

MICROORGANISMS AS PRODUCERS OF INTERFERONES OF TYPE I AND II: CURRENT STATUS OF RESEARCH**O. Bodnar, O. Skrotska***National University of Food Technologies***Key words:***Interferon**Producer**Bacteria**Yeast**Recombinant strain***Article history:**

Received 03.09.2019

Received in revised form

19.09.2019

Accepted 11.10.2019

Corresponding author:

O. Skrotska

E-mail:

skrotska@ukr.net

ABSTRACT

Interferons (IFNs) are produced by different cells of the body and have antiviral, antitumor, antibacterial and immunomodulatory action. Different types of interferons are characterized by certain differences in structure, molecular weight, and functional activity.

Today different ways of obtaining IFN have been developed. Furthermore, the most common production of IFN is by using microorganisms. Therefore, the purpose of this review is to analyze the current scientific literature on the production of various types of interferons using bacteria, yeast, fungi and unicellular algae. This review contains scientific data on the production of type I and II interferons (α -IFN, β -IFN, ϵ -IFN, γ -IFN) by recombinant *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, *Trichoderma reesei*, *Chlamydomonas reinhardtii*. Bacterial producers based on *E. coli* that are able to accumulate IFN in the form of insoluble inclusion bodies and to produce soluble IFN in the periplasmic space have been considered. Different authors approaches to optimization of cultivation process, as well as methods of isolation and purification of IFN have been shown. The data on the synthesis of consensus IFN by bacteria has been given. The paper also discusses eukaryotic expression systems of recombinant IFN based on *P. pastoris*. The data on the possibility of modification of IFN — fusion with albumin and *N*-glycosylation have been shown. Different approaches to increase IFN concentration in the culture fluid have been presented: use of low temperature induction by methanol, coexpression of molecular chaperones, codon optimization, application of metabolic engineering methods. The possibility of using other yeast for obtaining IFN — *K. lactis* and *Y. lipolytica* has been shown. It was also provided a material on the design of recombinant IFN producers based on *T. reesei* fungi and *C. reinhardtii* unicellular microalga.

The use of both pro- and eukaryotic producers has advantages and disadvantages. Moreover, the quality of recombinant interferon, its functional activity, quantity, concentration and yield are the most important factors to consider in selecting an expression platform to obtain it.

МІКРООРГАНІЗМИ ЯК ПРОДУЦЕНТИ ІНТЕРФЕРОНІВ І ТА ІІ ТИПУ: СУЧАСНИЙ СТАН ДОСЛІДЖЕНЬ

О. В. Боднар, О. І. Скроцька

Національний університет харчових технологій

Інтерферони (ІФН) продукуються різними клітинами організму і володіють противірусною, протипухлинною, антибактеріальною та імунomodуючою дією. Різні типи інтерферонів характеризуються певними відмінностями в структурі, молекулярній масі та за функціональною активністю.

На сьогодні розроблені різні способи отримання ІФН. При цьому найпоширенішим є виробництво ІФН з використанням мікроорганізмів, тому метою цього огляду є аналіз сучасної наукової літератури, у якій описано способи отримання різних типів інтерферонів з використанням бактерій, дріжджів, грибів та одноклітинних водоростей.

*У статті розглянуто продукцію інтерферонів I та II типу (α -ІФН, β -ІФН, ϵ -ІФН, γ -ІФН) рекомбінантними клітинами *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, *Trichoderma reesei*, *Chlamydomonas reinhardtii*, бактеріальні продуценти на основі *E. coli*, які здатні накопичувати ІФН у вигляді нерозчинних тілець включень, а також продукувати розчинний ІФН у периплазматичний простір. Проаналізовано різні підходи авторів до оптимізації процесу культивування, а також способів виділення й очищення ІФН. Викладено інформацію про синтез консенсусного ІФН бактеріями.*

*Описано еукаріотичні системи експресії рекомбінантного ІФН на основі *P. pastoris*. Наведено дані щодо можливості модифікації ІФН — поєднання з альбуміном та N-глікозилювання, різні підходи до збільшення концентрації ІФН у культуральній рідині: використання низькотемпературної індукції метанолом, коекспресія молекулярних шаперонів, оптимізація кодонів, застосування методів метаболічної інженерії. Показано можливість використання інших дріжджів для отримання ІФН — *K. lactis* та *Y. lipolytica*. Також наведено матеріал про конструювання рекомбінантних продуцентів ІФН на основі грибів *T. reesei* та одноклітинних водоростей *C. reinhardtii*.*

Використання як про-, так і еукаріотичних продуцентів має свої переваги та недоліки. При цьому якість рекомбінантного інтерферону, його функціональна активність, кількість, концентрація та вихід є найбільш важливими факторами, які слід враховувати при виборі експресійної платформи для його отримання.

Ключові слова: інтерферон, продуцент, бактерії, дріжджі, рекомбінантний штам.

Постановка проблеми. З початку відкриття інтерферонів (ІФН) дослідження їх біологічних властивостей були пов'язані з встановленням противірусної активності. Зокрема, показана ефективність їх застосування щодо широ-

кого кола вірусів (вірусу грипу, вірусу імунодефіциту людини, вірусу гепатиту С та В, вірусу простого герпесу тощо). Пізніше було встановлено, що ІФН здатні стимулювати клітинну ланку імунітету — активувати макрофаги, цитотоксичні Т-лімфоцити, природні кілери, простагландинову та кортикостероїдну системи. Показано, що ІФН проявляють протипухлинну дію, а також ефективні при бактеріальних інфекціях, спричинених мікроорганізмами родів *Listeria*, *Legionella*, *Streptococcus* та ін. [1].

Нині існує кілька способів отримання цитокінів, найпоширенішим серед яких є виробництво ІФН з використанням генетично модифікованих продуцентів. У технологіях рекомбінантного ІФН в основному використовують мікроорганізми, тому метою цього огляду є аналіз сучасної наукової літератури щодо отримання різних типів інтерферонів з використанням бактерій, дріжджів, грибів та одноклітинних водоростей.

Викладення основних результатів дослідження. Бактерії *Escherichia coli*. Серед бактеріальних експресійних систем для отримання рекомбінантних ІФН найбільш вивченими є клітини *E. coli*. Геном цих бактерій повністю розшифрований і досліджений, маніпуляції з генетичним матеріалом *E. coli* є досить простими, а кількість синтезованого рекомбінантного продукту досягає до 50% загального клітинного білка [2].

Інтерферон альфа (ІФН-α). Відноситься до ІФН I типу. На сьогодні ідентифіковано більше 20 підтипів ІФН-α. У виробництві отримують рекомбінантні ІФН-α2a та ІФН-α2b, які відрізняються за однією амінокислотою. Дані цитокіни складаються з 165 амінокислот з молекулярною масою близько 19 кДа. Їх застосовують для лікування хронічних вірусних гепатитів В і С, лейкомії, меланоми, саркоми Капоші, міеломи, лімфоми тощо [3].

