



Рекомбинантный лактоферрин человека – биологическая активность

А.И. Будевич

Научно-практический центр Национальной
академии наук Беларуси по животноводству

Лактоферрин – уникальный многофункциональный белок, содержащийся в секреторных жидкостях человека и животных (молоко, слюна, слеза, секреты носовых желез и др.)

Лактоферрин

- обеспечивает связывание и транспорт ионов железа;
- обладает иммуномодулирующими свойствами, противовирусным, антибактериальным и антигрибковым эффектом;
- оказывает противовоспалительное действие;
- обладает антиоксидантными свойствами;
- повышает адаптивные возможности организма.

Область применения – фармацевтика, косметология, пищевая промышленность, медицина, спорт.

Преимущества и недостатки использования лактоферрина крупного рогатого скота в качестве компонента лекарственных препаратов и пищевых добавок

ПЛЮСЫ	МИНУСЫ
Доступный источник сырья	Потенциальный аллерген
	Низкая аффинность к рецепторам
	Низкое содержание лактоферрина в молоке

**БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ДОБАВКИ, СОДЕРЖАЩИЕ
ЛАКТОФЕРРИН КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

НАЗВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ ДОБАВКИ	ПРОИЗВОДИТЕЛЬ	СТРАНА
Life extension Lactoferrin	Life extension	США
Lactoferrin 250 мг	Radiance	Новая Зеландия
Lactoferrin	Immunol	Австралия
Lactoferrin-GX	NRL pharma	Япония
Super-smart Lactoferrin	Super-smart	Люксембург
Ternimax	Hankintatukku Oy	Финляндия
Lactoferrin Gold 1.8	"Vita-tech International, Inc."	США
Symbiotics Lactoferrin- Colostrum Plus Capsules	Symbiotics	США

Японская компания MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD с 1986 года производит детское питание, обогащенное коровьим лактоферрином.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ЛАКТОФЕРРИН ИЗ ЖЕНСКОГО МОЛОКА

Лекарственный препарат	Действующее начало	Эффект	Разработчик
<p style="text-align: center;">«Лапрот»</p> <p>(растворы для внутривенного, внутримышечного, интраназального, перорального введения и обработки раневых поверхностей; глазные капли; мазь; суппозитории для ректального и интравагинального применения; болюсы и таблетки)</p>	<p style="text-align: center;">Лактоферрин из женского молока</p>	<p style="text-align: center;">Детоксицирующий Антибактериальный Противовоспалительный Иммуномодулирующий</p>	<p style="text-align: center;">Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена</p>

По результатам клинических испытаний «Лапрот» рекомендован :

- для профилактики возникновения злокачественных опухолей;
- для профилактики и/или лечения токсикозов различной этиологии; инфекций и воспалений в половых органах, органах желудочно-кишечного тракта, а также кожи и слизистых;
- для очищения ран, гнойных полостей и ускорения грануляции;
- для профилактики и/или лечения ринитов и конъюнктивитов различной этиологии.

**В РАМКАХ
НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИХ ПРОГРАММ СОЮЗНОГО
ГОСУДАРСТВА
«БЕЛРОСТРАНСГЕН» и «БЕЛРОСТРАНСГЕН-2»
ПЛУЧЕНЫ ТРАНСГЕННЫЕ КОЗЫ, В МОЛОКЕ
КОТОРЫХ СОДЕРЖИТСЯ
РЕКОМБИНАНТНЫЙ ЛАКТОФЕРРИН ЧЕЛОВЕКА**



