UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

TAJA HERMAN

NAČRTOVANJE PROTEINSKIH ANALOGOV REKOMBINANTNEGA HUMANEGA RASTNEGA HORMONA

DESIGN OF PROTEIN ANALOGS OF RECOMBINANT HUMAN GROWTH HORMONE

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala v Laboratoriju za biosintezo in biotransformacijo L11 na Kemijskem inštitutu v Ljubljani, pod mentorstvom prof. dr. Boruta Štruklja in somentorstvom dr. Ane Lenassi Zupan.

Najlepše se zahvaljujem mentorju, prof. dr. Borutu Štruklju, za trud in pomoč ter izkazano zaupanje med mojim delom. Prav tako bi se posebej zahvalila somentorici, dr. Ani Lenassi Zupan, za vodenje in usmerjanje na pravo pot raziskovanja, ki me je pripeljala do uspešnega zaključka raziskovalnega dela. Hkrati gre posebna zahvala tudi dr. Gorazdu Hribarju za veliko pomoč pri zaključevanju mojega diplomskega dela.

Najlepša hvala tudi vsem na oddelku L-11 Kemijskega inštituta, ki so mi pomagali pri mojih začetkih in mi dovolili, da sem se od njih veliko naučila. Posebej bi tu omenila Mirijam, Jelko, Teo, Ano, Tanjo in Majo, saj so vse pustile svoj pečat na mojem delu.

Posebna zahvala pa gre tudi vsem bližnjim, ki ste mi stali ob strani na moji študijski poti, ki ni bila vedno rožnata. Tu moram posebej omeniti Bojana, ki me je vedno podpiral in bil potrpežljiv tudi v težkih situacijah, in seveda mojo družino, ki mi je omogočila izbrati to pot v življenju in me na njej tudi vzpodbujala.

Hvala vsem, saj so rezultati te naloge rezultati nas vseh.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom mentorja prof. dr. Boruta Štruklja in somentorice dr. Ane Lenassi Zupan.

KAZALO

KAZALO 2
POVZETEK 5
ABSTRACT 6
KLJUČNE BESEDE 7
OKRAJŠAVE 8
1. UVOD 9
1.1 TEHNOLOGIJA REKOMBINANTNE DNA 9
1.2 EKSPRESIJSKI SISTEMI ZA PRIDOBIVANJE rP 10
1.2.1 BAKTERIJSKI EKSPRESIJSKI SISTEMI 10
1.2.2 DRUGI EKSPRESIJSKI SISTEMI 12
1.3 rhGH 14
1.3.1 STRUKTURA 14
1.3.2 DELOVANJE hGH 16
1.3.3 TERAPEVTSKA UPORABA IN INDIKACIJE rhGH 17
1.3.4 IZRAŽANJE V EKSPRESIJSKIH SISTEMIH 17
1.3.5 BIOLOŠKA ZDRAVILA Z rhGH 17
1.4 SODOBNI PRISTOPI PROTEINSKEGA NAČRTOVANJA 19
1.4.1 FUZIJSKI PROTEINI 21
1.5 KOORDINATIVNA VEZAVA 22
1.5.1 KOORDINATIVNA VEZ IN IMAC 22
1.5.2 PROTEINSKE STRUKTURE NA OSNOVI KOORDINATIVNE VEZI ... 24
2 NAMEN DELA 26
3 MATERIALI IN METODE 27
3.1 POTEK DELA 27
3.2 MATERIALI 28
3.2.1 BIOLOŠKI MATERIAL 28
3.2.2 PROTITELESA 29
3.2.3 VODA 30
3.2.4 GOJIŠČA ZA GOJENJE SEVOV *E. COLI* V STRESANIH KULTURAH 30
3.2.5 KEMIKALIJE 31
3.2.6 PROTEINSKI STANDARDI 32

3.2.7 PUFRI ... 33
3.2.8 OPREMA ... 34
3.3 METODE ... 36
3.3.1 PRIPRAVA KONSTRUKTOV pET17b-H6-hGH, pET17b-hGH-H152H154 IN pET17b-hGH-H96H153 ... 36
3.3.2 PRODUKCIJA ANALOGOV hGH V STRESANIH KULTURAH ... 39
3.3.3 ANALIZA BAKTERIJSKIH BIOMAS ... 40
3.3.4 IZOLACIJA TARČNIH PROTEINOV ... 41
3.3.5 KROMATOGRAFSKA IZOLACIJA ... 42
3.3.6 KONCENTRIRANJE VZORCEV ... 43
3.3.7 SHRANJEVANJE PROTEINOV ... 43
3.3.8 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV ... 44
3.3.9 POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA Z NATRIJEVIM DODECIL SULFATOM (SDS-PAGE) ... 44
3.3.10 PRENOS WESTERN NA NITROCELULOZNO MEMBRANO ... 47
3.3.11 ANALIZA ANALOGOV rhGH - DOLOČANJE SEKUNDARNE STRUKTURE PROTEINA IN BIOLOŠKE AKTIVNOSTI ... 49
3.3.12 PRIPRAVA DELCEV NA OSNOVI SAMOZDRUŽEVANJA PROTEINSKIH MOLEKUL ... 49
4 REZULTATI ... 51
4.1 PRIPRAVA KONSTRUKTOV pET17b-H6-hGH, pET17b-hGH-H152H154 IN pET17b-hGH-H96H153 ... 51
4.1.1 RESTRIKCIJSKO KLONIRANJE GENOV ANALOGOV rhGH ... 51
4.2 PRODUKCIJA ANALOGOV rhGH V STRESANIH KULTURAH ... 54
4.3 IMUNODETEKCIJA ANALOGOV rhGH ... 57
4.4 IZOLACIJA TARČNIH PROTEINOV ... 58
4.4.1 RAZTAPLJANJE INKLUZIJSKIH TELES ... 58
4.4.2 IZOLACIJA PROTEINA Z IMAC IN GF ... 60
4.5 ANALIZA ANALOGOV rhGH ... 69
4.5.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV V KONČNEM VZORCU PO KONCENTRIRANJU ... 69
4.5.2 DOLOČANJE SEKUNDARNE STRUKTURE ANALOGOV ... 69
4.6 DOLOČANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI ... 70

4.7 PRIPRAVA DELCEV NA OSNOVI SAMOZDRUŽEVANJA PROTEINSKIH MOLEKUL 70

5 DISKUSIJA 77

5.1 PRIPRAVA IN PROIZVODNJA ANALOGOV rhGH 77

5.2 IZOLACIJA, ČIŠČENJE IN ANALIZA ANALOGOV rhGH 79

5.3 PROTEINSKI DELCI, PRIPRAVLJENI NA OSNOVI SAMOZDRUŽEVANJA 81

6 SKLEP 83

LITERATURA 85

POVZETEK

Humani rastni hormon je protein s pomembno vlogo pri procesih telesne rasti in razvoja ter metabolizma v organizmu. Odsotnost ali nezadostno izločanje hGH lahko privede do patoloških stanj zaostalega razvoja pri otrocih in presnovnih motenj v vseh starostnih obdobjih. Zato se je do danes nadomestna terapija z rekombinantnim hGH v kliniki že močno uveljavila. Pripravki z rhGH sodijo v skupino bioloških zdravil, katerih proizvodnja je draga in zahtevna. Največji izziv pri pridobivanju rhGH za terapevtske namene je zagotavljanje ustrezne učinkovitosti procesov izražanja proteina v ekspresijskem sistemu in njegovega čiščenja. Vedno bolj pa se razvoj usmerja tudi v raziskave na področju novih dostavnih sistemov proteinskih učinkovin, ki bi omogočili prirejeno sproščanje učinkovine in morda tudi alternativni način aplikacije zdravila.

V okviru raziskovalne naloge smo pripravili tri analoge rhGH z dodatno uvedenimi histidinskimi ostanki (H6-hGH, hGH-H152H154, hGH-H96H153), ki so omogočili lažjo izolacijo proteinov po izražanju v celicah *E. coli*. Proces izražanja je potekal pri temperaturi 25°C, pri kateri so vsi trije analogi agregirali v inkluzijska telesca. Proces raztapljanja IT je potekal v odsotnosti kaotropnih reagentov, izoliran protein pa smo očistili z dvema kromatografskima metodama. Kot prvo metodo za čiščenje smo uporabili afinitetno kromatografijo z imobiliziranimi kovinami (IMAC), s katero smo ločili proteine na osnovi vezave med izpostavljenimi histidinskimi ostanki in kovinskimi ioni na nosilcu. Zaradi tvorbe agregatov proteina smo morali vse analoge dodatno očistiti še z gelsko filtracijo. Vsi trije izolirani proteini so kljub uvedenim strukturnim spremembam ohranili ustrezno sekundarno strukturo in biološko aktivnost, kar je ključnega pomena pri pripravi terapevtskih proteinov.

Po izolaciji ustrezne količine biološko aktivnih proteinov smo iz prvih dveh analogov pripravili tudi delce na osnovi samozdruževanja. Tako kot pri čiščenju na kolonah IMAC so tudi pri pripravi delcev ključno vlogo imeli uvedeni histidinski ostanki v strukturi proteina, ki so omogočili vezavo analoga na kovinski ion. Za pripravo delcev smo uporabili netoksične cinkove ione in biokompatibilna kelatorja fitinsko kislino in 1,4,8,11-tetraazaciklotetradekan-1,4,8,11-tetraocetno kislino. Oba analoga sta se v delce vezala stabilno in v visokem odstotku, dokazan vpliv dodane količine cinka pa bi lahko izkoristili tudi pri pripravi delcev želene velikosti, ki bi bili primerni za morebitno uporabo v klinične namene.

ABSTRACT

Human growth hormone is a protein with an important role in the processes of growth, development, and metabolism in human body. Its deficiency or insufficient excretion can cause pathological disorders including development retardation in children and metabolic disorders at all ages. Therefore the replacement therapy with recombinant hGH is very well established in clinics. Preparations with rhGH belong to the group of biological drugs that are very challenging and their production is complex and expensive. The greatest challenge in manufacturing rhGH for therapeutical means is to ensure the appropriate efficacy of protein production in expression system and its purification. However, the development today is also directed into the research regarding new delivery systems for protein drugs that would allow modified release of protein and maybe even an alternative route of drug administration.

In our research we have produced three analogues of rhGH with additionally designed histidine residues that allowed simplified isolation of proteins from the *E. coli* cells. The process of expression was held at 25°C with all three analogues, and all of them aggregated into the inclusion bodies. Inclusion bodies were solubilized in absence of chaotropic agents and the proteins were purified with two chromatographic methods. The first purification method used was immobilized-metal affinity chromatography (IMAC), which separates proteins on the basis of coordinative bond between histidine residues and immobilized metal ions in the column. Due to the aggregation of analogues, further step of purification with gel filtration was needed. All of the analogues retained their secondary structure and biological activity regardless of the structure modification, which is very important when producing therapeutic proteins.

After isolation of sufficient amount of biollogically active analogues, we prepared particles on the basis of protein self-assembly with the first two analogues. Just like during the IMAC purification, the coordinative bonds between ions and proteins were the driving force for particle synthesis. We used non-toxic zinc ions and biocompatible chelators phytic acid and TETA. Both analogues have successfully bonded into the particles in high percentage and the particles remained stable for one day. The proven influence of amount of zinc ions added on the size of particles could be used for preparation of particles with specific size and could be appropriate also for clinical use.

KLJUČNE BESEDE

Rekombinantni humani rastni hormon, histidin, E. coli, IMAC, delci

Recombinant human growth hormone, histidine, E. coli, IMAC, particles

OKRAJŠAVE

Amp	ampicilin
DLS	dinamično sipanje svetlobe (angl. Dynamic light scattering)
DTT	ditiotreitol
E. coli	bakterija *Escherichia coli*
GF	gelska filtracija
Glu	glukoza
GRAS	splošno prepoznano kot varno (angl. Generally recognized as safe)
H6-hGH	analog rhGH z dodanimi šestimi histidini (histidinskim repom)
hGH	humani rastni hormon
hGH-H152H154	analog rhGH
hGH-H96H153	analog rhGH
IDA	iminodiocetna kislina
IMAC	afinitetna kromatografija z imobiliziranimi kovinami
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktozid
IT	inkluzijska telesa
met-rhGH	analog rhGH z metioninskim ostankom
pDNA	plazmidna DNA
pit-hGH	pituitarni hGH
rDNA	rekombinantna DNA
rhGH	rekombinantni humani rastni hormon
rP	rekombinantni protein
SDS-PAGE	natrijev dodecil sulfat - poliakrilamidna gelska elektroforeza
TETA	1,4,8,11-tetraazaciklotetradekan-1,4,8,11-tetraocetna kislina

1. UVOD

1.1 TEHNOLOGIJA REKOMBINANTNE DNA

Tehnologija rekombinantne DNA sega v široko področje molekularne biologije. Kot del biotehnologije se ukvarja predvsem z združevanjem in rekombiniranjem iz različnih virov pridobljenega genetskega materiala. Njeni začetki segajo v sedemdeseta leta prejšnjega stoletja, s hitrim razvojem pa je odprla človeku pot do nadzora nad genetiko in izražanjem genov. Tako nam danes omogoča tudi tvorbo zaporedij, ki se drugače v naravi ne pojavljajo (1).

Prvi, ki so se začeli ukvarjati z razvojem tega področja, so bili znanstveniki Paul Berg, Herbert W. Boyer in Stanley N. Cohen. Bergu je leta 1971 na univerzi v Stanfordu uspelo pripraviti prvo rekombinantno DNA z vključitvijo odseka DNA bakterijskega virusa lambda v DNA zapis virusa SV40 (2). Naslednji korak naprej je naredil Cohen na univerzi v Kaliforniji, ko mu je uspelo rDNA vnesti v bakterijsko gostiteljsko celico, kjer je ohranila svojo funkcijo in sposobnost podvojevanja. Kasneje sta Boyer in Cohen na skupni poti raziskav s področja rDNA dokazala, da lahko genetski material določenega organizma uspešno prenesemo v celico kateregakoli drugega organizma, kjer lahko še naprej ohranja svojo funkcijo, se podvaja in prepisuje (2).

Kljub polemikam in strahu ljudi pred kloniranjem, so se za tehnologijo rDNA začela zanimati tudi podjetja. Leta 1976 je pod okriljem Boyerja in mladega kapitalista Swansona nastal Genentech, prvo in še danes eno najbolj znanih podjetij, ki je začelo razvijati zdravila na osnovi tehnologije rDNA (2,4,5). Kmalu zatem je sledil nov preobrat, ko sta Boyer in Itakura jeseni leta 1977 uspela sesalski protein, somatostatin, izraziti v bakterijskih celicah (3). V tistem času je že nastopilo obdobje hitrega razvoja na tem področju, ki je privabilo delovanje številnih drugih znanstvenikov, tudi ob podpori večjih farmacevtskih korporacij. Leta 1982 je na tržišče prodrlo prvo zdravilo, zasnovano na tehnologiji rDNA. Za imenom Humulin se skriva rekombinantno pridobljen humani inzulin in je rezultat skupnega delovanja podjetij Eli Lilly and Company in Genentech (2). Sedaj vsako leto pride na tržišče vedno več novih bioloških zdravil, katerih trg raste dvakrat hitreje kot pri klasičnih zdravilih in naj bi med letoma 2009 in 2014 dosegel predvideno rast 41 milijard dolarjev (6,53).

1.2 EKSPRESIJSKI SISTEMI ZA PRIDOBIVANJE rP

Ekspresijski sistem za terapevtske proteine lahko predstavljajo tako prokariontske kot evkariontske celice. Izbira ekspresijskega sistema je odvisna predvsem od narave in izvora tarčnega proteina, zahtevane količine in seveda stroškov procesa. Običajno obstaja močna povezava med kompleksnostjo tarčnega proteina in ekspresijskim sistemom, ki je primeren za njegovo izražanje. Enostavne proteine lahko pridobivamo v manj zahtevnih ekspresijskih sistemih, npr. bakterijah, medtem ko za kompleksnejše proteine, ki zahtevajo tudi specifične posttranslacijske modifikacije, običajno potrebujemo zahtevnejši ekspresijski sistem z evkariontskimi celicami. (7,8)

1.2.1 BAKTERIJSKI EKSPRESIJSKI SISTEMI

Bakterijske celice predstavljajo enostaven in nezahteven ekspresijski sistem. Prednosti bakterij so predvsem dobra raziskanost, poznano genetsko zaporedje, nezahtevnost glede pogojev gojenja in nizki stroški proizvodnje proteinov. Protein so sposobne izražati v velikih količinah, hkrati pa so priznano varen organizem za izražanje rP. Največja slabost, ki omejuje uporabo bakterijskih celic kot ekspresijskih sistemov, je odsotnost posttranslacijskih modifikacij. Pogosto predstavljajo problem tudi proteini, ki se izražajo kot neaktivni in netopni agregati v inkluzijskih telescih. Sama izolacija in čiščenje v tem primeru sicer ne predstavljata večje ovire, je pa pogosto zahtevnejši korak renaturacije proteina v aktivno obliko. V določenih primerih lahko problem predstavlja tudi izločanje bakterijskih proteaz, ki protein cepijo in razgradijo, pri izolaciji pa moramo več pozornosti nameniti zagotavljanju odsotnosti ostankov celičnih nečistot v končnem produktu (7,8).

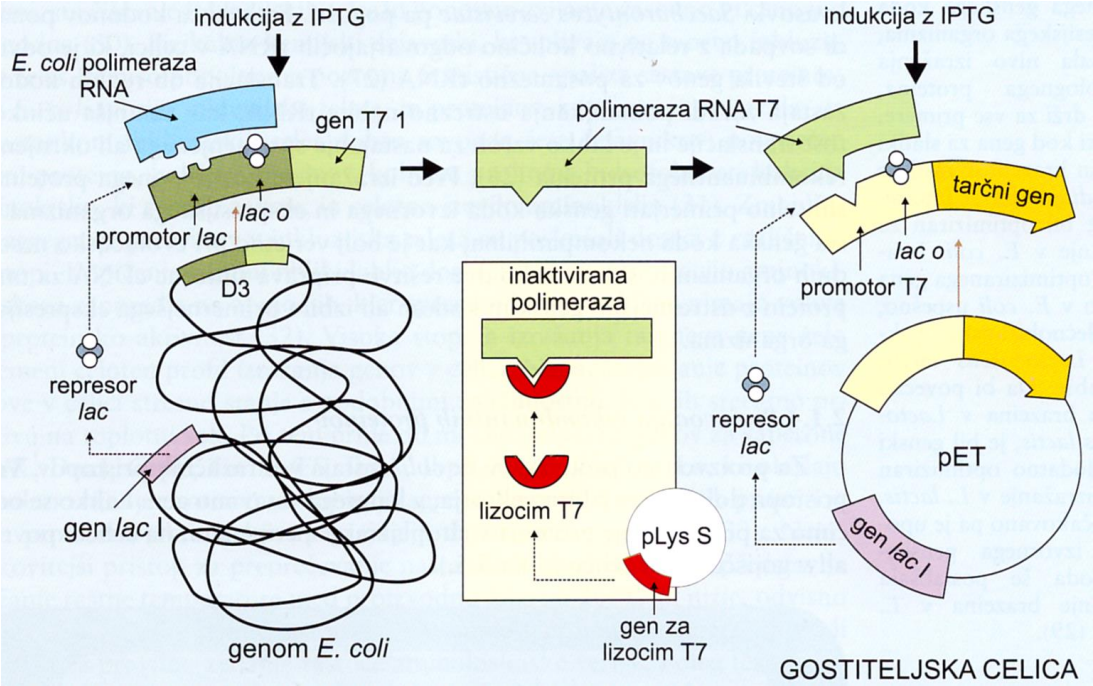
1.2.1.1 EKSPRESIJSKI SISTEM E. COLI

Gram negativna bakterija *Escherichia coli* je zaradi dobre raziskanosti in nezahtevnosti eden najpogosteje uporabljenih ekspresijskih sistemov za izražanje rhGH (17). Zanjo je značilna relativno visoka donosnost, saj lahko količina rekombinantnega proizvoda doseže tudi do 30% celotne količine celičnih proteinov. Čeprav so visoki donosi zaželeni pa lahko negativno vplivajo na celico, saj povzročijo stresno stanje, ki se lahko

kaže tudi v upočasnjeni rasti celic in zmanjšani produkciji proteina, največkrat pa v tvorbi netopnih inkluzijskih telesc (7).

Omejitev pri uporabi *E. coli* ekspresijskega sistema predstavlja predvsem odsotnost ustreznih posttranslacijskih sprememb, uporaba močnih promotorjev pa pogosto povzroči nepravilno zvijanje proteina in njegovo agregacijo v inkluzijska telesa (7). S tem bakterijska celica zmanjša intracelularni ozmotski tlak in uravnovesi energijski potencial. Protein v agregiranem stanju nima biološke aktivnosti, zato je pri čiščenju proteina potreben dodaten korak izolacije in naknadnega zvijanja proteina v aktivno obliko. V primeru terapevtskih proteinov ima nastajanje agregatov tudi svoje prednosti, saj agregacija ščiti protein pred razgradnjo z gostiteljevimi proteazami in degradacijo, struktura telesc pa je homogena in omogoča lažjo in učinkovitejšo izolacijo želenega proteina z manjšim številom potrebnih korakov čiščenja. Izgubo proteina zaradi nepopolne in neuspešne renaturacije pa lahko nadomestimo z zelo visoko stopnjo ekspresije (8).

Za rutinsko izražanje rhGH se pogosto uporablja sev *E. coli* BL21(DE3) s kromosomskim zapisom za polimerazo T7 (12). Prednosti seva sta možnost produkcije proteina v velikih količinah, izražanje je lažje inducirano in vodeno, dodatno prednost pa predstavljata deaktivirani proteazi lon in ompT z manjšo verjetnostjo degradacije proteina (11). Hkrati je sev kompatibilen s promotorskim sistemom T7 lacO, kar omogoča vstavitev gena za tarčni protein v enega od pET plazmidov s promotorjem T7 (slika 1-1). Izražanje polimeraze RNA T7 je pod nadzorom promotorja Lac, katerega lahko induciramo z dodatkom kemičnega induktorja izopropil-ß-D-tiogalaktopiranozida (IPTG) v gojišče (7,11,12). Polimeraza RNA T7, ki se veže na promotor T7 na plazmidu in prepiše vstavljeni gen, se začne izražati v velikih količinah, kar ima za posledico tudi veliko donosnost proizvodnje tarčnega proteina. Pogosto na gensko zaporedje uvedemo tudi histidinski rep za izražanje fuzijskega proteina, s čimer olajšamo kasnejše postopke izolacije in čiščenja proteina, vpliva na značilnosti proteina in njegovo biološko aktivnost pa običajno ni (11).



Slika 1-1: Prikaz sistema pET s ključnimi elementi. Ob indukciji z IPTG se lac represor umakne z lac promotorja in sproži prepisovanje gena za RNA T7 polimerazo. Polimeraza RNA T7 se veže na promotor T7 na plazmidu in prepiše vstavljeni gen za tarčni protein (41).

1.2.2 DRUGI EKSPRESIJSKI SISTEMI

1.2.2.1 GLIVE

Glivni ekspresijski sistemi pridobivajo na vrednosti predvsem zaradi enostavnosti gojenja in izražanja proteina v velikih količinah, hkrati pa jim dodano vrednost daje možnost enostavne glikozilacije proteina. Najpogosteje se za izražanje proteinov uporablja gliva kvasovka *Saccharomyces cerevisiae*, ki je že od nekdaj prisotna v procesih prehrambene predelave. Posledično je pridobila status GRAS in je danes priznana kot splošno varen ekspresijski sistem za proizvodnjo rP (7). Uveljavila se je tudi že na industrijskem nivoju, saj se uporablja pri proizvodnji zdravila z rhGH pod imenom Valtropin (17). Največjo slabost gliv kvasovk predstavljata možna hiperglikozilacija in nepravilna glikozilacija izraženega proteina. Hiperglikozilacija je manj izražena pri glivah vrst *Pichia pastoris* in *Hansenula polymorpha*, zato se slednji vedno bolj uveljavljata kot ekspresijska gostitelja v rutinskem izražanju rekombinantnih proteinov. (7).

1.2.2.2 TRANSGENE RASTLINE

Rastline postajajo vedno pogostejši ekspresijski sistem za proizvodnjo rP in nosijo velik potencial za proizvodnjo rekombinantnih produktov v večjem obsegu. Njihova prednost je predvsem nizka cena gojenja, velika donosnost in ustrezna varnost, problem pa lahko predstavlja genetska nestabilnost rastlin in vsebnost fenolnih oksidaz, ki lahko po izolaciji uničijo protein (9). Najprimernejše vrste za ekspresijo so rastline z visoko prehransko vrednostjo, kot so krompir, koruza, riž in druge rastline z jedilnimi semeni in plodovi (7).

1.2.2.3 BAKULOVIRUSNI SISTEM

Bakulovirusni sistemi se zaenkrat v industriji še niso uveljavili, kljub temu da je njihovo gojenje enostavno in omogočajo visok donos proteina. Nudijo nam tudi možnost kompleksnih posttranslacijskih modifikacij, vendar je vzorec glikozilacije drugačen od vzorca sesalskih celic, kar njihovo uporabo vseeno precej omejuje. Največjo oviro pa predstavlja proteoliza, katero lahko v procesu omejimo z inhibitorji in ustreznimi pogoji gojenja (7).

1.2.2.4 SESALSKE CELICE

Živalske celične linije so za izražanje kompleksnejših proteinov pogosto najprimernejše, saj so z vidika posttranslacijskih modifikacij najbolj podobne človeškim celicam in so se že uveljavile v farmacevtski proizvodnji. Najpogosteje se uporabljajo celice CHO ali ovarijske celice kitajskega hrčka in linija BHK ali ledvične celice mladiča hrčka. Glede pogojev gojenja so zahtevnejše in bolj občutljive, donosi so precej manjši in procesi gojenja so dragi. Zato se sesalske celice uporabljajo le za izražanje terapevtskih kompleksnih proteinov najvišjega cenovnega razreda (7).

1.2.2.5 TRANSGENE ŽIVALI

Vedno pogostejši so tudi primeri izražanja proteinov s pomočjo transgenih živalih. Običajno dosežemo izražanje proteina v mleku živali, iz katerega lahko protein izoliramo in očistimo. Prednosti te tehnologije sta relativno nizka cena in velike količine pridobljenega tarčnega proteina, problem pa predstavlja skrb za zdravje živali, saj lahko

nekateri proteini zatekajo nazaj v krvni obtok in pri njih povzročijo tudi resne neželene učinke (9).

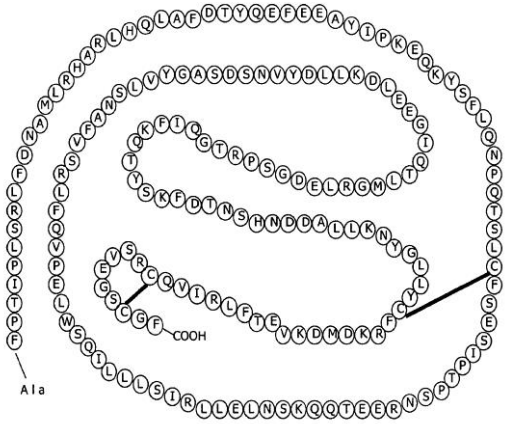
1.3 rhGH

Humani rastni hormon ali somatotropin je protein, ki so ga prvič izolirali in identificirali v poznih petdesetih letih prejšnjega stoletja. Pridobili so ga iz hipofiz trupel in odstranjenih žlez pacientov po hipofizektomiji. Klinična uporaba pit-hGH pri otrocih se je začela v letih 1957 in 1958 (17). Šele čez 20 let, leta 1979, je znanstvenikom prvič uspelo klonirati hGH (13,14) in uporaba rhGH pri ljudeh se je v literaturi prvič omenila leta 1982 (15). V tistem času so se pojavila tudi mnoga poročila o primerih Creutzfeld-Jakobove bolezni pri bolnikih, ki so prejemali pit-hGH, zato se je terapijo z njim postopno ukinjalo. Leta 1985 so pit-hGH dokončno odvzeli s tržišča ZDA (17,18).