При високій експресії рекомбінантного ІФН в клітинах *E. Coli*, зазвичай, формуються тілця включення. Їх утворення робить рекомбінантний білок нерозчинним, що спрощує його виділення у денатурованій формі. При цьому необхідно обробити тілця включення хімічними реагентами для розчинення і ренатурації ІФН в нативній формі. Виділення й очистка ІФН з нерозчинних тілець включень передбачають використання трьох і більше етапів хроматографії. Тому ведуться роботи з удосконаленню способів очищення рекомбінантних ІФН. Так, Романов зі співавт. пропонують спосіб очищення ІФН-α2b, що синтезується у вигляді тілець включень за культивування рекомбінантного штаму *E. coli* BDEES4, використовуючи дві стадії іонообмінної хроматографії. При цьому вихід очищеного ІФН становив 2—3 мг з одного грама біомаси. Специфічна активність отриманого ІФН-α2b щодо вірусу везикулярного стоматиту на клітинах L68 становила $1,5\text{—}2,5 \cdot 10^8$ МО/мг [4].

З тілець включень можна виділити більше 90% рекомбінантного білка, але кінцевий вихід очищеного активного ІФН сильно знижується в результаті процесів солюбілізації і ренатурації, тому нині реалізуються проекти з підвищення розчинності рекомбінантного ІФН в процесі біосинтезу. Однією з ефективних стратегій є використання конструкцій злитих білків [5].

Так, Vu зі співавт. дослідили вплив на розчинність ІФН- α 2b семи білкових міток — гексагістидину (His6), тіоредоксину (Trx), глутатіон-S-трансферази (GST), мальтозо-зв'язуючого білка (MBP), білкового фактора (NusA), дисульфідизомерази (PDI) та b'a' домену PDI. На основі *E. coli* BL21 (DE3) були сконструйовані різні рекомбінантні продуценти ІФН- α 2b з генами відповідних білкових міток. Для індукції експресії ІФН автори застосували ізопропіл- β -D-1-тіоґалактопіранозид (IPTG) за різних температурних режимів: 37°C та 18°C. Для всіх досліджуваних міток (крім GST) температура 18°C виявилась найефективнішою для індукції: рівень експресії ІФН зростав на 11—34%, а кількість розчинного ІФН — на 9—80% залежно від білкової конструкції. Серед досліджуваних міток високу ефективність показали MBP, PDI, NusA та Trx, але, враховуючи те, що MBP сприяє правильному згортанню ІФН в його біологічно активну конформацію, запобігає утворенню білкових конгломератів, захищає ІФН від деградації, а також специфічно зв'язується з колонками для хроматографічного розділення, автори пропонують використовувати саме мальтозо-зв'язуючий білок як ефективну мітку для поєднання з ІФН- α 2b. Після всіх стадій виділення та очищення з літра КР автори отримали 14,4 мг ІФН- α 2b [6].

Значна увага приділяється методам аналізу розчинного ІФН, що синтезується у периплазматичний простір клітини. Так, Dias зі співавт. запропонували високоефективну рідинну хроматографію з оберненою фазою (RP-HPLC) для якісного та кількісного аналізу ІФН- α в бактеріальних периплазматичних екстрактах без будь-якої попередньої стадії очищення. Для виділення білків автори використали метод осмотичному шоку без руйнування клітин *E. coli* W3110 — продуцента ІФН. Чутливість запропонованого методу становила 7,2 нг ІФН. Також розроблений метод можна застосовувати для ідентифікації ІФН у фармацевтичних субстанціях, оскільки він дає змогу виявити ІФН з різними структурними відмінностями: глікозилізовані та окислені ізоформи, а також N-метіонільзовані молекули [7].

Нині велику увагу дослідників привертає консенсусний інтерферон (кІФН) — штучно сконструйований інтерферон з усередненою амінокислотною послідовністю природних людських підтипів альфа-інтерферонів. Він характеризується більшою противірусною та антипроліферативною активністю, якщо порівняти з іншими інтерферонами, включаючи пегільовані варіанти.

El-Vaky зі співавт. розробили спосіб отримання розчинного кІФН- α з використанням *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) із застосуванням автоіндукції для синтезу ІФН. Суть автоіндукції полягає у використанні явища діауксії. Для культивування бактерій автори використовували поживне середовище, в якому джерелом вуглецю була глюкоза і лактоза. Спочатку бактерії споживають глюкозу, а потім лактозу, яка, крім джерела вуглецю й енергії, виконувала роль індуктора для синтезу ІФН. Найвища концентрація розчинного кІФН- α спостерігалась за температури культивування 25—30°C. При підвищенні температури до 37°C концентрація кІФН- α зменшувалась на 17%.

Після виділення й очищення авторам вдалось отримати 270 мг кІФН- α з одного літра культуральної рідини (КР). Протипухлинна активність консенсусного ІФН *in vitro* на моделі культуральної лінії HerG2 виявилась на 33% вищою порівняно зі звичайним ІФН- α . Противірусну активність досліджували *in vitro* на моделі вірусу простого герпесу I типу, при цьому терапевтичний індекс кІФН- α виявився у 42 рази вищим за комерційний ІФН- α , а специфічна противірусна активність склала $3,25 \cdot 10^6$ МО/мг [8].

Біосинтез консенсусного ІФН- α досліджували також Ahmed зі співавт. На основі *E. coli* BL21DE3 Pl_{ys} ними був сконструйований штам, здатний синтезувати ендогенний кІФН- α у вигляді тілець включень. Автори дослідили експресію кІФН- α при використанні різних поживних середовищ. Найбільшу концентрацію біомаси *E. coli* (25 г/л) і тілець включень (5,5 г/л) отримали за використання середовища M9 з лимонною кислотою як джерела вуглецю. Найнижчі показники спостерігались при використанні середовища LB: зниження концентрації клітин та тілець включень на 60% та 55% відповідно. Автори також оптимізували спосіб виділення й очищення кІФН- α . Для руйнування клітин був використаний механічний метод при дії тиску 103 МПа. Для сольобілізації кІФН- α найефективнішим виявився гуанідин, оскільки за його використання отримували найбільшу кількість високоочищеного ІФН. Запропоновано додавати *L*-аргінін у кінцевій концентрації 0,3—0,5 М у буфер для рефолдингу. Враховуючи всі етапи виділення, дослідники отримали 100 мг кІФН- α з одного літра КР. Противірусна активність отриманого кІФН- α на моделі вірусу везикулярного стоматиту *in vitro* становила $2 \cdot 10^8$ МО/мг [9].

Інтерферон бета (ІФН- β). Цитокін відноситься до інтерферонів I типу і складається з 166 амінокислот. ІФН- β притаманні антивірусні, антипроліферативні та імунomodуючі властивості. Його комерційні препарати використовують для лікування розсіяного склерозу, хронічного вірусного гепатиту, ревматоїдного артрити, статевих кондилом, злоякісної меланоми та інших онкологічних захворювань. Рекombінантні клітини *E. coli* продукують неглікозильований, але біологічно активний ІФН- β з молекулярною масою 18 кДа, що складається з 165 амінокислотних залишків.