Институт биологии гена РАН,
РФ



Научно-практический центр
НАН Беларуси по животноводству,
РБ



Конструкции по гену лактоферрина человека

hLf2



hLf3



hLf5



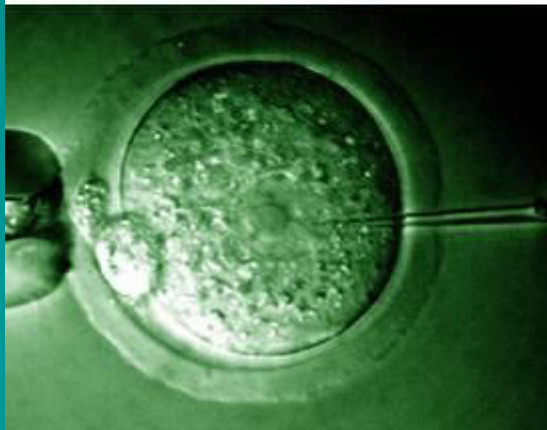
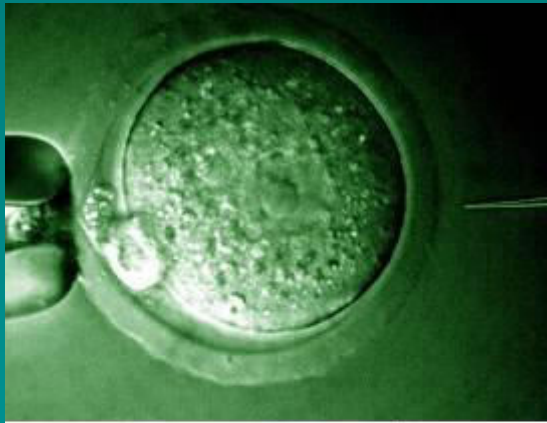
hLf7



hLf8



Микроинъекция рекомбинантной ДНК в зиготы мыши



Процесс доения трансгенной мыши



Таблица 1. Содержание лактоферрина человека в молоке трансгенных мышей

Генная конструкция	Количество лактоферрина в молоке, г/л
hLf2	4,00
hLf3	0,87-14,00
hLf5	1,50-40,00
hLf7	3,70-8,09
hLf8	0,22-3,30

Биотехнологический центр с опытным производством, РБ



Доильный зал



Цитологическая лаборатория



Экспериментальное стадо



Хирургическая операция по извлечению эмбриоматериала у коз



Реакция суперовуляции (яичник козы)



