ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ПРОДУЦЕНТА ДЛЯ ОТРИМАННЯ ІНТЕРФЕРОНУ ГАММА

Даллул Л.І., Гринюк І.І.
КПІ ім. Ігоря Сікорського, dalloul.linda@lll.kpi.ua

Вступ. Інтерферон гамма (IFNγ) є одним із ключових цитокінів, які беруть участь в імунній відповіді. Це єдиний представник інтерферонів II типу, виробляється переважно натуральними кіллерами та активованими Th1-клітинами [1]. Він є основним активатором макрофагів серед цитокінів та здатен більш активно впливати на імунну систему порівняно з IFNα та IFNβ. Окрім того, завдяки своїм цитостатичним, проапоптичним та антипроліферативним властивостям, гамма-інтерферон вважається перспективним для ад'ювантної імунотерапії різних типів раку [3, 4]. Показано, що IFNγ здатен запобігати поділу пухлинних шляхом зупинки клітинного циклу [4].

За часом створення і використання IFN поділяють на природні (I покоління), рекомбінантні (II покоління) та гібридні, синтетичні або мутантні (III покоління).

Використання препаратів IFNγ природного походження, зокрема людського лейкоцитарного IFNγ обмежується високою вартістю та дефіцитом сировини, яка застосовується для його виробництва. Окрім того недоліками природного препарату IFNγ є складність стандартизації його противірусної активності, нестабільність складу цитокінів в різних серіях. Це, в свою чергу, ускладнює передбачення побічних ефектів в кожному конкретному випадку.

Тому останнім часом все більше уваги приділяють рекомбінантним препаратам, розробленим за допомогою генно-інженерних технологій [1, 5 – 8]. На відміну від препаратів IFN природного походження, такі препарати мають високий ступінь очистки. На сьогодні існує декілька способів отримання інтерферону гамма, найпоширенішим серед яких є виробництво з використанням генетично модифікованого продуцента. Вибір продуцента є ключовим етапом в біотехнологічному процесі, тому метою нашої роботи було обґрунтувати вибір найефективнішого штаму продуцента для виробництва рекомбінантного інтерферону гамма.

Матеріали і методи. Дослідження використання різних видів продуцентів для виробництва інтерферону гамма проводили шляхом аналізу наукової літератури з використанням міжнародних систем цитування (PubMed, ResearchGate та ін.).

Результати та обговорення. В якості продуцентів рекомбінантного гамма-інтерферону використовують дріжджі (*Pichia pastoris*) та бактерії (*Escherichia coli*) [1].

Pichia pastoris - метилотрофні дріжджі, які вважають універсальною платформою для експресії гетерологічних розчинних білків, оскільки в них присутній механізм посттрансляційної модифікації, який забезпечує правильне згортання білкової молекули [6,7].

Для отримання високого виходу інтерферону гамма Prabhu зі співавторами сконструювали рекомбінантні штами *P. pastoris:* GS115- hIFNγ — з нативним

геном гамма-інтерферону, GS115-hIFNγ-PDI — з нативним геном гамма-інтерферону та коекспресією PDI, GS-hIFN-γopt — з геном гамма-інтерферону, що містив оптимізовані кодони. Було встановлено, що штам GS115-hIFNγ синтезував гамма-інтерферон у кількості (0,0002 г/л). При культивуванні GS115-hIFNγ-PDI продукція інтерферону зросла у 2,5 рази та становила 0,0005 г/л. Оптимізація кодону гена, що кодує IFNγ, призвела до значного посилення продукції білка, яке досягло 0,0018 г/л. Такий вихід зумовлено більшою ефективністю трансляції та більш стабільною мРНК. Тому в подальшому автори оптимізували параметри культивування штаму GS-hIFNγopt. Після оптимізації параметрів (t = 25 °C, pH = 7, концентрація метанолу – 1 %, швидкість перемішування – 250 об/хв, концентрація інокулята – 2 %) продукція гамма-інтерферону штамом GS-hIFNγopt зросла ще на 40% - до 0,00252 г/л [6]. Проте такий вихід продукту не є перспективним для комерційного виробництва гамма-інтерферону.

Razaghi A. et al проаналізувавши близько 50 трансформованих колоній *P. pastoris* також зробили висновок, що комерційне виробництво рекомбінантного IFNγ є економічно невигідним, оскільки найвищий рівень IFNγ було зареєстровано для *P. pastoris* CBS7435: MutS та становило ~ 0,000016 г/л.

Найчастіше в промисловому виробництві застосовують бактерії *Escherichia coli*. Цей мікроорганізм має ряд переваг: здатність розмножуватися шляхом простого поділу на середовищах, що містять недорогі і легкодоступні компоненти, такі як глюкоза, пептон, дріжджовий екстракт, швидкий ріст, потенційно високі рівні експресії протеїнів, порівняно з іншими мікроорганізмами, легке маніпулювання геномом, більшість параметрів культивування можна змінити для оптимізації експресії білка [8, 9].

