**Содержание**

Введение

1. Особенности получения интерферонов

2. Механизмы действия интерферонов

3. Терапевтическое применение ИНФ человека

Заключение

Список литературы

**Введение**

Интерфероны представляют собой белковые молекулы с молекулярной массой от 15000 до 21000 дальтон, продуцируемые и секретируемые клетками в ответ на вирусную инфекцию или другие возбудители.

Интерфероны (ИФН) — группа аутогенных гликопротеинов, биомеханизм действия которых связан с одновременным противовирусным эффектом - активацией клеточных генов, в результате чего синтезируются белки, ингибирующие синтез вирусной ДНК (РНК) и обладающие иммуномодулирующим эффектом — способностью усиливать экспрессию антигенов на клеточных мембранах и увеличивать активность цитотоксических Т-клеток и естественных киллеров [4].

ИФН подразделяются на два типа. К первому типу, действующему как ингибиторы репликации вируса и оказывающему преимущественно противовирусный эффект, относятся 22 различных подтипа ИФН-α и один подтип ИФН-β. Ко второму типу, проявляющему иммуномодуляторную активность, относятся ИФН-γ.

Существует три иммунологически различных класса ИФН: ИФН-α, ИФН-β, ИФН-γ.

К ИФН естественного происхождения относятся лимфобластоидный и лейкоцитарный ИФН (ИФН-α), синтезируемые соответственно стимулированными моноцитами и В-лимфоцитами человека, которые затем экстрагируются и очищаются; фибробластный ИФН (ИФН-β), получаемый из культуры фибробластов человека, и Т-лимфоцитарный ИФН (ИФН-γ).

К искусственно синтезируемым ИФН относится рекомбинантный ИФН-α, который представляет собой высокоочищенный единственный подтип ИФН-α, получаемый по рекомбинантной молекулярной технологии [1].

**1. Особенности получения интерферонов**

Известны способы получения лейкоцитарного интерферона человека из лейкоцитов донорской крови человека, индуцированных вирусами и другими индукторами.

Основным недостатком этих способов получения интерферонов являются вероятность контаминации конечного продукта вирусами человека, такими как вирус гепатитов В и С, вируса иммунодефицита и др.

В настоящее время более перспективным признан способ получения интерферона микробиологическим синтезом, который обеспечивает возможность получения целевого продукта со значительно более высоким выходом из сравнительно недорогого исходного сырья. Используемые при этом подходы позволяют создать оптимальные для бактериальной экспрессии варианты структурного гена, а также регуляторных элементов, контролирующих его экспрессию.

В качестве исходных микроорганизмов используют различные конструкции штаммов Pichia pastoris, Pseudomonas putida и Escherichia coli.

Недостатком использования P. pastoris в качестве продуцента интерферона, является крайне сложные условия ферментации этого типа дрожжей, необходимость строго поддерживать концентрацию индуктора, в частности метанола, в процессе биосинтеза.

Недостатком использования штаммов Ps. putida является сложность процесса ферментации при низком уровне экспрессии (10 мг интерферона на 1 л культуральной среды). Более продуктивным является использование штаммов Escherichia coli.

Известно большое количество плазмид и созданных на их основе штаммов Е. coli, экспрессирующих интерферон: штаммы Е. coli ATCC 31633 и 31644 с плазмидами Z-pBR322 (Psti) HclF-11-206 или Z-pBR 322(Pstl)/HclN SN 35-AHL6 (SU 1764515), штамм Е. coli pINF- AP2 (SU 1312961), штамм Е. coli pINF- F-Pa (AU 1312962), штамм E.Coli SG 20050 с плазмидой p280/21FN (Кравченко В.В. и др. Биоорганическая химия, 1987, т.13, №9, с.1186-1193), штамм E.Coli SG 20050 с плазмидой pINF14 (SU 1703691), штамм E.coli SG 20050 с плазмидой pINF16 (RU 2054041) и др. Недостатком технологий, основанных на использовании этих штаммов, является их нестабильность, а также недостаточный уровень экспрессии интерферона.

Наряду с особенностями используемых штаммов эффективность процесса во многом зависит от используемой технологии выделения и очистки интерферона.

