

Медицина үшін интерферондар алу технолологиясы

Интерферон. Классификациясы. α , β , γ - интерферондар.

Онко-логиялық және вирусты аурулар-дағы интерферондар.

Интерферондардың түр арнайылығы.

Алудың шектелген жағдайлары.

Вирусты инфекцияға тұрақты фактор Ұлттық институты Лондонда медициналық зертеулерден жануарлар жасушасы вирусыға қарсы ұшырап ортаға фактор бөледі, вирусты инфекцияға тұрақты жас жасушаға беруге қабілетті: ол жасушада вирустың көбейюіне қарсы болады және бұл қабілеттіліктің күшіне интерферон деп аталған.

Дәстүрлі оларды адамның қанынан алады. 1980ж. япондық бір компаниясы лимфобластоидты интерферонды лимфобластоидты жасушадан алу өндірісін іске қосты. Швецияда лимф аумақты көлемі 2000л ферменттерде өсірді. Алынған интерферонды моноклоналды антителаның көмегімен тазартылады. Интерферондар – бұл инфекцияға қарсы қорғаныстың бірінші сызығы. Теориялық және қолданбалы түрде интерферондарды зерттеулер төңкеріс әкелетіндей жаңалықтар болып табылады. Интерферон гені векторлы ДНК-ға тұрғызылды және бактериальды қалыптастырғыш элементтер қосылады, олар оның бактериальды жасушада транскрипция мен трансляцияны прогламмалау қазметін атқарады.

Барлық интерферондар (α -И басқа) гликопротеиндер: олар глобулярлы ақуыз типтес болады, сондықтан α -спираль құрылысының үлесіне 40-тан 75% дейін сәйкес келеді. α -И екі дисульфидті байланыс байқалады. Интерферондар–146-166 аминқышқылдар қалдықтарынан тұратын төменгі молекулярлы ақуыздар; түрі айқын көрінеді. Адамда интерферондардың ішінде жақсы зерттегендерге α -интерферондарын жатқызуға болады: оларды кодирлеуші гендер саны алынады. Интерферон өндіру үшін – ішек таяқшасынан басқа *Methylomanus*, *Salmonella*, *Pseudomonas* т.б. грам-теріс бактериялар пайдаланылады.

Қазіргі уақытта интерферондар гендері ашытқыларда және глюкозилірлеуді жүзеге асыруға қабілетті, жоғарға эукариоттар жасушаларында клонирленген болатын.

1981 жылы АҚШ алғаш рет адамның лейкоцитарлы интерферонын синтездеу үшін құрастырылған *Saccharomyces cerevisi* ол ашытқы жасушалары генетика жүзінде құралған қолданған болатын. LeIF генінің алынған тиімді экспрессиясы және бактериялардың ашытқы жасушалары алмастырылуы интерферон өндірісін 10 есеге көбейтуге мүмкіндік береді.

Зерттеудің үлкен мөлшері 166 амин қышқылынан тұратын МЛЧ кодтайтын химиялық жолмен синтездеуге арналған болатын. Осыған сәйкес, берілген ген 514 нп, тұратын болғандықтан, ең ірі ген болып шықты. Ол 1982 жылы ірі ағылшын ғалымымен синтезделді. 1984 жылы Россияда 600н.п өлшеміндегі α -интерферон гені толық синтезделген болатын.(М:Н:Колосова басшылығындағы бейорганикалық химия институты).

«Генентек» компаниясы γ - интерферонның синтезін бактериялық ашытқы және маймыл клеткаларында іске асырды: 1 л *E.Coli* культурасында γ - интерферонның 25000 бірлігі, 1 л ашытқы клеткасының культурасында – 1 млн.бірлігі және 1 л маймыл клеткасының культурасында иммундық интерферонның 100000 бірлігі синтезделді. Иммундық интерферондарды ген-инженерлік әдіс арқылы синтездеу қатерлі ісік пен лейкоз ауруына қарсы жеңілденеді деген үміт туды.