Пронуклеусы зиготы козы



Микроинъекция рекомбинантной ДНК в пронуклеус зиготы козы



Микроинъекция рекомбинантной ДНК в пронуклеус зиготы козы

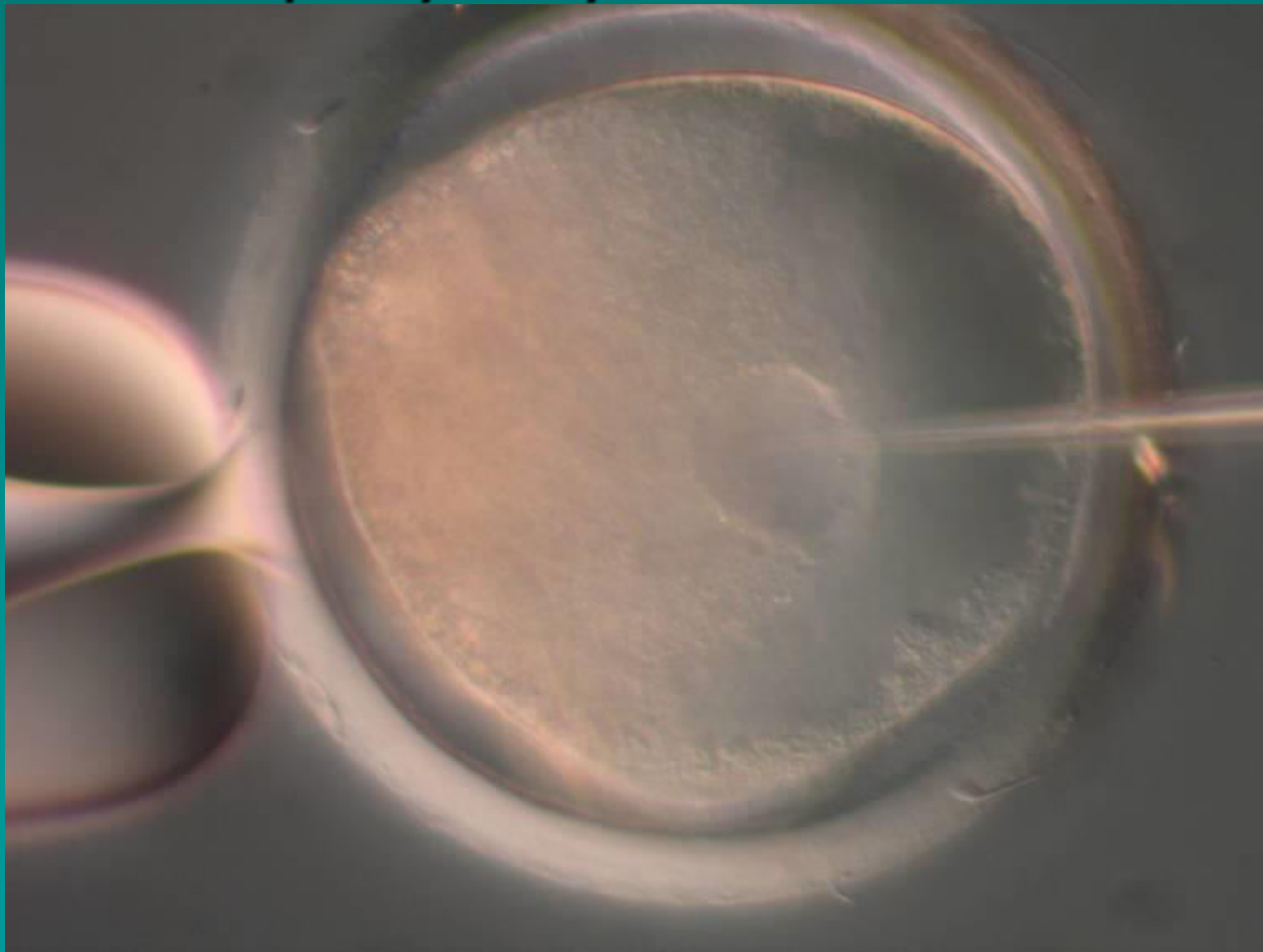


Таблица 2. Влияние генной конструкции с лактоферрином на показатель дробления

МИКРОИНЪЕЦИРОВАННЫХ КОЗЬИХ ЗИГОТ

Генная конструкция	Количество микроинъецированных зигот	Количество прородившихся клеток, n-%			Общее кол-во жизнеспособных клеток после культивирования, n-%
		до 2-х бластомеров	до 4-х бластомеров	до 8-бластомеров	
hLf-5	15	15-100,0	10-66,7	2-13,3	13-86,7
hLf -3	13	12-92,3	11-84,6	-	11-84,6
Буфер	12	10-83,3	9-75,0	1-8,3	10-83,3
Клетки без прокола	16	15-93,6	12-75,0	1-6,3	14-87,5

Таблица 3. Влияние спонтанного и индуцированного эструса на приживляемость микроинъецированных

ЗИГОТ КОЗ

Показатели	Спонтанный эструс	Индуцированный эструс	Всего
Количество пересадок, гол.-%	44-38,9	69-61,1	113-100
Количество пересаженных клеток, шт.	99	182	281
Приживляемость, гол.-%	14-31,8	18-26,1	32-28,3
Количество абортс, гол.-%	2-14,3	4 ¹ -22,2	6-18,8
*Получено приплода, гол.-%,	15-34,1	22-31,9	37-32,7
**из них:			
- живых, гол.-%	14-93,3	19-86,4	33-89,2
в т.ч. трансгенных	-	2-10,5	2-6,1
- мертворожденных, гол.-%	1-6,7	3-13,6	4-10,8
в т.ч. трансгенных	-	1-5,3	1-2,7

Таблица 4. Получение первичных по гену лактоферрина коз (производители ЛАК-1 и ЛАК-2)

