5000 rpm (Beckman centrifuga) in zamrznili za nadaljno obdelavo. Po SDS-PAGE in barvanju s Coomassie barvilom smo s profilno denzitometrično analizo akumulacijo G-CSF, ki se ohranja na podobno visokem nivoju kot v primeru vodenja po principu šaržnih fermentacij, to je med 30% in 40%. Iz biomase smo izolirali inkluzijska telesa, kot je opisano v Primeru 3. Pelet z inkluzijskimi telesi smo sprali z ohlajeno vodo, ponovno centrifugirali 30 minut na 10000 rpm in raztopili pri nedenaturirajočih pogojih v 50 kratnem volumnu 0,2 % N-lauroil sarkozina v 40 mM TrisHCl/pH=8.0. Raztapljanje je potekalo prekonočno 16 do 18 ur na sobni temperaturi pri stresanju 100 - 150 rpm. Po raztapljanju smo zmerili koncentracijo proteinov po Bradfordu na standard čistega hMet-G-CSF.

Koncentracije proteinov pri obeh principih vodenja fermentacije so znašale med 2 in 4 mg/ml. Delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF oz delež biološko aktivnega G-CSF je bil določen z merjenjem biološke aktivnosti raztopljenih inkluzijskih teles brez odstranitve N-lauroil sarkozina (pri taki diluciji vzorcev sarkozil ne moti).

Princip vodenja fermentacije	Način indukcije z 0.4 mM IPTG	Delež biološko aktivnega G-CSF
šaržni	začetna	44 %
šaržni z dohranjevanjem	začetna	39 %
šaržni	$OD_{600nm} \approx 6$	43 %
šaržni z dohranjevanjem	$OD_{600nm} \approx 6$	37 %

Tabela 2: Delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF glede na način vodenja fermentacije in glede na način indukcije.

Iz tabele 2 je razvidno, da dobimo v vseh primerih visok delež biološko aktivnega G-CSF, delež je največji v primeru, ko vodimo fermentacijo po principu šaržnih fermentacij.

Primer 5: Vpliv indukcije z laktozo na akumulacijo G-CSF in na delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF

Kulturo *E. coli* BL21(DE3) pET3a-Fopt5 iz banke sevov -70°C smo nacepili v razmerju 1:500 v LBG/amp medij in gojili 14-18 ur na stresalniku 25°C , 150 rpm. Tako pripravljeno kulturo smo uporabili kot vcepek za fermentor v razmerju 1:20 v modificiranem produkcijskem mediju LYST/amp, kjer smo kot vir ogljika namesto glukoze uporabili glicerol (6 g/l) in laktozo (2 g/l oziroma 4 g/l), ki je bila hkrati tudi induktor ekspresije namesto IPTG. Fermentacijo smo vodili po principu šaržnih fermentacij 17-21 ur pri 25°C , 500 rpm in pretoku zraka 1 vvm (7 L Chemap fermentor). Po koncu procesa je $\text{OD}_{\lambda 600\text{nm}}$ kulture znašal približno 20. Biomaso smo centrifugirali 5 minut na 5000 rpm (Beckman centrifuga), 1 krat sprali z 10 mM Tris/HCl, pH=8 pufrom in zamrznili za nadaljno obdelavo. Po SDS-PAGE in barvanju s Coomassie barvilom smo s profilno denzitometrično analizo določili akumulacijo G-CSF, ki znaša 27 % pri indukciji z 2 g/l laktoze oziroma 33 % pri indukciji s 4 g/l laktoze. Iz biomase smo izolirali inkluzijska telesa, kot je opisano v Primeru 3. Pelet z inkluzijskimi telesi smo sprali z ohlajeno vodo, ponovno centrifugirali 30 minut na 10000 rpm in raztopili pri nedenaturirajočih pogojih v 50 kratnem volumnu 0.2 % N-lauroil sarkozina v 40 mM TrisHCl/pH=8.0. Raztapljanje je potekalo prekonočno 16 do 18 ur na sobni temperaturi pri stresanju 100 - 150 rpm.