Mogowvat зі співавт. створили рекombінантний штам на основі *E. coli* BL21 (DE3), який продукує ІФН- β 1b у периплазматичний простір. На основі плазмиди pET-25b(+) автори сконструювали вектор з *N*-сигнальними послідовностями пектатліази В (pelB), що забезпечувало секрецію ІФН у периплазму клітини. Варто зазначити, що максимум синтезованого ІФН- β 1b досягається при OD₆₀₀ = 3,42 і становить 35% від загального вмісту білка, що є цілком ефективним, оскільки периплазма становить максимум 40% від загального вмісту клітини [10].

Також Mogowvat зі співавт. для оптимізації умов культивування рекombінантних клітин застосували методологію планування експерименту з використанням тривірневого факторного методу RSM. Достовірність моделі прогнозування максимальної надекспресії ІФН- β 1b була підтверджена експериментально з використанням *E. coli* BL21 (DE3). При цьому реальна концентрація роз-

чинного ІФН- β 1b була лише на 4,5% менша за прогнозовану. Тож методика моделювання оптимальних умов культивування є цілком раціональною та може використовуватись для оптимізації умов для надекспресії ІФН- β [11].

Інтерферон епсилон (ІФН- ϵ). Складається з 192 амінокислот і відноситься до ІФН I типу. Синтезується в легенях, шкірі, тонкому кишечнику, прямій кишці та репродуктивних тканинах [12]. Встановлена його противірусна активність, включаючи ВІЛ [13].

Про конструювання рекомбінантного продуцента ІФН- ϵ повідомили Abdel-Fattah зі співавт. Сконструйований ними штам на основі клітин *E. coli* BL21(DE3) pLysS продукував ІФН- ϵ у вигляді нерозчинних тілець включень. З літра КР автори отримали 114 мкг очищеного ІФН. Була показана його протипухлинна активність на клітинах раку молочної залози MDA-MB-231 і MCF-7, шляхом індукції раннього та пізнього апоптозу. Автори визначили рівень експресії каспази 3, яка бере участь в активації апоптозу клітин. Встановлено, що при обробці ракових клітин ІФН- ϵ підвищував синтез каспази 3 у 1,5 раза [14].

Інтерферон гамма (ІФН- γ). Це єдиний представник інтерферонів II типу, складається з 143 амінокислотних залишків, має молекулярну масу 25 кДа. Біологічно активний рекомбінантний ІФН- γ , що продукується клітинами *E. coli* є неглікозильованим білком з молекулярною масою 17 кДа. ІФН- γ проявляє як про-, так і протизапальні властивості. Цей цитокін посилює антигенпрезентуючу та лізосомну активність макрофагів, стимулює противірусну та протипаразитарну активність, сприяє адгезії і зв'язуванню лейкоцитів, а також впливає на проліферацію й апоптоз клітин [15].

Pandey із співавторами досліджували синтез ІФН- γ модифікованими клітинами *E. coli* GALG20 (DE3). Цей штам характеризується мутацією гена *pgi*, який кодує фермент фосфоглюкозоізомеразу. Зміни в доступності цього ферменту потенційно можуть впливати на метаболізм NADH/NADPH, цикл гліюксилату і цикл Кребса. Інактивація *pgi* в *E. coli* GALG20(DE3) призвела до збільшення потоку реакцій синтезу амінокислот і зменшення потоку реакцій синтезу нуклеотидів під час продукції ІФН- γ . Клітини штаму GALG20(DE3) в основному продукують цей цитокін у вигляді тілець-включень і лише 5% складає розчинний ІФН. Слід зазначити, що прогнозовані авторами результати щодо продукції ІФН- γ *in silico* підтвердились в експерименті. При цьому клітини *E. coli* GALG20(DE3) синтезували у 1,5 та у 3,5 раза більше ІФН- γ порівняно з штамми BL21(DE3) і MG1655(DE3) відповідно [16].

Надсинтез ІФН- γ трансформованими клітинами *E. coli* BL21(DE3) спостерігали Вабаєіроу зі співавт. Вчені оптимізували такі параметри культивування: концентрацію індуктора, час індукції та тривалість процесу. В ході досліджень не виявлено прямої залежності між кількістю індуктора та експресією ІФН. При цьому індукція 2,25 мг/л IPTG в середній логарифмічній фазі росту забезпечувала найвищу концентрацію ІФН- γ . Максимальний питомий вихід ІФН склав 400 мг з 1 г біомаси [17].

У табл. 1. наведена узагальнена інформація щодо параметрів культивування та синтезу ІФН вказаними вище штамми *E. coli*.

Таблиця 1. Бактерії *Escherichia coli* як продуценти інтерферонів I та II типу

Штам / Трансформуюча конструкція	Тип ІФН	Концентрація ІФН, г/л	Особливості процесу культивування	Джерело
<i>E. coli</i> W3110 / λ PLDsba-IFN- α 2a	ІФН- α 2a розчинний	0,05	Середовище LB, $t = 30^{\circ}\text{C}$, тривалість 16 год	[7]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) / MBP-TEVrs-IFN α -2b	ІФН- α 2b розчинний	0,14	Середовище LB з ампіциліном, $t = 37^{\circ}\text{C}$, при $\text{OD}_{600} = 0,5$ індукція IPTG при $t = 18^{\circ}\text{C}$ 12 год	[6]
<i>E. coli</i> GALG20(DE3) / pET28a-IFN γ	ІФН- γ в тільцях-включеннях	0,23	Середовище LB з канаміцином, $t = 3^{\circ}\text{C}$, при $\text{OD}_{600} = 0,5$ індукція IPTG 4 год	[16]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) / pET-25b	ІФН- β 1b розчинний	0,26	Середовище ТВ з ампіциліном, $t = 37^{\circ}\text{C}$, при $\text{OD}_{600} = 1,66$ індукція IPTG при $t = 30^{\circ}\text{C}$ 5 год.	[11]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) / pET-25b(+)	ІФН- β 1b розчинний	0,32	Середовище ТВ з ампіциліном, $t = 37^{\circ}\text{C}$, при $\text{OD}_{600} = 1$ індукція IPTG 3 год.	[10]
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus (DE3) / pET-clFN α	кІФН- α розчинний	1,2	Середовище LB з ампіциліном, $t = 25^{\circ}\text{C}$, експрес-автоіндукція лактозою, тривалість 24 год до досягнення $\text{OD}_{600} = 6-7$	[8]
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS / pET-28a(+)	ІФН- ϵ в тільцях-включеннях	5,54*	Середовище LB з канаміцином, $t = 37^{\circ}\text{C}$, при $\text{OD}_{600} = 0,6$ індукція IPTG 5 год	[14]
<i>E. coli</i> BDEES4	ІФН- α 2b в тільцях включеннях	5,65*	Середовище з гідролізатом казеїну (16 г/л), дріжджовим екстрактом (10 г/л), глюкозою (5 г/л), солями, ампіциліном та хлорамфеніколом; $t = 37^{\circ}\text{C}$, при $\text{OD}_{600} = 3$ індукція IPTG 3 год.	[4]
<i>E. coli</i> BL21DE3 PlyS / pET30-rhcIFN	кІФН- α в тільцях-включеннях	6*	Середовище M9 з канаміцином, $t = 37^{\circ}\text{C}$, тривалість 22 год, індукція IPTG через 4 год культивування	[9]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) / pET3a	ІФН- γ в тільцях включеннях	51	Модифіковане середовище M9, дробне внесення глюкози, $t = 37^{\circ}\text{C}$, індукція IPTG при концентрації клітин 65 г/л 4 год, тривалість 17 год	[17]

Примітка: * — концентрація тілець включень.