Алдыменен 1981 ж. Вашингтон университетінің генетиктері Аммерер және Холл «Генентек» зерттеушілерімен бірігіп, лейкоциттік интерферонды генетикалық құрастырылған ашытқы

клеткасында синтезделді. Бактериялық клеткамен салыстырғанда ашытқы клеткасында синтезделген интерферонның мөлшері 10 есе көп болды. Бұдан кейін β және γ - интерферондарды ашытқы клеткаларында синтездеу іске асырды.

Интерферонның түрлері және оларды алу жолдары

Интерферон 1957ж. ашылды. Интерферондардың 3 тобы белгілі: α -интерферондар (α -И), вирустардың лейкоциттерге әсері кезінде түзіледі; β -интерферондар (β -И) вирустардың фибробластқа әсері кезінде пайда болады; γ -интерферондары Т-лимфоциттердің бактериальды және вирусты антигендерге әсеріне жауап ретінде немесе жоғарғы беттегі детерминантты лимфоциттерге қарсы анти сарысулармен продуцирленеді. Анығырақ айтсақ, α -интерферон лейкоциттерде вирустарға қарсы түзіледі; β -интерферон фибробластарға вирустар әсер еткенде түзіледі және иммундық деп аталады; γ -интерферондары Т-лимфоциттерде вирустық немесе бактериялық антигендерге және қатерлі ісіктерге қарсы синтезделеді.

Лейкоциттік α -интерферон алғаш рет 1980 ж. «Биоген» компаниясының зерттеушілері Гилберт пен Вейсман және фин ғалымы Кантелл генетикалық құрастырылған ішек таяқшасы бактериясынан алды.

Лейкоциттік интерферонның генін алу үшін Сендай вирусымен жұқтырылған лейкоцит клеткаларынан иРНҚ фракциясын бөледі. Ревертаза арқылы синтезделген ктДНҚ ұшына олиго – d Г жалғайды, ал рестриктаза Pst 1 арқылы үлкен pBR 322 плазмидасының ұшына олиго dЦ жалғайды. Pst 1 бойынша өтеді. Лейкоциттік α -интерферонның геномында нитрон бөліктері жоқ және деглюкозаланбаған (сахар қалдықтары жоқ). Осыған байланысты α -интерферонның рекомбинанты генінің экспрессиясын E.Coli клеткасында іске асыру қиын емес. Ал, геннің өзін кері-транскрипция арқылы синтездеу өте күрделі, өйткені интерферон иРНҚ-сының мөлшері типті лейкоциттердің өзінде жеткіліксіз. 1982 жылы М.Н.Колосов тобы адамның α -интерферонның синтетикалық генінің синтездеп, оған бактериялық реттеуші элементтерін (промоторды, Lac – оперонның операторын, SD – тізбегін) жалғау арқылы геннің E.Coli клеткасындағы экспрессиясын бақылады.

АҚШ, Жапония, ГФР, Швейцария, Ресей, Франция мен Англияда E.Coli негізінде алынған ген-инженерлік интерферон барлық түрлерін өндірістік деңгейде шығару үшін қазір оларды соңғы клиникалық тексеруден өткізуде. Интерферон өндіру үшін – ішек таяқшасынан басқа *Methylomanus*, *Salmonella*, *Pseudomonas* т.б. грам-теріс бактериялар пайдаланылады. Фибробластық β -интерферон геномында да нитрондар жоқ. Бірақ олар γ -интерферондар сияқты глюкозаланған белок болып саналады. Сондықтан β және γ - интерферондарды E.Coli клеткасынан алу азда болса кемшілігі бар. Алайда, бұл кемшіліктерді ген инженериясының әдістерін пайдаланып, жоққа шығаруға болады. Алдыменен 1981 ж. Вашингтон университетінің генетиктері Аммерер және Холл «Генентек» зерттеушілерімен бірігіп, лейкоциттік интерферонды генетикалық құрастырылған ашытқы клеткасында синтезделді. Бактериялық клеткамен салыстырғанда ашытқы клеткасында синтезделген интерферонның мөлшері 10 есе көп болды. Бұдан кейін β және γ - интерферондарды ашытқы клеткаларында синтездеу іске асты. АҚШ-тың «Цетус» Биотехнологиялық фирмасы рекомбинантты β -интерферонды сүтқоректілер клеткалар культурасында синтездеу жұмысын іске асыра алды. Мұнда эукариоттық клеткада – глюкозалау өткендіктен интерферонның синтезделуі 300-500 есе көбейді. Адамның γ - интерферонының гені 12-хромосомада орналасқан және 3 нитрон мен 4 экзоннан құралған. Осыған қарамастан, 1982 ж. Жапон «Сантори» компаниясының зерттеушілері γ - интерферонның рекомбинантты генінің клонын E.Coli клеткасында көбейте алды. Адам интерферондарын алу үшін генді инженерлік технологияны қолдану біршама қиындықтармен қатар жүреді. Біріншіден, әртүлі ақуыздарды кодтайтын мРНҚ қоспасында кодтайтын интерферон құрамы өте аз, шамамен барлығы 0,1% .