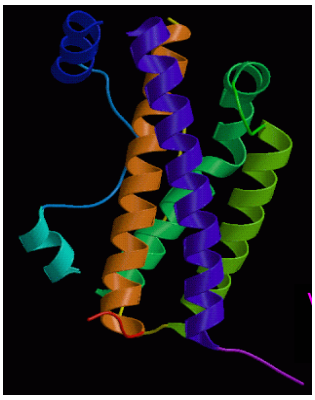
Prvi rhGH so pridobili v bakterijskih celicah *E. coli* in je, za razliko od endogenega hGH, vseboval dodatno metioninsko skupino na N-koncu. Danes lahko pridobimo rhGH z nativnim zaporedjem tako v bakterijskih kot v sesalskih ekspresijskih sistemih (17).

1.3.1 STRUKTURA hGH

Najpogostejša oblika hormona v telesu je globularni neglikoziliran enoverižni polipeptid, sestavljen iz 191 aminokislin (slika 1-2), z molekularno maso 22 kDa in izoelektrično točko okrog 5,3. V nativno strukturo dveh peptidnih zank (slika 1-3) so štiri vijačnice povezane z dvema disulfidnima mostovoma (18,19). Za biološko aktivnost je ta struktura izrednega pomena, saj naj bi prva in četrta vijačnica vsebovali primarna mesta za vezavo na hormonski receptor (slika 1-4) (16).

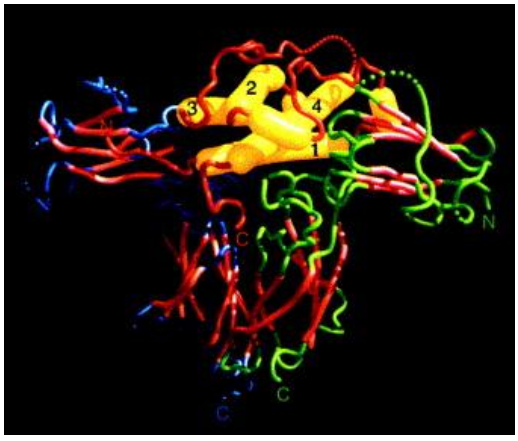


Slika 1-2: Primarna struktura humanega rastnega hormona (42).



Slika 1-3: Tridimenzionalna predstavitev humanega rastnega hormona. V različnih barvah so lepo vidne štiri osnovne vijačnice v strukturi (43).

Glikozilirana oblika hGH se v telesu pojavlja v približno 1% in ima delovanje, primerljivo z neglikozilirano obliko (17). Alternativno spajanje genov lahko vodi tudi v nastanek druge različice rastnega hormona, ki ne vsebuje ostankov, pomembnih za vezavo na receptor, in obsega 176 aminokislin z maso 20 kDa. Ta oblika se v obtoku pojavlja v 5 do 10%. Poleg dveh osnovnih oblik pa lahko v telesu nastaja še tretja različica hormona, in sicer v placenti v času pozne nosečnosti. Placentni hGH se od običajne različice razlikuje v 13 aminokislinah. (20,21).



Slika 1-4: Prikaz vezave molekule humanega rastnega hormona na dve molekuli receptorja. Vijačnica 1 in 4 sta ključnega pomena za vezavo na receptorja. Receptorski dimer nato sproži kaskado učinkov, značilnih za hGH (44).

Humani rastni hormon kodira skupek genov na kromosomu 17. Poznamo dva gena, ki nosita zapis za hGH pri človeku, hgH-N in hGH-V gen. hGH-N gen je odgovoren za sintezo običajnega hGH z 22 kDa in se izraža v hipofizi, medtem ko je gen hGH-V

odgovoren za sintezo placentne različice hGH pri nosečnicah v tretjem trimestru nosečnosti (17). Za ekspresijo gena za rastni hormon v hipofizi je ključnega pomena tkivno-specifični konstitutivni proteinski transkripcijski faktor (Pit-1 ali POUIFI) , ki se veže na dve mesti v promotorski regiji gena. Gen za GH se prepiše v mRNA, ki narekuje sintezo prehormona. Po odstranitvi signalnega peptida nastane končna oblika hormona in se shrani v granule. Glavna regulatorja sinteze GH sta specifični hipotalamični rastni-hormon sproščujoči hormon (GHRH), ki sintezo poveča, in somatostatin, hipotalamični inhibitor sinteze (21).

1.3.2 DELOVANJE hGH

hGH je hormon z izrazitim anaboličnim delovanjem. Je glavni regulatorni hormon za rast telesa in je vključen v metabolizem ogljikovih hidratov, maščob in proteinov. Večina njegovih učinkov se posreduje preko perifernih mediatorjev, somatomedinov (21). Najpomembnejši učinki hGH so rast kosti in hrustanca, diabetogeni in lipolitični učinki, povečana sinteza mišičnih proteinov, modulacija reprodukcije pri moških in ženskah, vzdrževanje, nadzor in modulacija funkcije limfocitov, vpliv na sproščanje in metabolizem inzulina, glukagona in tiroidnih hormonov in možni učinki na razvoj nevronskih tkiv (17).

Najmočnejši in najbolj specifičen je vpliv hGH na linearno rast telesa, ki je posledica direktnega učinka hormona na receptorje in indirektnega učinka preko stimulacije izločanja inzulinu podobnega rastnega dejavnika 1 (IGF-1). Stimulira vse vidike kostnega metabolizma hondrocitov, diferenciacijo prehondrocitov v hondrocite, njihovo proliferacijo in hipertrofijo ter privzem določenih aminokislin in sintezo proteinov. hGH poveča tudi aktivnost osteoklastov in osteoblastov ter v celoti poveča kostno maso in mineralno vsebnost kosti (21).

Visceralni organi, endokrine žleze, skeletne mišice, srce, koža in vezivno tkivo se odzivajo na hGH s hipertrofijo in hiperplazijo. Običajno se poveča tudi funkcionalna kapaciteta organa. hGH poveča renalni plazemski pretok, glomerulno filtracijo, srčni iztis in jetrni očistek mnogih substanc. Poveča mišice in njihovo kontraktilnost, kar je tudi razlog pogoste zlorabe pripravkov s hGH. hGH tudi senzitizira gonade na luteinizirajoči hormon in folikle stimulirajoči hormon, in tako promovira pubertetno spolno dozorevanje (20).

1.3.3 TERAPEVTSKA UPORABA IN INDIKACIJE rhGH

Klinična uporaba rhGH je usmerjena predvsem na dve glavni področji bioloških učinkov hGH, pospeševanje linearne rasti in modulacijo metabolizma. Indikacije za pospeševanje rasti vključujejo zdravljenje nezadostne učinkovitosti rastnega hormona pri otrocih, zaostale rasti otrok s kronično ledvično odpovedjo, manjše rasti pri Prader-Willijevem sindromu in pri Turnerjevem sindromu. rhGH je odobren tudi za dolgotrajno nadomestno terapijo pri odraslih s pomanjkanjem GH z nastopom bolezni v otroštvu ali v odrasli dobi. Prav tako pa se hGH zaradi metabolnih učinkov uporablja pri kaheksiji bolnikov z aidsom (17,18).

Dodatno se danes rhGH pogosto uporablja tudi pri indikacijah, ki niso navedene v navodilu za uporabo. Tako se ga veliko zlorabi predvsem v prepovedane namene, npr. za ohranjanje mladosti (18), zloraba pa je pogosta tudi pri doseganju želene hipertrofije mišic.

1.3.4 IZRAŽANJE V EKSPRESIJSKIH SISTEMIH

Vsi rhGH so danes pridobljeni z izražanjem v celicah *E. coli*, z izjemo rhGH v zdravilu Serostim oz. Saizen, katerega pridobivajo v sesalskih celičnih linijah, in zdravila Valtropin, ki je pridobljen v glivnih celicah *S. cerevisiae* (17).

Z direktnim citoplazmatskim izražanjem rhGH v celicah *E. coli* pridobimo met-rhGH z dodano metioninsko skupino na N-koncu. Nativno zaporedje se iz met-rhGH lahko pridobi s pomočjo encimske cepitve med postopki izolacije in češčenja. Drugi način izražanja v *E. coli* celicah omogoča pridobivanje rhGH z nativnim zaporedjem. V tem primeru se rhGH izraža v periplazmatski prostor v obliki teles, iz katerih je nato potrebna izolacija proteina in nadaljnje čiščenje (17).

Za pridobivanje rhGH v sesalskih celicah se uporablja glodalske celice C-127. Izražen protein se prenaša preko endoplazmatskega retikuluma in se izloča direktno v medij za gojenje. Izolacija proteina v tem primeru poteka kar neposredno iz medija in ne iz celic ekspresijskega sistema (17,18).

1.3.5 BIOLOŠKA ZDRAVILA Z rhGH

Biološka zdravila delimo na tradicionalna biološka zdravila in sodobna biološka zdravila. Tradicionalna biološka zdravila predstavljajo predvsem zdravila, pridobljena z

izolacijo iz rastlin, živali in človeške krvi, in zdravila, pridobljena s klasično biotehnologijo, kamor sodijo antibiotiki in steroidi. Sodobna biološka zdravila pa so pridobljena izključno s tehnologijo rDNA (23).

hGH se kot zdravilo uporablja že vrsto let. Najprej se je začel uporabljati kot pit-hGH za stimulacijo rasti pri hipopituitarnih otrocih, vendar so ga zaradi varnosti in potencialnih okužb s prioni leta 1985 umaknili s tržišča (19). V ZDA ga je nadomestil rhGH znan kot Protropin proizvajalca Genentech (18,22). Kmalu so sledili tudi drugi pripravki z rhGH, kot so Humatrope, Norditropin, Genotropin in drugi. Patent za rhGH v terapiji juvenilne pritlikavosti je v EU potekel leta 2002, v Ameriki pa naslednje leto, leta 2003 (18,22,23). Zdravila z rhGH, ki so danes na tržišču, so prikazana v tabeli 1-I.

Tabela 1-I: Zdravila z rhGH s pridobljenim dovoljenjem za promet.

Tip rhGH	**Ekspresijski sistem**	**Ime zdravila**	**Farmacevtska oblika**	**Imetnik dovoljenja za promet**
met-rhGH	*E. coli*	Protropin	Liofiliziran prašek in vehikel za injiciranje	Genentech, Inc.
rhGH z nativnim zaporedjem	*E. coli*	Genotropin	Liofiliziran prašek in vehikel za injiciranje	Pharmacia Corp. (sedaj Pfizer)
		Norditropin	Liofiliziran prašek in vehikel za injiciranje	Novo Nordisk
		Nutropin	Liofiliziran prašek in vehikel za injiciranje	Genentech, Inc.
		Humatrope	Liofiliziran prašek in vehikel za injiciranje	Eli Lilly
		Bio-Tropin/Tev-Tropin	Liofiliziran prašek in vehikel za injiciranje	Bio-Technology General Corp.
		Omnitrope	Liofiliziran prašek in vehikel za injiciranje	Sandoz (Novartis)
	S. cerevisiae	Valtropin	Liofiliziran prašek in vehikel za injiciranje	bioPartners GmbH
	Sesalske celice (linija C127)	Serostim	Liofiliziran prašek in vehikel za injiciranje	Serono Laboratories
		Saizen	Liofiliziran prašek	Serono Laboratories

			in vehikel za injiciranje	

Ravno zaradi zgodovinske obravnave hGH kot klasičnega zdravila, izoliranega iz žlez hipofiz, FDA še danes rhGH ne uvršča med biološka zdravila. Zanimivo je tudi, da FDA in EMA pripravke rhGH, kljub njihovi podobnosti v zgradbi in drugih dejavnikih, ne obravnavata kot generike in je do sedaj moralo vsako zdravilo z rhGH imeti opravljene svoje klinične študije. Izjema je le zdravilo Omnitrope, ki ga je FDA leta 2006 odobrila kot biološko primerljivo zdravilo (18). Biološka zdravila so namreč na področju generikov posebnost, saj je že najmanjša sprememba v procesu proizvodnje lahko vzrok za spremembo v zgradbi učinkovine. Zato se je v razvitem svetu uveljavila nova skupina bioloških zdravil z imenom Biološko primerljiva zdravila ali Biosimilars. Ta zdravila morajo prav tako imeti opravljene klinične raziskave, ki potrdijo njihovo varnost, učinkovitost in kakovost, vendar pa te raziskave niso tako obsežne kot pri inovativnih bioloških zdravilih (23).

1.4 SODOBNI PRISTOPI PROTEINSKEGA NAČRTOVANJA

Proteinsko načrtovanje ima poleg izbire primernega ekspresijskega sistema velik pomen pri pripravi proteinskih učinkovin. Različni načini modifikacije strukture omogočajo pripravo proteinov z izboljšanimi lastnostmi, ki posredno vplivajo tako na procese pridobivanja proteina kot na terapevtsko uporabo končnega izdelka. S skrbnim in natančnim proteinskim načrtovanjem moramo zagotoviti, da ostane tarčni protein stabilen, ima visoko terapevtsko vrednost in nizko stopnjo toksičnosti, ter da ima primerne farmacevtske lastnosti, kot so npr. ustrezna porazdelitev po telesu, primeren čas prisotnosti proteina na mestu delovanja, ustrezna pogostnost odmerjanja, varnost in učinkovitost proteina (24). Hkrati lahko s spreminjanjem lastnosti proteina vplivamo tudi na donosnost izražanja in na uspešnost izolacije in čiščenja končnega produkta.

Že majhne spremembe v strukturi proteina lahko pomenijo razliko v farmakodinamiki in farmakokinetiki proteinskega zdravila. Najpogostejši pristopi za načrtovanje proteinov s specifičnimi lastnostmi so zamenjava, delecija ali insercija posamezne aminokisline. Točkaste mutacije lahko vplivajo tudi na vzorec glikozilacije in

spremenijo končno konformacijo proteina, kar ima lahko velik vpliv na očistek proteinske učinkovine in na njeno interakcijo s tarčnim receptorjem. Prav tako lahko s točkastimi mutacijami, usmerjenimi na specifično aminokislino v strukturi, natančneje in na molekularnem nivoju preučimo odnos med tridimenzionalno strukturo proteina in njegovo funkcijo. Čeprav ima modifikacija proteina lahko prvenstveno vpliv na fizikalnokemijske lastnosti proteina in posledično na farmakološko aktivnost, so pogosti tudi primeri, ko ta sprememba hkrati vpliva tudi na farmakokinetiko končnega zdravila (25,26).

V raziskovalni nalogi smo pri dveh analogih uporabili pristop zamenjave aminokisline, ki bi nam omogočil lažjo izolacijo in čiščenje proteina. V strukturo smo uvedli histidinske ostanke, ki so sposobni tvorbe koordinativne vezi z anioni. S tem smo omogočili močnejšo vezavo proteina na kolono pri čiščenju z metodo IMAC (27), hkrati pa smo povečali možnosti vgradnje analoga v proteinske strukture, pripravljene na osnovi samozdruževanja in koordinativne vezi (28).

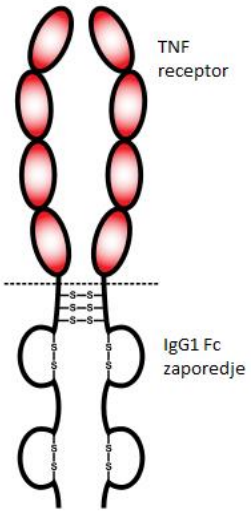
Ena od pogostih modifikacij proteinske strukture je tudi pegilacija. Običajni razpolovni časi za proteinske učinkovine so kratki, zato je potrebno pogosto odmerjanje ali celo neprekinjena infuzija za vzdrževanje ustrezne količine zdravila v plazmi. Pegilacija proteina ali pripenjanje PEG (monometoksi polietilen glikol) polimerov na strukturo je eden od pristopov za podaljšanje delovanja biotehnološkega zdravila. Višja stopnja pegilacije proteina v večji meri zmanjša izločanje proteina in spremeni volumen distribucije zdravila. Pegiliran protein ima tako razpolovni čas lahko precej daljši od osnovnega proteina brez uvedenih sprememb v strukturi (26).

Izključno z namenom lažje izolacije končnih proteinov in izboljšanja topnosti se proteinski strukturi pogosto pripne afinitetno zaporedje, ki zelo redko vpliva na biološko aktivnost proteina (11). Najpogosteje se uporablja histidinski rep v dolžini šestih histidinov na N-koncu, ki omogoča lažje čiščenje z metodo IMAC, saj se rep močneje veže na kolono in protein lažje ločimo od ostalih nečistot (27). Zaradi svoje majhnosti rep skoraj ne vpliva na topnost proteina, prav tako pa ne moti tridimenzionalne strukture proteina in omogoči ohranitev njegove biološke aktivnosti (11). Sicer so v uporabi tudi druga zaporedja, ki pa niso vedno tako nevtralna kot majhen oligohistidinski rep in lahko imajo tudi večje vplive na strukturo proteina (11).

1.4.1 FUZIJSKI PROTEINI

Fuzijski proteini so še eden od pristopov proteinskega inženiringa, katerega cilj je doseči specifičnost in selektivnost vezave efektorske molekule, ki se običajno porazdeljuje tudi nespecifično do drugih netarčnih mest (30). Zelo uporabni so se izkazali tudi pri izboljšanju ekspresije genov za tarčni protein, pripravo molekul z aditivnimi biološkimi aktivnostmi in pri ocenjevanju odnosa med strukturo in delovanjem posameznega proteina (25).

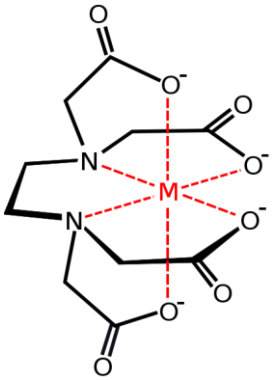
Osnova za sintezo fuzijskega proteina je združevanje kodirajočega zaporedja genov za en protein z zaporedjem za drugi protein s pomočjo ligacije. Fuzijski proteini lahko vsebujejo le posamezne dele zaporedij ali pa celotna zaporedja dveh različnih proteinov. Prvotno sta fuzijske proteine sestavljala protitelo z minimalno vezavno domeno in citotoksičen efektor (30). Boljše poznavanje bolezenskih procesov in za proces pomembnih molekul, kot so ligandi, receptorji, označevalci, in splošen napredek na področju biotehnologije, so omogočili pripravo fuzijskih proteinov z efektorskimi domenami in domenami, odgovornimi za specifično prepoznavanje tarčnih molekul. Primer zdravila s fuzijskim proteinom je Etanercept (slika 1-5), ki vsebuje TNF receptor II kot zaporedje za prepoznavanje tarče TNF-α in IgG1 Fc zaporedje kot efektorsko domeno. Zaradi prepoznavanja Fc zaporedij in vezave fuzijskega proteina na IgG molekule, se v organizmu močno podaljša razpolovni čas TNF receptorjev II (30).



Slika 1-5: Struktura Etanercepta kot primera zdravila s fuzijskim proteinom. S Fc regijo se učinkovina veže na IgG molekule, kar omogoči daljši razpolovni čas, ekstracelularna domena TNF receptorja pa veže molekule TNF-α (45).

1.5 KOORDINATIVNA VEZAVA

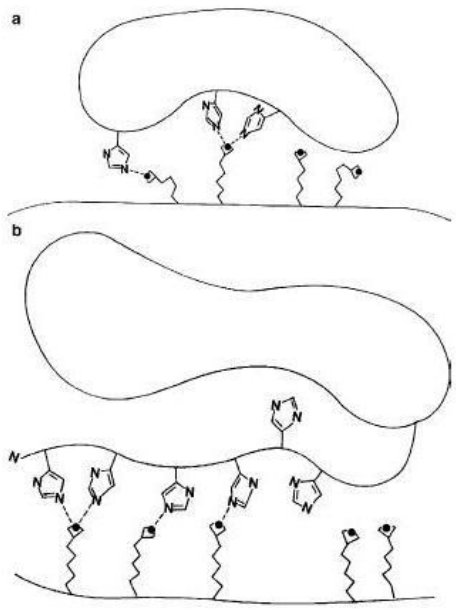
Izraz koordinativna ali semipolarna vez označuje kovalentno vez v koordinacijskih spojinah med centralnim atomom ali ionom in kelatorskim ligandom (slika 1-6). Posebnost koordinativne vezi je, da je ligand donor celotnega elektronskega para in je t.i. Lewisova baza, medtem ko je centralni ion akceptor elektronskega para ali Lewisova kislina (29).



Slika 1-6: Primer koordinativnih vezi med molekulo EDTA – kelatorjem, in kovinskim ionom (46).

1.5.1 KOORDINATIVNA VEZ IN IMAC

Afinitetna kromatografija z imobiliziranimi kovinskimi ioni ali IMAC je separacijska tehnika, pri kateri izkoriščamo koordinativno vezavo med na koloni imobiliziranim ionom in izpostavljenimi aminokislinskimi ostanki na površini proteina (slika 1-7) (27). Čeprav so za čiščenje proteinov v uporabi različne kromatografske metode, je IMAC danes najpogostejša tehnika izolacije, ki nam omogoča tudi pridobivanje čistega proteina v eni stopnji. Kljub temu da ni visoko specifična, ima kar nekaj prednosti pred ostalimi biospecifičnimi kromatografskimi tehnikami. Glavne prednosti so predvsem možnost večjega nanosa proteina, stabilnost liganda, blagi elucijski pogoji, enostavna regeneracija in nizka cena (27).



Slika 1-7: Prikaz vezave proteina na koloni IMAC preko skupin histidina, ki so lahko izpostavljeni na površini proteina (a) ali pa uvedeni v strukturo s histidinskimi podaljški (b) (27).

Eversonu in Parkerju (31) je leta 1974 prvič uspelo uporabiti imobilizacijo kelirajočih spojin za ločevanje metaloproteinov. Tehniko sta širšim krogom približala Porath (32) in Sulkowski (33) in ji postavila tudi njene osnovne temelje. Sprva se je IMAC uporabljala le za ločevanje proteinov, ki so imeli naravno izpostavljene histidinske ostanke. S svojim raziskovalnim delom je raziskovalcu Hochuli in sodelavcem (34) uspelo predstaviti možnost čiščenja rP z uvedenimi histidini na C- ali N- koncu zaporedja. Številni histidinski ostanki so pri naravnih proteinih redki, zato lahko dodatno uvedeni histidinski repi omogočijo pridobivanje tudi do 90% čistih proteinov z enostopenjsko izolacijo IMAC (27).

Pri izolaciji IMAC se najpogosteje uporabljajo imobilizirani kovinski ioni Cu(II), Ni(II), Zn(II), Co(II), Fe(III), ki pretežno vežejo histidinske ostanke v proteinu (27). Zato je toliko bolj smiselna uporaba rekombinantnih proteinov z dodatno uvedenimi histidinskimi zaporedji, ki izboljšajo vezavo na kolono. K vezavi proteinov sicer pripomorejo tudi prosti cisteinski ostanki, ki pa se pojavljalo zelo redko v ustreznem reduciranem stanju, in aromatske stranske verige Trp, Phe in Tyr, vendar tudi te le, če so v bližini dostopnih histidinskih ostankov (27).

Čiščenje na kolonah IMAC poteka v pogojih visoke ionske jakosti, saj se tako vzdržuje topnost in stabilnost proteinov (11). Na kolono se nanese vzorec proteina v fosfatnem pufru s pH 8,0, pri katerem so imidazolni dušiki v stranski verigi histidinov v

neprotonirani obliki. Neprotonirana oblika imidazolnih dušikov je namreč ključna za vezavo proteina na nosilec (27). Pufer ima običajno ionsko jakost med 300-500 mM NaCl, ki preprečuje nastajanje nespecifičnih elektrostatskih interakcij (11,27). Za elucijo se uporabljajo pufri z dodanimi nižjimi koncentracijami imidazola, saj ta s proteini tekmuje za vezavna mesta na stacionarni fazi in tako povzroči elucijo kontaminantov in šibkeje vezanih proteinov, ne da bi vplival na vezavo tarčnega proteina. Za elucijo tarčnega proteina pa se uporablja pufer z višjo koncentracijo imidazola (11).

Eden od problemov, ki se pojavljajo pri IMAC izolaciji rP, je toksičnost kovinskih ionov. Pri vsaki izolaciji namreč lahko pride do odtekanja na nosilcu vezanih ionov v vzorec. Za čiščenje terapevtskih proteinov je tako kljub šibkejši vezavi najprimernejši ion Zn^{2+}, saj so nikljevi ioni dokazano kancerogeni in so škodljivi kljub majhnim količinam, ki lahko odtečejo v proteinski vzorec (27,35).

1.5.2 PROTEINSKE STRUKTURE NA OSNOVI KOORDINATIVNE VEZI

Proteinske učinkovine zaradi svojih lastnosti zahtevajo parenteralno aplikacijo in redno injiciranje določenih odmerkov za vzdrževanje ustrezne koncentracije proteina v plazmi. Ravno način in pogostnost aplikacije sta glavna problema pri zagotavljanju kompliance bolnikov. Razvoj na področju biofarmacevtike se tako vedno bolj usmerja tudi v pripravo drugih farmacevtskih oblik, ki bi omogočile lažjo aplikacijo zdravila ali pa zmanjšale pogostnost odmerjanja.

Nanometrske strukture so v zadnjem času zelo pridobile na pomenu, saj so ena od alternativ, ki po parenteralni aplikaciji lahko izboljšajo topnost učinkovin, vplivajo na njihovo biološko uporabnost in porazdelitev, omogočijo ciljano delovanje in spremenijo profil sproščanja (36). Ob primerni velikosti in lastnostih pa bi lahko prišle v poštev tudi kot alternativna oblika za pulmonalno ali intranazalno aplikacijo.

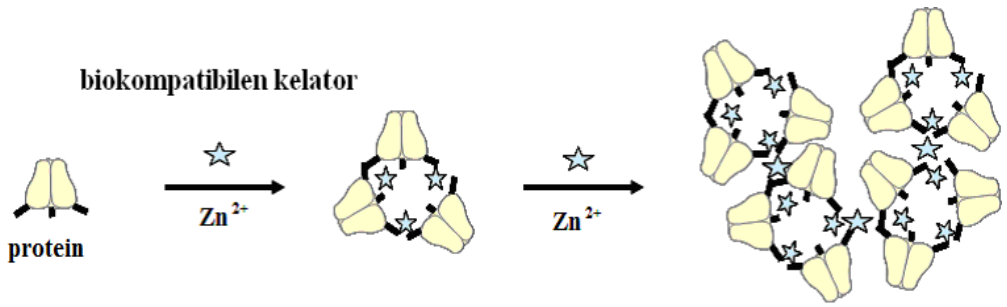
V literaturi lahko zasledimo podatke o proteinskih nanodelcih, pripravljenih na osnovi koordinativnih vezi. Osnova za nastanek nanodelcev je agregacija proteina na površini trdnega delca, katero lahko dosežemo na dva načina: inorganske nanodelce predhodno prevlečemo s kovino prehoda ali pa uporabimo kelatorje za pripravo delcev s samozdruževanjem (37).

