

TÁI GẤP CUỘN, TINH SẠCH VÀ ĐÁNH GIÁ TÍNH CHẤT CỦA hG-CSF BIỂU HIỆN TRONG *E. COLI*

Trần Thanh Hòa, 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 16 tháng 04 năm 2012)

TÓM TẮT: Nhân tố kích thích tạo dòng bạch cầu hạt của người (hG-CSF) là một nhân tố tạo máu có vai trò trong sự kích thích sự tăng sinh và biệt hóa của các tế bào tiền thân của bạch cầu trung tính, đồng thời làm tăng cường một số chức năng của bạch cầu trung tính trưởng thành. Vì vậy hG-CSF được dùng rộng rãi trong điều trị bệnh giảm bạch cầu hạt, đặc biệt là dạng giảm bạch cầu hạt gây ra bởi hóa trị liệu điều trị ung thư. Với tình trạng bệnh nhân ung thư đang ngày càng tăng hiện nay, nhu cầu về protein hG-CSF dùng trong trị liệu hiện nay là rất lớn. Trên cơ sở những nghiên cứu trước đây, trong báo cáo này chúng tôi trình bày những kết quả đạt được trong quá trình nghiên cứu thu nhận protein hG-CSF có hoạt tính sinh học. Protein hG-CSF đã được tái gấp cuộn và tinh sạch từ dạng thể vùi không có hoạt tính biểu hiện trong *E. coli*. Các kết quả kiểm tra và phân tích cho thấy protein hG-CSF thu nhận được có các đặc điểm lý hóa, cấu hình và hoạt tính sinh học tương đương với sản phẩm thương mại Neupogen.

Từ khóa: hG-CSF, M-NFS-60, tái gấp cuộn, tinh chế

MỞ ĐẦU

hG-CSF (human Granulocyte-Colony Stimulating Factor) là một thành viên của họ các glycoprotein tiết điều hòa sự sống sót, tăng sinh, biệt hóa và chức năng của các tế bào máu. Trong cơ thể, hG-CSF có vai trò quan trọng trong việc kích thích nguyên bào tủy phân chia và biệt hóa theo hướng tạo bạch cầu hạt và neutrophil. Do vậy, hG-CSF đóng vai trò quan trọng trong sự duy trì ổn định số lượng neutrophil trong máu, cũng như điều hòa sự tạo thành neutrophil trong các trường hợp khẩn cấp. Đồng thời hG-CSF cũng tăng cường các chức năng của bạch cầu trung tính, giúp nó trở nên phản ứng nhanh với nhiều tác nhân kích

thích, nâng cao khả năng miễn dịch của cơ thể [1],[3]. Hiện nay, hG-CSF được ứng dụng nhiều nhất để điều trị bệnh giảm bạch cầu hạt (neutropenia), đặc biệt là neutropenia do hóa trị liệu điều trị ung thư gây ra. Việc sử dụng hG-CSF làm giảm 50% nguy cơ nhiễm khuẩn và các rủi ro tương tự đối với các bệnh nhân neutropenia, đặc biệt đối với bệnh nhân điều trị ung thư, việc sử dụng hG-CSF kết hợp với các loại thuốc hóa trị làm giảm 50% nguy cơ bị neutropenia cấp độ nặng [2],[6].

Do có những ứng dụng quan trọng trong y được nên hiện nay nhu cầu hG-CSF tái tổ hợp là rất lớn và hG-CSF đã trở thành một trong những dược phẩm có doanh thu lớn nhất trên

thể giới. Nhằm mục tiêu xây dựng quy trình sản xuất hG-CSF tại Việt Nam, chúng tôi đã nghiên cứu tạo thành công dòng *E. coli* có khả năng biểu hiện protein hG-CSF tái tổ hợp ở dạng thể vùi [4] và cũng đã thiết lập thành công quy trình lên men thu nhận hG-CSF dạng thể vùi dùng làm nguyên liệu cho sản xuất hG-CSF [5]. Trên cơ sở đó, chúng tôi nghiên cứu quá trình tái gấp cuộn và tinh chế hG-CSF nhằm thu nhận hG-CSF tái tổ hợp tinh sạch và có hoạt tính sinh học.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên vật liệu

Chủng *E. coli* BL21(DE3) mang plasmid pEG [4] được sử dụng làm chủng chủ để biểu hiện protein hG-CSF. Chủng này có khả năng biểu hiện protein hG-CSF ở dạng thể vùi trong tế bào chất *E. coli*. Dòng tế bào M-NSF-60 (ATCC) dùng trong thử nghiệm hoạt tính của hG-CSF. Neupogen (Roche) là sản phẩm hG-CSF thương mại được sử dụng làm chất chuẩn.

