

ДРОЖЖИ *PICHIA PASTORIS* – ПРОДУЦЕНТЫ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИ СТАБИЛЬНЫХ ИНТЕРФЕРОНОВ-ГАММА ВЕТЕРИНАРНОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Зобнина А.Е., Цыганков М.А., Падкина М.В.
Санкт-Петербургский государственный университет

Гамма-интерферон (иммунный интерферон; ИФН- γ) принадлежит к семейству цитокинов. Он является активатором специфического клеточного иммунитета, стимулирует цитотоксичность макрофагов, повышает устойчивость организма к различным инфекциям.

Иммунные ИФН птиц и млекопитающих повышают бактерицидную и фунгицидную активность макрофагов и являются эффективными препаратами для лечения различных заболеваний животных. Есть данные, что использование куриного ИФН- γ в качестве адъюванта усиливает иммунный ответ организма на вакцины. Это позволяет предположить, что бычий ИФН- γ также можно использовать при вакцинации крупного рогатого скота.

В связи с широким спектром действия цитокинов естественно встала проблема получения значительных количеств этих биологически активных соединений. Эта проблема не могла быть решена традиционным способом – выделением из крови – ввиду ограниченности ресурсов донорской крови, а также опасности распространения вирусов. С разработкой методов работы с ДНК *in vitro* появилась возможность клонировать и экспрессировать чужеродные гены в различных прокариотических и эукариотических клетках-хозяевах. Впервые препараты рекомбинантных цитокинов были получены из бактерий *Escherichia coli*. Однако *E. coli* являются условно патогенными микроорганизмами, и получаемый белок не удается полностью очистить от продуктов жизнедеятельности бактерий, поэтому препарат в той или иной степени является токсичным, что значительно усложняет применение его в медицине и ветеринарии. Применение непатогенных микроорганизмов (дрожжей), не содержащих токсических и пирогенных факторов, как продуцентов рекомбинантного иммунного интерферона позволяет использовать этот белок в качестве лекарственного средства. Рекомбинантные белки, продуцируемые дрожжами, претерпевают корректную посттрансляционную модификацию и принимают нативную третичную и четвертичную структуры.

Ранее гены бычьего и куриного ИФН- γ были клонированы в составе векторов, обеспечивающих продукцию рекомбинантного белка клетками дрожжей *Pichia pastoris* и секрецию синтезированного белка в культуральную жидкость. Однако результаты опытов показали, что ИФН- γ подвержен существенной протеолитической деградации, обусловленной наличием нескольких потенциальных сайтов узнавания протеазами, два из которых расположены на С-конце. Для решения этой проблемы нами получены модифицированные гены бычьего и куриного интерферона-гамма (ИФН- γ), кодирующие соответствующие белки, лишённые на С-конце потенциальных сайтов расщепления протеазами (рисунок).

	130	140
A.	ИФН- γ ... <u>ArgLysArgLysArgSerGlnMetLeuPheArgGlyArgArgAlaSerMet</u>	
	ИФН- γ (Δ 10) ... <u>ArgLysGlySerAlaSerMet</u>	
	130	140
	ИФН- γ ... <u>ProSerPheLysArgLysArgSerGlnSerGlnArgArgCysAsnCys</u>	
	ИФН- γ (Δ) ... <u>ProSerPheLys</u>	
B.	ИФН- γ (Δ -C) ... <u>ProSerPheLysCys</u>	
	ИФН- γ (Δ -G) ... <u>ProSerPheLysGln</u>	

Аминокислотная последовательность С-конца молекул нативного и модифицированного ИФН- γ быка (А); нативного и модифицированных ИФН- γ курицы (В).

Созданы штаммы дрожжей *Pichia pastoris* – продуценты укороченных форм бычьего и куриного ИФН- γ . Результаты проведенных исследований рекомбинантных белков показали, что модифицированные бычий и куриные ИФН- γ действительно обладают повышенной стабильностью и при этом сохраняют биологическую активность. Эти данные свидетельствуют о том, что предложенные модификации не затрагивают участки белковых молекул, отвечающие за взаимодействие с рецептором. Протеолитическая стабильность модифицированных ИФН- γ , очевидно, повышает выход рекомбинантного белка по сравнению с нативным. Это позволяет в дальнейшем использовать созданные нами штаммы для получения очищенных препаратов бычьего и куриного ИФН- γ с возможностью их последующего применения для ветеринарных целей.