Hribar in sodelavci so pripravili oba tipa nanodelcev na primeru modelnih, specifično načrtovanih analogih proteina TNF-α. Prvi analog je imel dvojno histidinsko mutacijo,

druga dva analoga pa sta imela na N-konec pripet različno dolg histidinski rep (28,37,38). Prvo obliko, cink-fosfatne delce, so pripravili z obarjalno reakcijo in nanje uspešno vezali analoge TNF-α (28,37).

Drugo obliko nanostruktur, delce s samozdruževanjem, so uspešno pripravili s pomočjo dveh kelatorjev, raztopine 1,4,8,11-tetraazaciklotetradekan-1,4,8,11-tetraocetne kisline (v nadaljevanju TETA) in fitinske kisline. Oba kelatorja sta sposobna vezave cinkovih ionov, preko katerih so nato s koordinativno vezjo vezali protein (28,37). Za delce, nastale s samozdruževanjem, je značilna vezava s histidini bogatih proteinov in kelatorskih molekul ob prisotnosti ionov v rahlo bazičnem ali nevtralnem pH (slika 1-8). S količino in hitrostjo dodajanja uporabljenih ionov lahko nadzorujemo velikost nastalih delcev, ki pa je odvisna tudi od količine in tipa kelatorske molekule, saj je običajno kelatorska molekula sposobna vezave več ionov, na katere se preko histidinskih ostankov koordinativno vežejo proteini.

Zaradi toksičnosti drugih ionov kovin prehoda je za tvorbo koordinativne vezi pri terapevtskih proteinih primerna predvsem uporaba cinkovih ionov, kljub šibkejši interakciji med proteinom in ionom (28).



Slika 1-8: Pristop priprave struktur s samozdruževanjem proteinskih molekul (28).

2 NAMEN DELA

Humani rastni hormon je eden pomembnejših proteinov v procesu rasti in razvoja organizma. Njegovo pomanjkanje ali nezadostno izločanje lahko privede do patoloških stanj tako pri otrocih v obdobju rasti kot pri odraslih. Danes lahko nezadostno količino v organizmu uspešno nadomeščamo z biološkimi zdravili z rhGH. Namen našega dela je pripraviti tri analoge rhGH, katerim bi s pomočjo proteinskega načrtovanja v strukturo vnesli določene spremembe. Vsi trije analogi naj bi obdržali svojo biološko aktivnost, saj bodo uvedene spremembe služile predvsem lažji izolaciji in čiščenju izraženega proteina.

Poleg lažje izolacije in čiščenja pa bodo uvedene strukturne spremembe omogočile tudi pripravo proteinskih struktur na osnovi koordinativne vezi. Te proteinske strukture bi lahko kot farmacevtska oblika zdravila ob ustrezni velikosti omogočale nadzorovano sproščanje proteina po aplikaciji in tako podaljšale intervale odmerjanja v terapiji z rhGH, ali pa bi se uporabljale pri alternativnih načinih aplikacije.

Osnovni hipotezi:

Na osnovi proteinskega načrtovanja bodo pripravljeni analogi rhGH s histidinskimi ostanki ohranili biološko aktivnost kljub strukturnim spremembam, uvedenim z namenom lažje izolacije in čiščenja proteina. Hkrati se bodo analogi lahko vezali v proteinske strukture na osnovi koordinativne vezi med uvedenimi histidini in ustreznim kelatorjem ob prisotnosti kovinskega iona.

Hipotezi bomo preverili tako, da bomo:

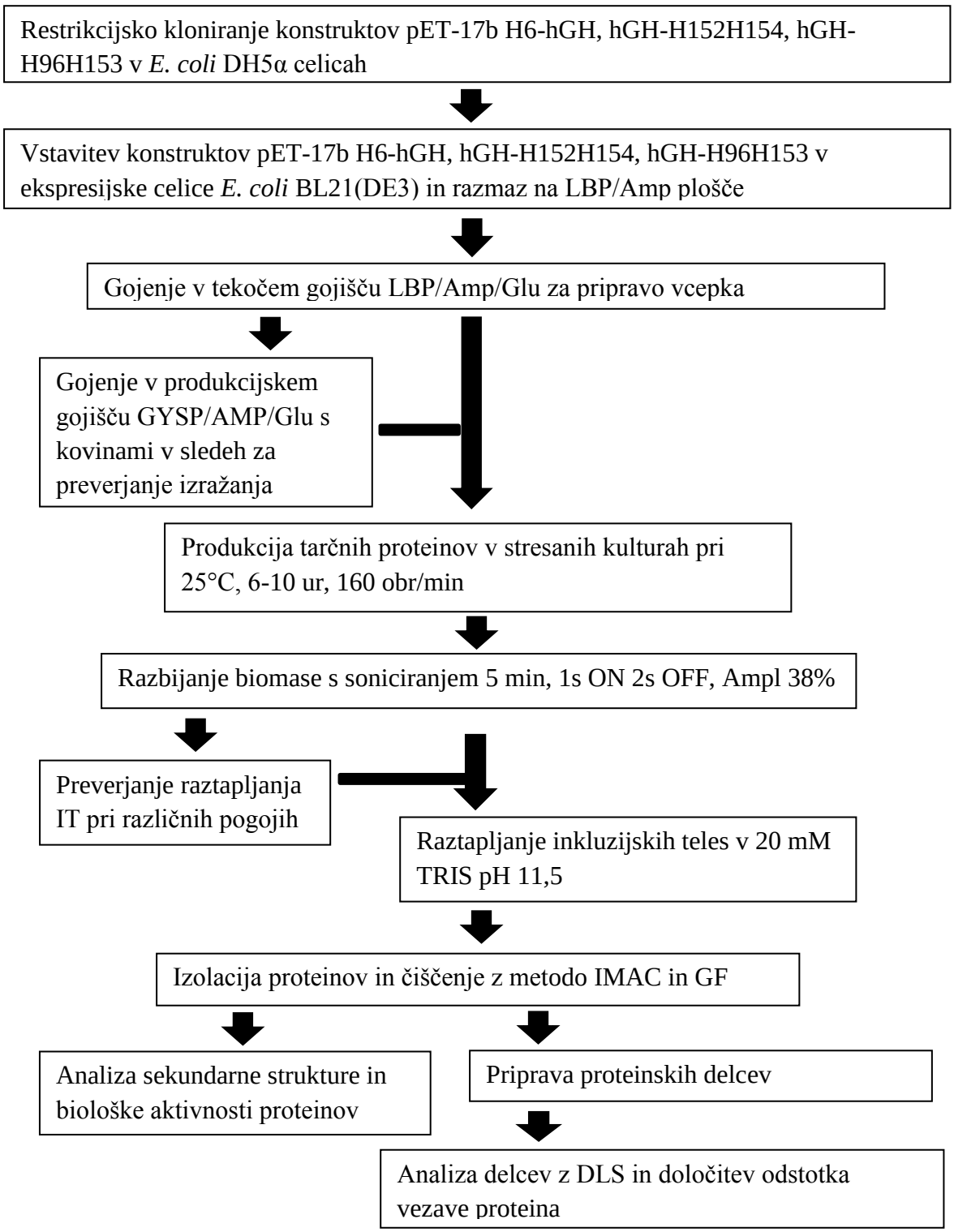
- vse tri analoge rhGH z uvedenimi spremembami v strukturi izrazili v sevu *E. coli* BL21(DE3)
- proteine izolirali iz inkluzijskih teles in jih očistili z metodo IMAC ter po potrebi še z gelsko filtracijo
- preverili ohranjenost sekundarne strukture s pomočjo cirkularnega dikroizma
- preverili biološko aktivnost pripravljenih analogov v primerjavi z rhGH
- pripravili proteinske strukture z molekulami analogov na osnovi koordinativne vezi s kelatorjema TETA in fitinska kislina
- preverili uspešnost vezave proteinskih molekul v proteinske strukture

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA

Raziskovalno delo je potekalo v več korakih, ki so pregledno prikazani na shemi 1.

Shema 1: Prikaz poteka dela po zaporednih korakih.



3.2 MATERIALI

3.2.1 BIOLOŠKI MATERIAL

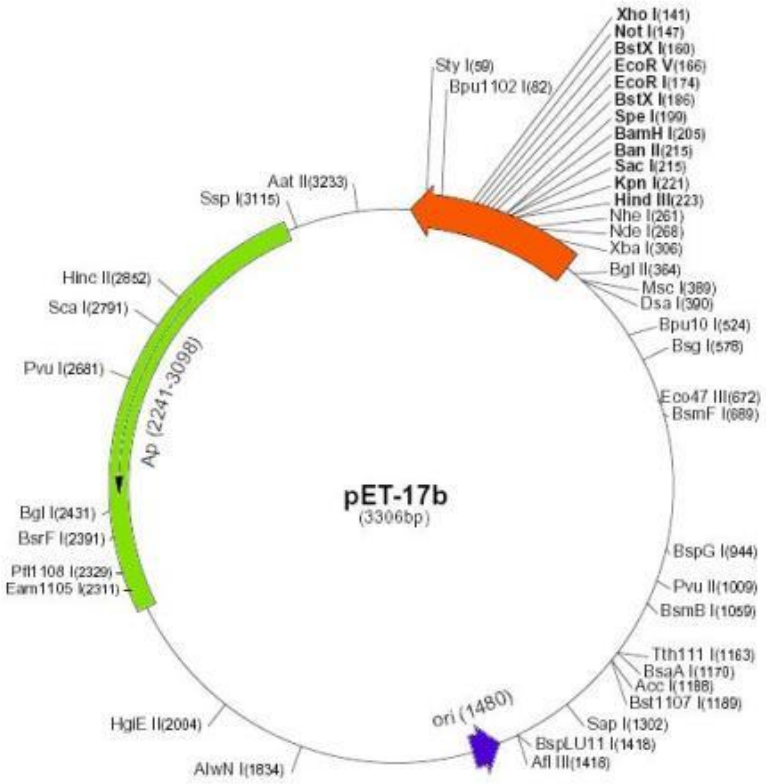
Za pridobivanje analogov rhGH smo uporabili sintetske gene hGH (Genscript), vstavljene v NdeI/EcoRI mesto znotraj pUC 57 plazmida:

- **Gene-1**: H6-hGH: 6 x His rep dodan na N-konec proteina (v nadaljevanju **gene 1**)
- **Gene-2**: hGH-H152H154: 2 His uvedena v strukturo: N152H in D154H (v nadaljevanju **gene 2**)
- **Gene-3**: hGH-H96H153: 2 His uvedena v strukturo: V96H in D153H (v nadaljevanju **gene 3**)

Na 5-konec je dodano NdeI restrikcijsko mesto, na 3-konec pa EcoRI restrikcijsko mesto. Narejena je bila tudi optimizacija gena za izražanje v *E. coli*.

3.2.1.1 VEKTOR pET-17b

Za produkcijo rhGH smo uporabili ekspresijski vektor pET-17b (slika 3-1) proizvajalca Novagen. Vektor vsebuje zaporedje za rezistenco na ampicilin, s katerim smo določali uspešno transformirane bakterijske kolonije po dodatku antibiotika v gojišča za gojenje bakterijskih kultur (12).



Slika 3-1: Prikaz vektorja pET-17b. Na levi je prikazana regija za rezistenco ampicilin – Ap (47).

3.2.1.2 BAKTERIJSKI SEVI

Za kloniranje genov smo uporabili bakterijski sev *Escherichia coli* DH5α (Novagen), za ekspresijo rP pa bakterijski sev *Escherichia coli* BL21(DE3).

3.2.2 PROTITELESA

Protitelesa, ki smo jih uporabili za potrjevanje prisotnosti analogov, so predstavljena v tabeli 3-I.

Tabela 3-I: Uporabljena protitelesa.

PRIMARNA PROTITELESA	Primarna protitelesa proti histidinskim ostankom: - Tetra-His mouse Ab BSA free Qiagen GmbH - Tetra-His mouse monoclonal IgG Quiagen GmbH 7.11.2011

	Primarna protitelesa proti hGH: - IgG Rabbit Polyclonal to Human Growth Hormone Agrenvec S.L. 18.11.2011
SEKUNDARNA PROTITELESA	Sekundarna protitelesa proti mišjim IgG: - Anti-Mouse IgG Whole molecule peroxidase conjugated, produced in rabbit SIGMA 9.1.2009 Sekundarna protitelesa proti kunčjim IgG: - Goat Anti-Rabbit IgG Peroxidase conjugate SIGMA 3.2.2004

3.2.3 VODA

Za pripravo raztopin in pufrov smo uporabili prečiščeno vodo (v nadaljevanju MQ voda), katero smo pridobili z napravo Millipore MilliQ A10 Synthesis. Izjemoma, kjer je posebej navedeno, smo uporabili tudi demineralizirano vodo, pridobljeno s postopkom reverzne osmoze s pomočjo naprave Millipore RiOs16 (v nadaljevanju demi voda ali dH_2O).

3.2.4 GOJIŠČA ZA GOJENJE SEVOV *E. COLI* V STRESANIH KULTURAH

V tabeli 3-II so predstavljena gojišča za gojenje stresanih kultur in njihova sestava.

Tabela 3-II: Gojišča za gojenje v stresanih kulturah.

gojišče Luria Bertani - LBP (1 L)	10 g fiton (Becton Dickinson) 5 g kvasni ekstrakt (Becton Dickinson, Difco) 10 g NaCl dH_20 do 1L
LBP/Amp/Glu (20mL)	100µL 50% glukoze 20µL ampicilina (c = 100 mg/mL) LBP do 20 mL
LBP/Amp (20mL)	20µL ampicilina LBP do 20 mL
GYSP (1L)	20 g fiton 5 g kvasni ekstrakt 10 g NaCl

	dH_2O do 1 L
GYSP/Amp/Glu (20 mL)	400 µL 50% glukoze 200 µL elementi v sledovih (tabela 3-III) 20µL ampicilina (c = 100 mg/mL) GYSP do 20 mL
GYSP/Amp (20 mL)	200 µL elementi v sledovih (tabela 3-III) 20µL ampicilina (c = 100 mg/mL) GYSP do 20 mL

Tabela 3-III: Sestava vodne raztopine elementov v sledovih, katero smo dodajali GYSP gojiščem.

Kemikalija	**Koncentracija**
$FeSO_4$ x $7H_2O$	4 g/l
$CaCl_2$ x $2H_2O$	4 g/l
$MnSO_4$ x nH_2O	1 g/l
$AlCl_3$ x $6H_2O$	1 g/l
$CoCl_2$ x $6H_2O$	0,4 g/l
$ZnSO_4$ x $7H_2O$	0,2 g/l
$NaMoO_4$ x $2H_2O$	0,2 g/l
$CuSO_4$ x $5H_2O$	0,1 g/l
H_3BO_3	0,05 g/l

Najprej smo pripravili osnovni gojišči LBP in GYSP. Sestavine smo zatehtali v primerno čašo, dodali približno polovico volumna dH_2O in premešali na magnetnem mešalu. Na koncu smo dodali vodo do končnega volumna in gojišče avtoklavirali. Dodatke smo gojišču dodajali aseptično tik pred uporabo.

V gojišča LBP smo ob pripravi vcepka običajno dodali do 25% inokuluma (5 ml inokuluma v 20 ml medija) ali 1 kolonijo, v produkcijska GYSP gojišča pa do 5% inokuluma (1 ml inokuluma v 20 ml medija) glede na gojišče.

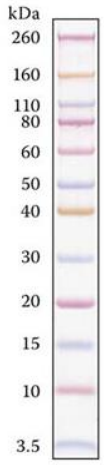
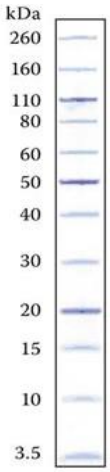
3.2.5 KEMIKALIJE

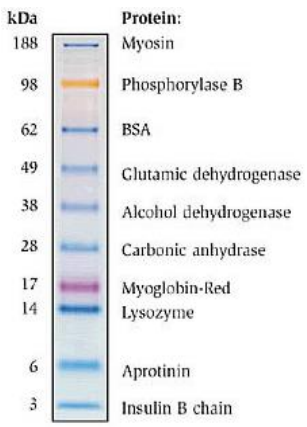
Vse uporabljene kemikalije so analitske stopnje čistoče in kupljene od proizvajalca Sigma, razen izjemoma, kjer je to posebej navedeno.

3.2.6 PROTEINSKI STANDARDI

Proteinski standardi, ki smo jih uporabili pri analizah vzorcev, so našteti in prikazani v tabeli 3-IV.

Tabela 3-IV: Proteinski standardi.

Standard	**Prikaz standarda na elektroforeznem gelu**
Novex Sharp Pre-stained Protein Standard (Invitrogen): standard molekulskih mas za SDS-PAGE (51), nanos 5-7 µl	
Novex Sharp Un-stained Protein Standard (Invitrogen): standard molekulskih mas za SDS-PAGE (51), nanos 5-7 µl	

SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen): standard molekulskih mas za Western prenos (52), nanos 5 µl	

3.2.7 PUFRI

Vse pufre (tabela 3-V) smo pripravljali z MQ vodo in jih filtrirali s sistemom Millivac Vacuum Pump XF54.

Tabela 3-V: Pripravljeni in uporabljeni pufri.

PUFER	**SESTAVA**
Pufer za spiranje	10 mM TRIS/HCl pH 8,0: 10 mM TRIS baza HCl za uravnavanje pH
Pufer za Western blot	TBS pH 7,4: 50 mM TRIS/HCl 150 mM NaCl (Carlo Erba Reagents)
Pufri za raztapljanje	1. 10 mM TRIS/HCl, 2M U pH 8,3: 10 mM TRIS 2M urea HCl za uravnavanje pH 2. 20 mM TRIS/HCl pH 11,5: 20 mM TRIS baza HCl za uravnavanje pH 2. 100 mM TRIS/HCl, 2M U pH 11,5: 100 mM TRIS 2 M urea
Pufri za IMAC izolacijo	Pufer A pH 8,0: 20 mM TRIS baza 0,5 N NaCl (Carlo Erba Reagents) 10 mM imidazol HCl za uravnavanje pH

	Pufer B pH 8,0: 20 mM TRIS baza 0,5 N NaCl (Carlo Erba Reagents) 0,3 M imidazol HCl za uravnavanje pH
Pufer za GF in shranjevanje proteina	Placebo hGH pH 7,0: 10 mM NaH_2PO_4(NaOH) 5% manitol (Merck) 10 mM β-ciklodekstrin (Valens Int. d.o.o.)
Pufer za pripravo nanodelcev	Fosfatni pufer s soljo (PBS) pH 7,4: 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM NaH_2PO_4 2 mM KH_2PO_4 HCl za uravnavanje pH

3.2.8 OPREMA

Delo v laboratoriju sem opravljala na Kemijskem inštitutu v Ljubljani pod okriljem Laboratorija za biosintezo in biotransformacijo L11. Pri delu sem uporabljala opremo, predstavljeno v tabeli 3-VI.

Tabela 3-VI: Oprema, uporabljena med raziskovalnim delom.

Naprava	**Model in znamka / izdelovalec**
Analitska tehtnica	XS205 (Mettler Toledo)
Precizna tehtnica	PEJ 420-3M (Kern & Sohn)
Stresalniki	IS-200K (Kambič) ISF-1-V (Adolf Kuhner AG)
Centrifuge	Rotina 35R (Hettich Zentrifugen; centrifugiranje vzorcev do 50 ml na nizkih obratih, ≤5000 obr/min) J2-HS (Beckman) z rotorjem Type JA-20 (centrifugiranje vzorcev do 230ml pri visokih obratih, 5000-15000 obr/min)
Mikrocentrifuge (centrifugiranje vzorcev 0,5 do 2 ml pri 5000-13200 obr/min)	Mikro242 (Tehtnica) Centril15R (Eppendorf)
Ultracentrifuga	L7-55 (Beckman)
Digitalna kamera	Olympus, C-3030 ZOOM
Mešalo	Vibro-mix (Tehtnica) Magnetno mešalo Rotamix 550 MMH (Tehtnica)
Sonikator	Ultrasonic processor CV33 (Cole Palmer) s

	sondama za soniciranje: - Caphorn sonda (za epice) - Potopna sonda (za 10-100 mL biomase)
pH meter	Seven Easy (Mettler Toledo)
Spektrofotometri	Hewlett Packard 8452A Diode Array Spectrophotometer (Hewlett Packard) Agilent 8453, Agilent Technologies
Sistem za pridobivanje prečiščene vode	MilliQ A10 Synthesis (Millipore)
Sistem za pridobivanje demineralizirane vode	RiOs 16 (Millipore)
Laminarij	Heraeus ELB 2448 (Heraeus) Iskra PIO LFV9 (Iskra)
Termobloki	Techno Dri-Black 08-3 (95°C) CH-100 (70°C) (Biosan)
Vodna kopel	GFL - 1013 (GFL) TW12 (Julabo)
Elektroforezni sistem	Xcell Sure LockTM System (Invitrogen) za gele NuPAGE)
Sistem za suhi prenos proteinov na membrano	iBlot (Invitrogen)
Kromatografski sistem	ÄKTA Purifier 100 (GE Healthcare)
Kromatografske kolone	Proizvajalec GE Healthcare, nosilca Chelating Sepharose (IMAC) in Superdex 75 (GF)
DLS sistem	Zetasizer Nano series HT Nano – ZS (Malvern Instruments)
CD spektrometer	Chirascan (Applied Photophysics)
Filtri za sterilno filtracijo	Millex Syringe Driven filter Unit (Millipore Corporation)
Črpalka za filtriranje pufrov	Millivac Vacuum Pump XF54
Kolone za čiščenje DNA	QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen)
Sistem za izolacijo DNA	QIAprep Spin Miniprep Kit (Quiagen)
Pipete	Pipetman P-10, P-20, P-100, P-200, P-1000, P-5000 (Gilson)
Koncentratorji	Amicon Ultra-15 (Millipore) Amicon Ultra-2 (Millipore)
Kolone za zamenjavo pufra	PD10 Desalting Columns (GE Healthcare)
Hladilni in zamrzovalni sistemi +8°C, +4°C, -20°C, -70°C	Različni proizvajalci
Homogenizator	PT 3100 (Polytron)

Pri kromatografskih metodah smo uporabili naslednje kolone različnih velikosti:

- IMAC:
- Kolona št. 108, Tricorn 10/20, 2,3 ml nosilca Chelating Sepharose FF, Ni-IDA
- kolona št. 53, XK 26/20, 32 mL nosilca Chelating Sepharose FF, Ni-IDA
- GF:

- kolona št. 86, XK 16/70, 120 ml nosilca Superdex75
- kolona št. 131, XK 26/60, 320 mL nosilca Superdex 75

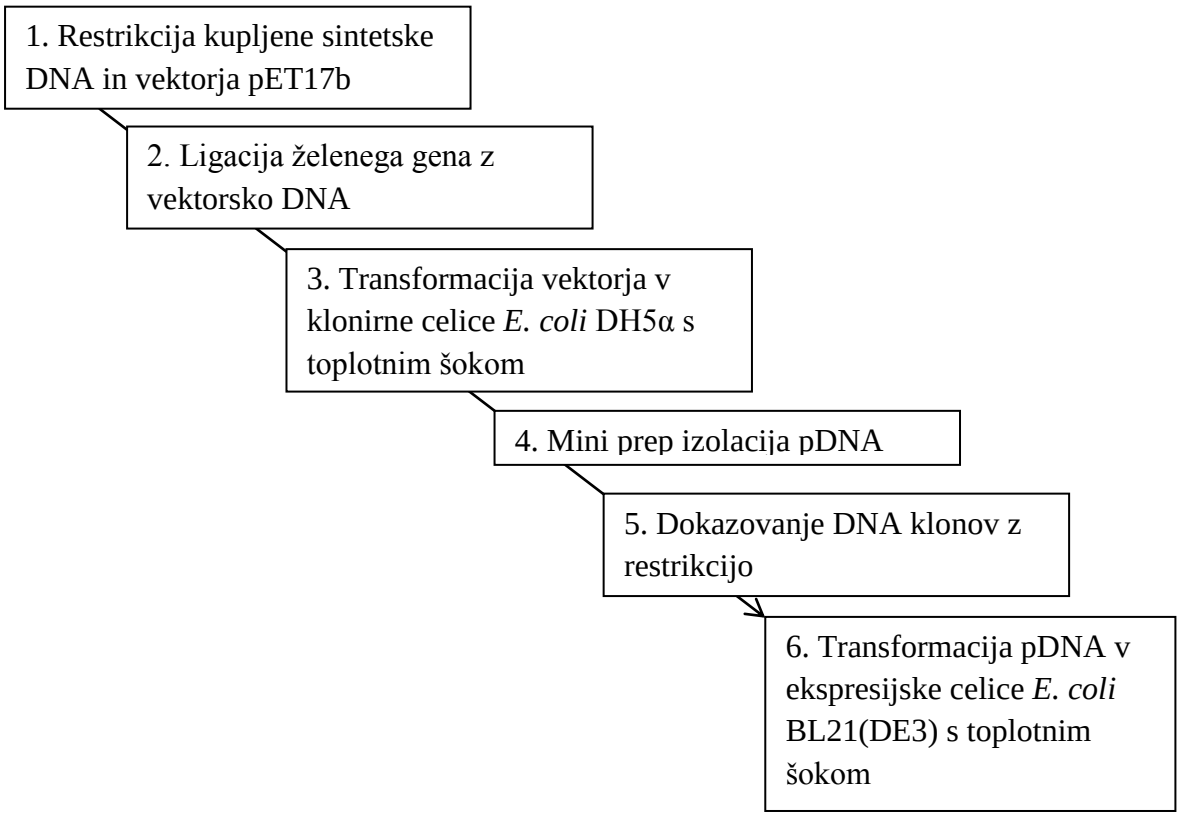
3.3 METODE

3.3.1 PRIPRAVA KONSTRUKTOV pET17b-H6-hGH, pET17b-hGH-H152H154 IN pET17b-hGH-H96H153

3.3.1.1 RESTRIKCIJSKO KLONIRANJE GENOV ANALOGOV rhGH

Restrikcijsko kloniranje kupljenih genov iz pUC57 v pET17b smo izvedli v več korakih, shematsko prikazanih v shemi 2.

Shema 2: Potek restrikcijskega kloniranja genov po zaporednih korakih.



3.3.1.1.1 PREPARATIVNA RESTRIKCIJA VEKTORJA pET-17b IN SINTETSKE DNA

Dobavljene sintetske tarčne gene smo s postopkom preparativne restrikcije prestavili iz vektorja pUC57 v pET17b. Za restrikcijo smo uporabili encima EcoRI in NdeI (New

England Biolabs), ki vektor pET17b cepita na mestih 174 in 268, sintetsko DNA pa cepita na ustreznih sintezno dodanih restrikcijskih mestih za oba encima.

Za restrikcijo pET17b smo pripravili dve zmesi.

1. zmes: 20 µL pET17b (300 ng/µL, 17.4.2005)
10 µL NEBuffer 4 (restrikcijski pufer, New England Biolabs)
2 µL EcoRI (c = 1 U/µL)
2 µL NdeI (c = 1 U/µL)
66 µL MQ voda

2. zmes: 130 µL pET17b (50 ng/µL, 12.5.2009)
15 µL NEB4
2,5 µL EcoRI (c = 1 U/µL)
2,5 µL NdeI (c = 1 U/µL)

Obe mešanici smo inkubirali 3 h na 37°C, da je potekla restrikcija, in nato še 10 min na 75°C za inaktivacijo encimov. Fragmente smo po restrikciji defosforilirali z 0,2 µL CIP (calf intestinal phosphatase, New England Biolabs) in ponovno inkubirali 1 h na 37°C in 10 min na 75°C. Za popolno inaktivacijo encima smo na koncu dodali še 1 µL 0,5 M EDTA.