Lên men cảm ứng biểu hiện hG-CSF

Quá trình lên men được thực hiện bằng hệ thống lên men tự động BioTron-LiFlus GX GX-05-12302 dung tích 5 lít với các thông số đã được mô tả trước đây [5]: thể tích lên men 3 lít, pH 7, nhiệt độ 37 °C, tốc độ khuấy 300 rpm, tốc độ sục khí 1 vvm, DO>20%. pH của môi trường nuôi cấy được điều chỉnh tự động bằng 24% NH₄OH và 20% H₃PO₄, DO của môi trường được điều chỉnh tự động đảm bảo DO > 20% dựa vào sự thay đổi tốc độ khuấy và tốc độ sục khí. Quá trình tạo bọt được ức chế bằng cách bổ sung dung dịch chất phá bọt khi cần thiết. Thực hiện lên men trong 24 giờ, cảm ứng

vào giờ thứ 10 khi OD_{600nm} = 8 bằng lactose. Sau quá trình lên men, thu nhận sinh khối, phá tế bào và thu nhận thể vùi: 40 g sinh khối tươi được hòa trong 500 ml lysis buffer (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1mM, PMSF 1mM, pH8) và phá tế bào bằng máy tạo áp suất Model M-110EH-30 Microfluidizer Processor trong 3 chu kỳ.

Tái gấp cuộn hG-CSF

Thể vùi sau khi rửa sạch được hòa tan bằng dung dịch 2 M urea, pH 12,5, khuấy đều ở nhiệt độ phòng trong 30 phút và pha loãng đến nồng độ cuối đạt 4-8 mg/ml (trung bình 0.5-1 g thể vùi được hòa trong 25 ml dung dịch hòa tan). Sau đó ly tâm loại bỏ cặn và tái gấp cuộn bằng cách pha trong dung dịch tái gấp cuộn (0-3 M urea, 0-15% sucrose, 5 mM cysteine, 0,5 mM cystine, pH 8) ở 15 °C trong 24 giờ với tỷ lệ 1:20. Sau đó chỉnh pH của dung dịch về pH 4 và giữ ở 4 °C trong 16 giờ.

Tinh chế hG-CSF

500 ml dung dịch protein hG-CSF sau tái gấp cuộn được đổi dung dịch đệm sang dung dịch 25 mM NaOAc, pH 4 bằng hệ thống lọc tiếp tuyến Quickstand Benchtop (GE Healthcare) với cột lọc có kích thước lỗ lọc 3000 NMWC, 1400 cm². Sau đó tinh chế bằng sắc ký trao đổi cation trên hệ thống sắc ký AKTA Explorer (GE Healthcare) với cột sắc ký Hiprep SP FF 20 ml. Quá trình tinh chế được tiến hành như sau: (1) cân bằng cột bằng 100 ml dung dịch 25 mM NaOAc, pH 4; (2) nạp 500 ml mẫu vào hệ thống; (3) rửa các thành phần gắn không đặc hiệu bằng 100 ml dung dịch 25 mM NaOAc, pH 4; (4) dung ly bằng dung dịch 50 mM Tris-

HCl, pH 8. Thu nhận được khoảng 50 ml phân đoạn ly giải và kiểm tra các phân đoạn protein (phân đoạn qua cột trong bước gắn, phân đoạn rửa và ly giải) bằng điện di SDS-PAGE.