Найбільші значення продукування гамма-інтерферону було встановлено для штамів *E. coli* GALG20 (DE3), BL21(DE3). Мутантний штам GALG20 (DE3) був розроблений раніше зі штаму K12 дикого типу MG1655 для збільшення продуктивності плазміди та характеризується мутацією гена pgi, який кодує фермент фосфоглюкозоізомеразу.

Штам *E. coli* BL21 (DE3), трансформований плазмідою pET3a та має ряд переваг у порівнянні з іншими штамами: швидкий ріст клітин у середовищі з мінімальним складом, низьке утворення ацетату при вирощуванні на високих рівнях глюкози, низький вміст протеази та здатність росту культури до високої щільності.

Pandey R. та співавторами було показано, що штам GALG20(DE3) продукував у 3,0 та 1,5 раза більше IFNγ порівняно з штамом дикого типу MG1655(DE3) та BL21(DE3) відповідно. Більша частина загального IFN-γ була експресована у вигляді тілець включення - 95% у GALG20(DE3), 97% у *BL21(DE3)* та 72% у MG1655(DE3). Число копій мРНК, що кодує IFN-γ було також вищим у штаму GALG20(DE3) порівняно з двома іншими штамами. Продукція IFN-γ штамом GALG20(DE3) становила 0,23 г/л, тоді як штамами MG1655(DE3) та BL21(DE3) виражений 0,07 г/л та 0.16 г/л IFN-γ відповідно [10].

Висновки. Отже, порівнявши технологічні показники різних штамів-продуцентів гамма-інтерферону та вихід цільового продукту для кожного з них, встановлено, що продуцент *P. pastoris* є економічно невигідним для промислового біосинтезу IFNγ, а більш доцільнішим є використання штаму *Escherichia coli* GALG20 (DE3), оскільки він має найбільший вихід цільового продукту порівняно з іншими продуцентами.

Список використаної літератури:

1. Hu Y, Alnabulsi A, Alnabulsi A, Scott C, Tafalla C, Secombes CJ, Wang T. Characterisation and analysis of IFN-gamma producing cells in rainbow trout Oncorhynchus mykiss. Fish Shellfish Immunol. 2021 Oct; 117:328-338. doi: 10.1016/j.fsi.2021.07.022
2. Resende M., Cardoso M. S., Ribeiro A. R., et al. Innate IFN-γ–Producing Cells Developing in the Absence of IL-2 Receptor Common γ-Chain. *J Immunol* 15 August 2017; 199 (4): 1429–1439. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601701
3. Jorgovanovic, D., Song, M., Wang, L. et al. Roles of IFN-γ in tumor progression and regression: a review. Biomark Res 8, 49 (2020). https://doi.org/10.1186/s40364-020-00228-x
4. Ni L., Lu J. Interferon gamma in cancer immunotherapy. Cancer Med. 2018 Sep;7(9):4509-4516. doi: 10.1002/cam4.1700. Epub 2018 Jul 23. PMID: 30039553; PMCID: PMC6143921.
5. Trinh L.B., Phue J.N., Shiloach J. Effect of methanol feeding strategies on production and yield of recombinant mouse endostatin from *Pichia pastoris*. Biotechnol Bioeng. 2003 May 20;82(4):438-44. doi: 10.1002/bit.10587.
6. Prabhu A. A., Veeranki V. D., Dsilva S. J. Improving the production of human interferon gamma (hIFN-γ) in Pichia pastoris cell factory: an approach of cell level. Process Biochem. 2016, 51 (6): 709—718. doi: 10.1016/j.procbio.2016.02.007.
7. Razaghi A, et al., Is Pichia pastoris a realistic platform for industrial production of recombinant human interferon gamma?, Biologicals (2016), http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.09.015
8. Castro L.S., Lobo G.S., Pereira P., Freire M.G., Neves M.C., Pedro A.Q. Interferon-Based Biopharmaceuticals: Overview on the Production, Purification, and Formulation. Vaccines (Basel). 2021 Apr 1;9(4):328. doi: 10.3390/vaccines9040328. PMID: 33915863; PMCID: PMC8065594.
9. Нєчаєва Я.О., Грабчук С.М., Горшунов Ю.В., Мотроненко В.В., Галкін О.Ю. Рекомбінантні білки терапевтичного призначення: особливості отримання, вивчення безпечності та ефективності (літературний огляд). Вісник Запорізького національного університету. 2017. №2, С. 85-93.
10. Pandey R., Kumar N., Monteiro G. A., Veeranki V. D., Prazeres D. M. F. Re-engineering of an Escherichia coli K-12 strain for the efficient production of recombinant human interferon gamma. Enzyme Microb. Technol. 2018, 117: 23-31. doi: 10.1016/j.enzmictec.2018.06.001.