Ekspresijski sistem	Indukcija z laktozo	Temperatura gojenja	Delež biološko aktivnega G-CSF
pET3a / P-Fopt5 <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	2 g/l	25°C	$\approx 25 \%$
pET3a / P-Fopt5 <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	4 g/l	25°C	$\approx 23 \%$

Tabela 3: Delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF oz. deleži biološko aktivnega G-CSF (v %) v inkluzijskih telesih, ki jih dobimo z indukcijo produkcijskega seva *E. coli* BL21 (DE3) pET3a/P-Fopt5 z laktozo.

Iz Tabele 3 je razvidno, da smo tudi z indukcijo z laktozo uspeli dobiti več kot 23 % delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF v inkluzijskih telesih z gojenjem pri temperaturi 25°C.

Primer 6: Vpliv indukcije z NaCl na akumulacijo G-CSF in na delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF

Kulturo *E. coli* BL21-SI pET3a/P-Fopt5 iz banke sevov –70°C smo nacepili v razmerju 1:20 v LBON/amp medij in gojili prehodno 8 ur na stresalniku 25°C, 160 rpm. 1 ml tako pripravljene kulture smo precepili v 20 ml GYSPON/amp100 medija, kateremu smo dodali induktor NaCl do končne koncentracije 1.2 M že na začetku ali pri $OD_{\lambda 600nm} \approx 0.5$, to je po približno 3 urah gojenja. Kulturo smo v obeh primerih gojili na stresalniku pri temperaturi 25°C in 160 rpm 20-24 ur. Za analizo na SDS-PAGE smo 5 ml tako pripravljene kulture po koncu gojenja centrifugirali 5 minut na 5000 rpm. Pelete smo nato resuspendirali v 15 ml 10 mM TrisHCl/pH=8.0. Vzorce smo zmešali v razmerju 3:1 s 4x SDS - vzorčnim pufrom z DTT (pH=8.7) in segrevali 10 minut na 95°C, odcentrifugirali ter tako pripravljene nanесли na gel. Akumulacija G-CSF je navedena v tabeli 4, kjer vidimo, da dobimo višjo akumulacijo G-CSF, ko dodamo 1.2 M NaCl v medij na začetku, to je ob inokulaciji in ne standardno pri $OD_{\lambda 600nm} \approx 0.5$, kot priporoča proizvajalec (Life Technologies).

Ekspresijski sistem	Pogoji gojenja in indukcije	Temperatura gojenja	Akumulacija G-CSF
pET3a / P-Fopt5 <i>E. coli</i> BL21-SI	GYSPON/amp100 1.2 M NaCl na začetku	25° C	25 %
pET3a / P-Fopt5 <i>E. coli</i> BL21-SI	GYSPON/amp100 1.2 M NaCl pri $OD_{\lambda 600nm} \approx 0.5$,	25° C	17 %

Tabela 4: Primerjava akumulacije G-CSF produkcijskega seva BL21-SI pET3a/P-Fopt5 pri različnih gojiščih in načinih indukcije.

Navedene vrednosti za vsebnost G-CSF so bile dobljene z denzitometrično analizo SDS-PAGE gelov obarvanih s Coomassie brilliant blue (Slika 3). Relativni

delež je bil določen s profilno analizo (program Molecular analyst; BioRad) gelov na aparatu Imaging densitometer Model GS670 (BioRad).

Priprava vzorcev za določanje biološke aktivnosti in poskuse spiranja inkluzijskih teles

Za analizo biološke aktivnosti ter poskuse spiranja inkluzijskih teles smo pripravili večjo količino biomase. Kulturo *E. coli* BL21-SI pET3a-Fopt5 iz banke sevov -70°C smo nacepili v razmerju 1:20 v LBON/amp medij in gojili prekodnevno 8 ur na stresalniku 25°C , 160 rpm. Po 10 ml tako pripravljene kulture smo precepili v 8 x 200 ml GYSPON/amp100 medija, kateremu smo dodali induktor NaCl do končne koncentracije 1.2 mM že na začetku. Kulturo smo gojili na stresalniku pri temperaturi 25°C in 160 rpm 24 ur. Iz biomase smo izolirali inkluzijska telesa, kot je opisano v Primeru 3. Pelet z inkluzijskimi telesi smo sprali z ohlajeno vodo in jih raztopili z dodatkom 0,2 % N-lauroil sarkozina kot je opisano v Primeru 9. Po raztapljanju smo zmerili koncentracijo proteinov po Bradfordu na standard čistega hMet-G-CSF. Koncentracija celotnih raztopljenih proteinov je bila med 2 in 3 mg/ml.