Известен способ получения интерферона, включающий в себя культивирование клеток Ps. putida, разрушение биомассы, обработку полиэтиленимином, фракционирование сернокислым аммонием, гидрофобную хроматографию на фенилсилохроме С-80, рН-фракционирование лизата, его концентрирование и диафильтрацию, ионообменную хроматографию на целлюлозе DE-52, элюирование в градиенте рН, ионообменную хроматографию полученного элюента на целлюлозе СМ-52, концентрирование пропусканием через кассету фильтров и гель-фильтрацию на Сефадексе G-100 (SU 1640996). Недостатком этого способа кроме сложной многостадийной ферментации является многостадийность при получении конечного продукта.

Известен также способ получения интерферона, включающий в себя культивирование штамма E.coli SG 20050/pIF16, в LB-бульоне в колбах в термостатированном шейкере, центрифугирование биомассы, ее промывку буферным раствором и обработку ультразвуком для разрушения клеток. Полученный лизат центрифугируют, промывают 3М раствором мочевины в буфере, растворяют в растворе гуанидин хлорида в буфере, обрабатывают ультразвуком, центрифугируют, проводят окислительный сульфитолиз, диализ против 8 М мочевины, ренатурацию и окончательную двухстадийную хроматографию на СМ-52 целлюлозе и сефадексе G-50 (RU 2054041).

Недостатками этого способа является его относительно невысокая производительность основных этапов процесса выделения и очистки. В особенности это относится к ультразвуковой обработке продукта, диализу и окислительному сульфитолизу, что приводит к нестабильности выхода интерферона, а также к невозможности использования этого метода для промышленного производства интерферона.

В качестве наиболее близкого аналога (прототипа) может быть указан способ получения лейкоцитарного интерферона человека, заключающийся в культивировании рекомбинантного штамма E.coli, замораживании полученной биомассы при температуре не выше -70°С, размораживании, разрушении клеток микроорганизма лизоцимом, удалении ДНК и РНК введением в лизат ДНК-азы и очисткой выделенной нерастворимой формы интерферона отмывкой буферным раствором с детергентами, растворении осадка интерферона в растворе гуанидин гидрохлорида, ренатурации и одностадийной очистке ионообменной хроматографией. В качестве продуцента используют штамм E.coli SS5, полученный с помощью рекомбинантной плазмиды pSS5, содержащей три промотора: Plac, Pt7 и Ptrp, и ген альфа -интерферона с введенными нуклеотидными заменами.

Экспрессия интерферона штаммом E.coli SS5, содержащим эту плазмиду, контролируется тремя промоторами: Plac, Pt7 и Ptrp. Уровень экспрессии интерферона составляет около 800 мг на 1 л клеточной суспензии.

Недостатком способа является низкая технологичность использования ферментативного разрушения клеток, ДНК и РНК микроорганизма и одностадийная хроматографическая очистка интерферона. Это обуславливает нестабильность процесса выделения интерферона, приводит к снижению его качества и ограничивает возможность использования приведенной схемы для промышленного производства интерферона.

Недостатками данной плазмиды и штамма на ее основе являются использование в плазмиде сильного нерегулируемого промотора фага Т7 в штамме Е. coli BL21 (DE3), в котором ген Т7 РНК полимеразы находится под промотором lac оперона и который всегда "течет". Следовательно, в клетке непрерывно происходит синтез интерферона, что приводит к диссоциации плазмиды и снижению жизнеспособности клеток штамма, и в результате - снижение выхода интерферона.

Для получения больших количеств ИФН используют шестидневные однослойные культуры клеток куриного эмбриона или культивируемые лейкоциты крови человека, зараженные определенным видом вируса. Иными словами, для получения ИФН создают определенную систему вирус-клетка.

Из клетки человека изолирован ген, ответственный за биосинтез ИФН. Экзогенный человеческий ИФН получают, используя технологию рекомбинантных ДНК. Процедура выделения кДНК ИФН-ов состоит в следующем:

1) Из лейкоцитов человека выделяют мРНК, фракционируют ее по размерам, проводят обратную транскрипцию, встраивают в сайт модифицированной плазмиды.