Дріжджі Pichia pastoris. На відміну від бактерій, дріжджі — одноклітинні еукаріоти, тому в них наявний механізм посттрансляційної модифікації і утворення дисульфідних зв'язків, що забезпечує правильне згортання і секрецію білкової молекули. Саме це робить *P. pastoris* більш універсальною платформою для експресії гетерологічних розчинних білків порівняно з *E. coli*.

ІФН- α . Для індукції синтезу ІФН при культивуванні рекомбінантних дріжджів *P. pastoris* додають метанол. При цьому висока концентрація метанолу впливає на клітинні метаболічні функції і пригнічує активність промотора алкогольоксидази, що призводить до зниження експресії рекомбінантного цитокіну [18]. Тому вчені розробляють нові способи індукції ІФН для підвищення стійкості *P. pastoris* до дії метанолу. Gao із співавт. Запропонували використання низькотемпературної індукції (20°C) та сумісної індукції метанолом і сорбітом в процесі культивування *P. pastoris* KM71. Найвищий синтез ІФН- α з активністю $1,8 \cdot 10^7$ МО/мг спостерігали при використанні метанолу у концентрації 10 г/л. При реалізації запропонованої авторами методики дріжджі витримували збільшення концентрації метанолу до 42 г/л із зменшенням синтезу ІФН лише на 11%. При підвищенні температури індукції від 20 до 30°C вказана концентрація метанолу призводила до зниження продукції ІФН на 80% [19].

ІФН має досить малу молекулярну масу, тому швидко виводиться з організму. Одним із способів модифікації ІФН з метою збільшення молекулярної маси та подовження періоду виведення є технологія поєднання з білком крові альбуміном (HSA). Період напіввиведення альбуміну з організму — 9 днів, а немодифікованого рекомбінантного ІФН- α 2а — 5 год. Тому Tian зі співавтор. вивчали експресію гібридного білка HSA-ІФН- α 1 модифікованими клітинами *P. pastoris* GS115. Протівірусна активність HSA-ІФН- α 1 на моделі вірусу везикулярного стоматиту з використанням клітин амніону людини WISH була у 6 разів нижчою, якщо порівняти з немодифікованим ІФН- α 1. Проте у дослідженнях *in vivo* біологічна активність гібридного цитокіну була у 10 разів вищою, ніж звичайного ІФН- α 1 [20].

Також можливість синтезу злитого з альбуміном ІФН досліджували Ningrum зі співавт. Вчені хімічно синтезували оптимізовану за кодонами нуклеотидну послідовність, що містила інформацію про синтез гібридного HSA-ІФН- α 2а. При дослідженні кількох штамів рекомбінантних дріжджів з цією генетичною конструкцією найбільшу концентрацію ІФН спостерігали при культивуванні штаму *P. pastoris* SMD1168, який є дефіцитним щодо продукції протеаз [21].

Альтернативним підходом для поліпшення фармакокінетичних властивостей ІФН- α є використання технології глікоінженерії [22]. *N*-глікозилювання є критичною посттрансляційною модифікацією, яка впливає на біологічну активність терапевтичних білків і швидкість виведення з організму. Тому Katla зі співавт. на основі *P. pastoris* SuperMan5 сконструювали штам дріжджів, здатний синтезувати глікозильований ІФН- α 2b. Введена у клітини *P. pastoris* генетична конструкція містила оптимізований ген ІФН- α 2b з одним сайтом *N*-глікозилювання в положенні 104 амінокислоти, де гліцин був замінений на аспарагін. Глікозильований ІФН мав в 1,3 раза більший

період напіввиведення та пригнічував реплікацію вірусів гепатиту С і Е на 85% та 66% відповідно [23].

ІФН- γ . Wang зі співавт. трансформували штам *P. pastoris* X-33 генетичною конструкцією з використанням послідовності сигнального пептиду α -фактора *Saccharomyces cerevisiae* (MF- α), який впливає на ефективність синтезу ІФН- γ . У разі використання такої експресійної системи вченим вдалось отримати штам дріжджів, здатний до продукції ІФН- γ у високій концентрації. Проти-вірусна активність отриманого ІФН на моделі вірусу енцефаломіокардиту з використанням клітинної лінії карциноми людини HEP2С становила $1,4 \cdot 10^7$ МО/мг [24].

При використанні як експресійної системи *P. pastoris* рекомбінантні білки набувають правильної конформації в ендоплазматичному ретикулумі (ЕПР), після чого секретуються комплексом Гольджі [25]. При неправильному згортанні формуються тільця включення, які піддаються ендоплазматичній деградації. Це призводить до низького виходу рекомбінантного білка [26]. Одним із способів вирішення цієї проблеми є коекспресія молекулярних шаперонів, які беруть участь в правильному згортанні і транслокації білків. Одним із таких шаперонів є дисульфідізомераза (PDI). PDI асоційована із ЕПР діє як фермент і шаперон. Як фермент — каталізує утворення дисульфідних зв'язків, а як шаперон — допомагає в згортанні білка в ЕПР [27].

Інший спосіб отримання високого виходу гетерологічних білків — це оптимізація кодонів [28]. Так, Prabhu зі співавтор. дослідили продукцію ІФН- γ у сконструйованих ними рекомбінантних штаммах *P. pastoris*: GS115-hIFN γ — з нативним геном ІФН- γ , GS115-hIFN γ -PDI — з нативним геном ІФН- γ та коекспресією PDI, GS-hIFN- γ opt — з геном ІФН- γ , що містив оптимізовані кодони. Найменшу кількість ІФН синтезував штам GS115-hIFN γ — 200 мкг/л. При культивуванні GS115-hIFN γ -PDI продукція ІФН зросла у 2,5 рази, а при культивуванні GS-hIFN- γ opt — у 9 разів. Тому в подальшому автори оптимізували параметри культивування штаму GS-hIFN- γ opt. Найбільша концентрація ІФН- γ спостерігалась за температури 25°C, а при 20, 30 та 37°C — концентрація ІФН- γ знижувалась на 44, 28 та 55% відповідно. Максимальна експресія ІФН була досягнута при використанні метанолу як індуктора у кінцевій концентрації 1%, а при 0,25; 0,5 та 2% концентрації — спостерігали зниження синтезу ІФН на 64, 52 та 12% відповідно. Після оптимізації параметрів продукція ІФН- γ штамом GS-hIFN- γ opt зросла на 40% [29].

