

УДК 571.27

В.А. ПРОКУЛЕВИЧ, М.И. ПОТАПОВИЧ

**ВЕТЕРИНАРНЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ ИНТЕРФЕРОНА**

Chicken, porcine and bovine interferon alpha genes were cloned in *Escherichia coli* and induction with IPTG or lactose results in high level accumulation of interferon alpha proteins in bacterial cells.

Chicken, porcine and bovine interferons from *E. coli* inclusion bodies were purified and tested for antiviral activity. Using these proteins new forms of injection preparations for the treatment and prophylaxis of animal's diseases were developed. Interferon-based preparations in question showed high immunostimulating and protective activity in animals.

Профилактика и лечение заболеваний животных требует обеспечения необходимыми ветеринарными препаратами. Основными профилактическими средствами против вирусных и бактериальных инфекций являются соответствующие вакцины. Для лечения заболеваний бактериальной этиологии выпускается огромное количество антибиотиков, однако противовирусных лечебных ветеринарных препаратов практически не существует. В этом плане перспективными считаются препараты на основе интерферонов.

Интерфероны – это белковые молекулы, которые синтезируются клетками всех видов животных – от рыб до человека. С точки зрения ветеринарии интерфероны интересны своими противовирусными и иммуномодулирующими свойствами. При этом стоит отметить, что интерфероны не относятся к чужеродным соединениям, а являются атрибутом самого организма с определенной долей видоспецифичности, т. е. свиной интерферон максимально проявляет свою активность у поросят и свиней, бычий – у крупного рогатого скота, куриный – у кур и т. д.

Интерфероны по своим свойствам могут претендовать на роль лечебно-профилактических препаратов при вирусных, бактериальных и смешанных бактериально-вирусных инфекциях, а также высокоэффективных иммуномодулирующих и антистрессовых агентов. Они могут выступать в качестве модификаторов действия других терапевтических лекарств, например антибиотиков, в десятки раз усиливая антибактериальный эффект и нейтрализуя отрицательное воздействие на иммунную систему.

Генно-инженерные методы создания продуцентов различных интерферонов и разработка схем биотехнологического производства высокоочищенных белков интерферонов дадут в руки ветеринаров высокоэффективные препараты нового поколения, которые во многом смогут заменить антибио-

тики и окажут помощь в борьбе с вирусными инфекциями при безвакциной профилактике и безопасной терапии моно- и смешанных инфекций сельскохозяйственных животных.

На кафедре микробиологии в рамках государственных программ «Ветеринарные препараты», ГНТП «Промышленные биотехнологии», межгосударственной целевой программы Евразийского экономического сообщества «Инновационные биотехнологии», хоздоговорных тематик ведутся разработки новых ветеринарных препаратов для животноводства на основе собственных белков животных и птицы – интерферонов. Поставлена задача создать полный биотехнологический процесс от конструирования высокоэффективных штаммов-продуцентов до получения препаративных форм, от разработки научно-технической документации до организации производства, от проведения фармакологических испытаний до утверждения инструкций по применению новых препаратов в животноводстве. В настоящей статье представлены основные результаты, полученные при выполнении поставленной задачи.

#### **Создание штаммов-продуцентов интерферонов животных и птицы**

На первом этапе необходимо было синтезировать последовательности ДНК, соответствующие структурным участкам генов интерферонов животных и птицы, поместить их в высокоэффективную систему экспрессии и сконструировать штаммы бактерий, продуцирующие целевые белки. С использованием созданных специфических праймеров амплифицированы гены куриного, свиного и бычьего лейкоцитарных  $\alpha$ -интерферонов. Продукты амплификации отсекарованы и клонированы в вектор экспрессии. В результате получены высокоэффективные продуценты куриного, свиного и бычьего альфа-интерферонов. Уровень накопления целевого белка составляет от 30 до 40 % от общего белка клеток [1–11].

#### **Получение субстанций рекомбинантных $\alpha$ -интерферонов**

Разработан способ получения субстанций куриного, бычьего и свиного интерферонов путем культивирования бактерий, наследующих рекомбинантные плазмиды, в жидкой полноценной питательной среде LB в ферментере объемом 4 л. Накопление сырой биомассы в конце процесса ферментации достигает 25 г/л. Практически весь целевой белок локализуется внутриклеточно, образуя нерастворимую в обычных условиях фракцию в виде телец включения.