Za restrikcijo sintetske DNA oz. kupljenih plazmidov pUC57-H6-hGH, pUC57-hGH-H152H154 in pUC57-hGH-H96H153 smo v epico dodali:

15 µL DNA
10 µL NEB4
2 µL NdeI (c = 1 U/µL)
2 µL EcoRI (c = 1 U/µL)
71 µL MQ voda

Restrikcijo smo izvedli na vseh treh kupljenih genih. Mešanice smo inkubirali 3 h na 37°C (restrikcija) in 10 min na 75°C (inaktivacija encimov).

Čiščenje fragmentov vektorja in sintetske DNA smo izvedli s čiščenjem na kolonah kupljenega kompleta QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, 48). Za določitev koncentracije DNA smo tretirane vzorce nanesli na 1% agarozni gel z etidijevim bromidom in izvedli elektroforezo. Kot označevalec smo uporabili λ DNA-HindIII označevalec proizvajalca New England Biolabs.

3.3.1.1.2 LIGACIJA IN TRANSFORMACIJA

Postopek kloniranja inserta obsega ligacijo tarčnega gena z vektorjem pET-17b in transformacijo v neekspresijskega gostitelja. Po analizi kloniranega konstrukta in potrditvi njegove ustreznosti smo izvedli transformacijo v ekspresijskega gostitelja.

- **Ligacija**

Ligacijo smo nastavili v epicah v testni paraleli in ločeno za vsak posamezen gen.

Testna ligacija:

4 µL vektorja 1+2
2 µL ligacijskega pufra (New England Biolabs)
1 µL T4 ligaze (c = 0,5 U/µL; New England Biolabs)
13 µL MQ vode

Ligacija posameznih konstruktov:

4 µL vektorja 1+2
4 µL tretirane DNA **gene 1/2/3**
2 µL ligacijskega pufra
1 µL T4 ligaze (c = 0,5 U/µL)
9 µL MQ vode

Vse epice smo inkubirali preko noči pri 16° C.

- **Transformacija DNA v bakterijske celice**

Transformacijo v celice smo vedno izvedli s pomočjo toplotnega šoka. Ustrezni količini (100-300 µL) kompetentnih bakterijskih celic smo takoj po odtalitvi dodali 10 µL

plazmidne DNA, premešali in inkubirali 30 min na ledu. Toplotni šok smo izvedli z inkubacijo 90 s pri 42°C. Nato smo epice inkubirali dodatnih 5 min na ledu, dodali po 0,9 mL medija LBP in inkubirali 1 h na 37°C ob stresanju pri 200 obr/min. Posamezne transformacijske zmesi smo razmazali na LBP/Amp plošče in jih inkubirali preko noči na 37°C.

Konstrukte smo po ligaciji najprej transformirali v kompetentne celice klonirnega seva *E. coli* DH5α, ki ne nosi zapisa za T7 polimerazo, po analizi in potrditvi ustreznosti klonov pa v ekspresijske celice *E. coli* BL21(DE3).

3.3.1.1.3 MINI PREP IZOLACIJA pDNA IN DOKAZOVANJE KLONOV

Za mini prep izolacijo pDNA iz DH5α celic smo nacepili nekaj klonov od vsake ligacijske zmesi na LBP/Amp plošče in jih preko noči inkubirali pri 30°C, ob stresanju na 150 obr/min. Izolacijo smo izvedli s pomočjo kupljenega kompleta reagentov QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, 49). Izolirano pDNA smo shranili na -80°C.

Za dokazovanje ustreznosti klonov smo izvedli restrikcijo z encimoma EcoRI in NdeI. V zmes smo dodali:

5 µL DNA
2 µLNEB4
0,2 µL NdeI (c = 1 U/µL)
0,2 µL EcoRI (c = 1 U/µL)
12,6 µL MQ vode

Restrikcija je potekala 2 h pri 37°C. Encima smo inaktivirali z inkubacijo 10 min na 75°C, fragmente pa analizirali z elektroforezo na 1% agaroznem gelu.

3.3.2 PRODUKCIJA ANALOGOV hGH V STRESANIH KULTURAH

3.3.2.1 PRIPRAVA PREDKULTURE IN VCEPKA

Po sveži transformaciji pDNA v ekspresijske celice BL21(DE3) smo po 1 kolonijo izbranega klona za vsak konstrukt z LBP/Amp plošč nacepili v 10 mL LBP/Amp/Glu medija. Kulturo smo stresali pri 25°C na 160 obr/min. Po približno 5 urah smo predkulturo

precepili v 100 ml LBP/Amp gojišča z dodano ustrezno količino glukoze in stresali na 25°C pri 160 obr/min, preko noči.

3.3.2.2 PRIPRAVA INDUCIRANE STRESANE KULTURE

Določeno količino vcepka vsakega konstrukta smo precepili v končni volumen ekspresijskega GYSP/Amp/Glu medija z dodano ustrezno količino 50% glukoze in z elementi v sledovih. Količina vcepka je bila enaka 5% volumna produkcijskega gojišča.
Prvič smo preverili izražanje proteina ob gojenju kultur pri temperaturi 25°C po začetni indukciji (induktor dodan takoj po inokulaciji kulture) in po kasnejši indukciji (induktor dodan po 3 urah stresanja po inokulaciji). Vse tri analoge smo nato pridobivali po kasnejši indukciji kulture z induktorjem IPTG (c = 0,4 M). Preverili smo tudi izražanje analoga **gene 1** pri temperaturah 25°C, 30°C in 37°C, kasneje pa smo zadostno količino vseh treh analogov pridobili z gojenjem pri temperaturi 25°C. Kulturam smo po 3 urah stresanja dodali po 1 µl IPTG na 1 ml kulture in jo stresali na določeni temperaturi pri 160 obr/min. Produkcijska faza je trajala 6-10 h. Kot indikator porabe gojišča med gojenjem kultur smo spremljali optično gostoto pri 600 nm (OD600).

3.3.2.3 MERJENJE OD600 BAKTERIJSKIH KULTUR

Za merjenje optične gostote smo odvzeli 1 ml vzorca bakterijske kulture in jo redčeno dali v kiveto. Vzorec smo vstavili v spektrofotometer, ki je pomeril navidezno absorbanco pri valovni dolžini 600 nm. Kot slepo raztopino smo vedno vzeli gojišče, v katerem smo gojili kulturo iz vzorca. Vzorce smo pred merjenjem ustrezno redčili, tako da je izmerjena absorbanca zavzemala vrednost v intervalu med 0,1 in 0,7. Dejansko vrednost OD600 smo nato izračunali glede na redčitev vzorca.

3.3.3 ANALIZA BAKTERIJSKIH BIOMAS

3.3.3.1 SPIRANJE BIOMASE

Po končanem stresanju smo celice ločili od gojišča s centrifugiranjem 10 min na 5000 obr/min. Supernatant smo odlili in pelet resuspendirali v 10 mM TRIS/HCl pH 8,0. Suspenzijo celic smo ponovno centrifugirali 10 min na 5000 obr/min in odlili supernatant.

Pelete s celicami smo uporabili za nadaljnjo analizo in izolacijo proteina, v primeru, da z delom nismo nadaljevali takoj, pa smo jih zamrznili na -20°C.

3.3.3.2 RAZBIJANJE CELIC

Celice smo razbijali s postopkom soniciranja. Pelet po spiranju smo resuspendirali v štirikratnem volumnu pufra 10 mM TRIS/HCl pH 8,0 glede na maso peleta (4 ml pufra na 1 g peleta). Suspenzijo smo ves čas hranili v čaši na ledu. Resuspendirane pelete smo homogenizirali s homogenizatorjem in sonicirali z ustrezno sondo cap-horn (za epice) ali veliko potopno sondo (za volumne 10-100 ml) pri amplitudi 38%. Soniciranje je trajalo 5 minut v intervalih: vklop sonifikatorja za 1 s / izklop sonifikatorja za 2 s, skupaj 15 min.
Po soniciranju smo suspenzijo centrifugirali 30 min na 15000 obr/min pri temperaturi 4°C. Za analizo izražanja proteina smo med postopkom odvzeli vzorce homogenata pred soniciranjem, peleta in supernatanta po soniciranju, in naredili SDS-PAGE ločbo.

3.3.4 IZOLACIJA TARČNIH PROTEINOV

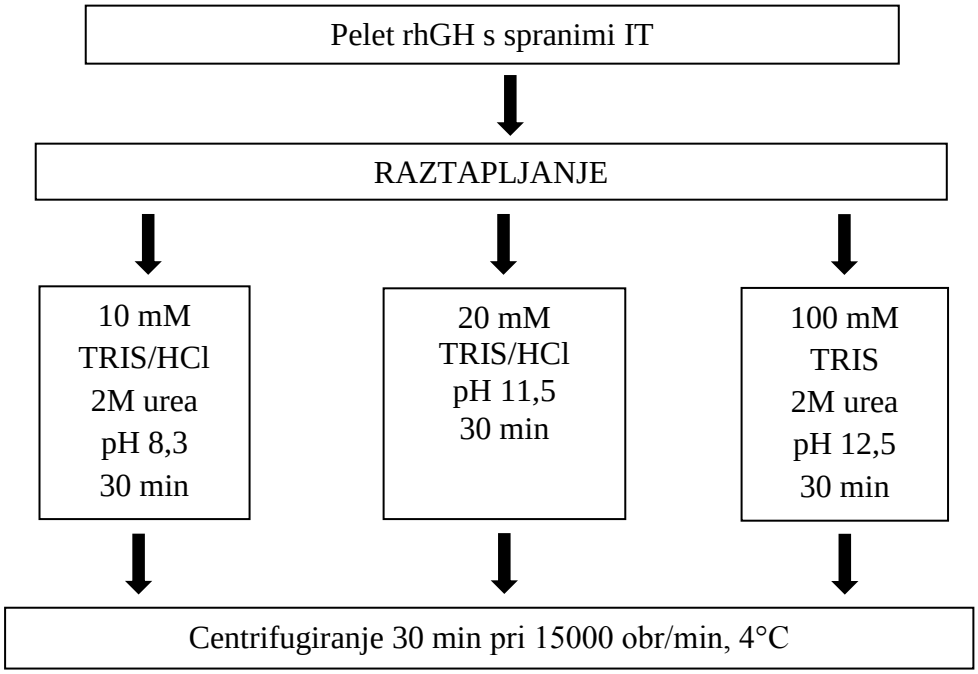
3.3.4.1 SPIRANJE INKLUZIJSKIH TELES

Pelet z inkluzijskimi telesi po soniciranju smo resuspendirali v desetkratnem volumnu pufra 10 mM TRIS/HCl pH 8,0 in suspenzijo centrifugirali 30 minut pri 15000 obr/min na 4°C.

3.3.4.2 RAZTAPLJANJE INKLUZIJSKIH TELES

Inkluzijska telesa smo raztapljali v različnih pufrih in primerjali uspešnost raztapljanja. Osnovni pufer za raztapljanje je bil pripravljen iz TRIS baze v različnih molarnih koncentracijah. Pogoje raztapljanja smo spreminjali z dodatkom uree (39) in različnimi vrednostmi pH (40). Različni pogoji raztapljanja v nobenem primeru niso vplivali denaturirajoče. Na shemi 3 je prikazan postopek raztapljanja z različnimi pufri.

Shema 3:Prikaz raztapljanja IT z različnimi pufri.



Primerjavo raztapljanja v različnih pufrih smo izvedli za analog **gene 1**. Na podlagi rezultatov smo za nadaljnja raztapljanja inkluzijskih teles vseh treh analogov uporabili vedno enak postopek. Inkluzijska telesa smo resuspendirali v 10-kratnem volumnu pufra 20 mM TRIS s pH 11,5. Suspenzijo smo stresali na 50 obr/min pri sobni temperaturi, približno uro in pol.

Po raztapljanju smo suspenzijo centrifugirali pri 4°C 30 min, na 15000 obr/min, in odvzeli vzorce za SDS-PAGE analizo. Supernatant s proteinom smo kasneje uporabili za čiščenje proteina s kromatografskimi metodami.

3.3.5 KROMATOGRAFSKA IZOLACIJA

3.3.5.1 IMAC IZOLACIJA

IMAC izolacijo smo izvedli večkrat pod različnimi pogoji in na različnih kolonah, odvisno od vzorca. Kot nosilec v koloni smo uporabili Chelating Sepharose Fast Flow s kelirajočo skupino IDA, na katero lahko imobiliziramo različne ione. Izolacijo smo izvedli z na kolono vezanimi nikljevimi ioni. Pretok na koloni smo nastavili na 1 mL/min. Kolono smo pred izolacijo regenerirali s svežimi ioni in jo pred nanosom ekvilibrirali s 3-kratnim volumnom začetnega pufra, ki je bil enak osnovnemu pufru A za izolacijo. Na kolono smo

nanesli supernatant po raztapljanju inkluzijskih teles, glede na količino supernatanta in koncentracijo proteina v supernatantu pa smo prilagajali velikost kolone in število posameznih nanosov na kolono. Po potrebi smo vzorce pred nanosom filtrirali.
Kot osnovni pufer A za IMAC izolacijo smo v vseh primerih uporabili 20 mM TRIS/HCl, 0,5 M NaCl (Carlo Erba Reagents), 10 mM imidazol pH 8,0. Pufer za elucijo ali pufer B je bil v vseh primerih 20 mM TRIS/HCl, 0,5 M NaCl, 0,3 M imidazol pH 8,0. Izolacije smo izvedli pri sobni temperaturi. Med ločbo smo zbirali frakcije po 2 mL in jih na koncu analizirali z SDS-PAGE, ločbo pa smo spremljali z merjenjem absorbance pri 280 nm in 260 nm.

3.3.5.2 GELSKA FILTRACIJA

Po potrebi smo vzorce po IMAC izolaciji očistili še z gelsko filtracijo oz. kromatografijo z ločevanjem po velikosti. Uporabili smo nosilec Superdex 75, na kolono pa nanesli združene frakcije po ločevanju z IMAC. Pretok smo nastavili glede na količino vzorca na 1 ml/min, pri analogu **gene 1** pa smo ločbo izvajali pri pretoku 4 ml/min. Pufer za gelsko filtracijo je bil enak placebo hGH pufru, katerega smo kasneje uporabili tudi za shranjevanje izoliranega proteina.

3.3.6 KONCENTRIRANJE VZORCEV

Po izolaciji in čiščenju proteina smo vzorce skoncentrirali na želeno koncentracijo. Koncentrirali smo v Amicon Ultra centrifugirkah, ki imajo membrano z MWCO 10 kDa, pri 3500 obr/min in 4°C. Pred koncentriranjem smo koncentratorje trikrat sprali z vodo MQ na 3500 obratih.

3.3.7 SHRANJEVANJE PROTEINOV

Analoge rhGH v placebo hGH pufru smo po koncentriranju na želeno koncentracijo razdelili na alikvote in jih v epicah zamrznili in shranili na -80°C.

3.3.8 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV

Koncentracijo proteinov v vzorcih smo določali po dveh metodah. Za določanje celokupne koncentracije proteinov smo uporabili metodo po Bradfordu (Bradford, 1976). Metoda temelji na vezavi barvila na proteinski vzorce. Koncentracijo proteinov lahko izračunamo na podlagi umeritvene krivulje in je proporcionalna vezavi barvila. Kot slepi vzorec smo vedno uporabili pufer, v katerem so bili proteini raztopljeni. Enak pufer smo uporabili tudi za redčenje vzorcev, v primeru da je bilo le-to potrebno.

Koncentracijo čistega proteina smo določali z metodo izračuna iz izmerjene absorbance pri 280 nm. Za izračun koncentracije smo uporabili ekstinkcijski koeficient 18800 M^{-1} cm^{-1}.

3.3.9 POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA ZNATRIJEVIM DODECIL SULFATOM (SDS-PAGE)

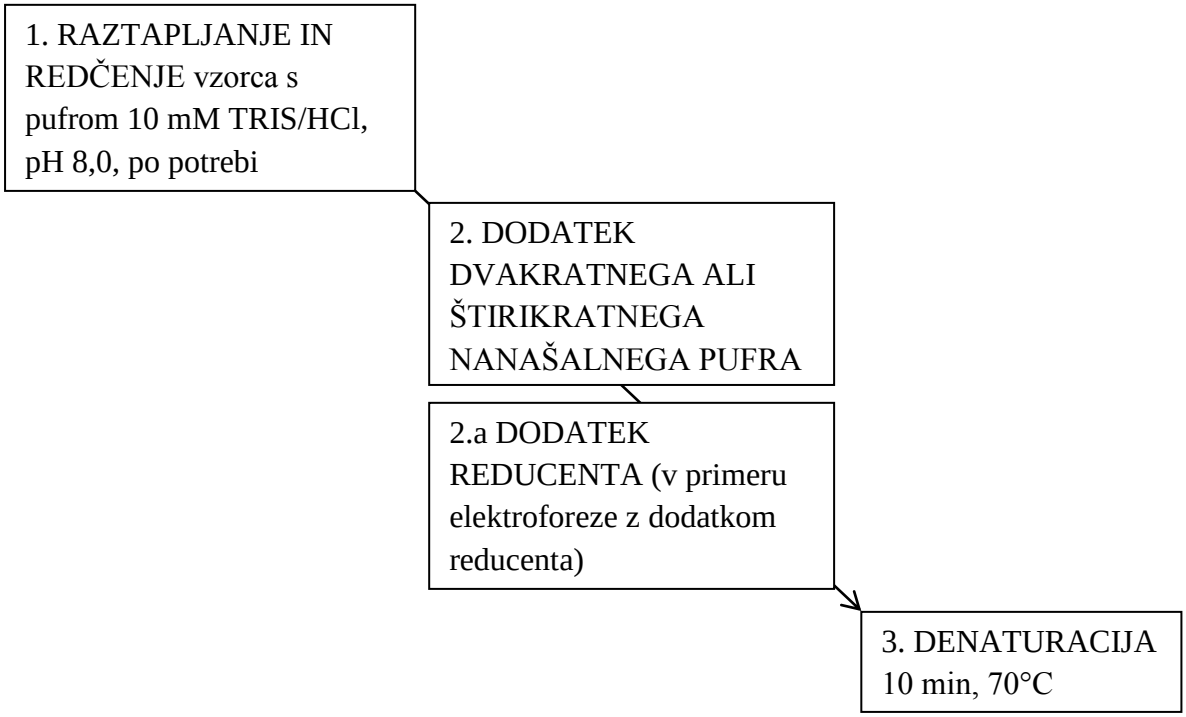
Analizo z SDS-PAGE smo uporabili pri več korakih. Po tem postopku smo analizirali bakterijsko biomaso, v nadaljnjih korakih pa smo z elektroforezo analizirali proteinske vzorce.

3.3.9.1 PRIPRAVA VZORCEV

Vzorce za analizo smo najprej ustrezno resuspendirali in po potrebi redčili s pufrom 10 mM TRIS/HCl pH 8,0. Nato smo vzorcem dodali dvakratni ali štirikratni vzorčni pufer in jih denaturirali 10 min pri 70°C. Vzorce smo na začetku pripravljali z reducentom, kasneje pa predvsem brez reducenta.

Postopek priprave vzorcev za SDS-PAGE je prikazan na shemi 4.

Shema 4: Prikaz postopka priprave vzorcev za SDS-PAGE analizo.



Vsi uporabljeni elektroforezni pufri so prikazani v tabeli 3-VIII.

Tabela 3-VII: Elektroforezni pufri.

Elektroforezni pufer: NuPAGE MES Running Buffer - 20x (Invitrogen). Pred uporabo smo pufer redčili z MQ vodo v razmerju 1:20
Vzorčni pufer: NuPAGE LDS Sample Buffer – 4x (Invitrogen). Dvakratni vzorčni pufer smo pripravili z redčenjem z MQ vodo.
Reducent: Nu-PAGE Sample Reducing Agent – 10x (Invitrogen)

Pripravljene vzorce smo nanesli v žepke na vrhu gela. Vedno smo poleg vzorcev na gel nanesli tudi proteinski standard Novex Sharp (Invitrogen), pri analizi rhGH tudi standard hGH. Uporabljali smo vnaprej pripravljene 4-12% gradientne gele proizvajalca Invitrogen z 10 ali 12 žepki. Elektroforeza je potekala 40 min pri napetosti 200 V in toku 125 mAmp (za dva gela 250 mAmp).

Po elektroforezni ločbi smo gele barvali predvsem z barvilom Simply Blue Safe Stain, ob zahtevani večji občutljivosti pa s srebrom.

3.3.9.2 PROTOKOLI BARVANJA GELOV PO SDS-PAGE ANALIZI

3.3.9.2.1 BARVANJE Z BARVILOM SIMPLY BLUE SAFE STAIN

Protokol barvanja z barvilom Simply Blue Safe Stain je po stopnjah prikazan v tabeli 3-IX.

Tabela 3-VIII: Stopnje barvanja z barvilom Simply Blue Safe Stain.

Stopnja	**Raztopina**	**Čas**	**Pogoji**
Spiranje gela	Voda MQ	3-krat 5 minut (skupaj 15 minut)	Sobna temperatura, stresanje 50 obr/min
barvanje	Raztopina barvila Simply Blue Safe Stain (Invitrogen), ogreta na 50°C	30 minut	Sobna temperatura, stresanje 50 obr/min
Razbarvanje ozadja	Voda MQ	Do razbarvanja ozadja, večkrat zamenjamo vodo	Sobna temperatura

3.3.9.2.2 BARVANJE S SREBROM

Za barvanje s srebrom smo uporabili vnaprej pripravljen komplet Silver Quest Silver Staining Kit (Invitrogen). Protokol je prikazan v tabeli 3-X.

Tabela 3-IX: Stopnje barvanja s srebrom.

Stopnja	**Raztopina**	**Čas**	**Pogoji**
Spiranje gela	Voda MQ	3-krat 5 minut	Sobna temperatura, stresanje 50 obr/min
Fiksiranje proteinov	40% etanol 10% ocetna kislina	20 minut	Sobna temperatura, stresanje 50 obr/min
Spiranje z etanolom	30% etanol	10 minut	Sobna temperatura, stresanje 50 obr/min
Senzibilizacija	30% etanol 10% Senzitizer (predpripravljen v kompletu)	10 minut	Sobna temperatura, stresanje 50 obr/min
Spiranje z etanolom	30% etanol	10 minut	Sobna temperatura, stresanje 50 obr/min
Spiranje gela	Voda MQ	10 minut	Sobna temperatura, stresanje 50 obr/min
Barvanje	1% raztopina barvila Stainer	15 minut	Sobna temperatura, stresanje 50 obr/min

	(predpripravljen v kompletu)		
Spiranje gela	Voda MQ	20-60 sekund	Sobna temperatura, stresanje 50 obr/min
Razvijanje barve	10% raztopina razvijalca Developer z dodano kapljico ojačevalca Developer enhancer (predpripravljena v kompletu)	4-8 minut	Sobna temperature, stresanje 50 obr/min
Ustavljanje barvanje	10 ml Stopper raztopine	10 minut	Dodamo direktno v razvijalno raztopino, sobna temperatura, stresanje 50 obr/min
Razbarvanje ozadja	Voda MQ	10 minut	Sobna temperatura

Za barvanje enega gela s srebrom potrebujemo po 100 ml raztopin, z izjemo 30% etanola, katerega pripravimo 200 ml.

3.3.10 PRENOS WESTERN NA NITROCELULOZNO MEMBRANO

Za imunodetekcijsko metodo prenosa Western smo uporabili sistem za suhi prenos iBLOT proizvajalca Invitrogen. Z vnaprej pripravljenimi reagenti smo proteine, ločene z elektroforezo, prenesli z gela na nitrocelulozno membrano. Prenos je potekal po programu P2, ki traja 6 min pri napetosti 23 V.

Uspešnost prenosa smo detektirali z barvilom Ponceau S. Membrano smo najprej sprali z že prej pripravljeno delovno raztopino Ponceau-S barvila (tabela 3-XI). Nato smo membrani dodali sveže pripravljeno raztopino in jo stresali s hitrostjo 50 obr/min na sobni temperaturi, približno 5 - 10 min. Po barvanju smo membrano spirali z vodo MQ 1-2 min, jo fotografirali in barvilo sprali z membrane s pufrom TBS pH 7,4. Pri elektroforezi, kateri je sledil Western prenos, smo uporabili SeeBlue Plus2 standard, saj je ta po prenosu na membrani dobro viden in je tudi indikator uspešnega prenosa.

Tabela 3-X: Raztopini Ponceau-S za barvanje po prenosu proteinov na membrano.

Raztopina	**Priprava**
Ponceau –S založna raztopina	2% Ponceau-s 2g 30% CCl3COOH (TCA) 30g 30% sulfosalicilna kislina 30g MQ voda do 100 mL
Ponceau delovna raztopina	V razmerju 1:10 z MQ vodo razredčena Ponceau Stock raztopina

3.3.10.1 DETEKCIJA PROTEINOV S PROTITELESI

Po prenosu Western smo proteine detektirali s protitelesi proti histidinskim ostankom in s protitelesi proti hGH. Postopek detekcije smo izvedli v obeh primerih enako, ne glede na vrsto izbranih protiteles. Stopnje detekcije so prikazane v tabeli 3-XII.

Tabela 3-XI: Stopnje detekcije proteinov s protitelesi.

Stopnja	**Raztopina**	**Čas stresanja**	**Temperatura**
blokiranje nespecifičnih vezavnih mest	5% raztopina mleka v TBS, pH 7,4	1 ura	sobna
spiranje	TBS pH 7,4	4-krat 5 minut	sobna
inkubacija s primarnimi protitelesi	raztopina primarnih protiteles v 5 % raztopini mleka v TBS, pH 7,4	čez noč	+ 4 °C
spiranje	TBS pH 7,4	4-krat 5 minut	sobna
inkubacija s sekundarnimi protitelesi	raztopina sekundarnih protiteles v 5 % raztopini mleka v TBS, pH 7,4	1 ura	sobna
spiranje	TBS pH 7,4	4-krat 5 minut	sobna
razvijanje barve z 0,015% H2O2	Color development solution - mešanica raztopin A in B: A: 15 mg 4-kloro-1-naftol, raztopljen v 5 ml metanola B: 15 µl 30% H_2O_2 v 25 ml TBS, pH 7,4	nekaj minut oz. do vidnosti obarvanja	sobna
zaustavitev reakcije	voda MQ	speremo	sobna

3.3.11 ANALIZA ANALOGOV rhGH - DOLOČANJE SEKUNDARNE STRUKTURE PROTEINA IN BIOLOŠKE AKTIVNOSTI

Sekundarno strukturo tarčnega proteina smo določili z pomočjo cirkularnega dikroizma. Vzorce čistega proteina smo redčili do želene koncentracije v placebo hGH pufru s 5% manitola in s ciklodekstrinom (tabela 3-V). Strukturo smo določali vzorcu **gene 1** in dvema vzorcema **gene 2**. Za meritev smo potrebovali po 100 µl vzorca.

Biološko aktivnost proteina so s standardno metodo na celičnih linijah *in vitro* preverili v celičnem laboratoriju oddelka L11 na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

3.3.12 PRIPRAVA DELCEV NA OSNOVI SAMOZDRUŽEVANJA PROTEINSKIH MOLEKUL

Za pripravo SA delcev smo uporabili cinkove ione in dve kelatorski raztopini, fitinsko kislino in TETA, obe s koncentracijo 50 mM. Delce smo pripravili iz dveh analogov, **gene 1** in **gene 2**. Za pripravo smo v raztopino dodali komponente po recepturi, prikazani v tabeli 3-XIII.

Tabela 3-XII: Receptura za pripravo SA-delcev.