Điện di SDS-PAGE và lai Western

Protein hG-CSF tái tổ hợp được điện di biến tính trên gel SDS-PAGE 15%, sau đó protein được chuyển lên màng lai bằng hệ thống chuyển màng Semi-Dry Trans-Blot (Biorad) ở hiệu điện thế 25 V trong 30 phút. Sau đó khóa màng bằng dung dịch sữa gầy 5% trong 1 giờ. Ủ màng với 1 μ g kháng thể đơn dòng kháng hG-CSF (R&D) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó ủ màng với 0,5 μ g kháng thể thứ cấp có gắn horseradish peroxidase. Cuối cùng hiện phim bằng bộ kit Hyperfilm ECL (GE Healthcare). Mẫu được tiến hành đồng thời với mẫu hG-CSF chuẩn và thang chuẩn phân tử lượng thấp (GE Healthcare) để ước lượng tương đối trọng lượng phân tử.

Kiểm tra cấu hình của hG-CSF tái tổ hợp

Protein hG-CSF tái tổ hợp (khoảng 7 μ g) được kiểm tra cấu hình tự nhiên thông qua phương pháp điện di không biến tính trên gel không biến tính PAGE 10% và phương pháp sắc ký lỏng cao áp đảo pha RP-HPLC sử dụng hệ thống sắc ký Agilent 1100 và cột sắc ký Inertsil WP300 C4 (GL Science). Các thí nghiệm được tiến hành đồng thời với mẫu hG-CSF chuẩn (neupogen) để so sánh, đối chứng.

Xác định trình tự amino acid và khối lượng phân tử của hG-CSF tái tổ hợp

Trình tự amino acid của protein hG-CSF tái tổ hợp được xác định bằng phương pháp phân tích khối phổ MS/MS của dung dịch protein

hG-CSF thủy phân không hoàn toàn bằng trypsin. Sau đó phân tích bằng phần mềm Mascot với cơ sở dữ liệu NCBIInr.

Khối lượng phân tử của protein hG-CSF được xác định bằng sắc ký lỏng kết hợp phổ khối LC/MS. Phổ khối sau khi ghi nhận được phân tích bằng phần mềm Magtran để tính toán trọng lượng phân tử của protein hG-CSF tái tổ hợp.

Kiểm tra hoạt tính sinh học của hG-CSF tái tổ hợp

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 được nuôi cấy trên môi trường RPMI 1640 với chất kích thích tăng sinh là M-CSF. Đầu tiên tế bào được nuôi ở mật độ tế bào khoảng 2×10^5 /ml, ở 37 °C, 5% CO₂, độ ẩm 85%, sau 48 giờ nuôi cấy thu nhận tế bào để xác định mật độ tế bào. Quy trình thử nghiệm hoạt tính được tiến hành gồm các bước: pha loãng mẫu thành dãy nồng độ từ 10^6 đến 10^{-2} pg/ml. Bổ sung 50 μ l mẫu hG-CSF và 50 μ l dịch tế bào vào đĩa 96 giếng. Ủ đĩa ở 37 °C, 5% CO₂ 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 ED₅₀. Từ đó, tính được giá trị LU (laboratory unit) và IU (international unit) theo công thức sau:

$$LU = \frac{1 \times 10^4}{ED_{50}} \text{ Units/mg}$$

$$IU_{mẫu} = \frac{LU_{mẫu} \times IU_{standard}}{LU_{standard}} \text{ Units/mg}$$

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

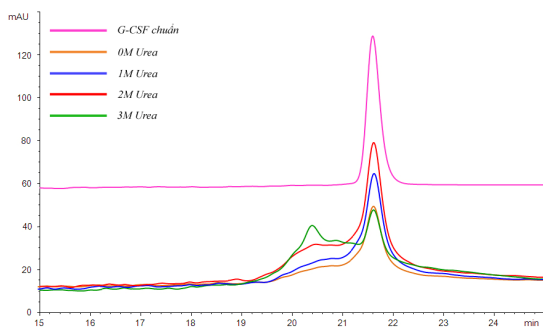
Tái gấp cuộn hG-CSF

Thế vùi chứa protein hG-CSF thu nhận sau quá trình lên men được rửa sạch, hòa tan trong dung dịch urea và được dùng để khảo sát quá trình tái gấp cuộn hG-CSF. Trước tiên, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của urea đến quá trình tái gấp cuộn hG-CSF. Các mẫu sau quá trình tái gấp cuộn được kiểm tra hiệu quả tái gấp cuộn bằng hai phương pháp: so sánh tương đối

lượng hG-CSF ở dạng kết cụm bằng cách đo OD₃₄₀, so sánh tương đối lượng hG-CSF gấp cuộn đúng bằng sắc ký RP-HPLC. Kết quả cho thấy, nồng độ urea 2 M cho hiệu quả tái gấp cuộn hG-CSF là tốt nhất. Ở nồng độ urea này, lượng protein bị kết cụm (tương đương với giá trị OD₃₄₀) thấp nhất, đồng thời lượng protein hG-CSF gấp cuộn đúng (tương đương với diện tích đỉnh hấp thu có thời gian lưu trùng với đỉnh hấp thu của hG-CSF chuẩn) là cao nhất.

