

## BƯỚC ĐẦU KHẢO SÁT QUY TRÌNH BẢO QUẢN hG-CSF TÁI TỔ HỢP BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐÔNG KHÔ

Lê Mai Hương Xuân, Vương Cát Khánh, Trần Thanh Hòa, Nguyễn Ngọc Quỳnh Giao,  
Đặng Thị Phương Thảo, Trần Linh Thuớc

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 21 tháng 03 năm 2011, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 18 tháng 11 năm 2011)

**TÓM TẮT:** hG-CSF là một cytokine có chức năng kích thích sự tăng sinh, biệt hóa, trưởng thành của bạch cầu hạt trung tính, thường được sử dụng như một loại thuốc điều trị chứng suy giảm bạch cầu ở những bệnh nhân ung thư hóa trị liệu cũng như ở bệnh nhân mắc các bệnh lý khác. Sau quá trình sản xuất, hG-CSF tái tổ hợp tổng hợp trong *E. coli* ở dạng lỏng, không được glycosyl hóa nên protein không ổn định, dễ mất hoạt tính, thời gian bảo quản ngắn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả bước đầu khảo sát việc bảo quản hG-CSF tái tổ hợp bằng phương pháp đông khô. Quy trình đông khô đã được đề xuất với các thông số cơ bản như điều kiện làm lạnh là  $-40^{\circ}\text{C}$  trong 60 phút, thể tích mẫu là 1/10 thể tích vật chứa, nhiệt độ ngưng tụ  $-70^{\circ}\text{C}$ , áp suất 20mTorr, 24 giờ. Mẫu sau quá trình đông khô có dạng bột, khô, mịn, màu trắng. Hiệu quả bảo quản của phương pháp đông khô được kiểm tra qua kết quả phân tích cấu hình hG-CSF bằng điện di Native-PAGE và sắc ký RP-HPLC; thử nghiệm hoạt tính sinh học in vitro trên tế bào M-NFS-60 và thử nghiệm hoạt tính in vivo trên chuột nhắt trắng *Mus musculus*.

**Từ khóa:** hG-CSF, đông khô, M-NFS-60.

### MỞ ĐẦU

hG-CSF (human Granulocyte Colony Stimulating Factor) là một cytokine đóng vai trò quan trọng trong quá trình điều hòa sự tăng sinh, biệt hóa, trưởng thành của bạch cầu hạt trung tính (Avalos *et al*, 1996; Basu *et al*, 2002). Với vai trò quan trọng đó, từ lâu hG-CSF đã được sử dụng để điều trị một số bệnh liên quan đến sự suy giảm bạch cầu trong máu, đặc biệt là bệnh giảm bạch cầu hạt (neutropenia), một loại bệnh thường gặp phải trong quá trình hóa trị điều trị ung thư (Basu *et al*, 2002; Garland *et al*, 1997). Hiện nay, do tình hình bệnh nhân ung thư đang có xu hướng

gia tăng nhanh ở Việt Nam cũng như trên thế giới, do vậy đã làm gia tăng nhu cầu sử dụng hG-CSF dùng hỗ trợ trong các liệu pháp hóa trị. Vì vậy việc nghiên cứu sản xuất hG-CSF tái tổ hợp sử dụng để làm protein trị liệu đang rất được quan tâm.

Tại Việt Nam, nhóm nghiên cứu tại PTN Công nghệ Sinh học Phân tử, trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TP. HCM cũng đã bước đầu nghiên cứu sản xuất thành công hG-CSF tái tổ hợp từ hệ thống biểu hiện ở tế bào *E. coli* (Hiếu *et al*, 2009; Hòa *et al*, 2009). Tuy nhiên sau quá trình sản xuất, hG-CSF tái tổ hợp có nguồn gốc từ tế bào *E. coli* thường tồn tại ở