1 mg proteina – analoga rhGH
10 µl (5 µl) kelatorja (TETA ali fitinske kisline, 50 mM)
Pufer PBS pH 7,4, do 4 ml
Želena količina $ZnSO_4$ (c = 30 mM)

Najprej smo skupaj zmešali kelatorsko raztopino in pufer in pH uravnali na 7,0. Ob mešanju na magnetnem mešalu pri 250 obr/min smo v raztopino dodali analog rhGH. Postopno smo dodajali še cinkove ione in spremljali rast delcev. Po vsakem dodatku ionov smo raztopino mešali 10 min in izmerili nastale delce na DLS.

3.3.12.1 DLS – DINAMIČNO SIPANJE SVETLOBE

Z DLS smo spremljali spreminjanje velikosti delcev ob dodajanju cinkovih ionov. Za meritev smo odvzeli po 1 ml vzorca v 12-mm polistirensko kiveto. Analiza je potekala pri 25°C v treh paralelnih meritvah. Rezultat je predstavljen kot povprečje vseh treh meritev porazdelitev velikosti.

3.3.12.2 DOLOČANJE STOPNJE VEZAVE PROTEINA V DELCE

Za določitev odstotka v delce nevezanega proteina smo odvzeli po 1 ml vzorca raztopine z delci. Raztopino smo odcentrifugirali na ultracentrifugi pri 40000 obr/min, 20 min, na 4°C. V supernatantu smo nato določili koncentracijo preostalega proteina z metodo merjenja absorbance pri valovni dolžini 280 nm.

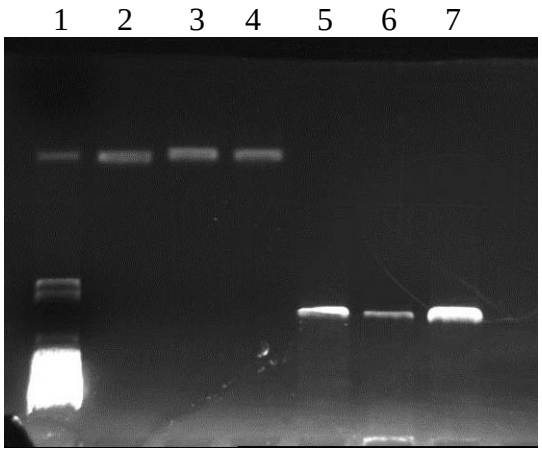
4 REZULTATI

4.1 PRIPRAVA KONSTRUKTOV pET17b-H6-hGH, pET17b-hGH-H152H154 IN pET17b-hGH-H96H153

4.1.1 RESTRIKCIJSKO KLONIRANJE GENOV ANALOGOV rhGH

4.1.1.1 PREPARATIVNA RESTRIKCIJA

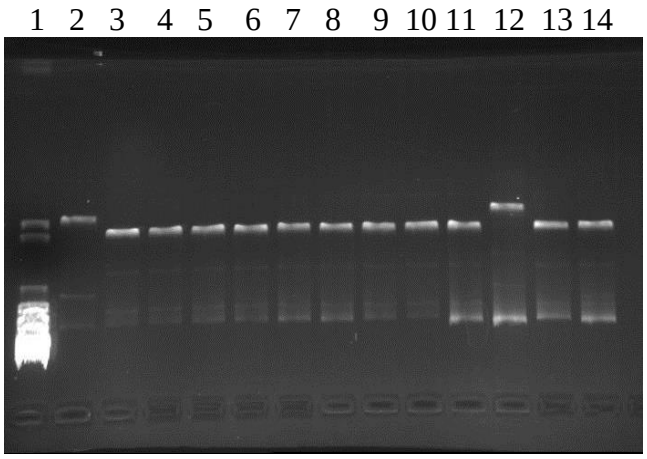
Restrikcijo smo uspešno izvedli z encimoma EcoRI in NdeI pri temperaturi 37°C. Rezultati elektroforezne analize fragmentov za ligacijo po restrikciji in po čiščenju na Qiagen koloni so predstavljeni na sliki 4-1.



Slika 4-1: Elektroforezna analiza fragmentov DNA po restrikciji (1% agarozni gel).
1: λ DNA-HindIII označevalec
2: **Gene 1**
3: **Gene 2**
4: **Gene 3**
5: pET17b zmes I + II
6: pET17b zmes I
7: pET17b zmes II

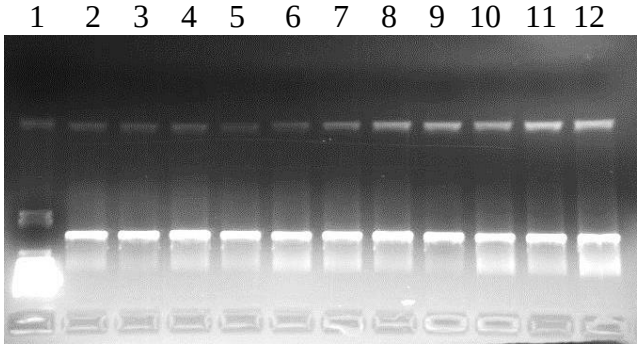
4.1.1.2 LIGACIJA, MINI PREP IZOLACIJA pDNA IN DOKAZOVANJE KLONOV

Za mini prep izolacijo pDNA smo nacepili po 6 klonov od vsake ligacije. Po 2 µL kulture od 4 klonov vseh treh genov smo nanesli na agarozni gel in izvedli elektroforezo za preverjanje ligacije. Neuspešno ligacijo smo zaznali pri klonu 2 gena 3 (slika 4-2).



Slika 4-2: Elektroforezna analiza klonov konstruktov (1% agarozni gel).
1: λ DNA-HindIII označevalec
2: pET17b
3: **gene 1** klon 1
4: **gene 1** klon 2
5: **gene 1** klon 3
6: **gene 1** klon 4
7: **gene 2** klon 1
8: **gene 2** klon 2
9: **gene 2** klon 3
10: **gene 2** klon 4
11: **gene 3** klon 1
12: **gene 3** klon 2
13: **gene 3** klon 3
14: **gene 3** klon 4
V pET17b
Nanosi 2 µL.

V naslednjem koraku smo ustreznost kloniranja dokazali z restrikcijo z encimoma EcoRI in NdeI (slika 4-3). Elektroforezna analiza nam je pokazala uspešnost kloniranja izbranih klonov vseh treh genov. Izolacijo pDNA smo izvedli na klonih št.1 vseh treh genov.



Slika 4-3: Analiza dokazovanja klonov z restrikcijo (1% agarozni gel).
1: λ DNA-HindIII označevalec
2: **gene 1**/1
3: **gene 1**/2
4: **gene 1**/3
5: **gene 1**/4
6: **gene 2**/1
7: **gene 2**/2
8: **gene 2**/3
9: **gene 2**/4
10: **gene 3**/1
11: **gene 3**/2
12: **gene 3**/4
V pET17b
Nanosi 2 µL.

4.1.1.3 TRANSFORMACIJA V CELICE E. COLI BL21(DE3)

Po transformaciji izbranih pDNA v celice BL21(DE3) smo po 1 µl zmesi nanesli na LBP/Amp plošče. Rezultati rasti s pomočjo vizualne ocene kolonij so predstavljeni v spodnji tabeli. Zelo opazna je razlika v velikosti kolonij (tabela 4-I), kar kaže na upočasnjeno rast kolonij celic, ki so sprejele tarčne gene.

Tabela 4-I: Vizualna ocena rasti kolonij.

KONSTRUKT	**OCENA KOLONIJ**
Gene 1/pET17b	Majhne kolonije
Gene 2/pET17b	Zelo majhne kolonije
Gene 3/pET17b	Majhne kolonije
pET17b	Velike kolonije

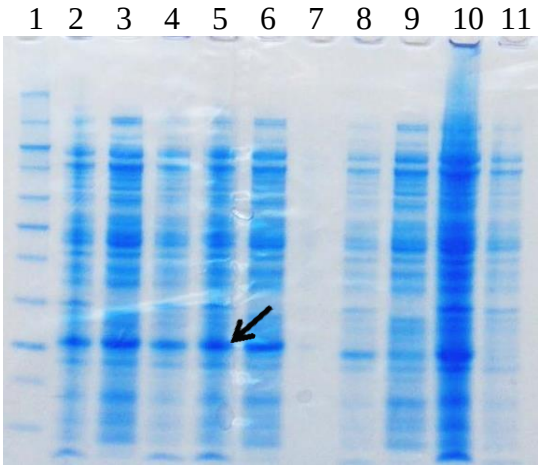
4.2 PRODUKCIJA ANALOGOV rhGH V STRESANIH KULTURAH

V prvem poskusu izražanja tarčnih proteinov smo preverili izražanje na 25°C pri 160 obr/min po začetni in po kasnejši indukciji. Pri začetni indukciji smo IPTG v kulturo dodali takoj po nacepitvi vcepka v produkcijsko gojišče, pri kasnejši pa po 3h stresanja na stresalniku. Produkcijska faza je trajala preko noči. Porabo gojišča smo spremljali z merjenjem OD600 ob dodatku IPTG in po končanem stresanju.

Izražanje tarčnih proteinov v celicah smo potrdili z elektroforezno analizo biomase (sliki 4-4 in 4-5). Ker so v nekaterih primerih vzorci bili pregosti za lep nanos v žepek gela, smo vzorcu po denaturaciji dodali še 10% Na-dodecil sulfat.

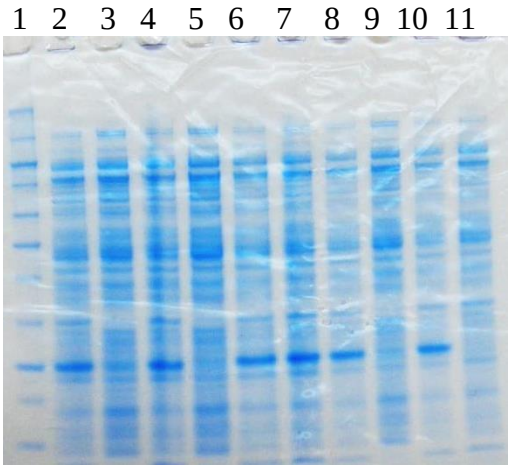
Lisa na elektroforeznem gelu pri približno 23 kDa potrjuje močno izražanje proteina te velikosti. Glede na znane podatke lisa ustreza našemu analogu rhGH, saj uvedene mutacije na strukturi nimajo večjega vpliva na samo velikost in maso proteina.

Prisotnost proteina smo določili tako v topni kot netopni frakciji, razlik med začetno in kasnejšo indukcijo nam v tem primeru pri 25°C ni uspelo potrditi.



Slika 4-4: SDS-PAGE analiza izražanja analogov rhGH z označeno liso, značilno za rhGH, gel 1.
1: Sharp proteinski standard z znanimi molekulskimi masami

GENE 1 žepki 2-7:
ZAČETNA INDUKCIJA žepki 2-4:
2: homogenat pred soniciranjem
3: supernatant po soniciranju



Slika 4-5: SDS-PAGE analiza izražanja analogov rhGH, gel 2.
1: Sharp proteinski standard z znanimi molekulskimi masami

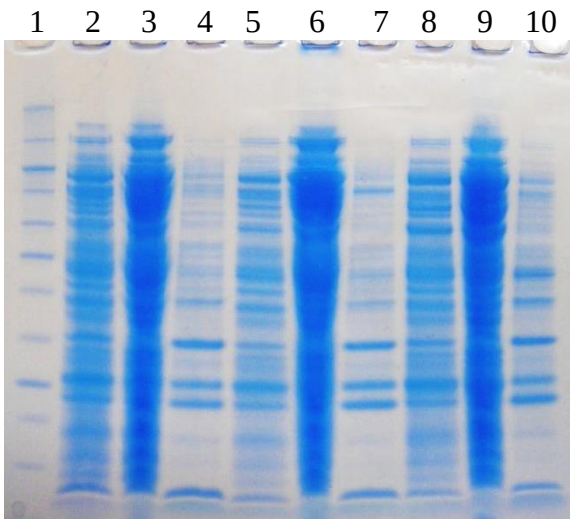
GENE 2 KASNEJŠA INDUKCIJA žepki 2-4:
2: homogenat pred soniciranjem*
3: supernatant po soniciranju
4: pelet po soniciranju*

4: pelet po soniciranju KASNEJŠA INDUKCIJA žepki 5-7: 5: homogenat pred soniciranjem 6: supernatant po soniciranju 7: pelet po soniciranju – pregost za nanos, zato analiza ni uspela **GENE 2** ZAČETNA INDUKCIJA žepki 8-10: 8: homogenat pred soniciranjem 9: supernatant po soniciranju 10: pelet po soniciranju* 11: negativna kontrola pET17b takojšnja indukcija Nanosi 15µL. *: vzorcu dodan 10% SDS, 5 µl po denaturaciji	**GENE 3** žepki 5-10 ZAČETNA INDUKCIJA žepki 5-7: 5: supernatant po soniciranju 6: homogenat pred soniciranjem* 7: pelet po soniciranju* KASNEJŠA INDUKCIJA žepki 8-10: 8: homogenat pred soniciranjem* 9: supernatant po soniciranju 10: pelet po soniciranju* 11: negativna kontrola pET17b kasnejša indukcija* Nanosi 15 µL. *: vzorcu dodan 10% SDS, 5 µl po denaturaciji

Vpliv temperature na izražanje proteinov smo določali za kulture po začetni in po kasnejši indukciji pri 25°C, 30°C in 37°C. Poskus smo izvedli le za analog **gene 1**.

Po soniciranju biomase smo analizirali vzorce z elektroforezno ločbo (sliki 4-6 in 4-7). Primerjava analiz kaže na boljšo produkcijo po kasnejši indukciji kulture, rhGH pa zaznamo tako v topni kot v netopni frakciji. V peletu po soniciranju opazimo precej manjšo prisotnost preostalih proteinov, vendar pa je pri temperaturah 30 in 37°C komaj zaznavna lisa, značilna za rhGH.

V vzorcu homogenata in supernatanta opazimo močnejšo liso v višini 60 kDa, ki je najizrazitejša pri 37°C in lahko kaže na prisotnost agregatov analogov rhGH.

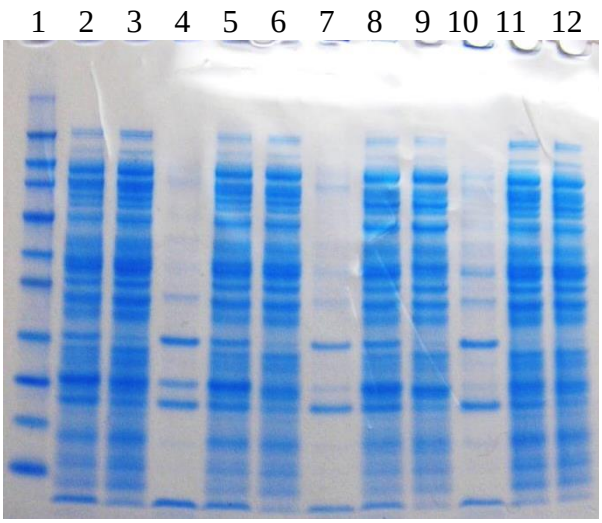


Slika 4-6: Vpliv temperature na izražanje proteinov, gel 1.
ZAČETNA INDUKCIJA
1: Sharp proteinski standard

25°C ZAČETNA INDUKCIJA žepki 2-4:
2: homogenat pred soniciranjem
3: supernatant po soniciranju
4: pelet po soniciranju

30°C ZAČETNA INDUKCIJA žepki 5-7:
5: homogenat pred soniciranjem
6: supernatant po soniciranju
7: pelet po soniciranju

37°C ZAČETNA INDUKCIJA žepki 8-10:
8: homogenat pred soniciranjem
9: supernatant po soniciranju
10: pelet po soniciranju
Nanosi 20 µL.



Slika 4-7: Vpliv temperature na izražanje proteinov, gel 2.
KASNEJŠA INDUKCIJA
1: Sharp proteinski standard

25°C KASNEJŠA INDUKCIJA:
2: homogenat pred soniciranjem
3: supernatant po soniciranju
4: pelet po soniciranju

30°C KASNEJŠA INDUKCIJA žepki 5-7:
5: homogenat pred soniciranjem
6: supernatant po soniciranju
7: pelet po soniciranju

37°C KASNEJŠA INDUKCIJA žepki 8-10:
8: homogenat pred soniciranjem
9: supernatant po soniciranju
10: pelet po soniciranju
Nanosi 20 µL.

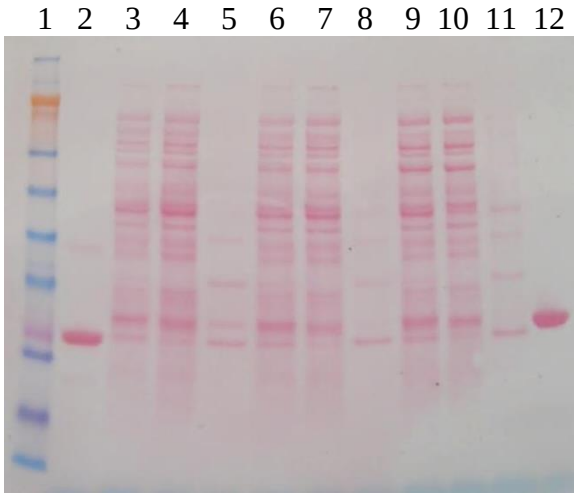
11: 25°C začetna indukcija supernatant po soniciranju – manjši nanos
12: 30°C začetna indukcija supernatant po soniciranju – manjši nanos

Produkcijo večjih količin analogov smo kasneje uspešno izvedli pri 25°C, s trajanjem produkcijske faze 6-10 ur in po kasnejši indukciji po 3 urah. Pod temi pogoji smo pridobili dovolj proteina za izolacijo in nadaljnje analize posameznih analogov hGH.

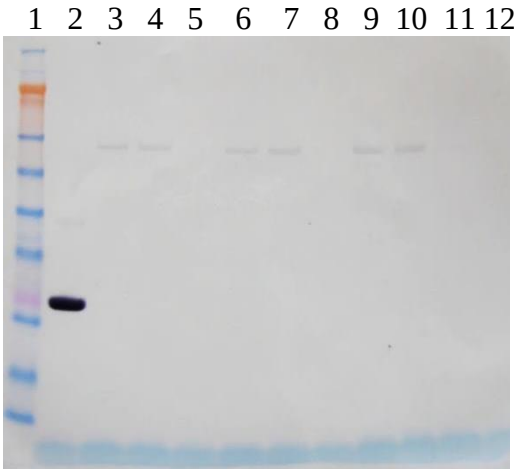
4.3 IMUNODETEKCIJA ANALOGOV rhGH

Izražanje analoga **gene 1** pri vseh treh temperaturah smo želeli potrditi tudi z imunodetekcijo. Najprej smo izvedli elektroforezno ločbo in gel obarvali z barvilom Ponceau-s (slika 4-8). Po prenosu proteinov na nitrocelulozno membrano smo imunodetekcijo izvedli z anti-His protitelesi (slika 4-9), saj smo pričakovali specifično vezavo protiteles na histidinski rep. Za kontrolo vezave protiteles smo na gel nanesli tudi analog proteina TNF z dodanim histidinskim repom.

Protitelesa anti-His se proti pričakovanjem niso vezala na H6-hGH, čeprav so se vezala na analog proteina TNF s histidinskim repom. Opaziti je tudi vezavo višje od rhGH v liniji malo pod 60 kDa pri vseh vzorcih, kar kaže na verjetno specifičnost vezave na kateri drug protein, bogat s histidini. Postopek smo ponovili tudi z drugimi anti-His protitelesi po denaturaciji vzorcev na 100°C 10 min, ki naj bi omogočila izpostavitev histidinskega repa, vendar se protitelesa ponovno niso vezala na analog H6-hGH.



Slika 4-8: Detekcija proteinov na membrani z barvilom Ponceau-s.



Slika 4-9: Detekcija proteinov na membrani s protitelesi anti-His.

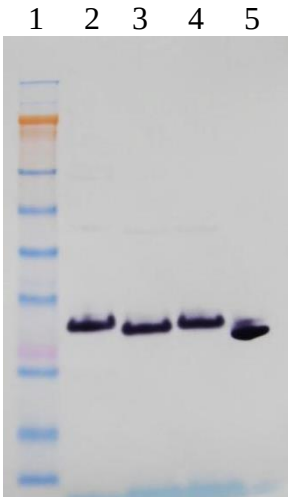
1: SeeBlue proteinski standard
2: analog TNF - H7dN6TNF

25°C KASNEJŠA INDUKCIJA žepki 3-5:
3: homogenat pred soniciranjem
4: supernatant po soniciranju
5: pelet po soniciranju

30°C KASNEJŠA INDUKCIJA žepki 6-8:
6: homogenat pred soniciranjem
7: supernatant po soniciranju
8: pelet po soniciranju

37°C KASNEJŠA INDUKCIJA žepki 9-11:
9: homogenat pred soniciranjem
10: supernatant po soniciranju
11: pelet po soniciranju
12: hGH standard
Nanosi 20 µL.

Po prejemu anti-hGH protiteles smo poskus imunodetekcije analogov ponovili in uspelo nam je potrditi izražanje tarčnih proteinov (slika 4-10).



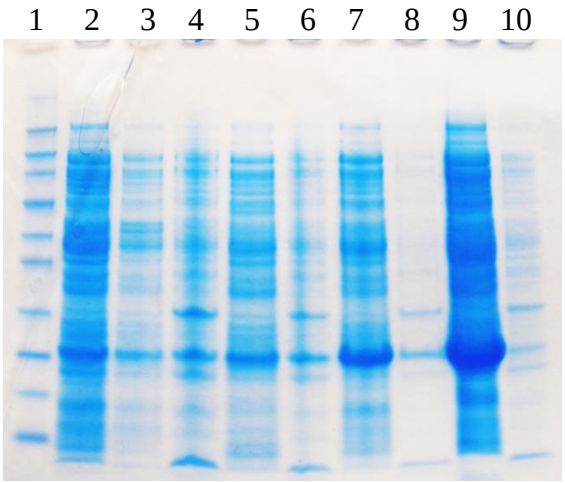
Slika 4-10: Detekcija proteinov na membrani s protitelesi anti-hGH.
1: SeeBlue proteinski standard
2: **gene 1**
3: **gene 2**
4: **gene 3**
5: hGH standard brez reducenta
Nanosi 25 µL.

4.4 IZOLACIJA TARČNIH PROTEINOV

4.4.1 RAZTAPLJANJE INKLUZIJSKIH TELES

Analize biomase so pokazale najvišjo prisotnost izraženih tarčnih proteinov v peletu po soniciranju. Tarčni protein se je v tem primeru izražal v obliki inkluzijskih teles v celicah. Inkluzijska telesa smo raztapljali v več različnih pufrih in primerjali uspešnost izolacije

proteina. Rezultate smo pridobili z elektroforezno analizo vzorcev in so predstavljeni na slikah 4-16 in 4-17. Za najprimernejši postopek raztapljanja se je izkazalo raztapljanje v pH 11,5 in brez uree, saj smo pridobili precej analoga rhGH, tudi v primerjavi s količino ostalih prisotnih proteinov. Pri pH 8,0 je bilo raztapljanje manj uspešno, saj smo izolirali precej manj analoga rhGH, pri pH 12,5 pa smo izolirali tudi precej več drugih proteinov, kar bi kasneje otežilo čiščenje tarčnega proteina.



Slika 4-11: SDS-PAGE analiza po raztapljanju IT.
1: Sharp proteinski standard
2: supernatant po prvem spiranju IT
3: supernatant po drugem spiranju IT
4: pelet (IT) po drugem spiranju
5: supernatant po raztapljanju v pH8,3; 10mM TRIS/HCl, 2M urea
6: pelet po raztapljanju v pH8,3; 10 mM TRIS/HCl, 2M urea
7: supernatant po raztapljanju v pH 11,5; 20mM TRIS/HCl
8: pelet po raztapljanju v pH 11,5; 20 mM TRIS/HCl
9: supernatant po raztapljanju v pH 12,5; 100 mM TRIS/HCl, 2M urea
10: pelet po raztapljanju v pH 12,5; 100 mM TRIS/HCl, 2M urea

4.4.2 IZOLACIJA PROTEINA Z IMAC IN GF

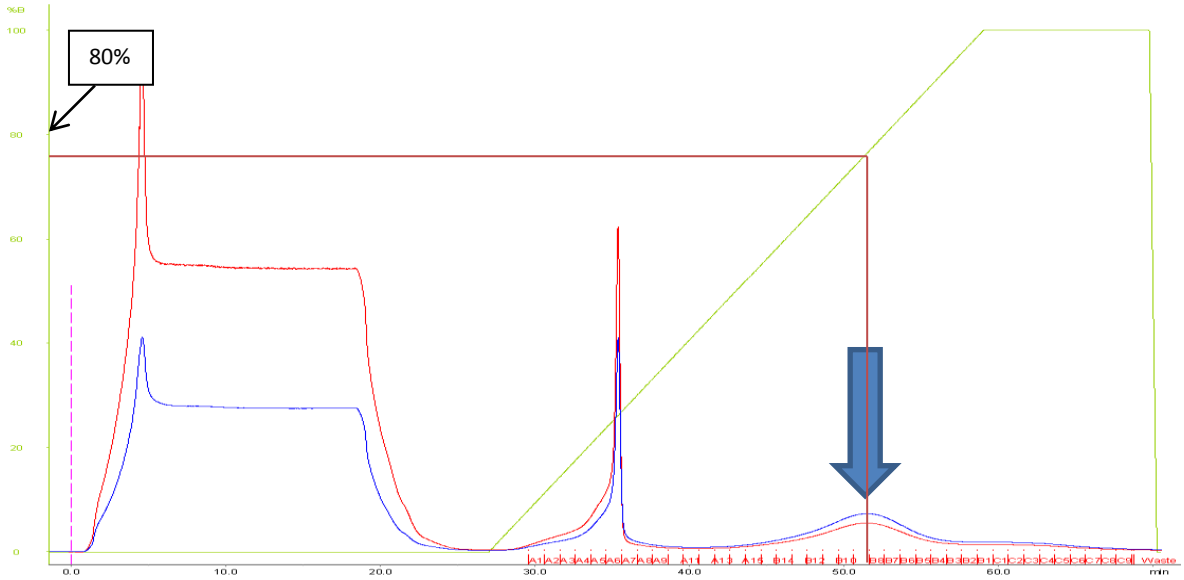
4.4.2.1 IZOLACIJA GENE 1

4.4.2.1.1 IMAC IZOLACIJA Z NIKLJEVIMI IONI

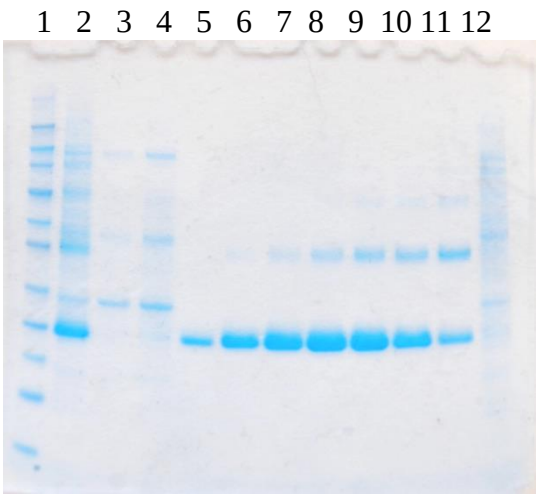
V prvi kromatografski stopnji čiščenja proteina smo ločili analoge rhGH od drugih proteinov, vendar so ostali prisotni tudi agregati tarčnega proteina. Zato je bila običajno pri čiščenju analogov rhGH potrebna še druga kromatografska stopnja z gelsko filtracijo.