Показатели	Количество
Количество трансплантированных зигот, n	281
Количество реципиентов, n	113
Количество родившихся козлят, n	33
из них трансгенных, n	2

Первичные по гену лактоферрина человека производители Лак-1 (слева) и Лак-2



Таблица 5. Трансмиссия трансгена приплоду F1 от производителей Лака-1 и Лака-2

Транс-генные производители	Осеменено коз, n-%	*Оплодотворилось коз, n-%	Получено живых козлят, n-%	**Получено трансгенных козлят всего, n-%	***Из них:	
					Самки, n-%	Самцы, n-%
ЛАК-1	44-40,4	36-81,8	72-52,2	22-30,6	10-45,5	12-54,5
ЛАК-2	65-59,6	42-64,6	66-47,8	15-22,7	3-20,0	12-80,0
Итого	109-100,0	78-71,6	138-100,0	37-26,8	13-35,1	24-64,9

* - от числа осемененных животных

** - от числа полученных живых козлят

*** - от числа полученных трансгенных козлят

Таблица 6. Продолжительность беременности, наличие трудных козлений, многоплодие у самок, осемененных спермой трансгенных производителей

Группы животных	Окоз-лилось маток, n	Кол-во дней беременности, n	*Кол-во трудных козлений, n-%	*Многоплодие маток		
				Одинцы, n-%	Двойни, n-%	Тройни, n-%
Опыт	76	148,51	4-5,3	21-27,6	43-56,6	12-15,8
Конт-роль	58	149,34	2-3,4	15-25,9	31-53,4	12-20,6

* - ОТ ЧИСЛА ОКОЗЛИВШИХСЯ МАТОК

Таблица 7. Содержание лактоферрина человека в молоке трансгенных коз-продуцентов

Генная конструкция	Трансгенные производители	Количество коз-продуцентов, гол.	Продукция лактоферрина человека с молоком, г/л	
			min-max	в среднем
hLf5	ЛАК-1	9	2,08-8,10	5,8
hLf3	ЛАК-2	3	0,25-3,40	1,9
Всего		12	0,25-8,10	4,9

Таблица 8. Трансмиссия трансгена приплоду от производителей F₁

Трансгенные производители	Осеменено коз, n-%	*Оплодотворилось коз, n-%	Получено живых козлят, n-%	**Получено трансгенных козлят всего, n-%	***Из них:	
					Самки, n-%	Самцы, n-%
F ₁ (hLf5)	124-87,3	96-77,4	174-90,6	90-51,7	48-53,3	42-46,7
F ₁ (hLf3)	18-12,6	12-66,7	18-9,4	9-50,0	2-22,2	7-77,8
Итого	142-100,0	108-76,1	192-100,0	99-51,6	50-50,5	49-49,5

* - от числа осемененных животных

** - от числа полученных живых козлят

*** - от числа полученных трансгенных козлят

Таблица 9. Трансмиссия трансгена приплоду от первичных самцов и производителей F₁

Трансгенные производители	Осеменено коз, n-%	*Оплодотворилось коз, n-%	Получено живых козлят, n-%	**Получено трансгенных козлят всего, n-%	***Из них:	
					Самки, n-%	Самцы, n-%
Первичные самцы	109-100,0	78-71,6	138-100,0	37-26,8	14-37,8	23-62,2
F ₁	142-100,0	108-76,1	192-100,0	99-51,6	50-50,5	49-49,5

* - от числа осемененных животных

** - от числа полученных живых козлят

*** - от числа полученных трансгенных козлят

Таблица 10. Содержание лактоферрина человека в молоке дочерей первичных трансгенных коз-продуцентов и дочерей, полученных от производителей F₁

Трансгенные производители	Количество дочерей-продуцентов, гол.	Продукция лактоферрина человека с молоком, г/л	
		min-max	В среднем
Первичные самцы	12	0,25-8,10	4,9
Производители F ₁	10	1,89-10,05	6,2

Белорусским государственным университетом:

- разработана технология выделения рекомбинантного лактоферрина человека из козьего молока;
- получен активный, высокоочищенный, качественный препарат рекомбинантного лактоферрина человека;
- с помощью пептидного картирования, дегликозилирования, иммунохимического анализа, дифференциальной сканирующей калориметрии, спектрофотометрии, ЭПР-спектроскопии, масс-спектрометрии, хроматографического и электрофоретического анализа установлена идентичность основных физико-химических характеристик рекомбинантного человеческого лактоферрина и природного лактоферрина из женского молока.