dạng lỏng, lại không được glycosyl hóa nên protein không ổn định, dễ mất hoạt tính, thời gian bảo quản ngắn. Do đó, việc sử dụng một phương pháp bảo quản thích hợp, không tốn kém nhiều chi phí, thuận lợi cho việc đóng gói, vận chuyển mà vẫn đảm bảo hoạt tính sinh học của hG-CSF là hết sức quan trọng. Một trong những phương pháp bảo quản protein được liệu đã và đang được sử dụng phổ biến, có hiệu quả tốt trên nhiều đối tượng là phương pháp đông khô. Đông khô là quá trình làm khô, trong đó, đầu tiên dung môi chứa protein được chuyển sang trạng thái rắn ở nhiệt độ thấp, sau đó tiến hành thăng hoa trực tiếp từ dạng rắn sang dạng hơi dưới điều kiện áp suất thấp. Mục tiêu của đông khô là tạo ra một hỗn hợp dạng bột khô có độ tự ổn định cao và không thay đổi cấu hình cũng như hoạt tính của protein sau khi hòa tan trở lại vào dung môi thích hợp. Sản phẩm dạng này có thể tồn tại trong một thời gian dài, dễ dàng bảo quản mà không mất đi những tính chất đặc trưng (Avis *et al*, 1999; Prestrelski *et al*, 2000). Do vậy, với mục tiêu bước đầu khảo sát quy trình bảo quản hG-CSF, chúng tôi đã tiến hành thử nghiệm bảo quản hG-CSF bằng phương pháp đông khô. Hiệu quả của phương pháp được kiểm tra thông qua kiểm tra cấu hình protein bằng điện di không biến tính Native-PAGE, sắc ký lỏng cao áp đảo pha RP-HPLC; thử nghiệm hoạt tính sinh học *in vitro* trên dòng tế bào M-NFS-60 và *in vivo* trên chuột nhắt trắng.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Hóa chất

hG-CSF tái tổ hợp được sản xuất tại phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Phân tử, trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TP. HCM. Mẫu ở dạng lỏng, có độ tinh sạch 95% và hoạt tính riêng đạt  $0,821 \times 10^8$  IU/mg. hG-CSF chuẩn là biệt dược Neupogen® (Roche, Thụy Sĩ). Neupogen® có chứa thành phần chính là protein hG-CSF được sản xuất trong *E. coli* bằng kỹ thuật DNA tái tổ hợp. Hoạt tính riêng của hG-CSF trong Neupogen® đạt  $10^8$  IU/mg.

### Khảo sát thời gian đông lạnh mẫu trước đông khô

Tiến hành đông lạnh mẫu ở các điều kiện -20°C và -40°C trong các khoảng thời gian từ 0 – 60 phút. Xác định tỷ lệ mẫu đã đông trong từng thời điểm để xác định được thời điểm mẫu đã đông hoàn toàn.

### Khảo sát tỷ lệ thể tích mẫu – vật chứa

Cho mẫu vào các vật chứa (falcon 50ml, falcon 15ml, eppendorf 1,5ml) với tỷ lệ thể tích mẫu – vật chứa là 1/5, 1/10, 1/20. Tiến hành đông lạnh mẫu và đông khô với các thông số: nhiệt độ ngưng tụ -70°C, áp suất 20mTorr. Tiến hành đông khô trong vòng 24 giờ, sau đó thu mẫu và xác định giá trị tỷ lệ chiều cao mẫu trên chiều cao vật chứa.

### Thử nghiệm hoạt tính sinh học *in vitro*

Hoạt tính sinh học của hG-CSF được xác định thông qua khả năng đáp ứng tăng sinh của dòng tế bào M-NFS-60. Dòng tế bào này có nguồn gốc từ chuột *Mus musculus*, chúng không có khả năng tự tăng sinh mà phụ thuộc vào các cytokine M-CSF, IL-3 và G-CSF. Khi môi trường nuôi cấy không bổ sung các cytokine này thì tế bào sẽ chết trong khoảng 24

– 72 giờ. Khi bổ sung G-CSF vào môi trường nuôi cấy, tùy thuộc vào hoạt tính của G-CSF mà tế bào M-NFS-60 sẽ tăng trưởng và phát triển. Hoạt tính G-CSF càng mạnh thì tế bào M-NFS-60 tăng trưởng và phát triển càng mạnh.

Quy trình thử nghiệm hoạt tính protein hG-CSF được tiến hành gồm các bước: pha loãng mẫu thành dãy nồng độ từ  $10^6$  đến  $10^{-2}$  pg/ml. Bổ sung 50 $\mu$ l mẫu hG-CSF và 50 $\mu$ l dịch tế bào vào đĩa 96 giếng. Ủ đĩa trong tủ ấm 37 $^{\circ}$ C, CO $_2$  5% trong 48 giờ. Bổ sung kit đếm tế bào CCK-8 (Dojindo, Nhật Bản) tỉ lệ 1/10 (v/v), ủ trong 3-4 giờ. Xác định giá trị OD $_{TB}$  = OD $_{450}$  – OD $_{595}$ , phân tích kết quả bằng phần mềm GraphPad Prism 5.0 để xác định được giá trị ED $_{50}$ . Từ đó, tính được giá trị LU (laboratory unit) và IU (international unit) theo công thức sau:

$$LU = \frac{1 \times 10^9}{ED_{50}} \text{ Units/mg}$$

$$IU_{mẫu} = \frac{LU_{mẫu} \times IU_{neu}}{LU_{neu}} \text{ Unit/mg}$$

Các mẫu hG-CSF tái tổ hợp được kiểm tra hoạt tính ngay sau khi đông khô và sau 2 tháng bảo quản ở -20 $^{\circ}$ C.