На следующем этапе были созданы оригинальные методы солюблизации, рефолдинга и очистки целевого белка. Чистота субстанции подтверждалась с помощью ВЭЖХ. При таких условиях культивирования и очистки из 1 л культуры получали до 500 мг очищенного белка альфа-интерферона [12]. Затем субстанции стабилизировали и использовали для получения препаративных форм ветеринарных препаратов.

#### **Разработка препаративных форм препаратов на основе интерферонов**

Препаративная форма – конечный результат создания любых лечебно-профилактических препаратов, как медицинских, так и ветеринарных. Она должна соответствовать установленным требованиям и обладать свойствами, определяющими максимальную функциональность действующего вещества (веществ) препарата, быть удобной в пользовании.

Эксперименты с различными полимерными композициями позволили решить поставленную задачу. Суть решения заключается в том, что препаративная форма включает  $\alpha$ -интерферон, стабилизаторы и воду. В качестве стабилизаторов выступают жирорастворимые витамины в виде коллоидных частиц с локализованными на поверхности остатками полиэтиленоксида, оказывающих стабилизирующее действие на интерферон и усиливающих его иммуномодулирующую и противовирусную активность с пролонгированным характером действия. Результатом изобретения, защищенного патентами Республики Беларусь [13] и ЕврАзЭС [14], является увеличение сохранения активности интерферона в жидкой лекарственной форме и повышение эффективности его лечебного действия за счет содержащихся в растворе витаминов, а также стабилизирующего действия коллоидных частиц жирорастворимых витаминов, обуславливающих пролонгированность действия препарата.

#### **Ветеринарные препараты на основе интерферонов животных**

Успешное конструирование штаммов-сверхпродуцентов интерферона, разработка сложнейших методов рефолдинга и очистки белков, создание оригинальной препаративной формы – все это позволило разработать большую линейку моно- и поликомпонентных ветеринарных препаратов, предназначенных для решения самых разнообразных задач ветеринарии. Главной отличительной особенностью всех разработанных препаратов является их видоспецифичность, соответствующая видоспецифичности входящих в их состав интерферонов. Появились препараты, отдельно предназначенные для про-

филактики и лечения заболеваний свиней, крупного рогатого скота. В разработке находятся препараты для кур, лошадей, собак. Это уникальные в своем роде препараты, действующим началом в которых являются защитные белки, полностью идентичные собственным белкам животных. Таким образом, создана возможность лечить животных не чужеродными для них веществами, а их собственными средствами защиты, просто увеличивая в нужное время концентрацию этих веществ в организме путем введения препаратов, содержащих интерфероны.

Всего создано три группы ветпрепаратов:

**I. Монокомпонентные препараты,** содержащие в качестве действующего вещества интерферон, который обладает следующими основными видами активности:

- противовирусный эффект;
- подавление роста и развития внутриклеточных инфекционных агентов невирусной природы (хламидии, риккетсии, бактерии, микоплазмы, простейшие);
- увеличение лизоцимной активности сыворотки крови;
- увеличение бактерицидной активности сыворотки крови;
- антиоксидантное и антистрессовое действие;
- стимуляция макрофагов и усиление фагоцитоза;
- усиление продукции антител;
- активизация естественных киллерных клеток;
- стимуляция освобождения гистамина базофилами;
- подавление гиперчувствительности замедленного типа.

Основные характеристики разработанных монокомпонентных препаратов приведены в табл. 1.

Таблица 1

**Основные характеристики монокомпонентных препаратов на основе интерферонов животных**

Препарат	Действующие вещества	Сфера применения
«Интерферон свиной рекомбинантный» ТУ ВУ 790624352.001-2010	Свиной рекомбинантный интерферон	Желудочно-кишечные и острые респираторные заболевания вирусной этиологии. Показаны к применению при угрозе распространения любых вирусных заболеваний, вызываемых как ДНК-, так и РНК-содержащими вирусами. Как иммуностимуляторы препараты применяют при иммунодефицитных состояниях животных, вызванных стрессами и неблагоприятными условиями содержания, кормления, транспортировки, при вакцинациях
«Интерферон бычий рекомбинантный» ТУ ВУ 790624352.002-2010	Бычий рекомбинантный интерферон	

**II. Бикомпонентные препараты,** содержащие в качестве действующего вещества интерферон и антибактериальный агент (антибиотик) и предназначенные для лечения смешанных бактериально-вирусных инфекций.