2) Полученным продуктом трансформируют Е. соli; образовавшиеся клоны подразделяют на группы, которые идентифицируют.

3) Каждую группу клонов гибридизируют с ИФН - мРНК.

4) Из образовавшихся гибридов, содержащих кДНК и хРНК, выделяют мРНК, проводят ее трансляцию в системе синтеза белка [4].

5) Определяют интерферонную противовирусную активность каждой смеси, полученной в результате трансляции. Группы, проявившие интерферонную активность, содержат клон с кДНК, гибридизировавшийся с ИФН - мРНК; повторно идентифицируют клон, содержащий полноразмерную ИФН - кДНК человека.

**2. Механизмы действия интерферонов**

ИФН проявляют некоторые виды активности как лимфокины и им-муномодуляторы. ИФН I типа, действующие преимущественно как ингибиторы репликации вирусов в клетке, реализуют свой эффект, стимулируя выработку рибосомами клеток хозяина клеточных ферментов, которые тормозят продукцию вирусов, нарушая трансляцию вирусной мРНК и синтез вирусных белков.

ИФН вырабатывают большинство видов животных, но проявление их активности видоспецифично, т.е. они действуют только у того вида животных, в которых вырабатываются.

ИФН вызывают индукцию трех ферментов:

протеинкиназы, нарушающей начальный этап построения пептидной цепи;

олигоизоаденилат синтетазы, активирующей РНК-азу, которая разрушает вирусную РНК;

фосфодиэстеразы, разрушающей конечные нуклеотиды тРНК, что приводит к нарушению элонгации пептида.

С учетом антивирусного и иммуномоделирующего эффектов ИФН в НПО «Биомед» предложены и успешно апробированы, суппозитории с ИФНаn1 и пробиотиками при терапии дисбактериозов вирусной и бактериальной этиологии, кандидозов; в гинекологической практике для лечения эндометритов, кольпитов, вагинитов и гинекологического герпеса.

**3. Терапевтическое применение ИНФ человека**

Различают два поколения препаратов интерферона. Для первого поколения характерно натуральное происхождение, при котором его получают из крови доноров. Из него получают интерферон лейкоцитарный человеческий сухой, который применяют для ингаляций и закапывания в носовые проходы. Также производят интерферон в свечах, очищенный концентрированный интерферон в сухом виде и Лейкинферон.

Этот метод получения препаратов на основе интерферона является достаточно дорогим и малодоступным, поэтому в конце 20 века при помощи генной инженерии были созданы препараты интерферона второго поколения.

Таким образом, удалось разработать препараты Виферон, Интераль и другие, содержащие в себе рекомбинантный человеческий интерферон альфа-

По причине своих уникальных свойств препараты интерферона применяют при лечении и профилактики всех респираторных заболеваний, большинства онкозаболеваний, для лечения многих вирусных заболеваний и гриппа. Препараты интерферона широко применяются в лечении гепатита В и С: интерферон ограничивает развитие вируса, препятствует возникновению цирроза и исключает смертельный исход.

У некоторых препаратов интерферона имеются побочные эффекты, например, кожные высыпания, аллергии и заболевания кроветворной системы.

При длительном приеме интерферона в организме вырабатываются антитела к интерферону, что делает его неспособным к борьбе с вирусами. Причина этих явлений кроется в наличии альбумина в препаратах на основе интерферона.