#### Kiểm tra cấu hình của hG-CSF tái tổ hợp đã đông khô

Mẫu hG-CSF tái tổ hợp đã đông khô được hòa tan lại vào nước cất vô trùng, và được kiểm tra cấu hình tự nhiên thông qua phương pháp điện di không biến tính Native-PAGE và sắc ký lỏng cao áp đảo pha RP-HPLC. Các thí nghiệm được tiến hành đồng thời với mẫu hG-CSF chuẩn để so sánh, đối chứng.

#### Thử nghiệm hoạt tính sinh học trên mô hình chuột

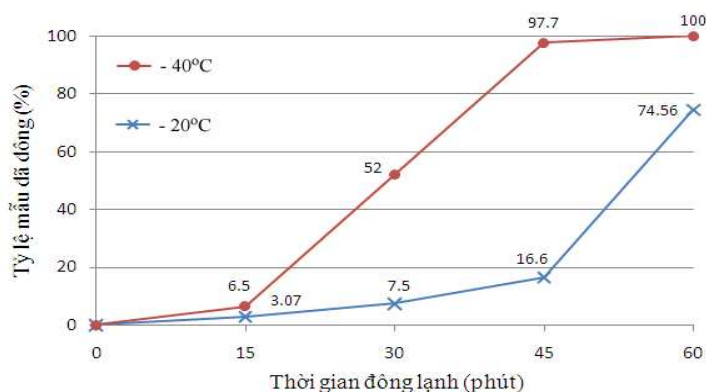
Sau 2 tháng bảo quản, mẫu hG-CSF đông khô được hòa tan trong nước cất tiêm và tiến hành thử nghiệm hoạt tính *in vivo* trên chuột nhắt trắng *Mus musculus* để xác định hiệu quả làm gia tăng lượng bạch cầu hạt trung tính trong máu chuột. Thử nghiệm được tiến hành song song với các mẫu: mẫu kiểm soát (dung dịch muối sinh lý NaCl 0,85%), mẫu chứng dương (hG-CSF chuẩn), mẫu chứng âm (dung dịch bảo quản) và mẫu hG-CSF tái tổ hợp đã đông khô. Quy trình thử nghiệm gồm các bước: chuột nhắt trắng khỏe mạnh (25-30g) nuôi ổn định trong 3 ngày; tiêm cyclophosphamide, liều tiêm 100mg/kg trọng lượng cơ thể chuột, nhằm làm suy giảm lượng bạch cầu của chuột; tiêm mẫu liên tục 4 ngày (mũi đầu tiên sau khi tiêm cyclophosphamide 24giờ); tiến hành thu máu sau mũi tiêm cuối cùng 6 giờ; xác định tổng lượng bạch cầu và lượng bạch cầu trung tính trong máu chuột thử nghiệm và đánh giá kết quả.

Ngoài ra, trong suốt quá trình thử nghiệm, chúng tôi tiến hành theo dõi thân nhiệt chuột và quan sát trạng thái sinh lý để đánh giá sơ bộ mức độ an toàn của sản phẩm hG-CSF tái tổ hợp trên chuột thử nghiệm.

#### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

##### Điều kiện đông lạnh mẫu trước đông khô

Ở điều kiện phòng thí nghiệm, chúng tôi tiến hành đông lạnh mẫu ở -20 $^{\circ}$ C và -40 $^{\circ}$ C và tiến hành xác định lượng mẫu đã đông theo thời gian, kết quả được trình bày ở Hình 1.