Шаперони Ssa1p (Hsp 70) і Ydj1p (Hsp 40) допомагають у транспортуванні білків у ЕПР, Kar2p і Sec63p беруть участь у транслокації розгорнутого білка, PDI сприяє правильному згортанню гетеролітичного білка. Тому в іншій праці Prabhu з колегами дослідили вплив цих шаперонів на продукцію ІФН- γ клітинами дріжджів. На основі рекомбінантних клітин *P. pastoris* вчені конструювали різні штамми з генами вказаних шаперонів, після чого досліджували їхній індивідуальний і сумісний вплив на синтез ІФН. Контрольний штам *P. pastoris* GS-hIFN- γ синтезував 0,22 мг/л ІФН- γ . У штамів з окремими генами шаперонів спостерігали збільшення продукції ІФН у 3 рази. А при

культивуванні штамів з сумісною експресією кількох шаперонів синтез ІФН- γ збільшувався у 4—9 разів. Найефективнішим виявився штам з сумісною експресією шаперонів Kar2p і PDI [30].

Іншим способом підвищення продуктивності рекомбінантних білків у *P. pastoris* є додавання в середовище культивування декількох субстратів з метанолом. Тому в іншій публікації Prabhu зі співавтор. висвітлили результати дослідження впливу різних концентрацій глюконату та метанолу на синтез ІФН- γ рекомбінантним штамом *P. pastoris* GS115/Mut β /hIFN- γ opt, який синтезує цитокін під контролем промотора алкогольоксидази (АОХ). При збільшенні концентрації глюконату від 10 до 60 г/л автори спостерігали збільшення питомої швидкості росту *P. pastoris*, але подальше збільшення концентрації субстрату до 80 та 100 г/л призвело до зменшення питомої швидкості росту на 15 та 27% відповідно. Максимальна концентрація ІФН (13 мг/л) спостерігалась при концентрації метанолу 10 г/л. Варто зазначити, що в цьому разі глюконат є безпосередньо джерелом вуглецю, який сприяє росту біомаси, тоді як метанол є джерелом вуглецю та індуктором, який сприяє транскрипційній активності генів АОХ. При збільшенні концентрації метанолу спостерігається різке зниження біомаси та, відповідно, виходу ІФН, що пов'язано з утворенням токсичного формальдегіду. Автори дослідили та визначили оптимальні концентрації глюконату (40 г/л) та метанолу (10 г/л) при їх одночасному додаванні у поживне середовище, при цьому концентрація ІФН зросла у 2 рази [31].

Досягнення в галузі метаболічної інженерії сприяли створенню мікробних продуцентів різних терапевтичних білків і ферментів. Тому Prabhu з колегами дослідили вплив окислювальних ферментів пентозо-фосфатного шляху та їх синергічний ефект на продукцію ІФН клітинами дріжджів. Вчені сконструювали штам *P. pastoris* GS/hIFN- γ /SR зі зміненими кодонами та генами 6-фосфоглюконолактонази і d-трибулозо-5-фосфат-3-епімерази. Цей штам продукував у 1,5 раза більше ІФН- γ порівняно зі штамом GS/hIFN- γ . Варто зазначити, що такого ефекту вдалось досягти за рахунок змішаної подачі джерел вуглецю глюконату та метанолу в концентрації 80 і 123 мг/л відповідно [32].

Виділення та очистка рекомбінантних білків є одним із найскладніших етапів біотехнології їх отримання. Одним із ефективних методів розділення білків є зворотна міцелярна екстракція, що ґрунтується на принципах рідинно-рідинної екстракції [33]. Так, Prabhu зі співавт. застосували метод нікель-хелатних зворотних міцел для очищення ІФН- γ , отриманого культивуванням *P. pastoris* X-33-hIFN- γ opt. Така методика очищення дає змогу повністю зберегти біологічну активність і стабільність ІФН. Активність очищеного ІФН- γ визначали за його дією на клітини раку молочної залози MCF-7. ІФН у концентрації менше 40 нг/мл майже не спричиняв інгібування росту MCF-7, тоді як у концентрації 60—100 нг/мл спостерігали зменшення життєздатності клітин на 25%, що пояснюється підвищенням рівнів активних форм кисню [34].

Узагальнена інформація щодо вказаних вище продуцентів ІФН на основі *P. pastoris* наведена у табл. 2.

Таблиця 2. Синтез інтерферону рекомбінантними клітинами *Pichia pastoris*

Штам / Трансформуюча конструкція	Тип ІФН	Концентрація ІФН, г/л	Особливості процесу культивування	Джерело
<i>P. pastoris</i> GS-hIFN- γ / Kar2p + PDI / pPIC9k	ІФН- γ	0,002	Середовище BMMY, $t = 28^{\circ}\text{C}$, pH = 6, при OD ₆₀₀ = 10 індукція 1% метанолом з інтервалом 24 год упродовж 72 год	[30]
<i>P. pastoris</i> GS-hIFN- γ^{opt} / pPICZ α A-hIFN- γ^{opt}	ІФН- γ	0,0025	Середовище BMGY, $t = 25^{\circ}\text{C}$, pH = 7, індукція 1% метанолом з інтервалом 24 год, тривалість 72 год	[29]
<i>P. pastoris</i> SMD1168 / pPICZ α B	HSA-ІФН- α 2a	0,014*	Середовище BMGY, $t = 30^{\circ}\text{C}$, індукція 0,5% метанолом через 24 год культивування, тривалість 72 год	[21]
<i>P. pastoris</i> GS115/Mut ^b / hIFN- γ^{op} / pPICZ α	ІФН- γ	0,027	Модифіковане середовище FM 22 з глюконатом (40 г/л) та метанолом (10 г/л), $t = 25^{\circ}\text{C}$, тривалість 72 год	[31]
<i>P. pastoris</i> X33-hIFN- γ^{opt} / pPICZ α B-hIFN- γ^{opt}	ІФН- γ	0,036	Середовище BMMY, $t = 25^{\circ}\text{C}$, індукція 1% метанолом з інтервалом 24 год, тривалість 60 год	[34]
<i>P. pastoris</i> GS/hIFN- γ / SR / pPIC9K-hIFN- γ^{opt}	ІФН- γ	0,123	Модифіковане середовище FM 22, $t = 25^{\circ}\text{C}$, індукція метанолом упродовж 72 год, тривалість 120 год	[32]
<i>P. pastoris</i> X-33 / pPICZ α C	ІФН- γ	0,3	Середовище BMGY, $t = 30^{\circ}\text{C}$, індукція 0,5% метанолом кожні 24 год, тривалість 96 год	[24]
<i>P. pastoris</i> SuperMan5 / pPICZ α A-IFN α 2b	ІФН- α 2b	0,35	Середовище BMGY, $t = 30^{\circ}\text{C}$, pH 5,2; індукція 0,5% метанолом з інтервалом 24 год упродовж 72 год	[23]
<i>P. pastoris</i> KM71 / pPICZ- α IFN	ІФН- α	2,7	Середовище з гліцерином (500 г/л) та солями, $t = 30^{\circ}\text{C}$; через 30 год індукція 0,5% метанолом та сорбітом за $t = 20^{\circ}\text{C}$ після споживання гліцерину, тривалість 98 год	[19]
<i>P. pastoris</i> GS115 / pPIC3.5-HSA-IFN α 1	HSA-ІФН- α 1	198*	Середовище BMGY, $t = 30^{\circ}\text{C}$, при OD ₆₀₀ = 2—6 індукція метанолом (5 мл/л) з інтервалом 24 год упродовж 72 год	[20]

Примітка: * — концентрація гібридного білка ІФН-альбумін.