Альбумин получают из крови, поэтому существует риск (хоть и минимальный) заражения гепатитом и другими болезнями, передающимися через кровь.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Название препарата | Подтип ИНФ | Способ получения | Фармакологическое действие | Показания к применению |
| Интерферон | α | Биосинтез в культуре лейкоцитов донорской крови под воздействием вирусов | Антивирусное, иммуномодулирующее, антипролиферативное | Вирусные заболевания, лейкоз, злокачественная меланома, рак почек, карциноидный синдром |
| Интерлок | α | Биосинтез в культуре лейкоцитов донорской крови под воздействием парамиковирусов | Подавляет жизнедеятельность ряда вирусов | Вирусные заболевания глаз, гепатиты |
| Интерферон альфа-2 | α2 | Рекомбинантный | Антивирусное, иммуномодулирующее, ингибирует пролиферацию большого спектра опухолевых клеток | Эпителиальная форма острой и рецидивирующей вирусной инфекции глаз; онкологические заболевания |
| Интерферон альфа-2а | α2а | Рекомбинантный. Белок, содержащий 165 аминокислот | Противовирусная, противоопухолевая активность | Лейкемический ретикулоэндотелиоз, саркома капоши, рак почки, мочевого пузыря, меланома, опоясывающий лишай |
| Реаферон | α2 | Рекомбинанатный ИНФ, продуцируемый бактериальным штаммом псевдомонады, в генетический аппарат которой встроен ген человеческого лейкоцитарного ИНФ α2. Идентичен человеческому лейкоцитарному ИНФ α2. | Противовирусная, иммуномодулирующая, противоопухолевая активность | Вирусные, опухолевые заболевания |
| Интерферон альфа – n1 | αn1 | Высокоочищенный человеческий ИНФ | Противовирусная | Хронический активный инфекционный гепатит В |
| Инреферон бета | β | Суперпродуция фибробластов человека стимулятором в присутствии ингибиторов обменных процессов | Противовирусная, иммуномодулирующая, противоопухолевая активность | Хронические вирусные инфекции в офтальмологии, гинекологии и урологии, дерматологии, гепатологии, онкологии |
| Интерферон гамма | γ | Рекомбинантный | Противовирусная, иммуномодулирующая, противоопухолевая активность | Хронические гранулематозные заболевания |

**Заключение**

Разработка методов получения лейкоцитарного и рекомбинантного интерферона в препаративных количествах, а также высокоэффективных методов их очистки открыла возможность применения этих препаратов в лечении вирусных гепатитов.

В настоящее время как у нас в стране, так и за рубежом выпускаются коммерческие препараты: человеческий лейкоцитарный, лимфобластный «Велферон» (Wellferon), фибробластный (Ферон); интерферон и интерфероны, полученные генно-инженерными методами: рекомбинантные альфа-(Роферон, Реальдерон и другие), бета- и гамма-интерферон (Гаммаферон) [3].

Главным из ИНФ является ИФНγ.

ИФНγ — ключевой медиатор активации системы естественной цитотоксичности, регулирует процесс дифференцировки естественных киллерных клеток и их цитотоксическое взаимодействие с клетками-мишенями, стимулирует цитотоксические и регуляторные функции макрофагов, активирует цито-токсические лимфоциты.

Под действием ИФНγ повышается продукция цитокинов, таких, как интерлейкин-1, интерлейкин-2, интерлейкин-12, ИФНβ, и фактора некроза опухолей-α.

**Список литературы**

1. www.antibiotic.ru/ab/brviri.shtml

2. www.interferon.su/php/content.php?id=71

3. www.pharmvestnik.ru

4. Временная фармакопейная статья 42У-23/60-439-97. Интерферон человеческий рекомбинантный альфа-два.

5. Гавриков А.В. Оптимизация биотехнологического производства субстанций рекомбинантных интерферонов человека.- М., 2003,

6. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология / Б.Глик, Дж. Пастернак. – М., Мир, 2002.

7. Государственная Фармакопея СССР. ХI изд., вып.1.— С. 175.

8. Государственный реестр лекарственных средств / Под ред. А.В. Катлинского и др. – М., 2002.

9. Народицкий Б.С. Молекулярная биотехнология интерферонов. // сборник научно-практической конференции«Интерферону – 50 лет». – М., 2007 г., стр. 17-23

10. Основы фармацевтической биотехнологии: Учебное пособие / Т.П. Прищеп, В.С. Чучалин, К.Л. Зайков, Л.К. Михалева. – Ростов-на-Дону.: Феникс; Томск: Издательство НТЛ, 2006.

11. Фролов А.Ф., Вовк А.Д., Дядюн С.Т. и др. Эффективность рекомбинантного альфа-два-интерферона при вирусном гепатите В//Врачебное дело.— Киев, 1990.— № 9.— С. 105–108.