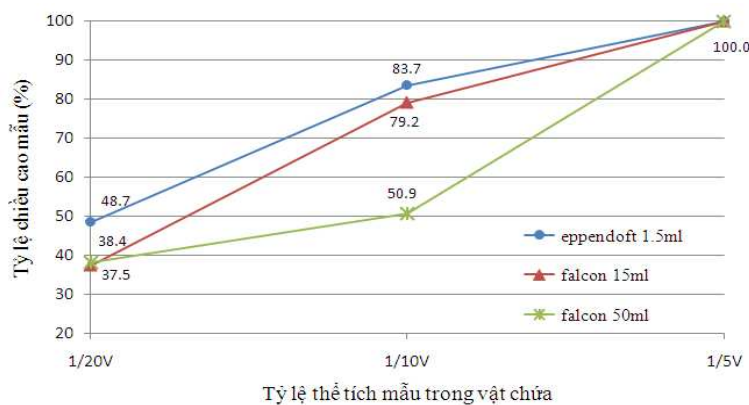


**Hình 1.** Kết quả khảo sát điều kiện đông lạnh mẫu

Kết quả cho thấy, ở nhiệt độ  $-20^{\circ}\text{C}$ , với khoảng thời gian đông lạnh là 60 phút, mẫu chỉ có thể đông được khoảng 75%. Trong khi đó ở nhiệt độ  $-40^{\circ}\text{C}$ , chỉ sau 45 phút, mẫu đã gần như đông hoàn toàn với tỷ lệ 97,7% và sau khoảng 60 phút, mẫu đã đông hoàn toàn và giữ được trạng thái đông khi đem ra môi trường nhiệt độ phòng. Do vậy với điều kiện phòng thí nghiệm, chúng tôi lựa chọn điều kiện đông lạnh mẫu là giữ ở  $-40^{\circ}\text{C}$  trong 60 phút.

### Tỷ lệ mẫu ban đầu trong vật chứa

Với mục tiêu tránh thất thoát mẫu trong quá trình đông khô và tiết kiệm vật chứa, chúng tôi tiến hành khảo sát tỷ lệ mẫu ban đầu trong vật chứa dựa trên tiêu chí là chiều cao của mẫu trong vật chứa sau quá trình đông khô. Kết quả của thí nghiệm được trình bày trong Hình 2.



**Hình 2.** Kết quả khảo sát tỷ lệ mẫu ban đầu

Kết quả cho thấy, ở cả ba vật chứa thông dụng trong phòng thí nghiệm (eppendorf 1,5ml, falcon 15ml, falcon 50ml), khi thể tích mẫu ban đầu đạt 1/5 thể tích vật chứa, trong quá trình

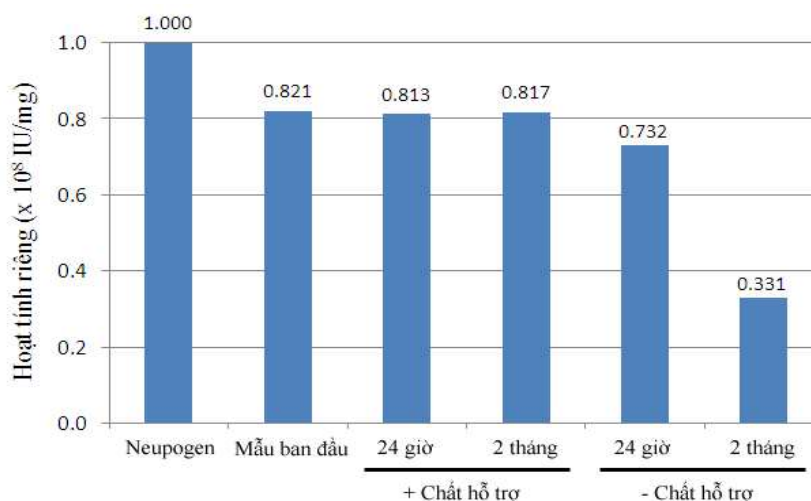
đông khô mẫu đều bị trào ra khỏi vật chứa gây thất thoát mẫu. Trong khi đó ở các tỷ lệ mẫu ban đầu thấp hơn là 1/10 và 1/20, mẫu không bị trào ra khỏi vật chứa và tỷ lệ chiều cao mẫu sau

đông khô tối đa chỉ vào khoảng 80% so với vật chứa. Do vậy để tiết kiệm vật chứa trong quá trình đông khô, chúng tôi lựa chọn tỷ lệ mẫu ban đầu là 1/10 so với thể tích vật chứa.

**Kiểm tra hoạt tính sinh học *in vitro* của hG-CSF sau đông khô**

Quá trình đông khô là một quá trình phức tạp gồm nhiều giai đoạn, trong đó protein trong mẫu đông khô phải được đông lạnh rồi sau đó tiến hành thăng hoa dung môi dưới điều kiện áp suất chân không, do vậy protein có thể bị biến đổi trong quá trình đông khô dẫn đến việc mất hoạt tính.