Bảng 1. Ảnh hưởng của urea đến sự tái gấp cuộn hG-CSF

Nồng độ urea (M)	OD ₃₄₀	Diện tích đỉnh hấp thu có cấu hình đúng
0	0,019	471
1	0,015	751
2	0,010	1.026
3	0,010	460



Hình 1. Ảnh hưởng của urea đến sự tái gấp cuộn hG-CSF

Nồng độ tối ưu của urea cho dung dịch tái gấp cuộn hG-CSF (2 M) được sử dụng để khảo sát ảnh hưởng của sucrose đến sự tái gấp cuộn hG-CSF. Trong dãy nồng độ sucrose được khảo sát (5%, 10% và 15%), nồng độ 10% cho hiệu quả tái gấp cuộn là tốt nhất. Khi tăng nồng độ sucrose lên 15%, lượng hG-CSF gấp cuộn đúng không có sự gia tăng thậm chí giảm so với ở mẫu bổ sung 10% sucrose (diện tích đỉnh hấp thu hG-CSF có cấu hình đúng ở mẫu 15% sucrose là 1,464 so với mẫu 10% sucrose là 1.548).

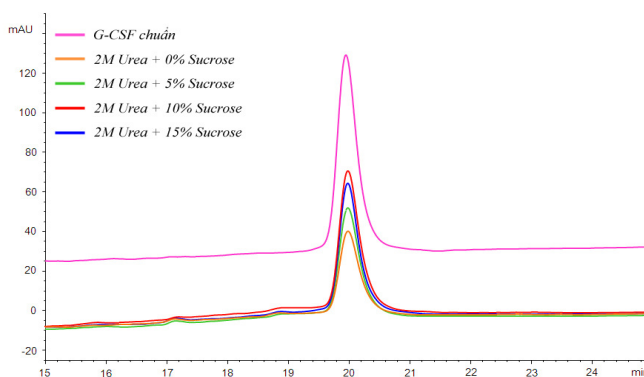
Từ kết quả này có thể khẳng định, sucrose có hiệu quả làm gia tăng sự tái gấp cuộn hG-CSF và nồng độ sucrose tối ưu cho dung dịch tái gấp cuộn hG-CSF là 10%.

Bảng 2. Ảnh hưởng của sucrose đến sự tái gấp cuộn hG-CSF

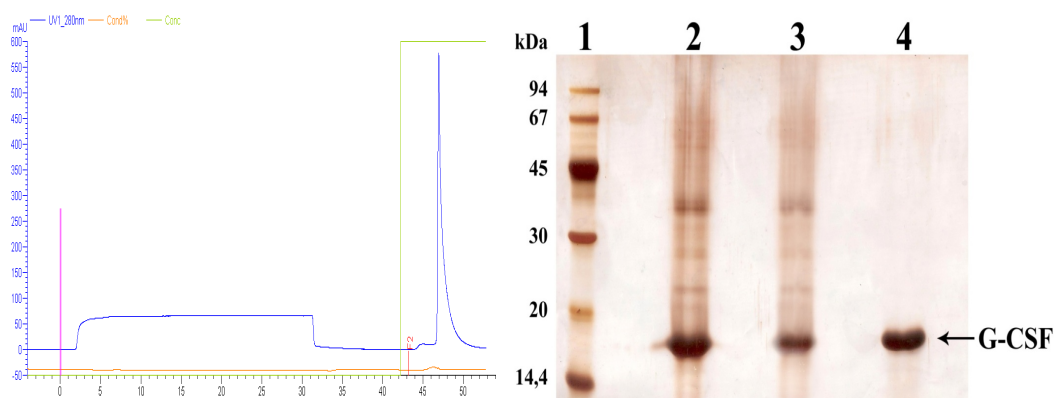
Nồng độ sucrose (%)	OD ₃₄₀	Diện tích đỉnh hấp thu có cấu hình đúng
0	0,012	1076
5	0,011	1289
10	0,012	1548
15	0,012	1464