Analog **gene 1** se je pri vezavi na nikljeve ione eluirali pri približno 70-80% elucijskega pufra s 30 mM imidazolom (slika 4-18). Zaradi dodanega histidinskega repa je bila vezava proteina močnejša in izolacija na kolonah IMAC zato lažja in uspešnejša. SDS-PAGE analiza frakcij je prikazana na sliki 4-19.

Delež pufra B (%)



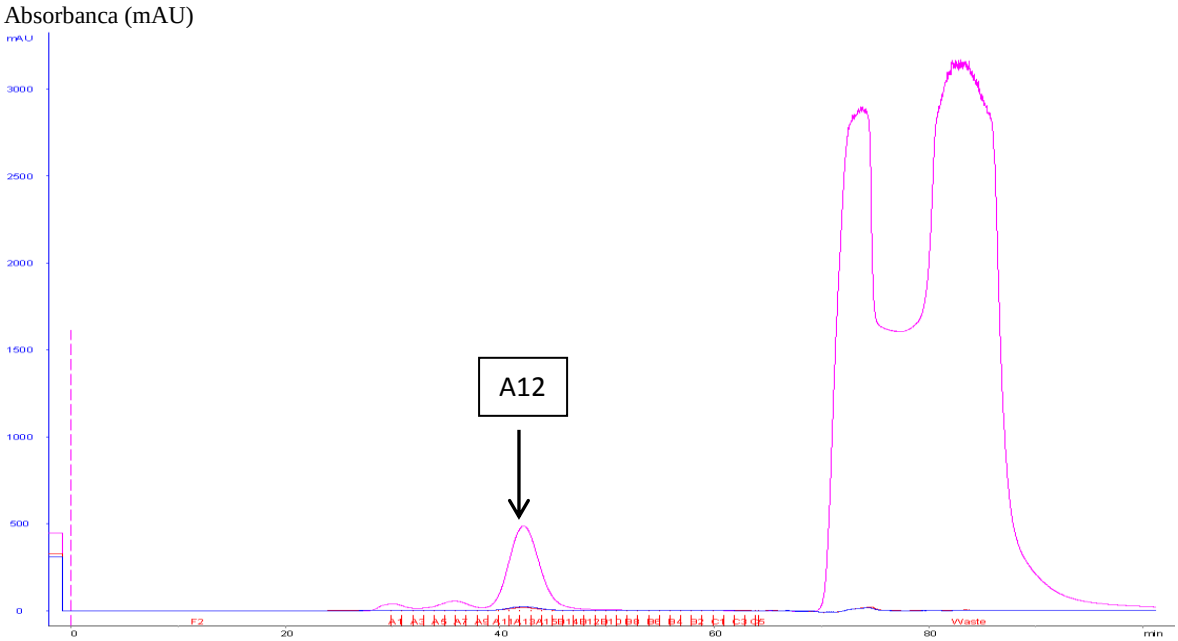
*Slika 4-12: Kromatogram ločbe analoga **gene 1** z IMAC z označenim vrhom, značilnim za rhGH in deležem pufra B ob eluciji analoga.*



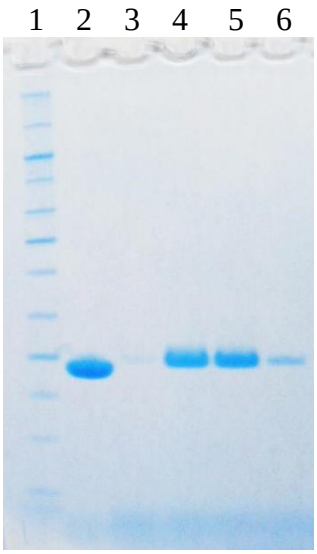
Slika 4-13: SDS-PAGE analiza frakcij po IMAC ločbi analoga ***gene 1*** *z nikljevimi ioni.*
1: Novex Sharp proteinski standard
2: filtrat izhodnega vzorca
3: frakcija A6
4: frakcija A7
5: frakcija B15
6: frakcija B13
7: frakcija B11
8: frakcija B9
9: frakcija B7
10: frakcija B5
11: frakcija B3
12: nevezana frakcija
Nanosi 24 µL.

4.4.2.1.2 GELSKA FILTRACIJA

Z gelsko filtracijo nam je uspelo ločiti tarčni analog od prisotnih agregatov proteina in pridobili smo dovolj čist protein za nadaljnjo karakterizacijo (sliki 4-26 in 4-27).



*Slika 4-14: Kromatogram gelske filtracije analoga **gene 1**.*

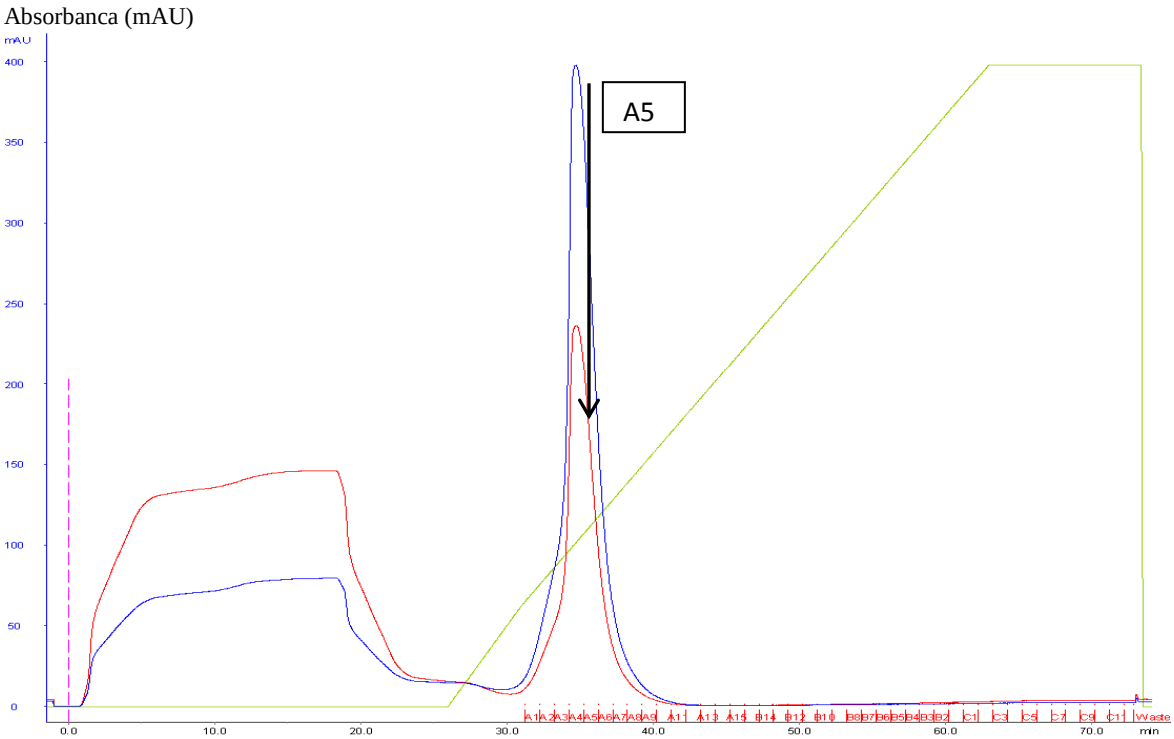


*Slika 4-15: SDS-PAGE analiza frakcij po GF **gene 1**.*
1: Sharp proteinski standard
2: hGH standard
3: frakcija A10
4: frakcija A12
5: frakcija A14
6: frakcija B15
Nanosi 24 µL.

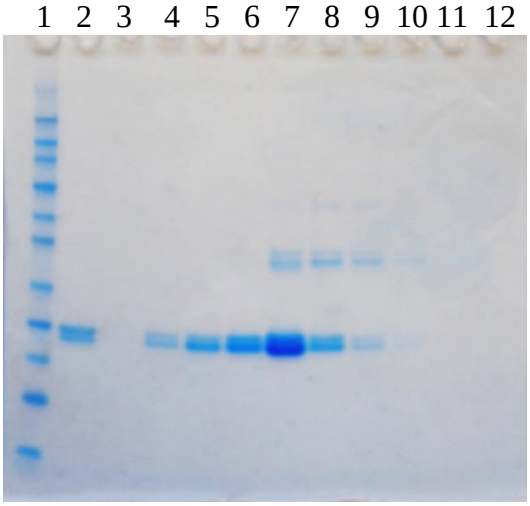
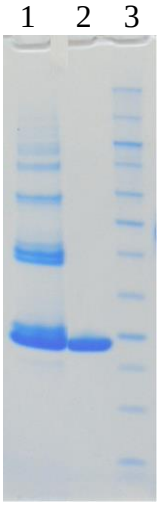
4.4.2.2 IZOLACIJA GENE 2

4.4.2.2.1 IMAC IZOLACIJA Z NIKLJEVIMI IONI

Izolacija analoga **gene 2** na nikljevih ionih je bila uspešna, vendar se je zaradi strukture z manjšim številom histidinskih ostankov ta analog vezal šibkeje kot analog **gene 1** in se je eluiral že pri 25% elucijskega pufra (slika 4-28). Po izolaciji so bili še vedno prisotni agregati rhGH analoga (slika 4-29), zato smo izvedli še dodatno čiščenje z GF. Na sliki 4-30 je prikazana tudi analiza združenih frakcij po IMAC, kjer so agregati bolj izrazito vidni.

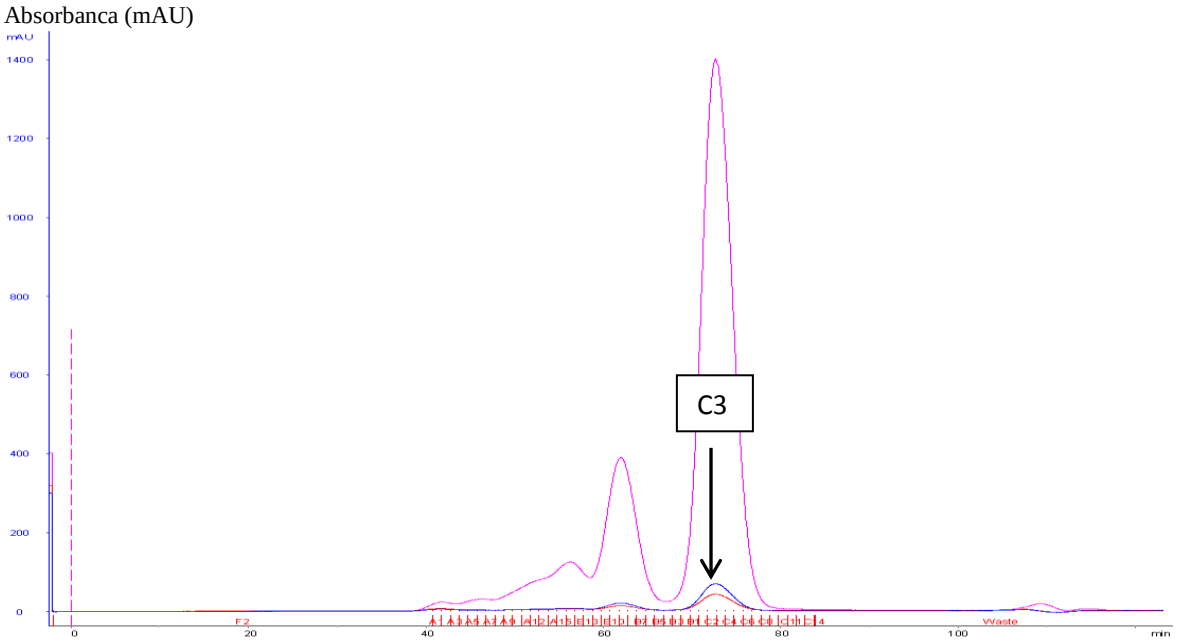


*Slika 4-16: Kromatogram ločbe analoga **gene 2** na IMAC z nikljevimi ioni.*

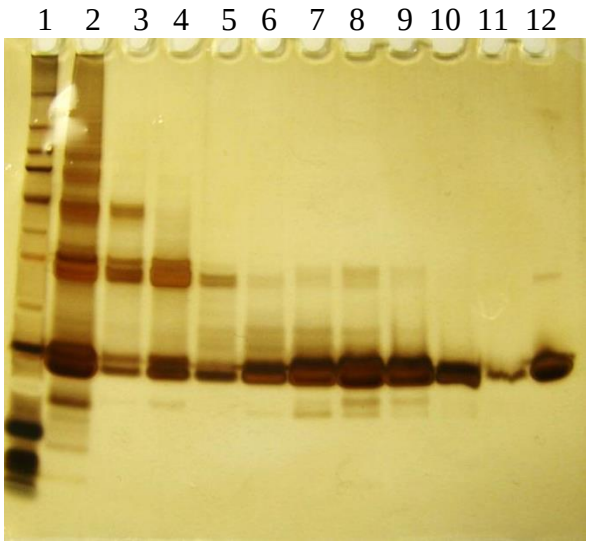
	
*Slika 4-17:SDS-PAGE analiza frakcij analoga **gene 2** po IMAC z nikljevimi ioni.* 1: Sharp proteinski standard 2: izhodni filtrat 3: nevezana frakcija 4: frakcija A1 5: frakcija A2 6: frakcija A3 7: frakcija A5 8: frakcija A7 9: frakcija A8 10: frakcija A9 11: frakcija A10 12: frakcija A12 Nanosi 20µL.	*Slika 4-18: SDS-PAGE analiza združenih frakcij analoga **gene 2** po IMAC.* 1: združene frakcije **gene 2** po IMAC 2: hGH standard 3: Sharp proteinski standard Nanosi 20 µL.

4.4.2.2.2 GELSKA FILTRACIJA

Gelsko filtracijo smo izvedli po izolaciji na koloni IMAC z vezanimi nikljevimi ioni (slika 4-33). Za analog rhGH je značilen drugi vrh, kar je potrdila SDS-PAGE analiza (slika 4-34). Za večjo občutljivost elektroforeze smo gel obarvali s srebrom in potrdili zadostno čistost izoliranega proteina, saj v osrednjih frakcijah agregatov praviloma ni več prisotnih.



*Slika 4-19: Gelska filtracija analoga **gene 2**.*



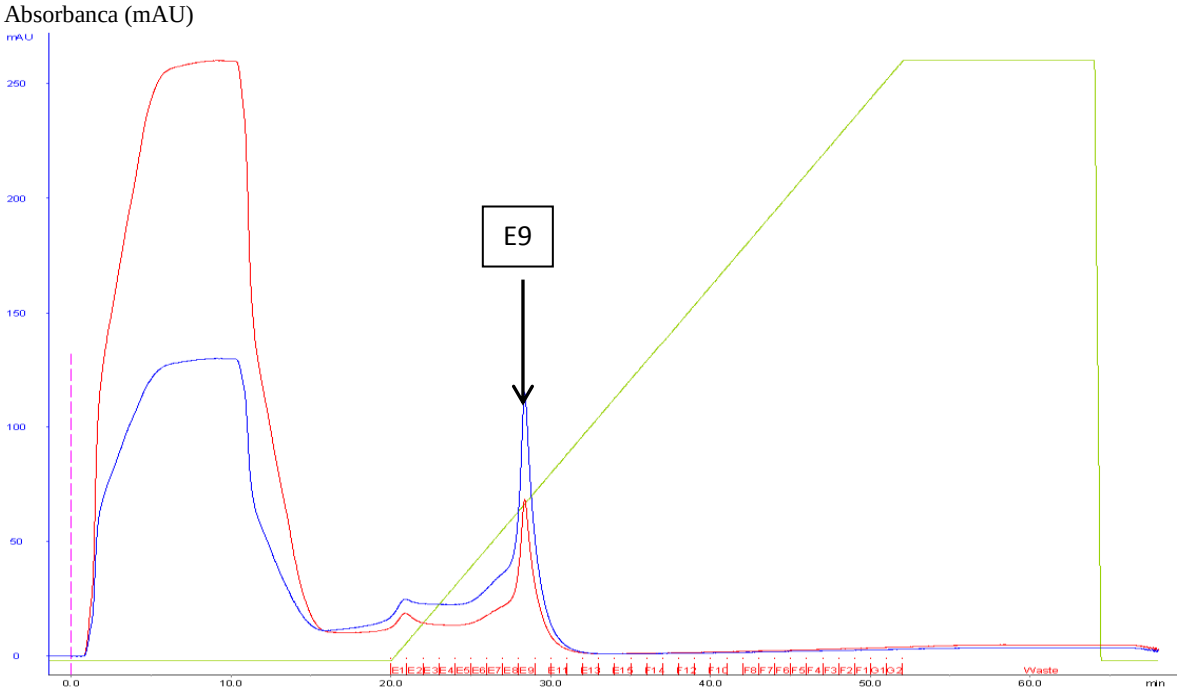
*Slika 4-20: SDS-PAGE analiza frakcij po GF analoga **gene 2**.*
1: Sharp proteinski standard
2: izhodni vzorec (združene frakcije po IMAC)
3: frakcija B12
4: frakcija B9
5: frakcija B4
6: frakcija B2
7: frakcija C1
8: frakcija C3
9: frakcija C5

10: frakcija C7 11: frakcija C9 12: hGH standard Nanosi 25 µL.

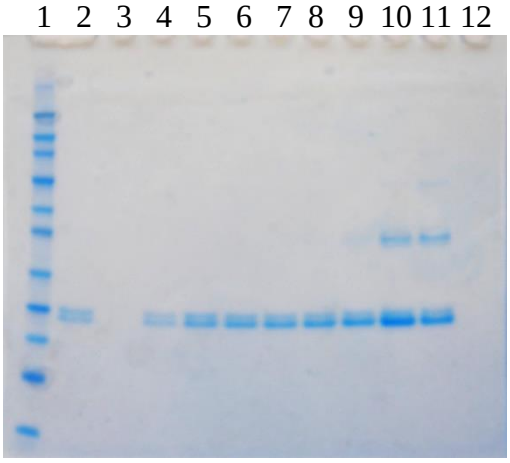
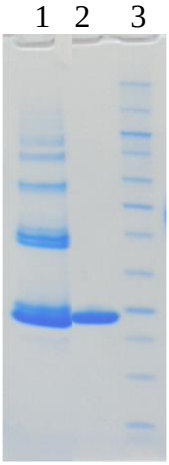
4.4.2.3 IZOLACIJA GENE 3

4.4.2.3.1 IMAC IZOLACIJA Z NIKLJEVIMI IONI

Analog **gene 3** se je podobno kot **gene 2** šibkeje vezal na kolono in se eluiral pri približno 25% elucijskega pufra (slika 4-35). Ločba je v tem primeru precej lepa, na gelu lahko vidimo, da je agregatov v frakcijah ostalo zelo malo, vendar so še vedno prisotni (slika 4-37).

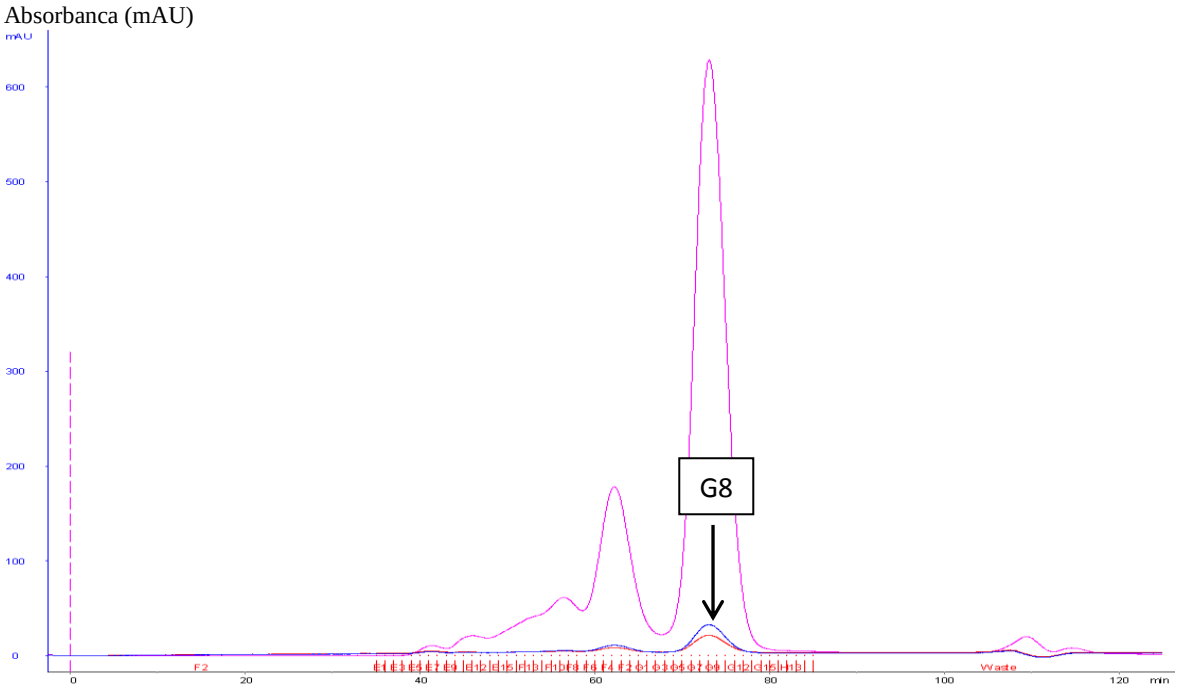


*Slika 4-21: Kromatogram ločbe analoga **gene 3** na IMAC z nikljevimi ioni.*

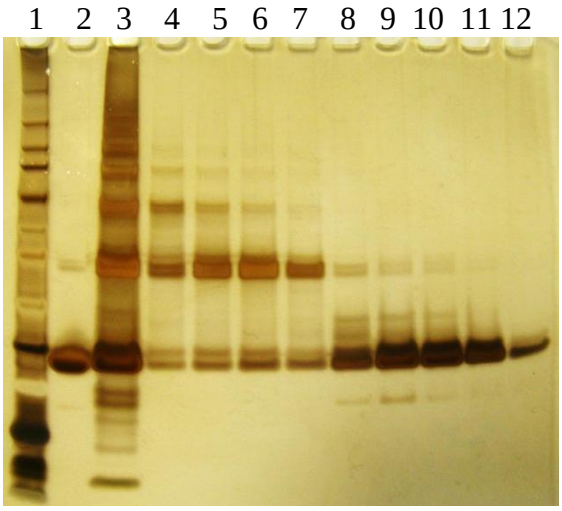
	
*Slika 4-22: SDS-PAGE analiza frakcij analoga **gene 3** po IMAC z nikljevimi ioni.* 1: Sharp proteinski standard 2: izhodni filtrat 3: nevezana frakcija 4: frakcija E1 5: frakcija E3 6: frakcija E5 7: frakcija E6 8: frakcija E7 9: frakcija E8 10: frakcija E9 11: frakcija E10 12: frakcija E12 Nanosi 20 µL.	*Slika 4-23: SDS-PAGE analiza združenih frakcij analoga **gene 3** po IMAC.* 1: **gene 3** združene frakcije po IMAC 2: hGH standard 3: Sharp proteinski standard Nanosi 20 µL.

4.4.2.3.2 GELSKA FILTRACIJA

Gelska filtracija po IMAC z nikljevimi ioni nam je pri vzorcu **gene 3** dala podobne rezultate kot pri drugem analogu (slika 4-40). V osrednjih frakcijah vrha, značilnega za rhGH, smo pridobili dovolj čist protein brez agregatov (slika 4-41).



*Slika 4-24: Gelska filtracija analoga **gene 3**.*



*Slika 4-25: SDS-PAGE analiza frakcij po gelski filtraciji analoga **gene 3**.*
1: Sharp proteinski standard
2: hGH standard
3: izhodni vzorec – združene frakcije po IMAC
4: frakcija F6
5: frakcija F4
6: frakcija F2
7: frakcija G1
8: frakcija G6
9: frakcija G8

10: frakcija G10 11: frakcija G12 12: frakcija G14 Nanosi 25 µL.

4.5 ANALIZA ANALOGOV rhGH

4.5.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV V KONČNEM VZORCU PO KONCENTRIRANJU

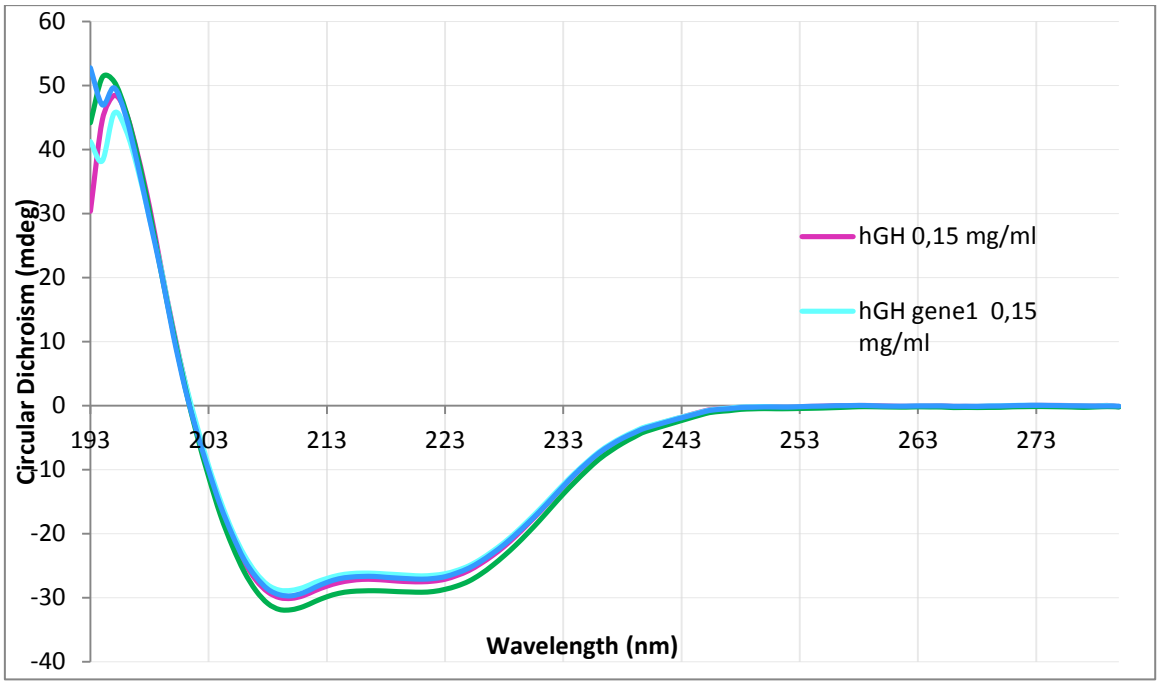
Koncentracijo čistega proteina smo določili z izračunom iz izmerjene absorbance pri 280 nm. Koncentracija vzorca **gene 1** po koncentriranju je bila 1,6 mg/mL.

Pri drugem konstruktu smo izolirani protein delili na dva vzorca, saj je bil volumen za izvedbo kromatografskih metod na celotnem vzorcu prevelik. Zato smo jih izvedli v dveh zaporednih ločbah, kasneje pa smo tudi koncentraciji določili za vsak vzorec posebej. Prvi vzorec je imel koncentracijo 1,2 mg/mL, drugi vzorec pa 1,5 mg/mL.

Tretji konstrukt smo izolirali v najmanjši količini, končno koncentracijo smo določili le 0,82 mg/mL. Zaradi majhne količine izoliranega proteina smo nadaljnje postopke izvedli le na prvih dveh analogih.

4.5.2 DOLOČANJE SEKUNDARNE STRUKTURE ANALOGOV

Sekundarno strukturo analogov smo določili s pomočjo cirkularnega dikroizma. Dobljen spekter s krivuljo, značilno za α-vijačnice, je potrdil pričakovano sekundarno strukturo (slika 4-42).



Slika 4-26: CD spekter vseh treh analogov rhGH.