Ekspresijski sistem	Temperatura gojenja	Delež biološko aktivnega G-CSF
pET3a / P-Fopt5 <i>E. coli</i> BL21-SI	25°C	$\approx 40 \%$

Tabela 5: Delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF v inkluzijskih telesih oz delež biološko aktivnega G-CSF, ki ga dobimo z indukcijo produkcijskega seva *E. coli* BL21-SI pET3a / P-Fopt5 z 1.2 M NaCl.

Iz Tabele 5 je razvidno, da smo dobili tudi s produkcijskim sevom *E. coli* BL21-SI pET3a/P-Fopt5, kjer smo inducirali ekspresijo heterolognega gena z 1.2 M NaCl, visok delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF (oz. biološko aktivnega G-CSF) v inkluzijskih telesih z gojenjem pri temperaturi 25°C .

Topnost inkluzijskih teles

Tudi s produkcijskim sevom *E. coli* BL21-SI pET3a/P-Fopt5, kjer smo inducirali ekspresijo heterolognega gena z 1.2 M NaCl, smo dobili z gojenjem pri temperaturi 25°C bolj topna inkluzijska telesa. Tako tudi v tem primeru ni dovoljeno spiranje inkluzijskih teles z detergenti, ker se preveč pravilno zvitega prekursorja G-CSF izgubi v izpirku (Slika 4).

Primer 7: Vpliv dodatkov, ki delujejo stresno, npr. etanola ali propanola, na delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF v inkluzijskih telesih

Kulturo *E. coli* BL21(DE3) pET3a-Fopt5 iz banke sevov -70°C smo nacepili v razmerju 1:500 v LBPG/amp100 medij (10 g/l phyton, 5 g/l yeast extract, 10 g/l NaCl, 100 mg/ml ampicilina) in gojili 17 ur na stresalniku 25°C, 160 rpm. 10 ml tako pripravljene kulture smo precepili v 200 ml medija s takojšnjim dodatkom induktorja IPTG do končne koncentracije 0.4 mM:

- GYSP/amp100 medija (kontrola);
- GYSP/amp100 medija z dodatkom etanola (končna koncentracija etanola v mediju 3%);
- GYSP/amp100 medija z dodatkom izo-propanola (končna koncentracija izo-propanola v mediju 3%).

Kulturo smo nato gojili na stresalniku pri temperaturi 25°C in 160 rpm 24 ur v primeru kontrole GYSP/amp100 medija. V primeru GYSP/amp100 medija z dodatkom etanola ali izo-propanola smo kulture gojili pod enakimi pogoji 34 ur, saj dodatek enega ali drugega upočasni rast. Iz biomase smo izolirali inkluzijska telesa, kot je opisano v Primeru 3. Pelet z inkluzijskimi telesi smo sprali z ohlajeno vodo in jih raztopili z dodatkom 0,2 % N-lauroil sarkozina kot je opisano v Primeru 9.

Ekspresijski sistem	Temperatura gojenja v °C	Dodatek	Delež biološko aktivnega G-CSF
pET3a / P-Fopt5 <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	25°C	brez dodatka	≈ 50 %
pET3a / P-Fopt5 <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	25°C	3 % etanol	≈ 59 %
pET3a / P-Fopt5 <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	25°C	3 % propanol	≈ 62 %

Tabela 6: Delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF (v %) v inkluzijskih telesih, ki jih dobimo z indukcijo produkcijskega seva *E. coli* BL21 (DE3) pET3a / P-Fopt5 v GYSP/amp100 mediju z 0.4 mM IPTG in z dodatki etanola ali propanola, ki delujeta stresno.

Iz Tabele 6 je razvidno, da dodatki etanola ali propanola, ki sprožita stresne proteine, povečajo delež pravilno zvitega prekursorja G-CSF oz. delež biološko aktivnega G-CSF v inkluzijskih telesih.