Tinh chế hG-CSF

Dung ly thu nhận hG-CSF bằng cách dùng dung dịch 50 mM Tris-HCl pH 8 để thay đổi pH (ở điều kiện này hG-CSF tích điện âm) nhằm ly giải hG-CSF ra khỏi cột. Các phân đoạn chứa protein được thu nhận và kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE.



Hình 2. Ảnh hưởng của sucrose đến sự tái gấp cuộn hG-CSF.



Hình 3. Sắc ký đồ và điện di SDS-PAGE.

1. thang chuẩn, 2. phân đoạn trước qua cột, 3. phân đoạn không gắn cột, 4. phân đoạn dung ly.

Phân đoạn 2 (protein dung ly) (hình 3, giếng 4) có vạch tương ứng với hG-CSF với độ tinh sạch cao, trong khi đó phân đoạn 1 (protein không gắn lên cột) (hình 3, giếng 3) chứa hầu hết các protein tạp có trong phân đoạn trước khi qua cột (hình 3, giếng 2), ngoài ra phân đoạn này còn chứa một vạch protein tương ứng với hG-CSF. Tuy nhiên khi kiểm tra cấu hình và hoạt tính sinh học (không được trình

bày ở đây), vạch protein này chủ yếu là các protein hG-CSF ở dạng kết cụm và không có hoạt tính sinh học.

Nhận diện hG-CSF tái tổ hợp bằng lai Western

Protein hG-CSF tinh sạch được kiểm tra khả năng nhận diện bởi kháng thể kháng hG-CSF bằng điện di SDS-PAGE và lai Western. Protein hG-CSF tinh sạch cho một vạch trên bản điện di SDS-PAGE nằm giữa hai vạch protein chuẩn 14,4 kDa và 20 kDa, phù hợp với kích thước lý thuyết 18,8 kDa (hình 4, giếng 1). Đồng thời vạch protein hG-CSF này cũng được nhận diện bởi kháng thể kháng hG-CSF trong quá trình lai Western (hình 4, giếng 3).