Do đó chúng tôi tiến hành kiểm tra hoạt tính sinh học của các mẫu hG-CSF đã đông khô bằng thử nghiệm khả năng kích thích tăng sinh dòng tế bào M-NFS-60. Đồng thời chúng tôi tiến hành đánh giá hiệu quả của việc bổ sung chất hỗ trợ (5% maltose) trong việc bảo quản hG-CSF khi sử dụng phương pháp đông khô. Các mẫu được thử nghiệm ở các thời điểm trước đông khô, 24 giờ sau đông khô và sau 2 tháng bảo quản ở -20°C. Kết quả được thể hiện ở Hình 3.



**Hình 3.** Hoạt tính riêng của các mẫu hG-CSF trong quá trình bảo quản

Ở loạt mẫu có bổ sung chất hỗ trợ, hoạt tính riêng của các mẫu hG-CSF tái tổ hợp 24 giờ sau khi đông khô và sau 2 tháng bảo quản gần như không thay đổi so với mẫu ban đầu. Trong khi đó ở loạt mẫu không bổ sung chất hỗ trợ, hoạt tính riêng của hG-CSF chỉ giảm nhẹ 24 giờ sau khi đông khô (0,732 x 10<sup>8</sup>IU/mg so với 0,821 x 10<sup>8</sup>IU/mg), nhưng sau 2 tháng bảo quản, hoạt tính riêng của mẫu giảm mạnh, giảm

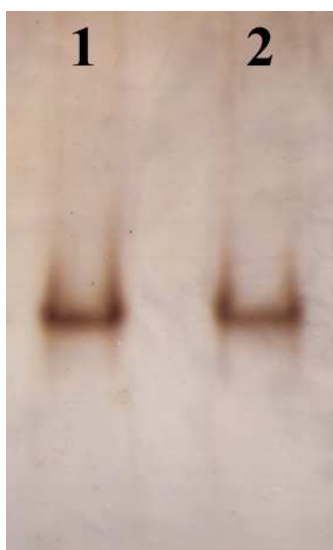
hơn 50% so với mẫu ban đầu (0,331 x 10<sup>8</sup>IU/mg so với 0,821 x 10<sup>8</sup>IU/mg). Vì vậy có thể nói chất hỗ trợ (5% maltose) làm gia tăng hiệu quả bảo quản hG-CSF và phương pháp bảo quản hG-CSF bằng phương pháp đông khô có bổ sung 5% maltose cho hiệu quả bảo quản hG-CSF tốt với hoạt tính sinh học không thay đổi sau 2 tháng.

**Kiểm tra cấu hình hG-CSF tái tổ hợp sau đông khô**

Các mẫu hG-CSF đã đông khô đồng thời cũng được tiến hành kiểm tra cấu hình bằng phương pháp điện di Native-PAGE và chạy sắc ký RP-HPLC với đối chứng là hG-CSF chuẩn (Neupogen).

Kết quả điện di Native-PAGE cho thấy, mẫu hG-CSF đông khô (giếng 2, Hình 4) cho một

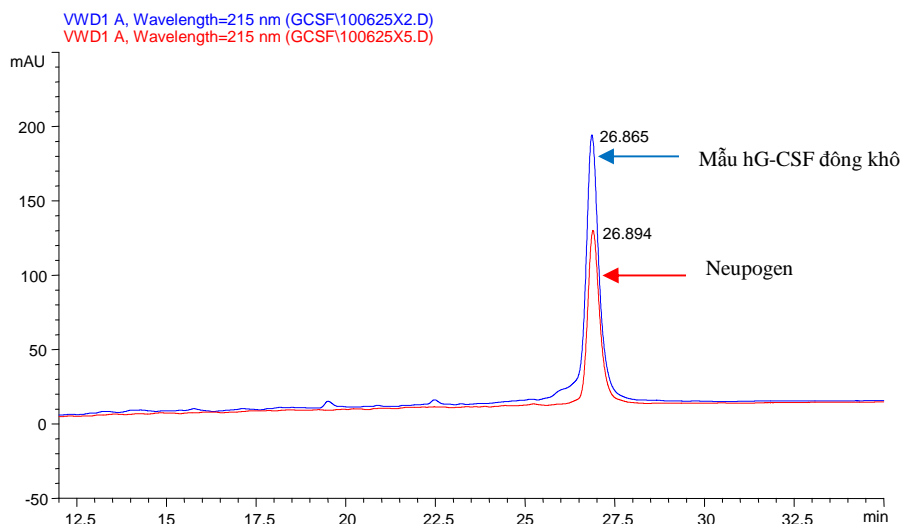
vạch protein hoàn toàn tương đồng với vạch protein của mẫu hG-CSF chuẩn, điều này chứng tỏ protein hG-CSF sau khi đông khô vẫn giữ được nguyên vẹn cấu hình tự nhiên. Đồng thời, trên bản gel điện di cũng không thấy xuất hiện các vạch protein khác (nằm phía trên hay phía dưới vạch chuẩn). Như vậy, có thể kết luận quá trình đông khô không làm kết cụm (dimer hóa, oligomer hóa) hay phân hủy protein hG-CSF.