Дріжджі *Kluveromyces lactis*. На відміну від *E. coli* система експресії гетерологічних білків на основі *K. lactis* не потребує аналізу на наявність ендотоксинів, порівняно з *P. pastoris*, індукція синтезу ІФН не потребує метанолу як індуктора. Тому нині *K. lactis* розглядають як альтернативну платформу для конструювання рекомбінантних штамів, що здатні синтезувати ІФН.

Нещодавно Pandey з колегами сконструювали рекомбінантний штам *Kluveromyces lactis* KLIFNG10 та оптимізували параметри його культивування для отримання розчинного ІФН- γ . Досліджуючи вплив концентрації лактози на ріст біомаси, автори виявили, що в разі використання 20 г/л лактози концентрація *K. lactis* KLIFNG10 становила 15 г/л, тоді як концентрації 40, 80 та 100 г/л викликали зменшення концентрації біомаси на 8, 7 та 20% відповідно. За використання лактози у концентрації 200 та 250 г/л відбувалось повне інгібування субстрату. Використовуючи як джерело вуглецю лактозу, автори спостерігали двофазний ріст культури. При цьому спочатку споживалась лактоза (перші 20—24 год культивування), а як побічний продукт метаболізму *K. lactis* продукували етанол і ацетат. У другій фазі як джерело вуглецю клітини споживали етанол. Автори припускають, що саме етанол і є індуктором синтезу ІФН- γ [35].

Також Pandey зі співавт. за рахунок використання статистичного підходу методики поверхневого відклику (Box-Behnken — BBD) та алгоритмів штучної нейронної мережі, яка заснована на генетичному алгоритмі (ANN-GA) оптимізували умови культивування штаму *K. lactis* GG799 для біосинтезу розчинного ІФН- γ . Достовірність розрахунків для визначення оптимального складу поживного середовища була підтверджена експериментально. При цьому реальна концентрація біомаси *K. lactis* виявилась на 9,5% вищою, а концентрація рекомбінантного ІФН- γ лише на 2% меншою за передбачувану. Тривалість культивування склала 98 год, але максимальну продукцію ІФН- γ спостерігали на 38 год. Після завершення ферментації концентрація ІФН- γ була на 10% меншою [36].

Дріжджі *Yarrowia lipolytica*. Як і у вищих еукаріот, ранні етапи секреції білків *Y. lipolytica* в основному йдуть шляхом котрансляції з посттрансляційною модифікацією: утворення дисульфідного зв'язку, глікозилювання та правильного згортання. Однією з переваг використання *Y. lipolytica* для конструювання рекомбінантних штамів є низьке гіперглікозилювання білків, що більше властиве клітинам ссавців, ніж дріжджам [37].

Gasmi зі співавт. досліджували спосіб внесення олеїнової кислоти (ОК) як індуктора синтезу ІФН- $\alpha 2b$ при культивуванні *Y. lipolytica* JMY1852p. При концентрації олеїнової кислоти 20 г/л після закінчення фази індукції дріжджі синтезували 240 мг/л ІФН. При чотириразовому дробному внесенні ОК по 5 г/л спостерігали зростання продукції ІФН- $\alpha 2b$ на 24%. Застосувавши метод безперервної подачі ОК зі швидкістю потоку 1,25 г/год, вдалось збільшити концентрацію ІФН на 94%. Варто зауважити, що на активність ІФН- $\alpha 2b$, що продукується, в цьому разі впливають нові протеази, які накопичуються в

культуральній рідині через 3 год після початку культивування та сприяють деградації рекомбінантного цитокіну. Автори встановили, що додавання 10 мкМ пепстатину призводить до збільшення активності виділеного ІФН у 19 разів і становить $26,2 \cdot 10^7$ МО/мг [38].

Гриби *Trichoderma reesei*. Мікроорганізм використовується у біотехнології для промислового отримання ферментів для розщеплення лігноцелюлози. Гриби *T. reesei* підходять для масштабних процесів ферментації, їх можна культивувати на недорогому поживному середовищі з відносно невеликою тривалістю процесу. Проте продукція протеаз *T. reesei* є суттєвим бар'єром для досягнення високих рівнів продукції гетерологічних білків, зокрема цитокінів, які є чутливими до дії цих ферментів. Ідентифіковано більше 30 протеаз, що секретуються *T. reesei* [39], з них 13 — здатні руйнувати молекули терапевтичних білків, таких як антитіла, ІФН- $\alpha 2b$ та інсуліно-подібний фактор росту [40].

Першою публікацією про можливість використання *T. reesei* як продуцента ІФН є праця Landowski зі співавт. На основі штаму *T. reesei* M504 з делецією 8 протеаз науковці сконструювали штам M577 здатний до синтезу ІФН- $\alpha 2b$. Працюючи з цим штамом, автори створили та дослідили нові продуценти ІФН з делеціями за додатковими протеазами. Вчені відібрали два найактивніші штами: *T. reesei* M673 з делецією гену субтилізинпротеази *slp7* синтезував у 3,5 раза більше ІФН, а M674 з делецією гену металопротеази *amp2* — у 4 рази більше цього цитокіну, якщо порівняти з вихідним штамом M577. Також автори дослідили вплив соєвого інгібітора трипсин-протеази (SBTI) на синтез ІФН- $\alpha 2b$. При культивуванні *T. reesei* M674 на поживному середовищі з SBTI спостерігали збільшення синтезу ІФН- $\alpha 2b$ у 2 рази [41].

Одноклітинні водорості. Використання клітин рослин як продуцентів терапевтичних білків має свої переваги. Зокрема, синтезований білок може накопичуватися у великих кількостях в клітині у вигляді вакуолей, що захищатиме його від дії протеаз. Тому для отримання ІФН нині розробляють експресійні платформи не лише на основі бактерій, дріжджів і грибів, але й одноклітинних водоростей. Враховуючи, що біотехнологічні системи на основі мікроводоростей поєднують властивості рослин і мікроорганізмів, вони стають альтернативними засобами для генної інженерії.