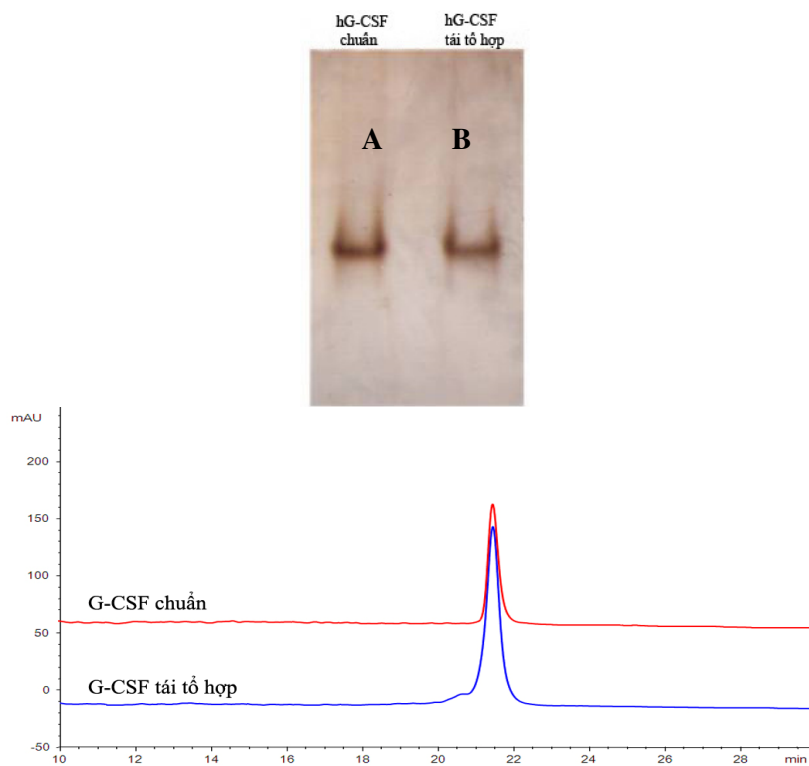


Hình 4. Điện di đồ hG-CSF và lai Western. 1,3. hG-CSF, 2,4. Thang chuẩn

Cấu hình của hG-CSF tái tổ hợp

Cấu hình của protein hG-CSF tái tổ hợp đồng thời được kiểm tra bằng phương pháp điện di không biến tính và sắc ký lỏng cao áp RP-HPLC. Protein hG-CSF tái tổ hợp cho một vạch protein duy nhất hoàn toàn tương tự như protein hG-CSF chuẩn trên gel Native-PAGE, đồng thời không thấy xuất hiện các vạch protein khác tương ứng với các cấu hình dạng

dimer, trimer, oligomer. Đồng thời sắc ký đồ RP-HPLC cũng cho thấy protein hG-CSF tái tổ hợp có xuất hiện một đỉnh hấp thu có thời gian lưu hoàn toàn trùng khớp với protein hG-CSF chuẩn. Do vậy có thể thấy protein hG-CSF tái tổ hợp tồn tại chủ yếu ở dạng monomer và có cấu hình hoàn toàn tương tự với protein hG-CSF chuẩn.



Hình 5. Điện di đồ không biến tính (A) và sắc ký đồ RP-HPLC (B) của hG-CSF tái tổ hợp.

Trình tự amino acid và khối lượng phân tử của hG-CSF tái tổ hợp

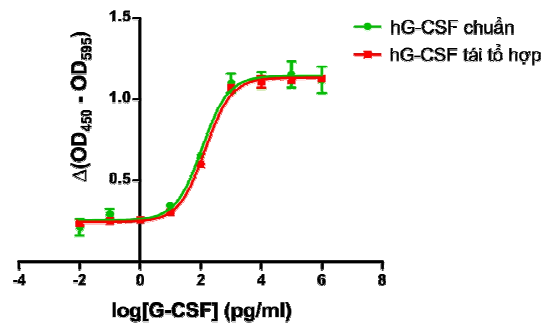
Bằng phương pháp LC/MS và phân tích bằng phần mềm Magtran, chúng tôi đã xác định được hG-CSF tái tổ hợp có trọng lượng phân tử là 18797,3 Dalton, hoàn toàn phù hợp với khối lượng phân tử trên lý thuyết là 18799 Dalton. Đồng thời khi xác định trình tự amino acid bằng phương pháp khối phổ, chúng tôi cũng đã nhận diện được 2 đoạn peptide có trình tự (MTPLGPASSLPQSFLK và RAGGVLVASHLQSFLEVSYSR) hoàn toàn trùng khớp với trình tự protein hG-CSF.

Kiểm tra hoạt tính sinh học của hG-CSF tái tổ hợp

Hoạt tính sinh học của hG-CSF tái tổ hợp được kiểm tra dựa trên khả năng kích thích tăng sinh dòng tế bào M-NFS-60 và so sánh với mẫu hG-CSF chuẩn. Kết quả kiểm tra cho thấy mẫu hG-CSF có hoạt tính riêng đạt $1,24 \times 10^8$ IU/mg so với mẫu chuẩn là 10^8 IU/mg. Theo yêu cầu của Dược điển Châu Âu năm 2009, hoạt tính của hG-CSF sẽ đạt yêu cầu khi hoạt tính riêng của nó đạt từ 80-125% so với mẫu hG-CSF chuẩn, như vậy hG-CSF tái tổ hợp mà chúng tôi tạo được có hoạt tính tương đương 124% so với mẫu hG-CSF chuẩn, hoàn toàn phù hợp với tiêu chuẩn.