4.6 DOLOČANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI

Biološko aktivnost so v celičnem laboratoriju na Kemijskem inštitut v Ljubljani določili za končni vzorec analoga H6-hGH (**gene 1**) in končna dva vzorca analoga hGH-H152H154 (**gene 2**). Rezultati so predstavljeni v tabeli 4-IV v odstotkih glede na rhGH z nativnim zaporedjem.

*Tabela 4-II: Biološka aktivnost analogov **gene 1** in **gene 2**.*

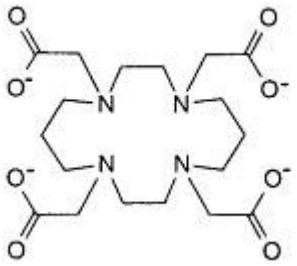
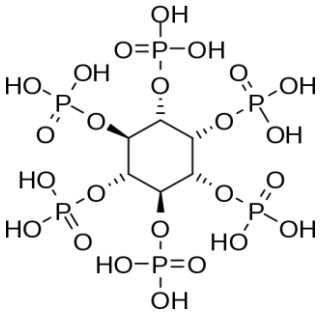
paralelke	**Gene 1 (%)**	**Gene 2/I (%)**	**Gene 2/II (%)**
1	82,09	54,80	60,28
2	101,36	70,02	82,74
3	135,09	88,48	81,84
Povprečje	106,18	71,10	74,96
Standardna deviacija	26,83	16,78	12,71

4.7 PRIPRAVA DELCEV NA OSNOVI SAMOZDRUŽEVANJA PROTEINSKIH MOLEKUL

Delce smo pripravili z dvema različnima kelatorjema, prikazanima v tabeli 4-V, in z analogoma **gene 1** (H6-hGH) in **gene 2** (hGH-H152H154). Analog **gene 1** ima na N-koncu

vezan heksahistidinski rep, **gene 2** pa ima v strukturi poleg naravno prisotnega histidina tudi dva dodatno uvedena histidinska ostanka.

Tabela 4-III: Kelatorja, uporabljena pri pripravi SA delcev.

TETA (1,4,8,11-tetraazaciklotetradekan-1,4,8,11-tetraocetna kislina) 	Fitinska kislina 
- 4 vezavna mesta na N in 4 vezavna mesta na $-COO^-$	- 12 vezavnih mest na $-COO^-$

Priprava nanodelcev je potekala po recepturah, predstavljenih v tabelah 4-VI in 4-VII.

*Tabela 4-IV: Receptura za pripravo delcev **gene 1**.*

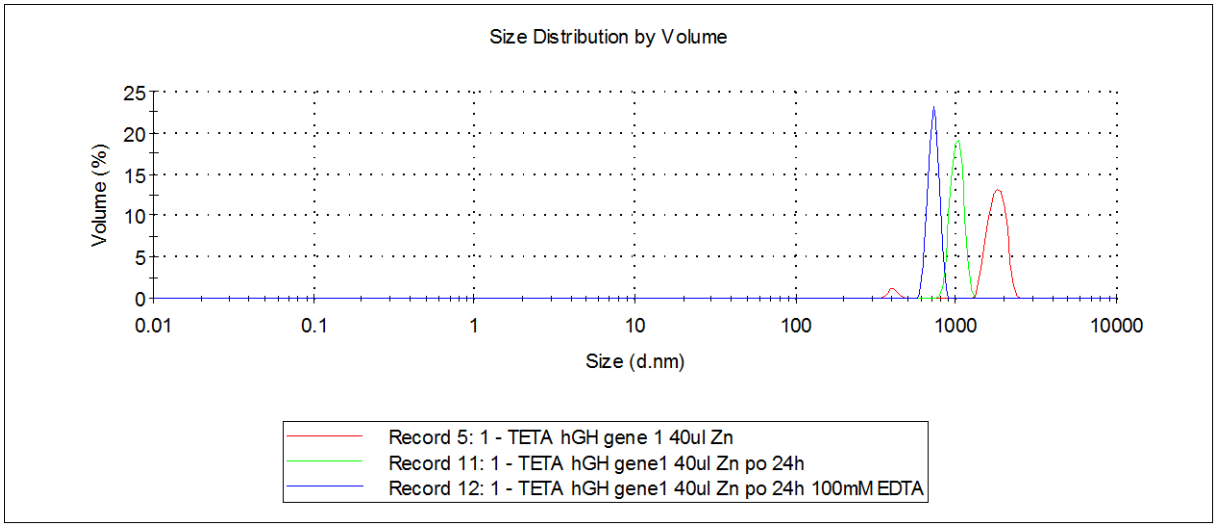
SA-delci z analogom gene 1
3365 µL PBS
10 mL kelatorja (c = 50 mM)
625 µL analoga rhGH (c = 1,6 mg/mL)
40 µL $ZnSO_4$ (c = 30 mM)

*Tabela 4-V: Receptura za pripravo delcev **gene 2**.*

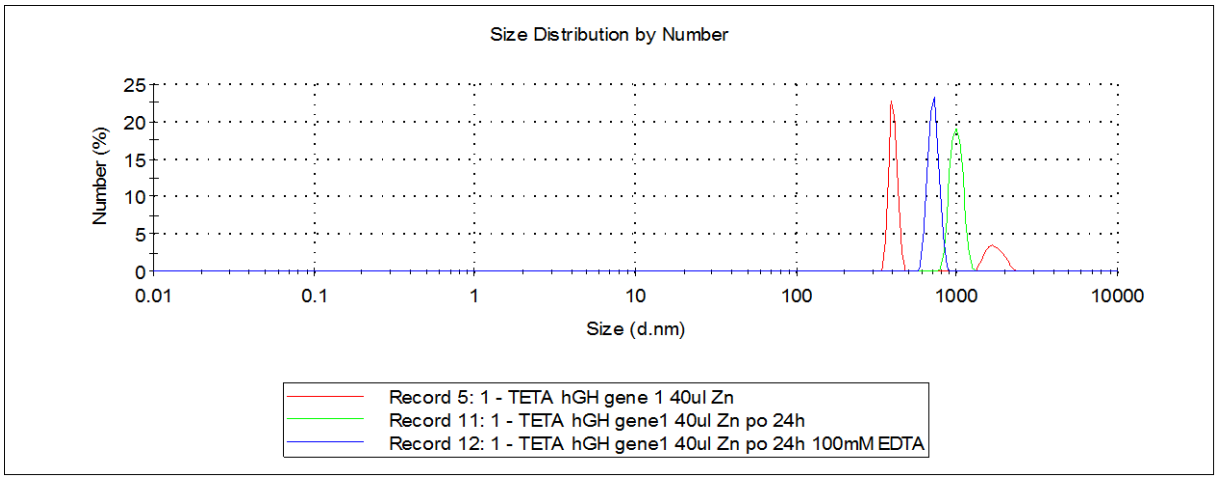
SA-delci z analogom gene 2
3162 µL PBS
5 µL kelatorja (c = 50 mM)
833 µL analoga rhGH (c = 1,2 mg/mL)
40 µL $ZnSO_4$ (c = 30 mM) (20+20 µL)

Po 20 min mešanja smo velikost delcev preverili z DLS (slike 4-43 do 4-50). Barvne krivulje na grafih prikazujejo porazdelitev nastalih delcev za oba kelatorja. Meritev DLS smo naredili tudi na vzorcih brez dodatka $ZnSO_4$ (sliki 4-51 in 4-52), s čimer smo potrdili domnevo, da je za tvorbo delcev potrebna prisotnost kovinskih ionov. Pri analogu **gene 2** smo najprej dodali po 20 µL $ZnSO_4$ in preverili velikost delcev na DLS, nato smo dodali še preostalih 20 µL. S tem smo potrdili domnevo, da je tudi od količine dodanih ionov odvisna velikost nastalih delcev.

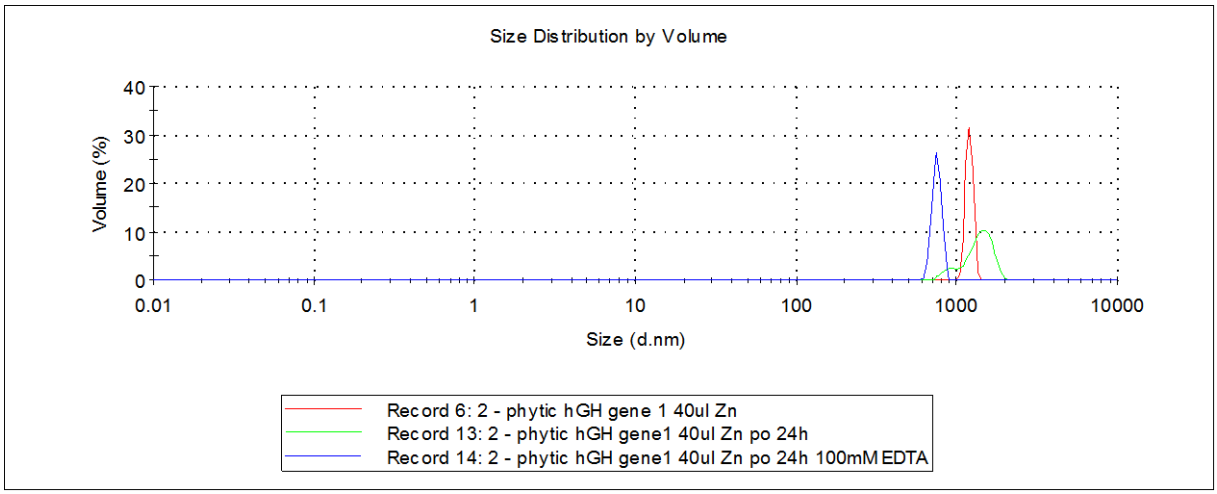
Po dodatku 40 µL cinkovih ionov smo dobili precej velike delce, zato smo po 24 h in ponovnem merjenju na DLS dodali 100 mM EDTA, ki je vezala določeno količino cinkovih ionov in volumen delcev se je opazno zmanjšal.



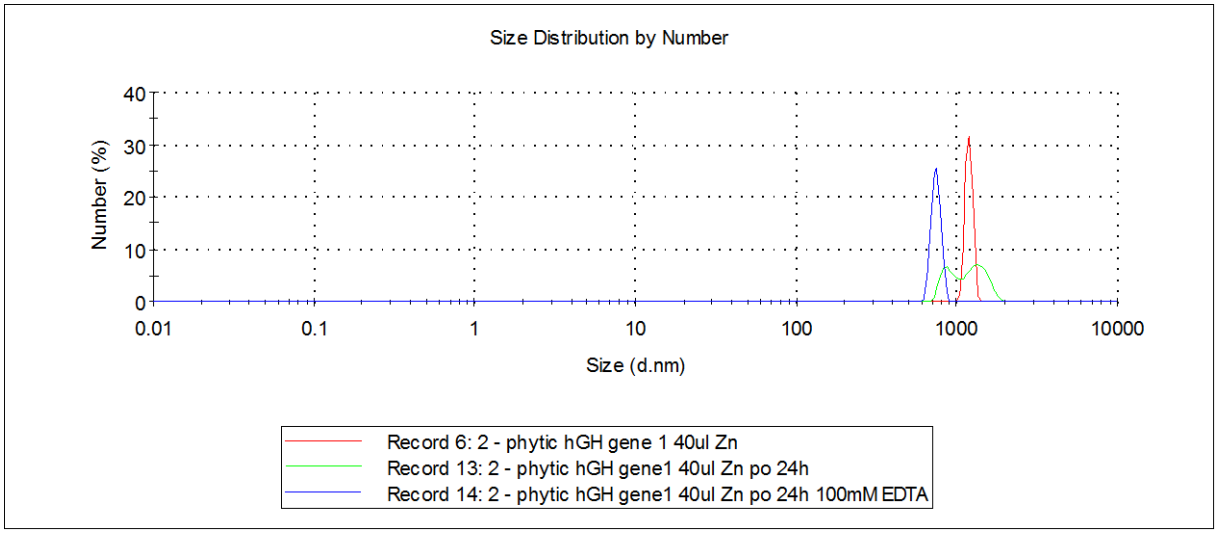
*Slika 4-27: Delci rhGH **gene 1** (TETA) – porazdelitev velikosti delcev po volumnu.*



*Slika 4-28: Delci rhGH **gene 1** (TETA) – porazdelitev velikosti delcev po številu.*

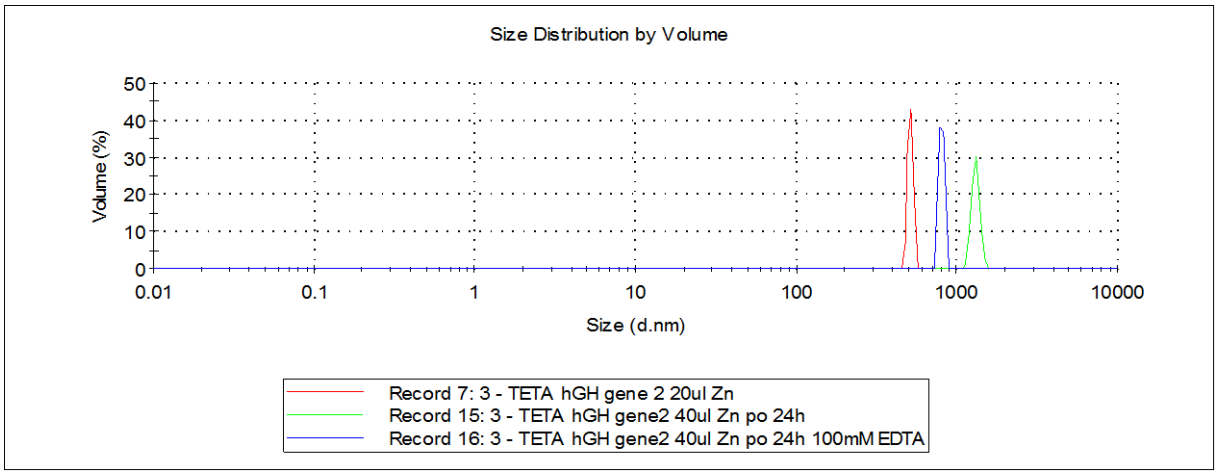


*Slika 4-29:Delci rhGH **gene 1** (fitinska kislina) – porazdelitev velikosti delcev po volumnu.*

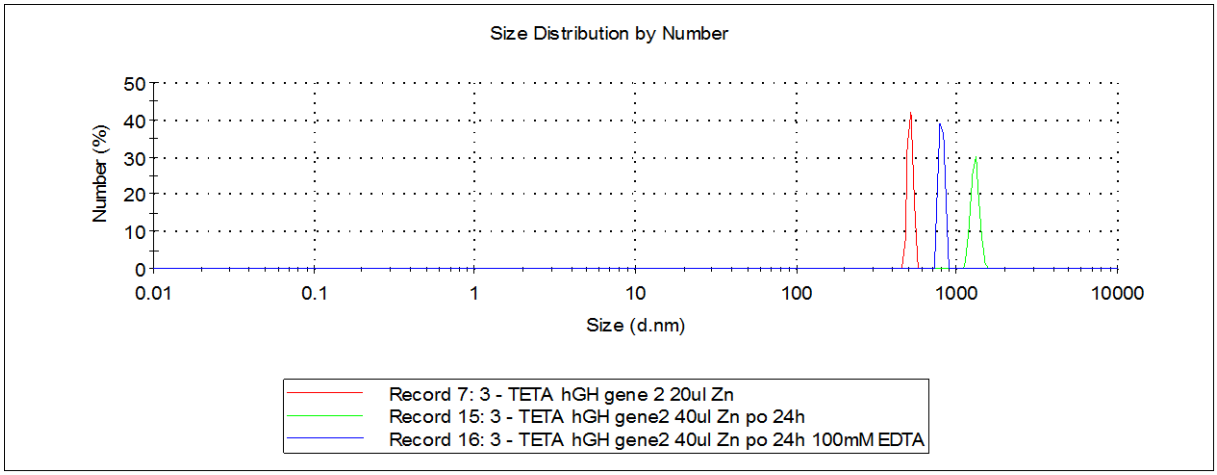


*Slika 4-30: Delci rhGH **gene 1** (fitinska kislina) – porazdelitev velikosti delcev po številu.*

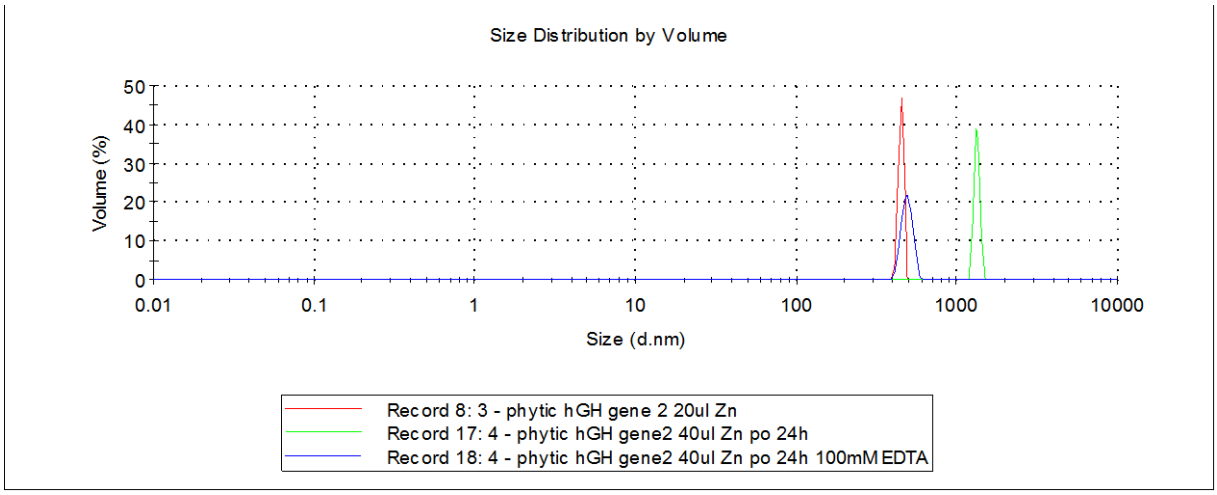
Pri analogu **gene 1** (slike 4-43 do 4-46) smo takoj na začetku dodali po 40 µL $ZnSO_4$, kar se je izkazalo skoraj za prekomerno količino. Dobili smo dve populaciji delcev, med katerima je ena predstavljala sicer številčno manjšo ampak volumsko mnogo večjo populacijo v velikosti več kot 1 µm. Pri pripravi delcev s fitinsko kislino smo dobili le eno populacijo v velikosti 1 µm. Po 24 h smo ponovno preverili velikost delcev na DLS in glede na rezultate sklepali, da so delci stabilni, saj se je porazdelitev glede na število le rahlo znižala. Zanimivo je, da smo po 24 h pri delcih s kelatorjem TETA opazili le še eno populacijo, ki je po velikosti delcev nekje med prejšnji dan zaznanima populacijama, pri fitinski kislini pa smo zaznali ločevanje na dve populaciji.



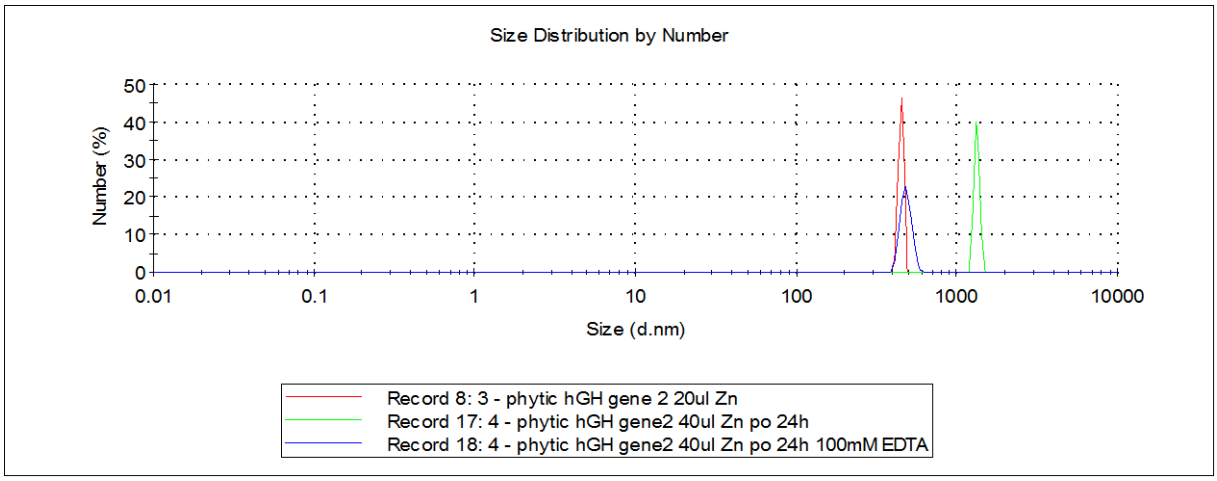
*Slika 4-31: Delci rhGH **gene 2** (TETA) – porazdelitev velikosti delcev po volumnu.*



*Slika 4-32: Delci rhGH **gene 2** (TETA) – porazdelitev delcev po številu.*

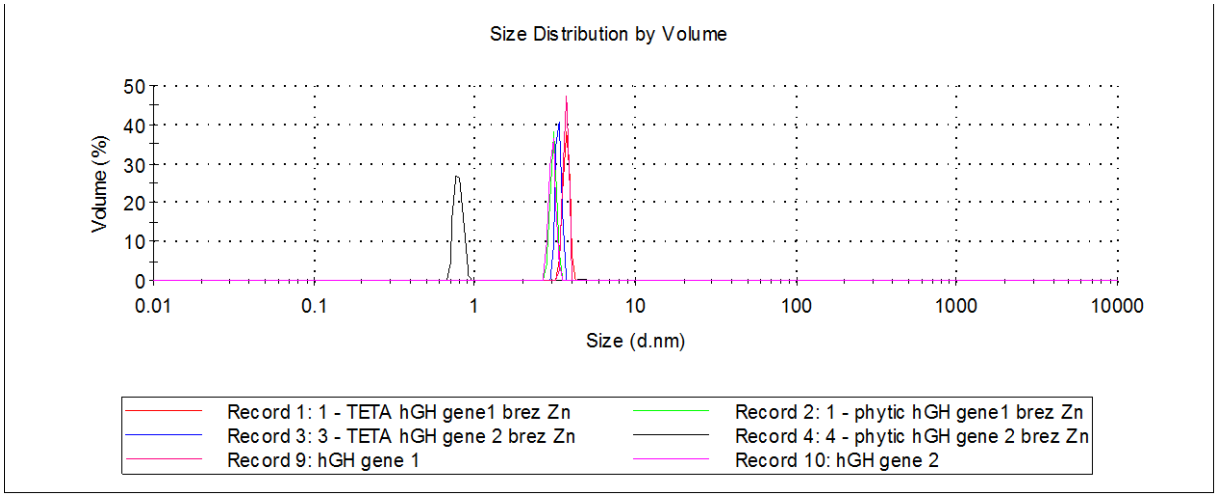


*Slika 4-33: Delci rhGH **gene 2** (fitinska kislina) – porazdelitev velikosti delcev po volumnu.*

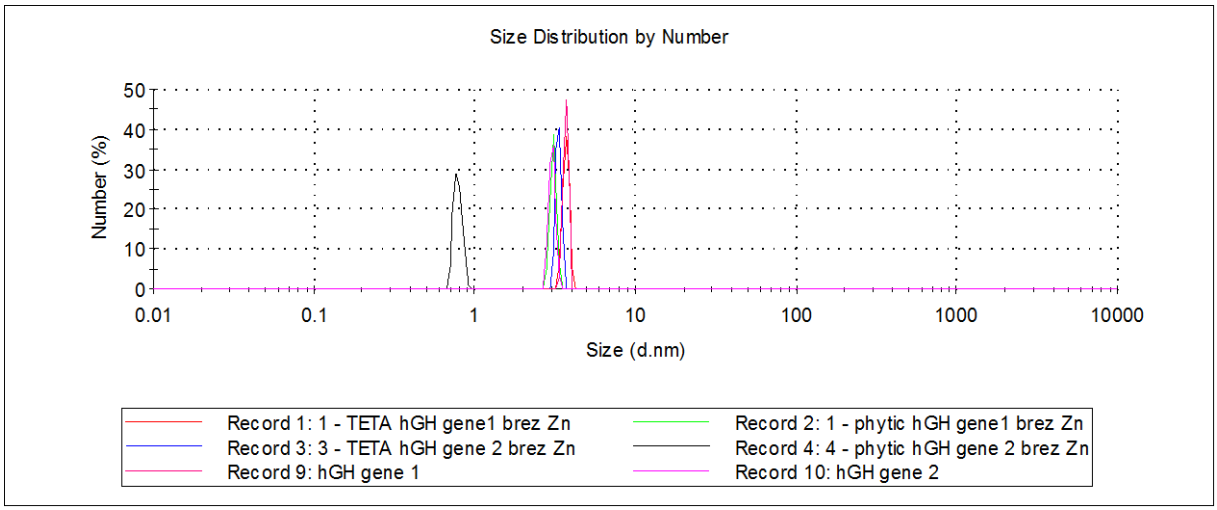


*Slika 4-34: Delci hGH **gene 2** (fitinska kislina) – porazdelitev velikosti delcev po številu.*

Pri analogu **gene 2** (slike 4-47 do 4-50) smo najprej dodali le 20 µL $ZnSO_4$ in po 10 min mešanja preverili porazdelitev velikosti delcev na DLS. Pri obeh kelatorjih smo dobili le eno populacijo primerljive velikosti pod 1 µm, zato iz dobljenih rezultatov ne moremo sklepati na vpliv kelatorja na velikost nastalih delcev. Po dodatku preostalih 20 µL smo delce ponovno pustili stati 24 h in ponovno potrdili stabilnost delcev, saj smo zaznali populacijo v velikosti malo nad 1 µm z le rahlim upadom številčnosti.



*Slika 4-35: Delci hGH **gene 1** in **gene 2** (TETA in fitinska kislina brez cinkovih ionov) – porazdelitev velikosti delcev po volumnu.*



*Slika 4-36: Delci hGH **gene 1** in **gene 2** (TETA in fitinska kislina brez cinkovih ionov) – porazdelitev velikosti delcev po številu.*

Za preverjanje pomembnosti dodatka ionov v raztopino za pripravo delcev smo nastavili poskus brez dodanih cinkovih ionov. Iz grafov (sliki 4-51 in 4-52) je razvidno, da delci pravzaprav ne nastajajo, saj se dobljena velikost giblje v območju do 5 nm.

Stopnjo vgradnje proteina v delce smo preverili z določanjem koncentracije proteina, preostalega v raztopini. Po uri in pol smo z ultracentrifugiranjem 1 mL vzorca ločili delce od raztopine in pomerili absorbanco v raztopini pri 280 nm.

V raztopino za pripravo delcev smo dodali po 1 mg proteina, končni volumen raztopine za pripravo je bil 4 mL. Začetna koncentracija proteina v raztopini je bila torej 0,25 mg/mL. Določene koncentracije v raztopini po pripravi delcev in odstotek v delce vgrajenega proteina so predstavljeni v tabeli 4-VIII.

Tabela 4-VI: Odstotek vgradnje proteinov v delce.