El-Ayouy зі співавт. сконструювали бінарний вектор експресії, що містить людський ген ІФН- $\alpha 2a$. Векторну конструкцію рTRAK-IFN- $\alpha 2a$ спочатку перенесли в *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, яку потім використовували для трансформації одноклітинних водоростей *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124. Автори зазначають, що найбільшу кількість ІФН продукує перша трансгенна лінія *C. reinhardtii*. Рекомбінантний ІФН- $\alpha 2a$ показав протипухлинну активність *in vitro* на клітинах гепатоцелюлярної карциноми людини Hep-G2, *in vivo* — на експериментальній моделі карциноми Ерліха, а також противірусну дію на моделі вірусу везикулярного стоматиту *in vitro* [42].

Узагальнена інформація щодо вказаних вище продуцентів інтерферону наведена у табл. 3.

Таблиця 3. Різні групи мікроорганізмів як продуценти рекомбінантних інтерферонів

Штам / Трансформуюча конструкція	Тип ІФН	Концентрація ІФН, мг/л	Особливості процесу культивування	Джерело
<i>K. lactis</i> KLIFNG10 / pVVDRP02	ІФН- γ	0,385	Середовище YPLAC з лактозою (20 г/л), $t = 28^\circ\text{C}$, тривалість 60 год	[35]
<i>K. lactis</i> GG799/hIFN- γ / pKLAC2-hIFN- γ	ІФН- γ	1,1	Середовище (г/л): лактоза — 80, дріжджовий екстракт — 10, мікроелементи — 15 мл/л; $t = 30^\circ\text{C}$, тривалість 38 год	[36]
<i>C. reinhardtii</i> CC-124 / pTRAK-IFN- α 2a	ІФН- α 2	155	Середовище TAP з канаміцином, $t = 25^\circ\text{C}$, тривалість 7 діб	[42]
<i>Y. lipolytica</i> JMY1852p / JME1070	ІФН- α 2b	425	Середовище GNY з пепстатином, $t = 28^\circ\text{C}$, $\text{P}_\text{H} = 5$, безперервна подача олеїнової кислоти (індуктор) 1,25 г/год, тривалість 22 год	[38]
<i>T. reesei</i> M674 / pTTv254	ІФН- α 2b	4500	Середовище (г/л): дріжджовий екстракт — 20, целюлоза — 40, целобіоза — 80, сорбоза — 40, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 5, KH_2PO_4 — 5, SBTI — 0,4 мг/мл, $\text{pH} 4,5$; $t = 28^\circ\text{C}$, тривалість 120 год з температурним зсувом від 28 до 22 $^\circ\text{C}$ упродовж 48 год	[41]

Висновки

Нині розробляються різні системи експресії ІФН на основі бактерій, дріжджів, грибів та одноклітинних водоростей. При цьому якість рекомбінантного інтерферону, його функціональна активність, кількість, концентрація та вихід є найбільш важливими факторами, які слід враховувати при виборі експресійної платформи для виробництва гетерологічного білка.

Література

1. Li S. F., Gong M. J., Zhao F. R., Shao J. J., Xie Y. L., Zhang Y. G., Chang H. Y. Type I interferons: distinct biological activities and current applications for viral infection. *Cell Physiol. Biochem.* 2018, 51(5): 2377—2396. doi: 10.1159/000495897.
2. Sanchez-Garcia L., Martin L., Mangués R., Ferrer-Miralles N., Vazquez E., Villaverde A. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. *Microb. Cell Fact.* 2016, 15:33. doi: 10.1186/s12934-016-0437-3.
3. Silva M. M., Lamarre B., Cerasoli E., Rakowska P., Hills A., Bailey M. J., Wheeler J. X., Burns C. J., Gaines-Das R. E., Jones C., Robinson C. J. Physicochemical and biological assays

- for quality control of biopharmaceuticals: interferon alpha-2 case study. *Biologicals*. 2008, 36 (6): 383—392. doi: 10.1016/j.biologicals.2008.06.003.
4. Romanov V. P., Kostromina T. I., Miroshnikov A. I., Feofanov S. A. Preparative method for obtaining recombinant human interferon $\alpha 2b$ from inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2016, 42 (6): 631—637. doi: 10.1134/s1068162016040154.
5. Rabhi-Essafi I., Sadok A., Khalaf N., Fathallah D. M. A strategy for high-level expression of soluble and functional human interferon alpha as a GST-fusion protein in *E. coli*. *Protein Eng. Des. Sel.* 2007, 20 (5): 201—209. doi: 10.1093/protein/gzm012.
6. Vu T. T., Jeong B., Krupa M., Kwon U., Song J. -A., Do B. H., Nguyen M. T., Seo T., Nguyen A. N., Joo C. H., Choe H. Soluble prokaryotic expression and purification of human interferon alpha-2b using a maltose-binding protein tag. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 26 (6): 359—368. doi: 10.1159/000446962.
7. Dias P. V. S., Arthuso F. S., Oliveira J. E., Suzuki M. F., Sousa J. M., Ribela M. T. C. P., Bartolini P., Soares C. R. J. Determination of recombinant Interferon- $\alpha 2$ in *E. coli* periplasmic extracts by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 2018, 1072: 193—198. doi:10.1016/j.jchromb.2017.11.023.
8. El-Baky N. A., Linjawi M. H., Redwan E. M. Auto-induction expression of human consensus interferon-alpha in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol.* 2015, 15 (1). doi: 10.1186/s12896-015-0128-x.
9. Ahmed N., Bashir H., Zafar A. U., Khan M. A., Tahir S., Khan F., Khan M. I., Akram M., Husnain T. Optimization of conditions for high-level expression and purification of human recombinant consensus interferon (rh-cIFN) and its characterization. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2015, 62 (5): 699—708. doi: 10.1002/bab.1320.
10. Morowvat M. H., Babaeipour V., Rajabi-Memari H., Vahidia H., Maghsoudie N. Overexpression of recombinant human beta interferon (rhINF- β) in periplasmic space of *Escherichia coli*. *Iran. J. Pharm. Res.* 2014, 13: 151—160. PMID: 24711841.
11. Morowvat M. H., Babaeipour V., Rajabi Memari H., Vahidi H. Optimization of fermentation conditions for recombinant human Interferon beta production by *Escherichia coli* using the response surface methodology. *Jundishapur J. Microbiol.* 2015, 8 (4). doi: 10.5812/jjm.8(4)2015.16236.
12. Demers A., Kang G., Ma F., Lu W., Yuan Z., Li Y., Lewis M., Kraiselburd E. N., Montaner L., Li Q. The mucosal expression pattern of interferon- ϵ in rhesus macaques. *J. Leukoc. Biol.* 2014, 96(6): 1101—1107. doi: 10.1189/jlb.3A0214-088RRR.
13. Garcia-Minambres A., Eid S. G., Mangan N. E., Pade C., Lim S. S., Matthews A. Y., de Weerd N. A., Hertzog P. J., Mak J. Interferon epsilon promotes HIV restriction at multiple steps of viral replication. *Immunol. Cell. Biol.* 2017, 95(5): 478—483. doi: 10.1038/icb.2016.123.
14. Abdel-Fattah M., Saeed H., El-Shennawy L., Shalaby M., Embaby A., Ataya F., Mahmoud H., Hussein A. The Arabian camel, *Camelus dromedarius* interferon epsilon: Functional expression, in vitro refolding, purification and cytotoxicity on breast cancer cell lines. *PLoS One.* 2019, 14(9). doi: 10.1371/journal.pone.0213880.
15. Babaeipour V., Shojaosadati S. A., Robotjazi S. M., Khalilzadeh R., Maghsoudi N. Over-production of human Interferon- γ by HCDC of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochem.* 2006, 42: 112-117. doi: 10.1016/j.procbio.2006.07.009.
16. 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.
17. Babaeipour V., Shojaosadati S. A., Maghsoudi N. Maximizing production of human interferon- γ in HCDC of recombinant *E. coli*. *Iran. J. Pharm. Res.* 2013, 12 (3): 563-572. PMID: 24250663.
18. 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, 82(4): 438—444. doi: 10.1002/bit.10587.