**Hình 4.** Kết quả điện di Native-PAGE. 1: Neupogen. 2: Mẫu hG-CSF đông khô

Đồng thời với điện di Native-PAGE, mẫu hG-CSF đông khô cũng được kiểm tra cấu hình thông qua hệ thống sắc ký lỏng cao áp đảo pha RP-HPLC. 20 $\mu$ l mẫu hG-CSF được nạp vào cột Inertsil WP300 C4 (GL Science, Nhật Bản), và được dung ly bằng gradient acetonitril từ 30% đến 70% trong 30 phút. Sắc ký đồ trên Hình 5

cho thấy hG-CSF tái tổ hợp hòa tan sau đông khô cho một peak tại thời gian lưu khoảng 26,865 phút. Thời gian lưu này là hoàn toàn trùng khớp so với thời gian lưu của mẫu Neupogen (26,894 phút). Như vậy, hG-CSF sau đông khô vẫn giữ đúng cấu hình tự nhiên.



**Hình 5.** Kết quả phân tích cấu hình hG-CSF tái tổ hợp bằng RP-HPLC.

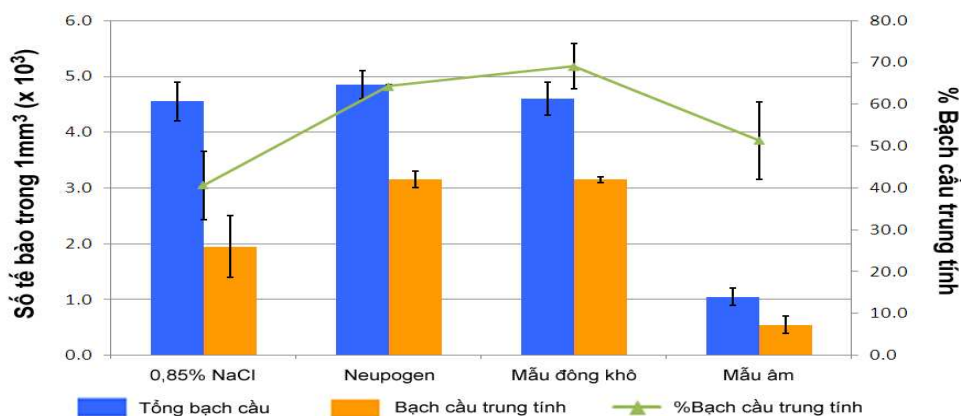
**Kiểm tra hoạt tính sinh học trên mô hình chuột của hG-CSF đông khô**

Mẫu hG-CSF sau 2 tháng bảo quản cũng bước đầu được thử nghiệm hoạt tính trên mô hình động vật bằng cách sử dụng mô hình chuột bị bệnh giảm bạch cầu hạt. Sau khi được xử lý với cyclophosphamide để tạo mô hình

bệnh giảm bạch cầu hạt, chuột được tiêm bổ sung hG-CSF trong 4 ngày liên tục với liều tiêm 80µg/kg trọng lượng cơ thể chuột, sau đó tiến hành thu máu và xác định các thông số: tổng bạch cầu hạt, lượng bạch cầu trung tính và phần trăm bạch cầu trung tính. Kết quả được thể hiện ở Bảng 1 và Hình 6.