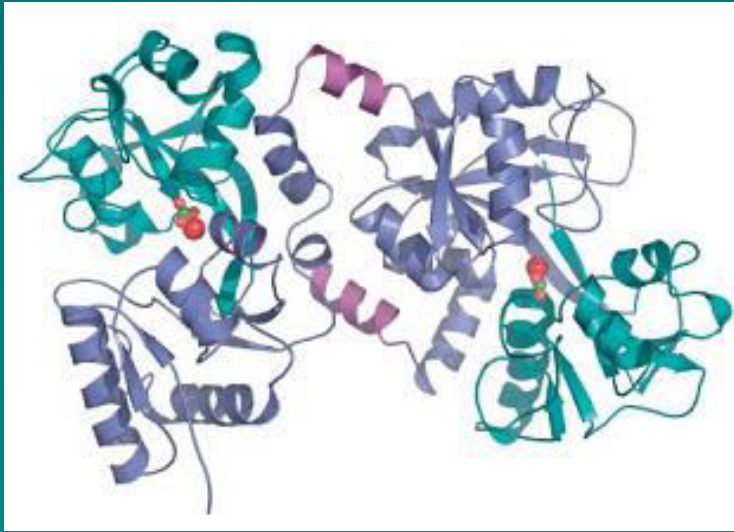
Белорусским государственным университетом:

- разработаны технологии получения железонасыщенных (апо-) и железонасыщенных (холо-) форм лактоферринов;
- разработан ряд методик количественного и качественного контроля белка («Методика определения человеческого рекомбинантного лактоферрина в молоке методом иммуноферментного анализа», «Методика определения массовой доли влаги в препарате рекомбинантного человеческого лактоферрина», «Методика определения электрофоретической чистоты и молекулярной массы рекомбинантного человеческого лактоферрина из молока трансгенных коз», «Методика определения содержания белка в препарате рекомбинантного человеческого лактоферрина»).

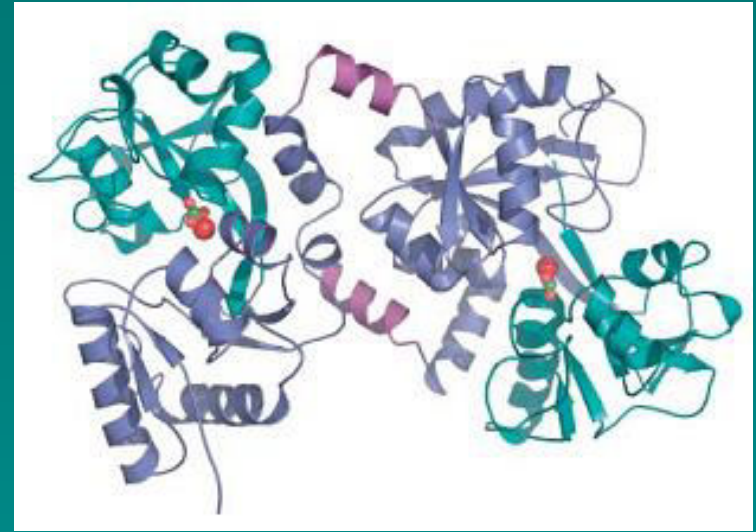
Белорусским государственным университетом:

- организовано оснащенное оборудованием опытное лабораторное производство лекарственных и пищевых средств с данным белком и выпущены их опытные партии;
- разработаны и утверждены технические условия «Молоко козье с лактоферрином человеческим рекомбинантным» - источник белка (ТУ ВУ 100235722.212-2012), технические условия «Лактоферрин человеческий рекомбинантный» (ТУ ВУ 100235722.213-2013), технические условия на биологически активные пищевые добавки «Капеллакт-иммуно» (ТУ ВУ 100235722.216-2013) и «Фортеллакт-иммуно» (ТУ ВУ 100235722.218-2013);
- разработаны проекты фармакопейных статей производителей на лекарственные средства противоанемического, противодиарейного, иммуномодулирующего, противовоспалительного и адаптогенного действия и составлен проект плана их доклинических испытаний.

Белорусским государственным университетом установлено:



=



Рекомбинантный лактоферрин человека

Лактоферрин из женского молока

Семак И.В., заведующий кафедрой
биохимии биологического факультета
БГУ



Преимущества РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА из молока коз-производителей:

- идентичен лактоферрину из женского молока;
- не оказывает аллергенного действия;
- обладает высокой аффинностью к рецепторам человека;
- содержится в молоке в концентрации 1,5-6 грамм на литр, что делает экономически выгодным его выделение и производство на его основе лекарственных препаратов и пищевых добавок.

СОГЛАСОВАНО

Первый заместитель генерального
директора РУП «НПЦ НАН Беларуси
по животноводству»



И.П.Шейко
2012 г.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель проректора по научной
работе ВГУ



Т.А.Дик
2012 г.

**МОЛОКО КОЗЬЕ С ЛАКТОФЕРРИНОМ ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ
РЕКОМБИНАНТНЫМ**

ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ
ТУ ВУ 100235722.212-2012

Срок действия с « 13 » 03 2012 г.
по « 13 » 03 2016 г.

СОГЛАСОВАНО

Письмо ГУ «Республиканский
центр гигиены, эпидемиологии
и общественного здоровья»

№ 16-12-03/8134
« 16 » 03 2012 г.

РАЗРАБОТАНО

Заведующий кафедрой биохимии
Белорусского государственного
университета, кандидат биологических наук

И.В. Семак
« 23 » 01 2012 г.

Заведующий лабораторией воспроизводства
и генной инженерии с.-х. животных РУП
«НПЦ НАН Беларуси по животноводству»,
кандидат сельскохозяйственных наук

А.И. Будевич
« 22 » 01 2012 г.

Нормоконтролер
Белорусского государственного
университета

Т.Н. Долгая
« 30 » 01 2012 г.



Биологические эффекты рекомбинантного лактоферрина человека, полученные Институтом физиологии НАН Беларуси

Противовоспалительное действие лактоферрина.

Целью данного эксперимента было установление возможного противовоспалительного эффекта рчЛФ в ответ на введение бактериального агента (*Lipopolysaccharide, Esherihia coli, Sigma, USA; lot No 6226-10MG*) в количестве 10 мкл/мл/кг.

Исследования были проведены на крысах, которым интрагастрально на протяжении месяца вводили рчЛФ в концентрации 1 мкг/мл, 10 мкг/мл и 100 мкг/мл, контрольная группа получала физиологический раствор.

Установлено, что температура тела животных контрольной группы, которым внутрибрюшинно вводился липополисахарид, поднялась в среднем на $0,64 \pm 0,37^{\circ}\text{C}$ у 100% крыс, а в опытных группах указанный показатель снизился в среднем на $0,36^{\circ}\text{C}$ у 62,3% животных и повысился только на $0,3^{\circ}\text{C}$ у 37,7% крыс.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в присутствии рчЛФ в живом организме проявляются пролонгированные протекторные эффекты в отношении токсического действия эндотоксина кишечной палочки.

Влияние рчЛФ на процессы пролиферации и дифференциации клеток некоторых опухолей *in vitro*.

Целью исследований явилось определение способности рчЛФ выступать в качестве онкопротектора.