Primer 8: Raztapljanje inkluzijskih teles z 2 M ureo v pufru Z (40mM Tris/HCl, pH 8,0)

K 0,30 g s hladno vodo spranih inkluzijskih teles (pripravljenih, kot je opisano v Primeru 3) smo dodali 12 ml pufru Z (40 mM Tris/HCl pH=8.0) z 2 M ureo. Po homogenizaciji smo raztapljali med rahlim stresanjem pri 80 rpm pri 20°C 16 ur. Nato smo centrifugirali 10 minut pri 14000 rpm in 10 °C in pelet zavrgli. Supernatant, ki vsebuje raztopljene proteine inkluzijskih teles, pa smo uporabili za določitev celokupnih proteinov, SDS-PAGE analizo in določitev biološke aktivnosti.

Koncentracija proteinov po Bradfordu (glede na hMetG-CSF): 2,6 mg/ml, celokupni raztopljeni proteini: 31 mg. (Količina raztopljenih proteinov: približno 10 % mase inkluzijskih teles).

Biološka aktivnost G-CSF: okrog $1,5 \times 10^7$ IU/mg

Primer 9: Raztapljanje inkluzijskih teles z 0,2 % N-lauroil-sarkozin v pufru Z (40 mM Tris/HCl, pH 8,0)

Na 0,31 g s hladno vodo spranih inkluzijskih teles (pripravljenih, kot je opisano v Primeru 3) smo dodali 15,6 ml pufru Z (40 mM Tris/HCl pH=8.0) z 0.2% N-lauroil-sarkozina. Po homogenizaciji smo raztapljali 1 uro pri sobni temperaturi (20-22°C) med stresanjem na 100-150 rpm. Za pospešitev oksidacije oziroma tvorbe disulfidnih vezi smo nato dodali 0,1 M $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ do končne koncentracije 40 μM . Stresanje smo nadaljevali preko noči (16 ur) na stresalniku pri 80 rpm in temperaturi 20°C. Naslednji dan smo centrifugiramo 10 minut pri 14000 rpm in +10 °C in pelet zavrgli. V supernatantu z raztopljenimi proteini inkluzijskih teles smo odstranili N-lauroil-sarkozin z DOWEX-om (DOWEX 1 Sigma), tako da smo dodali 0,39 g DOWEX 1, stresali 1 uro na sobni temperaturi (20-22°C) in 100-150 rpm, nato pa proteinsko raztopino oddekanirali. Tako pripravljeno raztopino inkluzijskih teles smo uporabili za določitev celokupnih proteinov, SDS-PAGE analizo in za določitev biološke aktivnosti. Koncentracija proteinov po Bradfordu (glede na hMetG-CSF) 4,4 mg/ml, celokupni raztopljeni proteini: 68 mg, (količina raztopljenih proteinov: približno 20 % mase inkluzijskih teles).

Biološka aktivnost G-CSF: okrog $4,0 - 4,5 \times 10^7$ IU/mg – ni bistvenih razlik, če je dodan $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ali ne.

Primer 10: Raztapljanje inkluzijskih teles z 0,2 % NDSB (195, 201, 211, 256) v pufru Z (40 mM Tris/HCl, pH 8,0)

Na približno 0,16 g alikvote s hladno vodo spranih inkluzijskih teles (pripravljenih, kot je opisano v Primeru 3) smo dodali 40-kratni prebitek pufru Z (40 mM Tris/HCl pH=8.0) z dodatkom različnih NDSB (non-detergent sulfobetaine) v koncentraciji 0, 2%. Uporabljeni so bili NDSB 195, NDSB 201, NDSB 211 in NDSB 256. Po homogenizaciji smo vzorce inkluzijskih teles raztapljali pri temperaturi 20 °C med stresanjem pri 80 rpm preko noči. Vzoredno smo raztapljali tudi vzorce inkluzijskih teles, pri katerih smo po začetnem 30-minutnem raztapljanju za pospešitev oksidacije dodali raztopino 0,1 M $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ do končne koncentracije 40 μM in nato nadaljevali stresanje preko noči. Naslednjega dne smo po centrifugiranju oborine zavrgli, supernatante pa brez vsake predhodne obdelave

uporabili za določitev celokupnih proteinov, SDS-PAGE analizo in za določitev biološke aktivnosti. Koncentracija proteinov po Bradfordu (glede na hMetG-CSF): v vseh primerih okrog 3,6 mg/ml, torej skupno okrog 24 mg celokupnih proteinov (Količina raztopljenih proteinov: približno 15 % mase inkluzijskih teles).

Biološka aktivnost G-CSF: okrog $3\text{--}4 \times 10^7$ IU/mg – ni bistvenih razlik, če je dodan $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ali ne.