**Bảng 1.** Lượng tổng bạch cầu và bạch cầu trung tính ở các lô chuột thử nghiệm hoạt tính sinh học trên mô hình chuột

	<b>Tổng bạch cầu</b> (x10 <sup>3</sup> tế bào/mm <sup>3</sup> )	<b>Bạch cầu trung tính</b> (x10 <sup>3</sup> tế bào/mm <sup>3</sup> )	<b>% Bạch cầu trung tính</b>
<b>NaCl 0,85%</b>	4,55 ± 0,35	1,95 ± 0,55	40,6 ± 8,2
<b>Neupogen</b>	4,85 ± 0,25	3,15 ± 0,15	64,2 ± 0,4
<b>Mẫu đông khô</b>	4,60 ± 0,30	3,15 ± 0,05	69,1 ± 5,5
<b>Mẫu âm</b>	1,05 ± 0,15	0,55 ± 0,15	51,3 ± 9,3



**Hình 6.** Kết quả thử nghiệm hoạt tính sinh học hG-CSF trên mô hình chuột

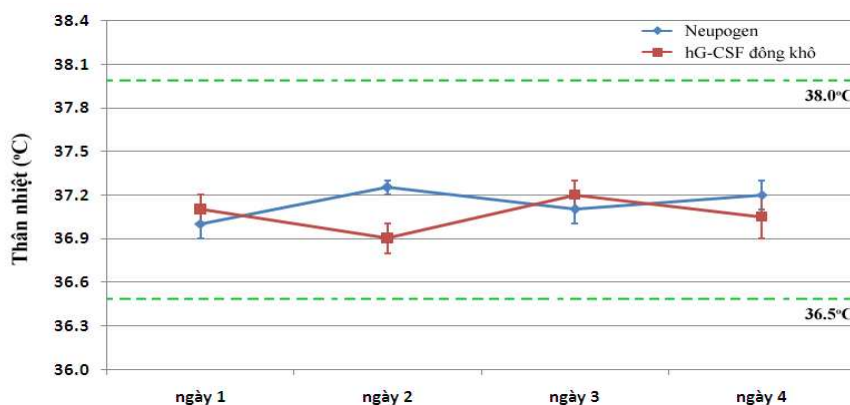
Kết quả thử nghiệm cho thấy, ở mẫu đối chứng âm, tổng lượng bạch cầu và bạch cầu trung tính giảm xuống mức rất thấp ( $1,05 \times 10^3$  tế bào/mm<sup>3</sup> và  $0,55 \times 10^3$  tế bào/mm<sup>3</sup>), phù hợp với mô hình chuột bị bệnh giảm bạch cầu hạt. Trong khi đó, ở mẫu hG-CSF đông khô, tổng bạch cầu được phục hồi trở về trạng thái bình thường như ở mẫu kiểm soát (tiêm 0,85% NaCl), và lượng bạch cầu trung tính có xu hướng tăng, đạt đến gần 70% tổng lượng bạch cầu. Các kết quả này hoàn toàn phù hợp với vai trò và chức năng trong cơ thể sống của hG-CSF, đồng thời các kết quả cũng cho thấy mẫu hG-CSF đông khô cho hiệu quả hoàn toàn tương tự như mẫu đối chứng dương (tiêm Neupogen). Do vậy có thể khẳng định mẫu hG-CSF đông khô có hoạt tính sinh học tương tự như mẫu Neupogen khi kiểm tra trên mô hình động vật.

Ngoài ra, trong quá trình thử nghiệm hoạt tính trên mô hình động vật, chúng tôi còn bước đầu đánh giá độc tính của mẫu hG-CSF đông khô thông qua việc theo dõi thân nhiệt chuột

hàng ngày ở thời điểm 1 giờ sau các mũi tiêm hG-CSF và theo dõi tình trạng sưng, nóng, bong da, hoại tử da và những phản ứng bất thường trên da tại vị trí tiêm.

Kết quả theo dõi thân nhiệt (Hình 7) cho thấy, thân nhiệt của tất cả các chuột ở cả 2 nhóm thử nghiệm tiêm Neupogen và hG-CSF đông khô liều 80μg/kg đều có sự dao động, tuy nhiên sự dao động này ổn định trong khoảng từ 36,9°C đến 37,3°C, không có con chuột nào có thân nhiệt vượt qua khoảng nhiệt độ cho phép ở chuột bình thường là 36,5°C – 38,0°C. Đồng thời, việc theo dõi sinh lý chuột cho thấy tại các vị trí tiêm thuốc không xảy ra các hiện tượng viêm, sưng hay các hiện tượng kích ứng khác, sau 4 ngày tiêm thuốc tất cả các lô chuột đều có sức khỏe bình thường, không xảy ra hiện tượng chuột bị chết. Kết quả này bước đầu cho thấy mẫu hG-CSF đông khô không gây nên các tác dụng phụ đặc biệt (như tăng thân nhiệt quá ngưỡng bình thường, gây viêm, sưng hay gây chết) trong khoảng 4 ngày thử nghiệm trên cơ thể chuột sống ở liều lượng đã thử nghiệm.