Таблица 11. Влияние химиопрепаратов и рчЛФ на гибель клеток атипичной тератоидной/рабдоидной опухоли человека (ATRO, G IV) (опухоль, поражающая спинной и головной мозг у детей)

Название препарата	Концентрация, мкг/мл	Гибель клеток, %
Контроль	-	38,1±3,0
Карбоплатин	4,0	81,3±2,9**
Метотриксат	50,0	69,8±2,5**
Темозоломид	2,0	72,1±4,7**
Цисплатин	1,0	53,4±4,8**
Этопозид	1,0	66,2±8,2**
Лактоферрин	100,0	70,4±3,2**
Лактоферрин	10,0	50,6±4,3*
Лактоферрин	1,0	62,5±4,3*

*- $P \leq 0,05$; **- $P \leq 0,001$

Таблица 12. Влияние химиопрепаратов и рчЛФ на гибель клеток злокачественной кругломелкоклеточной нейробластомы человека (G IV)

Название препарата	Концентрация, мкг/мл	Гибель клеток, %
Контроль	-	36,6±4,2
Винкристин	0,2	62,4±8,8*
Карбоплатин	4,0	42,5±3,3*
Метотриксат	50,0	65,5±11,5*
Тепотекан	0,04	39,7±9,4
Циклофосфан	10,0	43,2±4,6
Цисплатин	1,0	49,8±11,7
Цитарабин	1,0	61,2±2,6*
Этопозид	1,0	54,5±6,1*
Лактоферрин	100,0	57,6±6,6*
Лактоферрин	10,0	63,0±5,2*
Лактоферрин	1,0	43,5±8,9

*- $P \leq 0,05$; **- $P \leq 0,001$

Таблица 13. Комбинированное влияние химиопрепаратов и рчЛФ на гибель клеток ганглиоглиомы человека

Название препарата	Концентрация, мкг/мл	Гибель клеток, %
Контроль	-	23,4±3,6
Темозоломид	2,0	46,6±4,5*
Цисплатин	1,0	51,2±6,5*
Лактоферрин	10,0	59,1±2,9*
Лактоферрин+ Цисплатин	10,0+1,0	51,2±5,7*
Лактоферрин+ Темозоломид	10,0+2,0	40,0±1,4*
Лактоферрин	100,0	84,0±6,3*
Лактоферрин+ Цисплатин	100,0+1,0	71,6±6,9*
Лактоферрин+ Темозоломид	100,0+2,0	70,8±3,8*

*- $P \leq 0,05$; **- $P \leq 0,001$

Анальгетические эффекты лактоферрина человека.

В соответствии с протоколом исследований у крыс изучали порог ноцицептивной реакции до , затем через 30-40 мин после интраназального введения рчЛФ в дозах 1; 10 и 100 мкг/мл, а также через одну и через две недели после введения. Оценка величины латентного периода ноцицептивного рефлекса (ЛПНР) проводилась и использованием анальгезиметра («Hot Plate», Stoelting, США) Однократное воздействие на слизистую оболочку носа животных уже через 30-40 минут вызывает гипералгезический эффект.

Влияние лактоферрина на когнитивные функции у крыс.

В соответствии с протоколом опытов поведенческие реакции крыс изучали через 30 минут после интраназального введения 10 мкл рчЛФ в различных концентрациях в течение 5 минут в приподнятом крестообразном лабиринте. Использование рчЛФ в дозе 1 мкг/мл выявило увеличение времени активного состояния экспериментальных животных по всему крестообразному лабиринту в **1,6 раза**, общее время неподвижного состояния при этом снизилось в **1,9 раза**, в **1,9** раза увеличилось время нахождения крыс в активном состоянии в дистальных частях закрытых площадок лабиринта, а также в **1,7 раза ($P \leq 0,05$)** возросла максимальная скорость перемещения животных в центральном секторе приподнятого крестообразного лабиринта по сравнению с контролем.

Институтом генетики и цитологии Национальной академии наука Беларуси: изучено воздействие различных концентраций лактоферрина из молока трансгенных коз на пролиферацию и апоптоз клеток линии рака легкого A549 и иммортализированной клеточной линии эмбриональных фибробластов человека.