Primer 11: Raztapljanje inkluzijskih teles s 5 % DMSO v pufru Z (40mM Tris/HCl, pH 8,0)

Na 0,16 g s hladno vodo spranih inkluzijskih teles (pripravljenih, kot je opisano v Primeru 3) smo dodali 40-kratni prebitek pufra Z (40 mM Tris/HCl pH=8.0) z dodatkom 5 % DMSO. Po homogenizaciji smo inkluzijska telesa raztapljali pri temperaturi 20°C med stresanjem pri 80 rpm preko noči. Vzporedno smo raztapljali tudi vzorec inkluzijskih teles, pri katerih smo po začetnem 30-minutnem raztapljanju za pospešitev oksidacije dodali raztopino 0,1 M $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ do končne koncentracije 40 μM in nato nadaljevali stresanje preko noči. Naslednjega dne smo po centrifugiranju oborine zavrgli, supernatante pa brez vsake predhodne obdelave uporabili za določitev celokupnih proteinov, SDS-PAGE analizo in za določitev biološke aktivnosti. Koncentracija proteinov po Bradfordu (glede na hMetG-CSF): okrog 3,6 mg/ml, torej skupno okrog 24 mg celokupnih proteinov (Količina raztopljenih proteinov: približno 15 % mase inkluzijskih teles).

Biološka aktivnost G-CSF: okrog 4×10^7 IU/mg – ni bistvenih razlik, če je dodan $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ali ne.

Primer 12: Testiranje biološke aktivnosti G-CSF *in vitro*

Biološko aktivnost G-CSF smo določali z metodo proliferacije na celični liniji NFS-60 po znani metodi (Hammerling, U. s sodelavci v *J Pharm Biomed Anal* **13**, 9-20 (1995)) in uporabi mednarodnega standarda Human recombinant G-CSF (88/502, yeast cell derived; NIBSC Potters Bar, Hertfordshire, UK); (Mire-Sluis, A.R. s sodelavci v *J Immunol Methods* **179**, 117-126 (1995)).

Lek farmacevtska družba d. d.



Patentni zahtevki

1. Postopek pridobivanja proteinov, označen s tem, da se pravilno zvit prekursor heterolognega proteina po ekspresiji nahaja v inkluzijskih telesih.
2. Postopek pridobivanja proteinov po zahtevku 1, označen s tem, da so heterologni proteini izbrani iz skupine, ki obsega: G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EGF, HSA, DNAzo, FGF, TNF-alfa, TNF-beta, interferone in interleukine.
3. Postopek pridobivanja proteinov po zahtevku 1, označen s tem, da je izbrani heterologni protein G-CSF.
4. Postopek pridobivanja proteinov po zahtevku 1, označen s tem, da ekspresija poteka v organizmih, ki so izbrani iz skupine, ki sestoji iz bakterij in kvasovk.
5. Postopek pridobivanja proteinov po zahtevku 4, označen s tem, da ekspresija poteka v bakteriji *E. coli*.
6. Postopek pridobivanja proteinov po zahtevku 1, označen s tem, da vključuje način vodenja biosinteze, ki vključuje enega ali več parametrov, ki so izbrani iz skupine: temperature gojenja, sestave gojišča, načina indukcije, principa vodenja fermentacije in ko-ekspresije pomožnih proteinov.
7. Način vodenja biosinteze po zahtevku 6, označen s tem, da je temperatura gojenja med 20°C in 30°C.
8. Način vodenja biosinteze po zahtevku 7, označen s tem, da je temperatura gojenja okoli 25°C.
9. Način vodenja biosinteze po zahtevku 6, označen s tem, da je induktor izbran iz skupine, ki obsega IPTG, laktozo in NaCl.
10. Način vodenja biosinteze po zahtevku 9, označen s tem, da je izbrani induktor IPTG.
11. Način vodenja biosinteze po zahtevku 10, označen s tem, da je koncentracija IPTG v območju med 0.1 mM in 1 mM.
12. Način vodenja biosinteze po zahtevku 11, označen s tem, da je koncentracija IPTG okoli 0.4 mM.
13. Način vodenja biosinteze po zahtevku 9, označen s tem, da se induktor doda na začetku fermentacije.
14. Način vodenja biosinteze po zahtevku 6, označen s tem, da je princip vodenja biosinteze izbran iz skupine, ki obsega vodenje fermentacije po principu šaržnih

fermentacij, vodenje fermentacije po principu šaržnih fermentacij z dohranjevanjem in vodenje fermentacije v stresani kulturi.