Бикомпонентные противоинфекционные препараты обладают рядом преимуществ перед известными противовирусными и антибактериальными монофункциональными средствами профилактики и лечения продуктивных сельскохозяйственных животных.

В бифункциональных препаратах интерферон проявляет все перечисленные свойства, однако необходимо обратить особое внимание на то, что интерфероны многократно усиливают антибактериальное действие антибиотиков, входящих в состав препарата, снимая их иммунодепрессивное действие на организм животного.

В свою очередь антибиотик, входящий в состав препарата, на фоне повышенной лизоцимной и бактериостатической активностей сыворотки крови животного, индуцируемых интерфероном, обеспечивает полное и быстрое подавление жизнедеятельности чувствительных патогенных бактерий в низких терапевтических концентрациях при сокращенных сроках лечения, а также:

- обладает пролонгированным действием;
- не проявляет иммунодепрессивного эффекта на организм животного;
- за счет комплексного воздействия резко снижает угрозу возникновения лекарственной устойчивости и рецидивов при лечении.

Характеристика разработанных бикомпонентных препаратов представлена в табл. 2.

**Основные характеристики бикомпонентных препаратов на основе интерферонов животных и антибиотиков**

Препарат	Действующие вещества	Сфера применения
Раствор «Гентаферон-С» ТУ ВУ 790624352.003-2010  Раствор «Гентаферон-Б» ТУ ВУ 790624352.004-2010	Гентамицина сульфат, интерферон свиной рекомбинантный Гентамицина сульфат, интерферон бычий рекомбинантный	Для лечения инфекций бактериальной и смешанной (бактериально-вирусной) этиологии, в частности, заболеваний, вызываемых чувствительными к гентамицину сульфату микроорганизмами
«Энрофлоксаферон-С» ТУ ВУ 790624352.005-2010  «Энрофлоксаферон-Б» ТУ ВУ 790624352.006-2010	Энрофлоксацин, интерферон свиной рекомбинантный Энрофлоксацин, интерферон бычий рекомбинантный	Для лечения инфекционных заболеваний бактериальной и смешанной (бактериально-вирусной) этиологии, в частности, заболеваний, вызываемых чувствительными к энрофлоксацину микроорганизмами
Раствор «Линкоферон-С» ТУ ВУ 790624352.008-2010  Раствор «Линкоферон-Б» ТУ ВУ 790624352.012-2010	Линкомицина гидрохлорид, интерферон свиной рекомбинантный Линкомицина гидрохлорид, интерферон бычий рекомбинантный	Для лечения инфекционных заболеваний бактериальной и смешанной (бактериально-вирусной) этиологии, в частности, болезней, вызванных чувствительными к линкомицину микроорганизмами, устойчивыми к пенициллинам и другим антибиотикам
«Тилоферон-С» ТУ ВУ 790624352.010-2011 «Тилоферон-Б» ТУ ВУ 790624352.011-2010	Тилозин, интерферон свиной рекомбинантный Тилозин, интерферон бычий рекомбинантный	Для лечения инфекционных заболеваний бактериальной и смешанной (бактериально-вирусной) этиологии, в частности, болезней, вызванных чувствительными к тилозину микроорганизмами

**III. Поликомпонентные препараты, содержащие в качестве действующего вещества интерферон и комплекс витаминов А, D<sub>3</sub>, Е и С в оптимальных физиологических соотношениях.**

Поликомпонентные препараты обладают ярко выраженным синергическим действием, при этом усиливаются как эффекты интерферона, так и витаминов, входящих в состав препаратов.

Характеристики разработанных поликомпонентных препаратов представлены в табл. 3.