В экспериментах по изучению действия лактоферрина на клеточную линию рака легкого A549 при одно- и двукратном введении препарата не было обнаружено заметного снижения темпов пролиферации.

При изучении действия лактоферрина на иммортализированной линии эмбриональных фибробластов человека при трехкратном введении в культуру лактоферрин уменьшал количество клеток на поздних сроках культивирования в концентрациях 100 и 1000 мкг/мл, причем ингибирующий эффект возрастал с концентрацией препарата вплоть до полной гибели клеток.

Институт ом экспериментальной ветеринарии им. С.Н.

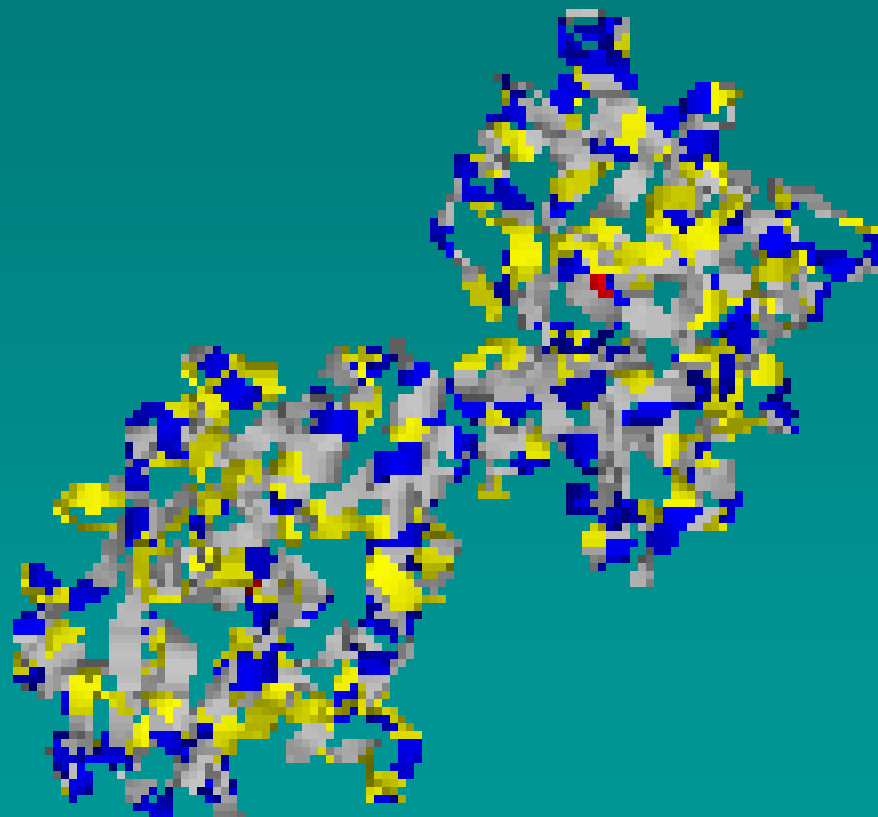
Вышелесского: установлено отсутствие стимулирующего действия рчЛФ на выработку противовирусных антител к вирусам диареи, инфекционного ринотрахеита, трансмиссионного гастроэнтерита и ротавируса свиней в организме иммунизированных морских свинок, однако установлено повышение продукции антибактериальных антител к штамму бактерий *Escherihia coli* A20 у морских свинок под действием рчЛФ

КОНЦЕПЦИЯ

Научно-технологической программы Союзного государства
**«Создание научной и технологической основы
фарминдустрии производства высокоэффективных и
биологически безопасных продуктов функционального
питания, гигиенических и лекарственных средств нового
поколения на основе лактоферрина и других белков
человека»**

на 2016-2020 годы
(НТП «БелРосФарм»)
(НТП «БелРосЛакт»)

Модель лактоферрина



Спасибо за внимание!