Сурет 1- E.Coli-дағы адам интерферонының синтезіне рекомбинантты плазмиданың сызба-нұсқасы

Анықталғандай интерферондар алдымен жасушада құрамында белгі ретінде соңында М бар полипептидтік тізбектен тұратын сабақтасқан түрінде синтезделеді, нәтижесінде бүтін биологиялық белсенділікке ие, жетілген интерферон түзіледі. Жетілген ақуыз түзетін белгі беретін пептидті ыдыратуға қабілетті ферменттері бактерия құрамында болмайды. Сондықтан бактериялар жетілген интерферон синтездеу үшін, плазмаға тек оны кодтайтын бөлігіндегі генді енгізіп, геннің бір бөлігін алып тастау керек, өйткені, ол белгі беретін пептидті кодтайды. Берілген процедура келесідей түрде жүзеге асырылады. Интерферон геннің құрамында Sau 3A1 рестриктазамен ыдырайтын 3 бөлігі бар, олардың біреуі белгі беретін бөлігінің қасында орналасады. Геннің осы ферментпен толық емес ыдыратуы геннің үзіндісін бөліп алуға мүмкіндік береді. Ол бірінші, цистеинсіз жетілген интерферонды кодтайтын реттіліктегі нуклеотидтерден құралады. Цистеинді кодтайтын триплет ATG белгі беретін бөлікпен бірге ферментпен ыдырайды. Бүтін геннің полинуклеотидтер реттілігінде тотықсыздану үшін құрамында берілген триплет. Сондай-ақ оған жалғастырылған ақуыз синтезінің инициация нүктесі – ATG триплеттен тұратын үлкен емес. ДНК үзіндісі химиялық жолмен синтезделген болатын. Бұл үзіндіні жетілген геннің оқшауланған бөлігіне жалғастырылады және жетілген интерферонның бүтін гені орнатылған болатын. Құрастырылған генді плазмаға мынадай түрде енгізеді, яғни, нРНК синтезінің басталуын қамтамасыз ететін ДНК промотор бөлігінің E.coli экстрактілері мынадай плазмадан тұрады, олар қарсы вирустық белсенділікке ие болады.

Генді – инженерлік әдіспен синтезделген интерферон бөлініп алынады, тазартылып оның физико-химиялық қасиеттері, донор қанынан алынған интерферон қасиеттеріне жақын алынған және ұсақ болып шықты. 1л бактериальды суспензияға 5мг интерферонға дейін синтезделуге қабілетті бактериялар алуға мүмкін болады, оның құрамы шамамен 10^{11} бактериальды жасушалардан тұрады, бұл донордың 1 литр қанынан алынатын интерферон мөлшерінен 5 мың есе артық болады. әртүрлі зертханаларда генді – инженерлік технологияны қолданған кезде әртүрлі интерферондарды продуцирлейтін бактериалар штамдары алынды: олар α - β - және γ - типтес болып келеді. В- және ф-интерферондарын алу үшін E. coli қолданудың кемшіліктеріне – бактерияда эукариоттар ақуыздарының гликозилирленген аппараттарының болмауы, гликозилирленбеген молекулалар синтезіне жол бермейді. Бірақ гликозилирлеудің маңызды белгісіз болса да, гликозилирленбеген β -және γ - интерферондары практика жүзінде толық қарсы вирустық белсенділігін сақтайды және бұл ерекшелік генді-инженерлік препараттарды медицина практикасында қолдануда ұқыптылық пен мұқияттылықты талап етеді.