Таблица 3

**Основные характеристики поликомпонентных препаратов на основе интерферонов животных и витаминов**

Препарат	Действующие вещества	Сфера применения
«Тетравитферон-С» ТУ ВУ 790624352.015-2011  «Тетравитферон-Б» ТУ ВУ 790624352.016-2010	Витамины А, D <sub>3</sub> , Е, С, интерферон свиной рекомбинантный Витамины А, D <sub>3</sub> , Е, С, интерферон бычий рекомбинантный	Для профилактики гиповитаминозов и заболеваний, развивающихся на их фоне. Как иммуномодуляторы при иммунодефицитных состояниях животных, вызванных неблагоприятными условиями содержания

Таким образом, разработан широкий спектр препаратов, главными компонентами которых являются белки интерферонов животных. Аналогов этим препаратам нет ни в одной стране мира. Все они прошли регистрационные процедуры и в процессе широких производственных испытаний показали высокую эффективность. Препараты: раствор «Гентаферон-С», раствор «Гентаферон-Б», «Интерферон свиной рекомбинантный» и «Интерферон бычий рекомбинантный» выпускаются на предприятиях РУП «Минский завод ветеринарных препаратов» и ООО «Научно-производственный центр БелАгроГен».

1. Потапович М.И., Прокулевич В.А. // Материалы Междунар. науч. конф. «От классических методов генетики и селекции к ДНК-технологиям». Мн., 2007. С. 117.

2. Потапович М.И., Николайчик Е.А., Прокулевич В.А. // Материалы Междунар. науч. конф. «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии», Минск, 2–6 июня 2008 г.: в 2 т. Мн., 2008. Т. 1. С. 301.

3. Потапович М.И., Прокулевич В.А. // Вестн. БГУ. 2008. № 2. С. 34.

4. Прокулевич В.А., Шаблич Н.М., Желдакова Р.А., Шолух М.В. // Материалы Междунар. науч. конф. «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии», Минск, 2–6 июня 2008 г.: в 2 т. Мн., 2008. Т. 2. С. 37.

5. Желдакова Р.А., Крупенько Н.А., Прокулевич В.А. Там же. С. 114.

6. Потапович М.И., Николайчик Е.А., Прокулевич В.А. // Докл. НАН Беларуси. 2009. Т. 53. № 2. С. 72.

7. Потапович М.И., Трубицына М.В., Николайчик Е.А., Прокулевич В.А. // Материалы Междунар. школы-конф. «Генетика микроорганизмов и биотехнология», Пушино, 21–24 окт. 2008 г. М., 2008. С. 72.

8. Потапович М.И., Николайчик Е.А., Прокулевич В.А. // Материалы Междунар. науч. конф. «Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты», Минск, 3–6 дек. 2008 г. Мн., 2008. С. 260.

9. Трубицына М.В., Потапович М.И., Прокулевич В.А. // Тр. БГУ: в 7 т. Сер. «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем». Мн., 2008. Т. 3. Ч. 1. С. 80.
10. Нашкевич Н.Н., Потапович М.И., Ульянченко С.А. и др. // Там же. 2010. Т. 4. Ч. 1. С. 13.
11. Patarovich M.I., Trubitsyna M.V., Prokulevich V.A. // Proceedings of International Life Sciences Student's Conference, Киев, Украина, 19–23 авг. 2009 г. Киев, 2009. С. 99.
12. Потапович М.И., Шолух М.В., Голенченко С.Г., Прокулевич В.А. // Материалы 14 Междунар. Пущинской школы-конф. мол. ученых «Биология – наука XXI века», Пущино, 2010 г.: в 2 т. М., 2010. Т. 1. С. 279.
13. Препарат, обладающий антивирусным и антимикробным действиями: пат. РБ а20080606 от 10.02.2010 / В.А. Прокулевич и др.
14. Препарат на основе интерферона: пат. 014669 ЕврАзЭС / В.А. Прокулевич и др.; заявл. 08.06.2009; опубл. 30.12.2010.

Поступила в редакцию 30.06.11.

**Владимир Антонович Прокулевич** – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии. Область научных интересов – генетика микроорганизмов, биотехнология, разработка и создание ветеринарных препаратов. Автор более 120 научных публикаций.

**Максим Иосифович Потапович** – заведующий НИЛ биотехнологии кафедры микробиологии. Область научных интересов – молекулярная биология, биотехнология, иммунология, биохимия. Автор 17 научных публикаций.