Bảng 3. Kết quả kiểm tra hoạt tính hG-CSF

	hG-CSF chuẩn	hG-CSF tái tổ hợp
R^2	0,9968	0,9965
ED_{50}	196,2	158,4
LU/mg	$0,51 \times 10^7$	$0,63 \times 10^7$
IU/mg	1×10^8	$1,24 \times 10^8$

**Hình 6.** Đồ thị tăng sinh và hàm lượng**KẾT LUẬN**

Nhằm mục tiêu xây dựng quy trình sản xuất hG-CSF tại Việt Nam, chúng tôi đã nghiên cứu quá trình tái gấp cuộn và tinh sạch hG-CSF có hoạt tính từ dạng thể vùi biểu hiện trong *E. coli*: đã xây dựng thành công quy trình tái gấp cuộn và tinh sạch hG-CSF có hoạt tính, protein hG-CSF thu nhận được đã được kiểm tra và cho thấy có các đặc điểm về cấu hình tự nhiên, khả năng được nhận diện bởi kháng thể kháng hG-CSF, trọng lượng phân tử, trình tự amino acid của một số đoạn peptide và hoạt tính sinh học hoàn toàn tương tự như sản phẩm hG-CSF thương mại (Neupogen).

Hiện nay trên thị trường có nhiều loại sản phẩm G-CSF đã được thương mại hóa bởi nhiều công ty trên thế giới, trong đó G-CSF tái tổ hợp được sản xuất chủ yếu từ tế bào *Escherichia coli* như Filgrastim (Neupogen®), Pegfilgrastim (Neulasta®) và tế bào động vật hữu nhũ như Lenograstim (Granocyte®). Tuy nhiên giá thành của sản phẩm G-CSF còn khá cao, với một lọ tiêm Neupogen 300 $\mu\text{g/ml}$ là khoảng 1,9 triệu đồng, nên khả năng đáp ứng điều trị cho phạm vi rộng là vấn đề khó khăn. Do đó chúng tôi hướng đến việc nghiên cứu quy trình công nghệ để sản xuất protein G-CSF tái tổ hợp nhằm đáp ứng nhu cầu trong nước là một yêu cầu cấp thiết.

REFOLDING, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE RECOMBINANT hG-CSF EXPRESSED IN *E. COLI*

Tran Thanh Hoa, Dang Thi Phuong Thao, Tran Linh Thuoc

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT: Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF) is a hematopoietic growth factor produced by monocytes, fibroblasts, and endothelial cells. It stimulates the proliferation and differentiation of neutrophil precursor cells, enhancing some of the functional properties of mature neutrophils. So hG-CSF has been widely used to treat different forms of neutropenia, especially chemotherapy-induced neutropenia. In this study, we reported refolding, purification of hG-CSF expressed as inclusion body in *E. coli* and characterization of recombinant hG-CSF by native-PAGE and RP-HPLC chromatography showed similar yields to the standard (Neupogen). The molecular mass and peptide fragment sequence deduced from LC-MS method and the immunoassay confirmed the identity of recombinant hG-CSF. In vitro bioassay showed an equivalent biological effect (124 %) to the standard reference recombinant hG-CSF.

Key words: hG-CSF, M-NFS-60, refolding, purification

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. S. Basu, A. Dunn, A. Ward, G-CSF. Function and modes of action. *Int J Mol Med*. 10: 3-10. (2002).
- [2]. J. E. Frampton, C. R. Lee, D. Faulds, Filgrastim a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in neutropenia. *Drugs*, 48: 731-760. (1994).
- [3]. J. M. Garland, P. J. Quesenberry, D. J. Hilton, *Colony-stimulating factors: molecular and cellular biology*, New York: M-arcel Dekker Inc, (1997).
- [4]. N.T.P. Hiếu, T. T. Hòa, Đ.T.P. Thảo, T.L.Thước, Tạo dòng và biểu hiện hG-CSF (human Granulocyte Colony Stimulating Factor) tái tổ hợp bằng hệ thống vector biểu hiện được cảm ứng bằng NaCl trong *E. coli*. *Tuyển tập báo cáo khoa học Hội nghị khoa học toàn quốc lần thứ IV: Hóa sinh và Sinh học phân tử phục vụ nông, sinh, y học và công nghiệp thực phẩm, Hà Nội*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, tr. 695-698, (2008).
- [5]. T. T. Hòa, L. V. Đức, N. Q. Huy, Đ. T. P Thảo, T.L. Thước, 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*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, tr. 432-436, (2009).
- [6]. K. Welte, J. Gabrilove, M. H. Bronchud, E. Platzer, G. Morstyn, Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. *Blood*, 88(6): 1907-1929, (1996).