Интерфероның барлық түрінен әлемдік өндірісте жарамдылығы жоғарылауы. И.фиброаумақтағы,(плод) түсіктің ұлпасынан алынған, культура жасушасын демеуге болады. Жалпы жоғарыда айтылған әдістер интерферонды шығымы төмен бағасы жоғары препаратын тазалығы жеткіліксіз деп сипаттаған. Қазіргі жаңа заманымыздағы сатыда перспективтігі жоғарылау әдіс микроорганизмді генетикалық конструирлеу көмегімен интерферон биосинтезі.

Интерферонның қолданылуы

Интерферон ауыр науқасқа қолданылады өткір вирусты гепатитке, склерозға, остеосаркомдарға және кейбір лимфа түріне. Оларды мелан емдеу үшін, бірқатар өңеш ісігіне, өкпе және миға қабылдайды, интерферонның ерекшелігімен емдеу үшін мұндай препараттар қажет, олар адамның жасушасынан алынады. Шамамен 20 γ -интерферон α -интерферондарының гетерогенді класына қарағанда не бары бір жеке ақуызбен көрсетілген, ол бір генмен кодирленеді. β -И-на қатысты жағдай анық бола бастады. Адамның β -интерферондарына қатысты тек бір ақуыз бөлінеді, сондай-ақ, β_1 – интерфероны оған фибробластардың индукциясынан кейін байқалатын, практика жүзінде барлық қарсы вирустың белсенділік сәйкес келеді. Әртүрлі β -интерферондары кодтайтын гендер қатары геномада бар болатыны ескеріледі. Интерферондардың түрлері анық байқалатынын ескеріп, емдеу

үшін арналған қажетті. Мұндай препараттар адам жасушаларынан алынған болатын дәстүрлі түрде оларды адамның қанынан алады. (1л қаннан небары 1мкг интерферон бөліп алуға болады, яғни, шамамен инъекция үшін, 1 рет салады.) Интерферондарды генді-инженерлік технология көмегімен алу саласында жеткен жетістіктерге қарамастан және олардың әртүрлі вирусты ауруларды емдеу үшін қолданылуы, соның ішінде онкологиялық ауруларды емдеу үшін, әлі көптеген сұрақтарды шешуге тура келеді. Қазіргі заман сатыларында интерферондардың барлық гендері идентифицирленген болмайды: α_4 генінің жаңа түрлері пайда болды; фибробластты интерферон гендері туралы мәліметтер өте аз (β_1 генінен басқа) басқа): олардың басқа заттармен әрекеттесеуі және биосинтез механизмі соңына дейін анықталмады. Интерферондарға байланысты көптеген құбылыстардың ашылуы, бірқатар ауыр ауруларды емдеу үшін жаңа құралдар жасауға себеп болады.

Интерферонның биологиялық әрекеті

Интерферон әрекетінің механизмін келесідей негізгі кезеңдермен байланыстыруға болады.

Интерферондар жасушалы рецепторлармен байланысып екі ферменттің синтезін иницирлейді: олар 2,5,- олигоаденилатсинтетаза мен протеинкиназа түзілуі сәйкес келетін гендердің транскрипциясы инициациясының есебінен жүзеге асады. Олардың вириондарынан тұратын немесе көптеген вирустардың репликация өнімі болып табылатын, екі тізбекті ДНК қатысында екі фермент өзінің белсенділігін көрсетеді. 2,5,- олигоаденилатсинтетаза ферменті 2,5,- олигоаденилаттар (АТР-ден) синтезін катализдейді, олар жасушалы рибонуклеаза 1-ң белсенділігін арттырады: протеинкиназа IF2 трансляция инициациясының факторын фосфорлирлейді (осылайша белсенділігін арттырады). Осы жағдайлар нәтижесіне ақуыз биосинтезі ингибирленеді және жұққан жасушада вирустардың көбеюін лизис болдырады.(иРНК мен рРНК деградациясы) интерферондар әрекетінің басқа механизмдері де белгілі, мысалы, тРНК инактивациясы, метилірлеу процесінің бұзылуы және басқалар.