VZOREC	**Koncentracija v raztopini po pripravi nanodelcev (izmerjena z A280)**	**Odstotek vgrajenega proteina**
hGH **gene 1** TETA	0,074 mg/mL	70,4 %
hGH **gene 1** fitinska kislina	0,077 mg/mL	69,2 %
hGH **gene 2** TETA	0,041 mg/mL	83,6 %
hGH **gene 2** fitinska kislina	0,035 mg/mL	86,0 %

5 DISKUSIJA

Biološka zdravila so do danes dosegla velik napredek na področju zdravljenja različnih resnih obolenj. Kljub prednostim v terapiji imajo zaradi svoje največkrat proteinske narave precej omejitev, med katerimi so pomembni tako zahtevnost in stroški proizvodnje kot tudi slabosti neizogibne parenteralne aplikacije. Sintetsko načrtovanje analogov terapevtskih proteinov lahko z manjšimi spremembami v strukturi v zadostni meri vpliva na lastnosti, ki omogočijo lažje pridobivanje in čiščenje proteina. Hkrati lahko tudi spremenijo profil delovanja zdravila, predvsem v smeri manjše občutljivosti proteinske učinkovine na zunanje dejavnike. Po drugi strani lahko na terapevtsko učinkovitost in uporabnost vplivamo tudi s pripravo različnih farmacevtskih oblik, ki spremenijo način aplikacije ali pa omogočijo modificiran profil sproščanja na mestu delovanja in bolj tarčno usmerjeno delovanje. Na tem področju je zelo obetavna priprava različnih vrst nanodelcev, v katere lahko na različne načine vgradimo terapevtski protein.
V raziskovalni nalogi smo se posvetili trem analogom rhGH. Osnovno zamisel dela lahko razdelimo na tri glavne dele. Prvi del predstavlja pripravo analogov rhGH, sledita izolacija in čiščenje proteinov v drugem delu. Zadnji del je posvečen pripravi delcev s proteinom na osnovi koordinativne vezi.

5.1 PRIPRAVA IN PROIZVODNJA ANALOGOV rhGH

Za pripravo smo izbrali tri analoge rhGH s sintetsko uvedenimi histidinskimi ostanki, ki omogočajo koordinativno vezavo proteina na kovinske ione. Prvi analog, H6-hGH, je najbolj bogat s histidini in se zato pričakovano močneje veže v koordinativni vezi. Druga dva analoga imata vsak po dve mutaciji, uvedeni v strukturo. Vsi trije analogi so z vidika biološke aktivnosti zelo podobni, kar kaže na zanemarljiv vpliv uvedenih sprememb na učinkovitost. Vendar so te spremembe lahko ključnega pomena pri načrtovanju zdravil z večjo stroškovno učinkovitostjo v proizvodnji in terapiji.

Sintetske gene smo najprej vstavili v klonirni sev *E. coli*, ki omogoča namnožitev genskega materiala brez izražanja rP. Dobljene klone smo preverili na agaroznem gelu in izolirali pDNA vseh treh konstruktov iz ustreznega klona 1. Za ekspresijo analogov smo gene vstavili v vektor pET17b s prisotnim zaporedjem za rezistenco na ampicilin, ki je namenjen selekciji kolonij z uspešno transformacijo plazmida v celicah *E. coli*. rhGH je

glede ekspresijskega sistema nezahteven, saj ne potrebuje dodatnih posttranslacijskih modifikacij za doseganje biološke učinkovitosti. Analoge smo v zadostnih količinah pridobili v stresanih kulturah seva *E. coli* BL21(DE3) z zapisom za T7 RNA polimerazo, ki omogočajo poceni proizvodnjo enostavnejših proteinov pod kontrolo promotorja lac UV5 (7). Prednost bakterijskih ekspresijskih sistemov so predvsem visoki donosi, dobro pa je poznana tudi njihova genetika. Ravno zato je *E. coli* eden pogostejših organizmov, ki se uporablja za pridobivanje rekombinantnih proteinov, pri pridobivanju rhGH pa je uveljavljen tudi na industrijskem nivoju (17).

Za namnožitev vcepka smo transformirane bakterije najprej nanesli na LBP gojišče s prisotnim ampicilinom za selekcijo in z dodano glukozo. Glukoza naj bi uspešno inhibirala izražanje rP in tako omogočila hitrejšo namnožitev vcepka, kasneje pa lahko ob ustreznem OD600 kulturo precepimo v ekspresijsko gojišče GYSP. Pri pET plazmidih poteka ekspresija pod vplivom močnega promotorja T7. Prepisovanje gena za vstavljeni protein se aktivira po vezavi T7 RNA polimeraze na promotor, posredno torej z induktorjem IPTG, ki z vezavo na promotor lac UV5 sproži prepisovanje gena za T7 RNA polimerazo. Vse ponovitve procesa proizvodnje smo izvedli po postopku s kasnejšo indukcijo z IPTG.

Izražanje proteinov smo izvedli pri treh različnih temperaturah. Protein se je izražal tako v topni kot v netopni frakciji. Običajno bakterijske kulture pri nižji temperaturi počasneje rastejo, česar v tem primeru nismo potrdili in smo za nadaljnjo produkcijo proteinov izbrali nižjo temperaturo (25°C) od optimalne, saj smo vseeno dosegli zadostno rast v bakterijskih kulturah. Čeprav izražanja proteina nismo kvantitativno določili, smo pri SDS-PAGE analizi na gel nanesli primerljive količine vzorca. Zato smo lahko glede na intenziteto lis sklepali tudi na količino proteinov v vzorcu. V peletu po soniciranju biomase je v primerjavi s supernatantom prisotnih zelo malo ostalih proteinov, kar olajša čiščenje tarčnega proteina kljub potrebnemu raztapljanju inkluzijskih teles. V primeru izražanja proteina v netopni obliki inkluzijskih teles je nižja temperatura zaželena tudi zaradi boljše topnosti IT, saj ima protein zaradi počasnejše produkcije pri nižji temperaturi več časa za ustreznejše zvijanje in lahko precipitira v bolj topnih agregatih (11).

Prisotnost analogov rhGH smo potrdili tudi z imunokemijsko metodo prenos po Westernu. Nepričakovano se protitelesa proti histidinskim ostankom niso vezala na analog H6-hGH, ki je najbogatejši s histidini. Možno je, da se rep pri nativni konformaciji proteina zvije v njegovo notranjost in tako ni izpostavljen vezavi, vendar vezava ni uspela niti po denaturaciji proteina na 100°C, ki naj bi rep izpostavila in omogočila vezavo.

Možna bi bila tudi neustreznost protiteles ali izguba njihove strukture in afinitete, kar pa smo ovrgli z močno vezavo na analog TNF - H7dN6TNF, prav tako pa so se protitelesa v manjšem obsegu vezala na protein z velikostjo približno 60 kDa. Za potrditev ekspresije vseh treh analogov smo zato postopek ponovili in uporabili protitelesa proti hGH, ki so se vezala na vse tri analoge.

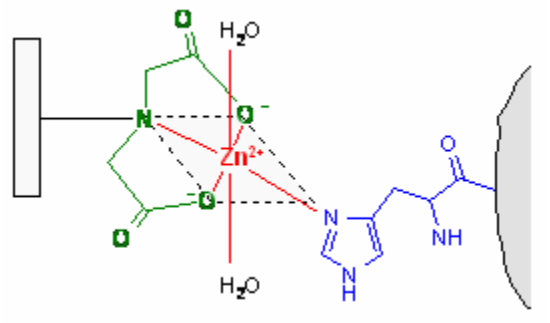
5.2 IZOLACIJA, ČIŠČENJE IN ANALIZA ANALOGOV rhGH

Analoge rhGH smo morali izolirati iz inkluzijskih teles, ki so se tvorila ne glede na temperaturo gojenja kulture. Raztapljanje smo izvedli pri različnih pogojih v petih različnih pufrih. Za osnovo smo vzeli do sedaj že uporabljene pogoje raztapljanja, katere so primerjali Patra et al. (32) in Sonoda et al (33), IT pa smo poskusili raztopiti tudi brez kaotropnih agensov. V vseh primerih smo vzpostavili pogoje, ki ne povzročijo obširnejše degradacije proteinov, tudi v primeru dodatka 2M uree ali 2% NLS.

Raztapljanje pri pH 11,5 v 20 mM TRIS/HCl se je nepričakovano izkazalo kot najboljše zaradi zadostne izolacije analogov rhGH iz inkluzijskih teles, ki je bila sicer boljša pri raztapljanju z 2M ureo pri pH 12,5, vendar pa so se v tem primeru iz peleta izolirali tudi skoraj vsi preostali proteini in je bil delež izoliranega analoga rhGH precej manjši. Pri nižjem pH 8,5 ob 2M urei je izolacija opazno slabša, saj tudi po raztapljanju v IT ostane približno enaka količina analoga kot smo jo izolirali, medtem ko se skupaj z analogom izolira tudi precejšen del preostalih proteinov. Zanimivo je, da so Sonoda et al. (33) IT raztopili šele ob mnogo ostrejših pogojih, medtem ko je naš poskus brez kaotropnih agensov v alkalnem pH uspel, kar je morda tudi posledica gojenja stresanih kultur pri nižji temperaturi, ugodnejši za nastajanje bolj topnih IT. Z odsotnostjo kaotropnih agensov smo tudi poskusili ohraniti sekundarno strukturo, tako da po raztapljanju pravzaprav ni bil več potreben korak renaturacije, temveč smo po centrifugiranju, s katerim smo ostanke celic ločili od supernatanta s tarčnim proteinom, lahko kar nadaljevali s čiščenjem proteina.

Za osnovno metodo čiščenja proteina smo izbrali IMAC, ki omogoča tudi enostopenjsko čiščenje s histidini bogatih proteinov (27). Ker smo v zadnjem delu naloge želeli pripraviti tudi delce na osnovi samozdruževanja s pomočjo koordinativne vezave proteina na kovinski ion, ki je ključnega pomena tudi za uspešno čiščenje s to metodo, je vezava na kolono IMAC hkrati zgodnji pokazatelj, ali bo vezava analogov v delce uspešna.

Pri vseh treh analogih smo kot nosilec za vezavo proteina uporabili Chelating Sepharose FF z vezano skupino IDA. Na skupino IDA smo vezali nikljeve ione, lahko pa bi uporabili tudi cinkove ione, vendar bi bila vezava proteinov na kolono v tem primeru verjetno šibkejša (slika 5-1). Proteine smo s kolone eluirali z naraščajočo koncentracijo imidazola.



Slika 5-1: Primer kompleksa IDA-Zn2+-histidin. V modri barvi je prikazana histidinska skupina na površini proteina, v rdeči koordinativne vezi in kovinski ioni, v zeleni pa iminodiocetna kislina IDA, Podobno se histidinski ostanki vežejo na kolono z vezanimi nikljevimi ioni (27).

Glede na strukturo analogov smo pričakovali uspešno a različno močno vezavo analogov na nikljeve ione. Po pričakovanjih je bila vezava prvega analoga s histidinskim repom najmočnejša, saj je do elucije proteina prišlo šele pri dodatku približno 80% pufra z višjo koncentracijo imidazola. Preostala dva analoga sta se vezala šibkeje, saj je bil za njuno elucijo zadosten dodatek le 30% elucijskega pufra.

Med delom so se analogi rhGH izkazali kot proteini, ki zelo hitro agregirajo, saj je do agregacije prišlo že ob daljšem stanju na sobni temperaturi ali pa pri močnejšem stresanju. Pogosto smo imeli tudi težave pri filtriranju, saj je protein lahko ostal na filtru. Tudi po izolaciji IMAC so v vzorcih pogosto ostali prisotni tudi nereducibilni agregati, katere smo morali odstraniti z dodatnim korakom čiščenja, gelsko filtracijo. Združene frakcije po izolaciji IMAC smo nanesli na kolono z nosilcem Superdex 75. Ta korak nam je tudi omogočil izmenjavo pufra, v katerem smo nato hranili analoge. Za hranjenje smo uporabili placebo hGH pufer z dodanim β-ciklodekstrinom, ki je proteine dodatno stabiliziral in preprečil nadaljnjo agregacijo v vzorcih (50). Po gelski filtraciji smo pridobili dovolj čiste analoge za nadaljnjo analizo in pripravo delcev.

Vse tri analoge smo analizirali in preverili njihovo biološko aktivnost in sekundarno strukturo. Rezultati so vsi ustrezali pričakovanjem, saj smo analogom določili visoko biološko aktivnost, ki je primerljiva z biološko aktivnostjo nespremenjenega rhGH. Za ohranjanje biološke aktivnosti je nujno potrebna nativna struktura proteinov. S pomočjo cirkularnega dikroizma smo določili ustrezno sekundarno strukturo analogov s prevladujočimi α-vijačnicami, kar je potrdilo naše domneve, da spremembe, katere smo uvedli v strukturo proteina, ne vplivajo na končno strukturo in biološko aktivnost proteina.

5.3 PROTEINSKI DELCI, PRIPRAVLJENI NA OSNOVI SAMOZDRUŽEVANJA

Pri pripravi delcev na osnovi koordinativne vezi smo se odločili za dve kelatorski molekuli, ki se med seboj razlikujeta po velikosti in številu vezavnih mest. Pred pripravo smo predpostavili, da na velikost sintetiziranih delcev najbolj vpliva količina dodanih cinkovih ionov, prav tako pa smo med analogoma **gene 1** in **gene 2** pričakovali različno stopnjo vezave proteina v delce, saj imata z uvedenimi histidinskimi ostanki medsebojno različno spremenjeno strukturo. Pripravo in nastajanje delcev smo spremljali z metodo dinamičnega sipanja svetlobe – DLS. Primerjali smo porazdelitev velikosti delcev obeh analogov glede na velikost in število po dodani določeni količini $ZnSO_4$ in hkrati opazovali razliko med pripravo s kelatorjem TETA ali fitinsko kislino.

Velikosti dobljenih populacij delcev so pri obeh analogih in pri obeh kelatorjih primerljive, zato ne moremo sklepati na vpliv teh parametrov na velikost nastalih delcev. Zaradi velikega premera smo v vse vzorce po 24 h dodali še 100 mM EDTA, ki kelira določeno količino cinkovih ionov. Po pričakovanjih se je po dodatku EDTA v vseh primerih zmanjšala velikost delcev, število pa je ostalo nespremenjeno. Iz tega lahko zaključimo, da je pri pripravi delcev zelo pomembna dodana količina kovinskih ionov, brez katerih delci ne nastajajo, z njihovim ustreznim dodajanjem pa bi lahko tudi nadzorovali in prilagajali velikost nastalih delcev.

Na koncu smo preverili še količino v delce vezanega proteina. Analog **gene 2** z dvema uvedenima histidinoma v strukturi se je vezal v višjem odstotku, kar je presenetljivo, saj so za vezavo odgovorne koordinativne vezi s histidini, katerih ima analog **gene 1** s heksahistidinskim repom več. Morda je vzrok manjše vezave omejena dostopnost histidinov, ki bi lahko bila razlog tudi za že prej neuspešno vezavo anti-His protiteles.

Delce bi lahko pripravili tudi z drugimi kovinskimi ioni, ki se v koordinativni vezi vežejo močneje, vendar smo se zaradi toksičnosti ostalih elementov prehoda odločili za netoksične cinkove ione. Pri pripravi terapevtskega proteina za nadaljnje študije bi morali to dejstvo upoštevati tudi pri IMAC izolaciji in jo izvesti s cinkovimi ioni. Ker pa pri raziskovalni nalogi nadaljnjih študij nismo načrtovali, smo zaradi močnejše vezave na kolono pri izolaciji IMAC uporabili kar nikljeve ione.

6 SKLEP

V raziskovalni nalogi nam je uspelo pripraviti tri analoge rhGH z dodatno uvedenimi histidinskimi ostanki, katere smo na osnovi samozdruževanja in koordinativne vezi lahko vezali v proteinske delce. Prvi od analogov je imel na N-konec dodan histidinski podaljšek s šestimi histidinskimi ostanki, preostala dva pa sta imela v strukturo uvedena dva dodatna histidina.

Vse tri analoge smo uspešno pripravili v celicah *E. coli* BL21(DE3). Ker so se izraženi proteini agregirali v inkluzijska telesca, smo stresane kulture gojili pri nižji temperaturi 25°C, kar je omogočilo nastajanje bolj topnih IT in olajšalo njihovo raztapljanje. Tako nam je inkluzijska telesca uspelo raztopiti brez dodanih kaotropnih agensov v pufru 20 mM TRI/HCl pri alkalnem pH, po raztapljanju pa smo lahko takoj nadaljevali s čiščenjem s kromatografskimi metodami.

Dodatno uvedeni histidini v analogih rhGH so omogočili čiščenje proteinov z metodo IMAC. Vse tri analoge smo uspešno očistili z vezavo na nikljeve ione. Dokazali smo, da je število histidinov v strukturi pomembno za močnejšo vezavo na kolono, saj se je prvi analog v vseh primerih vezal močneje kot preostala dva analoga. Med delom smo tudi ugotovili, da vsi trije modelni proteini hitro agregirajo, prav tako pa so po ločbi IMAC v vzorcih še vedno bili prisotni nereducibilini agregati. Večjo stopnjo čistote smo nato dosegli z gelsko filtracijo, v pufer za shranjevanje pa smo dodali ciklodekstrine, ki so stabilizirali protein in preprečili nadaljnjo agregacijo.

Po pripravi zadostne količine prvih dveh analogov rhGH nam je z njima uspelo pripraviti tudi delce na osnovi samozdruževanja. Za pripravo smo uporabili dva kelatorja, fitinsko kislino in kislino TETA. Kljub različnim lastnostim obeh kelatorjev nismo dokazali vpliva kelatorja na rast delcev, prav tako se je proti pričakovanjem v delce vezalo več drugega analoga z manj histidinskimi ostanki. Možno je, da se histidinski rep pri prvem analogu zvije v strukturo tako, da histidini niso izpostavljeni, kar potrjuje tudi dejstvo, da nam na prvi analog ni uspelo vezati anti-His protiteles. Vendar te ugotovitve ne moremo potrditi z vezavo na kolono IMAC, prav tako pa nam anti-His protiteles ni uspelo vezati niti po denaturaciji prvega analoga. Vseeno pa smo pri sintezi delcev uspeli dokazati, da se protein v njih veže stabilno in da je njihova velikost odvisna predvsem od dodanih ionov. Tako bi lahko z ustreznim dodajanjem ionov pripravili delce določene želene velikosti, ki bi lahko glede na velikost bili primerni tudi kot farmacevtska oblika za

različne načine aplikacije, saj strukturne spremembe rhGH niso vplivale na sekundarno strukturo in biološko aktivnost proteina, omogočile pa so njegovo vezavo v delce.

LITERATURA

1: http://en.wikipedia.org/wiki/Recombinant_DNA (ogledano 30.6.2013)

2: http://www.chemheritage.org/discover/online-resources/chemistry-in-history/themes/pharmaceuticals/preserving-health-with-biotechnology/berg-boyer-cohen.aspx (ogledano 30.6.2013)

3: Itakura K, Hirose T, Crea R, Riggs AD, Heyneker HL, Bolivar F, Boyer HW: Expression in Escherichia coli of a Chemically Synthesized Gene for the Hormone Somatostatin. Science, New Series, 1977; 198: 1056-63.

4: http://www.fiercebiotech.com/topics/rDNA.asp (ogledano 30.6.2013)

5: http://www.utsouthwestern.edu/edumedia/edufiles/education_training/programs/stars/holland-dnatech-history.pdf (ogledano 1.7.2013)

6: http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/biologic-therapeutic-drugs-markets-bio079b.html (ogledano 1.7.2013)

7: Jevnikar Z: Ekspresijski sistemi. Biološka zdravila – od gena do učinkovine, ur. Štrukelj B, Kos J. Prva izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 68-111.

8: Rezaei M, Zarkes-Esfahani SH: Optimization of production of recombinant human growth hormone in Escherichia coli. Journal of Research in Medical Sciences, 2012: 681-5.

9: Kadir F, Hamers M: Production and downstream processing of biotech compounds. Pharmaceutical Biotechnology, ur. Crommelin D, Sindelar R. Second Edition, Taylor & Francis, London, 2002: 53-70.

10: Singh S M, Panda A K: Solubilization and Refolding of Bacetrial Inclusion Body Proteins. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005; 99: 303-10.

11: Gräslund S, Nordlund P, Weigelt J, Hallberg BM, Bray J, Gileadi O, Knapp S, Oppermann U, Arrowsmith C, Hui R, Ming J, dhe-Paganon S, Park HW, Savchenko A, Yee A, Edwards A, Vincentelli R, Cambillau C, Kim R, Kim SH, Rao Z, Shi Y, Terwilliger TC, Kim CY, Hung LW, Waldo GS, Peleg Y, Albeck S, Unger T, Dym O, Prilusky J, Sussman JL, Stevens RC, Lesley SA, Wilson IA, Joachimiak A, Collart F, Dementieva I, Donnelly MI, Eschenfeldt WH, Kim Y, Stols L, Wu R, Zhou M, Burley SK, Emtage JS, Sauder JM, Thompson D, Bain K, Luz J, Gheyi T, Zhang F, Atwell S, Almo SC, Bonanno JB, Fiser A, Swaminathan S, Studier FW, Chance MR, Sali A, Acton TB, Xiao R, Zhao L, Ma LC, Hunt JF, Tong L, Cunningham K, Inouye M, Anderson S, Janjua H, Shastry R, Ho CK, Wang D, Wang H, Jiang M, Montelione GT, Stuart DI, Owens RJ, Daenke S, Schütz A, Heinemann U, Yokoyama S, Büssow K, Gunsalus KC: Protein production and purification. Nature Methods, 2008; 5(2): 135-146.

12: pET System Manual. Novagen, 2003.

13: Goeddel DV, Heyneker HL, Hozumi T, Arentzen R, Itakura K, Yansura DG, Ross MJ, Miozzari G, Crea R, Seeburg PH: Direct expression in Escherichia coli of a DNA sequence coding for human growth hormone. Nature, 1979; 281: 544-8.

14: Martial J, Hallewell RA, Baxter JD, Goodman HM: Human growth hormone: complementary DNA cloning and expression in bacteria. Science, 1979; 205: 602-7.

15: Hintz RL, Rosenfeld RG, Wilson DM, Bennett A, Finno J, McClellan B, Swift R: Biosynthetic methionyl human growth hormone is biologically active in adult man. Lancet, 1982; 1: 1276-9.

16: Wells JA, de Vos AM: Structure and function of human growth hormone: implications for the hematopoietins. Annual review of biophysics and molecular structure 1993; 22: 329-51.

17: Marian M: Growth Hormones. Production and downstream processing of biotech compounds. Pharmaceutical Biotechnology, ur. Crommelin D, Sindelar R. Second Edition, Taylor & Francis, London, 2002; 245-57.

18: Doljak B: Rastni in drugi hematopoezni dejavniki. Biološka zdravila – od gena do učinkovine, ur. Štrukelj B, Kos J. Prva izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 310-36.

19: Cazares-Delgadillo J, Ganem-Rondero A, Kalia YN: Human Growth hormone: New delivery systems, alternative routes of administration, and their pharmacological relevance. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2011; 78: 278-88.

20: Krieg RJ, Santos F, Chan JCM: Growth hormone, insulin-like growth factor and the kidney. Kidney International, 1995; 48: 321-36.

21: Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA: Physiology. Fifth Edition, Elsevier, Inc. USA, 2004: 839-846.

22: http://en.wikipedia.org/wiki/Growth_hormone_treatment (ogledano 30.6.2013)

23: Štrukelj B: Razvoj, delitev in vloga bioloških zdravil. Biološka zdravila – od gena do učinkovine, ur. Štrukelj B, Kos J. Prva izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 4-24.

24: Ho R, Gibaldi M: Biotechnology and Biopharmaceuticals. Transforming Proteins and Genes into Drugs.Wiley-Liss, New Jersey, 2003: 51.

25: Sindelar R: Genomics, proteomics and additional biotechnology-related techniques. Pharmaceutical Biotechnology, ur. Crommelin D, Sindelar R. Second Edition, Taylor & Francis, London, 2002: 133-172.

26: Braeckman R: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Peptide and Protein drugs. Pharmaceutical Biotechnology, ur. Crommelin D, Sindelar R. Second Edition, Taylor & Francis, London, 2002: 105-130.

27: Gaberc-Porekar V, Menart V: Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2001; 49: 335-60.

28: Hribar G: Nadzorovana agregacija analogov dejavnika tumorske nekroze alfa v proteinske nanostrukture. Doktorska disertacija, mentor prof. dr. Radovan Komel. Ljubljana, 2009.

29: Lazarini F, Brenčič J: Splošna in anorganska kemija. DZS, Ljubljana, 1992: 241-52.

30: Ho R, Gibaldi M: Biotechnology and Biopharmaceuticals. Transforming Proteins and Genes into Drugs.Wiley-Liss, New Jersey, 2003: 371-4.

31: Everson RJ, Parker HE: Zinc binding and synthesis of eight-hydroxy-quinoline-agarose. Bioinorganic Chemistry, 1974; 4: 15-20.

32: Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. Nature, 1975; 258: 598-9.

33: Sulkowski E. Purification of Proteins by IMAC. Trends in Biotechnology, 1985; 3: 1-7.

34: Hochuli E, Bannwarth W, Doebeli H, Gentz R, Stueber D: Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. Nature Biotechnology, 1988; 6: 1321-5.

35: Bal W, Kozlowski H, Kasprzak KS: Molecular models in nickel carcinogenesis. Journal of Inorganic Biochemistry, 2000; 79: 213-8.

36: Cegnar M, Obermajer N, Kos J, Kristl J: Nosilni sistemi za dostavo bioloških učinkovin. Biološka zdravila – od gena do učinkovine, ur. Štrukelj B, Kos J. Prva izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 210-47.

37: Hribar G, Bele M, Gaberc-Porekar V: Different types of Protein Nanostructures based on Coordinative bond. World Journal of Engineering, Supplement 2009; P359.

38: Hribar G, Žnidaršič A, Bele M, Maver U, Caserman S, Gaberšček M, Gaberc-Porekar V: Zinc-phosphate nanoparticles with reversibli attched TNF-α analogs: an interesting concept for potential use in active immunotherapy. Journal of Nanoparticle Research, 2011; 13: 3019-32.

39: Patra AK, Mukhopadhyay R, Mukija R, Krishan A, Garg LC, Panda AK: Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from Escherichia coli. Protein Expression and Purification, 2000; 18: 182-192.

40: Sonoda H, Sugimura A: Improved Solubilization of Recombinant Human Growth Hormone Inclusion Body Produced in *Escherichia coli*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2008; 72: 2675-80.

41: Jevnikar Z: Ekspresijski sistemi. Biološka zdravila – od gena do učinkovine, ur. Štrukelj B, Kos J. Prva izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 75.

42: Tou JS, Taylor DW: Method of removing N-terminal alanine residues from polypeptides with Aeromonas aminopeptidase. United States Patent, Patent number 6743600, date of patent Jan. 1, 2004.

43: http://www.cs.stedwards.edu/chem/Chemistry/CHEM43/CHEM43/Projects04/Growth Factors/STRUCTURE.HTML (ogledano 1.7.2013)

44: Okada S, Kopchick JJ: Biological effects of growth hormone and its antagonist. Trends in Molecular Medicine, 2001; 3: 126-32.

45: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Etanercept.svg (ogledano 30.6.2013)

46: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Metal-EDTA.svg (ogledano 1.7.2013)

47: http://www.rhizobia.co.nz/research/bioprospecting (ogledano 30.6.2013)

48: Quiaquick Gel extraction Kit protocol, Quiagen.

49: QIAprep Spin Miniprep Kit protocol, Quiagen.

50: Arun R, Ashok Kumar CK, Sravanthi VVNSS: Cyclodextrins as Drug Carrier Molecule: A Review. Sci Pharm. 2008; 76: 567-598.

51: http://products.invitrogen.com/ivgn/product/LC5801 (ogledano 5.8.2013)

52: http://products.invitrogen.com/ivgn/product/LC5625 (ogledano 5.8.2013)

53: http://www.imap.com/imap/media/resources/IMAP_PharmaReport_8_ 272B8752E0FB3.pdf (ogledano 2.9.2013)