15. Način vodenja biosinteze po zahtevku 14, označen s tem, da je izbrani princip vodenja fermentacije vodenje fermentacije po principu šaržnih fermentacij.
16. Način vodenja biosinteze po zahtevku 6, označen s tem, da je gojišče celic izbrano iz skupine, ki obsega GYST/amp100, GYSP/amp100, LYSP/amp100, LYST/amp100, LBON/amp100 in GYSPON/amp100.
17. Način vodenja biosinteze po zahtevku 16, označen s tem, da je izbrano gojišče GYST/amp100.
18. Način vodenja biosinteze po zahtevku 6, označen s tem, da so dodatki, ki delujejo stresno, izbrani iz skupine, ki obsega etanol in propanol.
19. Postopek pridobivanja proteinov po zahtevku 6, označen s tem, da dodatno vključuje spiranje inkluzijskih teles.
20. Spiranje inkluzijskih teles po zahtevku 19, označeno s tem, da se spiranje izvede s pripravki, ki so izbrani iz skupine, ki obsega Tris/HCl pufer, fosfatni pufer, acetatni pufer, citratni pufer in vodo.
21. Spiranje inkluzijskih teles po zahtevku 20, označeno s tem, da je koncentracija pufrov izbrana v območju med 1 mM in 10 mM.
22. Spiranje inkluzijskih teles po zahtevku 19, označeno s tem, da je izbrani pripravek voda.
23. Postopek pridobivanja proteinov po zahtevku 19, označen s tem, da dodatno vključuje raztapljanje inkluzijskih teles.
24. Raztapljanje inkluzijskih teles po zahtevku 23, označeno s tem, da se za raztapljanje inkluzijskih teles uporabljajo topila, ki so izbrana iz skupine, ki sestoji iz uree v denaturirajočih koncentracijah (1-2 M), N-lauroil sarkozina v nendenaturirajočih koncentracijah (0.05 - 0.2% (m/v)), nizkih koncentracij Zwittergentov, non-detergent sulfobetainov, betaina, sarkozina, karbamoil sarkozina, taurina, DMSO in višjih koncentracij nekaterih pufrov, izbranih iz skupine, ki sestoji iz HEPES, HEPPS, MES, ACES, MES. N-lauroil sarkozina, non-detergent sulfobetainov in DMSO.
25. Raztapljanje inkluzijskih teles po zahtevku 24, označeno s tem, da je izbrano topilo za raztapljanje N-lauroil sarkozin.

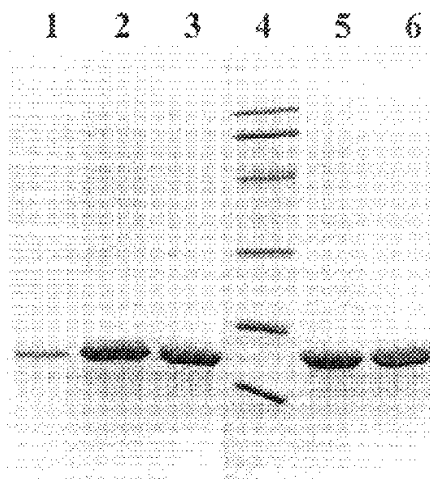
26. Raztapljanje inkluzijskih teles po zahtevku 25, označeno s tem, da je koncentracija N-lauroil sarkozina v območju med 0.1% - 0.25%.
27. Raztapljanje inkluzijskih teles po zahtevku 26, označeno s tem, da je koncentracija N-lauroil sarkozina okoli 0.2%.
28. Postopek pridobivanja biološko aktivnega G-CSF, označen s tem, da so izbrani parametri za način vodenja biosinteze:
- temperatura gojenja: okoli 25°C
 - sestava gojišča: GYST/amp100
 - vodenje fermentacije: šaržni princip fermentacije
 - indukcija: IPTG s koncentracijo okoli 0.4 mM
 - način indukcije: začetna indukcija
29. Postopek pridobivanja biološko aktivnega G-CSF po zahtevku 28, označen s tem, da nadalje vključuje spiranje inkluzijskih teles z vodo.
30. Postopek pridobivanja biološko aktivnega G-CSF po zahtevku 29, označen s tem, da nadalje vključuje raztapljanje inkluzijskih teles z N-lauroil sarkozinom s koncentracijo okoli 0.2%.