Hình 7. Kết quả khảo sát thân nhiệt chuột qua 5 ngày thử nghiệm

### KẾT LUẬN

hG-CSF là một cytokine có vai trò quan trọng trong quá trình kích thích tăng sinh, biệt hóa và trưởng thành của bạch cầu hạt trung tính. Hiện nay, cytokine này đang được sử dụng rộng rãi trong việc điều trị các bệnh lý liên quan đến suy giảm lượng bạch cầu hạt như neutropenia, hội chứng suy giảm miễn dịch... với nhiều ưu điểm như: chi phí thấp, tác dụng tốt, thời gian trị bệnh ngắn. Sau quá trình sản xuất, hG-CSF tái tổ hợp tổng hợp trong *E. coli* thường tồn tại ở dạng lỏng, lại không được glycosyl hóa nên protein không ổn định, dễ mất

hoạt tính, thời gian bảo quản ngắn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả bước đầu khảo sát việc bảo quản hG-CSF tái tổ hợp bằng phương pháp đông khô. Kết quả cho thấy phương pháp đông khô là phương pháp phù hợp nhằm bảo quản hG-CSF tái tổ hợp do mẫu hG-CSF sau quá trình đông khô vẫn giữ được cấu hình tự nhiên khi điện di Native-PAGE và chạy sắc ký RP-HPLC, đảm bảo hoạt tính sinh học *in vitro* khi thử nghiệm trên dòng tế bào M-NFS-60 và hoạt tính sinh học *in vivo* khi thử nghiệm trên chuột nhắt trắng, đồng thời có độ an toàn khi thử nghiệm trên chuột.

## PRELIMINARY STUDY ON PRESERVATION OF RECOMBINANT hG-CSF BY LYOPHILIZATION

Le Mai Huong Xuan, Vuong Cat Khanh, Tran Thanh Hoa, Nguyen Ngoc Quynh Giao,  
Dang Thi Phuong Thao, Tran Linh Thuoc  
University of Science, VNU-HCM

**ABSTRACT:** hG-CSF is a cytokine that stimulates the proliferation, differentiation, function of mature neutrophils and is generally used for treatment of neutropenia in cancer patients under

chemotherapy or other diseased patients. After production process, *E. coli*-derived recombinant hG-CSF is usually available as non-glycosylated, liquid protein, so that it's often unstable, easy to lose their biological activity. In this study, we report the results of using lyophilization to storage recombinant hG-CSF. We found out the freezing conditions and the suitable protein volumes for freeze-drying process. Furthermore, we also studied the effects of lyophilization on this protein by testing the structure with Native-PAGE, RP-HPLC, testing biological activity on M-NFS-60 cell lines and in mouse (*Mus musculus*).

**Key word:** hG-CSF, lyophilization, M-NFS-60

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Avalos R. *Molecular Analysis of the Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor*. Blood -New York-. (1996). 88 (3), 761-777.
- [2]. Avis, K. E., & Wagner, C. M. (1999). *Cryopreservation: Applications in pharmaceuticals and biotechnology*. Drug manufacturing technology series, v. 5. Denver, Colo: Interpharm Press.
- [3]. Basu S, Dunn A, Ward A. (2002) G-CSF: function and modes of action. *International journal of molecular medicine*. 10(1): 3-10.
- [4]. Garland JM, Quesenberry PJ, Hilton DJ (1997) *Colony-stimulating factors: molecular and cellular biology*. New York: M. Dekker.
- [5]. Hiếu N.T.P., Khánh V.C., Hòa T.T., Thảo Đ.T.P., Thước T.L. (2009). Thu nhận hG-CSF có hoạt tính từ thể vùi non-classical ở *Escherichia coli*. *Tuyển tập báo cáo khoa học hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Thái Nguyên (11-2009)*. Nhà xuất bản ĐH Thái Nguyên, tr. 791 – 793.
- [6]. Hòa T.T., Đức L.V., Huy N.Q., Thảo Đ.T.P., Thước T.L. (2009). Nghiên cứu lên men biểu hiện hG-CSF dạng thể vùi ở tế bào *E. coli* bằng hệ thống lên men tự động. *Tuyển tập báo cáo khoa học hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc khu vực phía nam, Tp. HCM (10-2009)*. Nhà xuất bản Khoa học – Kỹ thuật, tr. 432 – 436.
- [7]. Prestrelski, S. J., & Maa, Y. F. (2000). Biopharmaceutical powders: particle formation and formulation considerations. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 1(3): 283-302.