Lek farmacevtska družba d. d.



1/4

Slika 1

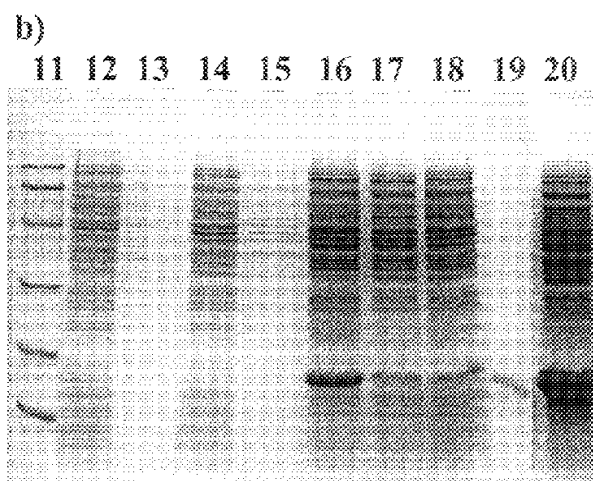
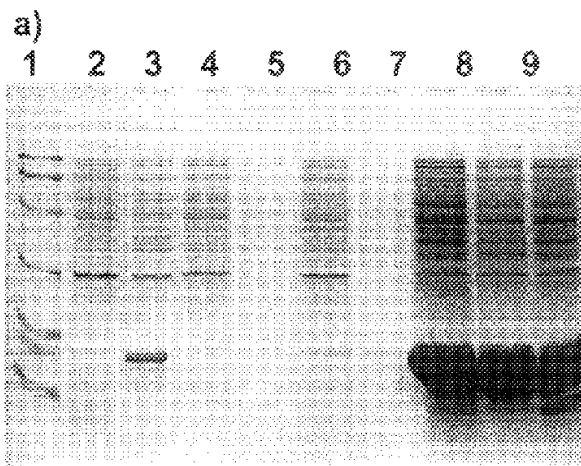


Lek farmacevtska družba d. d.

Handwritten signature

2/4

Slika 2

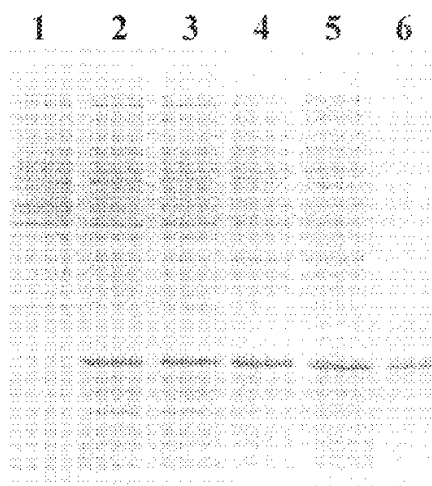


Lek farmacevtska družba d. d.

[Handwritten signature]

3/4

Slika 3

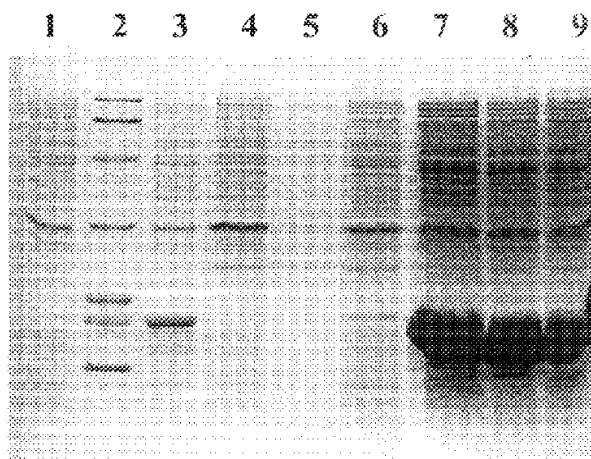


Lek farmacevtska družba d. d.

[Handwritten signature]

4/4

Slika 4



Lek farmacevtska družba d. d.

Priloga