19. Gao M. J., Zhan X. B., Gao P., Zhang X., Dong S. J., Li Z., Shi Z. P., Lin C. C. Improving performance and operational stability of porcine interferon- α production by *Pichia pastoris* with combinational induction strategy of low temperature and methanol/sorbitol co-feeding. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2015, 176 (2): 493—504. doi: 10.1007/s12010-015-1590-6.
20. Tian S., Li Q., Yao W., Xu C. Construction and characterization of a potent, long-lasting recombinant human serum albumin-interferon α 1 fusion protein expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 2013, 90 (2): P. 124—128. doi:10.1016/j.pep.2013.05.002.
21. Ningrum R. A., Herawati N., Wardiana A. Development of higher molecular weight of recombinant human interferon alpha-2a by albumin fusion technology in methilotropic yeast *Pichia pastoris*. *Inter. J. Advan. Sci. Engineer. Inform. Technol.* 2017, 7 (1): 8—14. doi: 10.18517/ijaseit.7.1.912.
22. Sinclair A. M., Elliott S. Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *J. Pharm. Sci.* 2005, 94 (8): 1626—1635. doi: 10.1002/jps.20319.
23. Katla S., Yoganand K. N. R., Hingane S., Ranjith Kumar C. T., Anand B., Siva-prakasam S. Novel glycosylated human interferon alpha 2b expressed in glycoengineered *Pichia pastoris* and its biological activity: N-linked glycoengineering approach. *Enzyme Microb. Technol.* 2019, 128: 49—58. doi: 10.1016/j.enzmictec.2019.05.007.
24. Wang D., Ren H., Xu J. W., Sun P. D., Fang X. D. Expression, purification and characterization of human interferon- γ in *Pichia pastoris*. *Mol. Med. Rep.* 2014, 9 (2): 715—719. doi:10.3892/mmr.2013.1812.
25. Sitia R., Braakman I. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature.* 2003, 426 (6968): 891—894. doi: 10.1038/nature02262.
26. Inan M., Aryasomayajula D., Sinha J., Meagher M. M. Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase. *Biotechnol Bioeng.* 2006, 93 (4): 771—778. doi: 10.1002/bit.20762.
27. Agashe V. R., Hartl F. U. Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2000, 11 (1): 15—25. doi: 10.1006/scdb.1999.0347.
28. Chang S. W., Lee G. C., Shaw J. F. Codon optimization of *Candida rugosa* lip1 gene for improving expression in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of the purified recombinant LIP1 lipase. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54 (3): 815—822. doi: 10.1021/jf052183k.
29. 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.
30. Prabhu A. A., Bharali B., Singh A. K., Allaka M., Sukumar P., Veeranki V. D. Engineering folding mechanism through Hsp70 and Hsp40 chaperones for enhancing the production of recombinant human interferon gamma (rhIFN- γ) in *Pichia pastoris* cell factory. *Chem. Eng. Sci.* 2018, 181: 58—67. doi: 10.1016/j.ces.2018.02.003.
31. Prabhu A. A., Venkata Dasu V. Dual-substrate inhibition kinetic studies for recombinant human interferon gamma producing *Pichia pastoris*. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2017, 47 (10): 953—962. doi: 10.1080/10826068.2017.1350977.
32. Prabhu A. A., Veeranki V. D. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* GS115 for enhanced pentose phosphate pathway (PPP) flux toward recombinant human interferon gamma (hIFN- γ) production. *Mol. Biol. Rep.* 2018, 45 (5): 961—972. doi:10.1007/s11033-018-4244-2.
33. Prabhu A. A., Chityala S., Garg Y., Venkata Dasu V. Reverse micellar extraction of papain with cationic detergent based system: an optimization approach. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2017, 47 (3): 236—244. doi: 10.1080/10826068.2016.1201685.
34. Prabhu A. A., Purkayastha A., Mandal B., Kumar J. P., Mandal B. B., Veeranki V. D. A novel reverse micellar purification strategy for histidine tagged human interferon gamma (hIFN- γ) protein from *Pichia pastoris*. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018, 107: 2512—2524. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.130.

35. Pandey R., Veeranki V. D. Optimizing secretory expression of recombinant human interferon gamma from *Kluyveromyces lactis*. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2018, 48 (2): 202—212. doi: 10.1080/10826068.2018.1425706.
36. Pandey R., Kumar N., Prabhu A. A., Veeranki V. D. Application of medium optimization tools for improving recombinant human interferon gamma production from *Kluyveromyces lactis*. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2018, 48 (3): P. 279—287. doi: 10.1080/10826068.2018.1425714.
37. Madzak C., Gaillardin C., Beckerich J. M. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Biotechnol.* 2004, 109 (1—2): 63—81. doi: 10.1016/j.jbiotec.2003.10.027.
38. Gasmi N., Ayed A., Ammar B. B., Zrigui R., Nicaud J. M., Kallel H. Development of a cultivation process for the enhancement of human interferon alpha 2b production in the oleaginous yeast, *Yarrowia lipolytica*. *Microb. Cell. Fact.* 2011, 10. doi: 10.1186/1475-2859-10-90.
39. Adav S. S., Chao L. T., Sze S. K. Quantitative secretomic analysis of *Trichoderma reesei* strains reveals enzymatic composition for lignocellulosic biomass degradation. *Mol. Cell. Proteomics.* 2012, 11(7). doi: 10.1074/mcp.M111.012419.
40. Landowski C. P., Huuskonen A., Wahl R., Westerholm-Parvinen A., Kanerva A., Hanninen A. L., Salovuori N., Penttila M., Natunen J., Ostermeier C., Helk B., Saarinen J., Saloheimo M. Enabling low cost biopharmaceuticals: a systematic approach to delete proteases from a well-known protein production host *Trichoderma reesei*. *PLoS One.* 2015, 10 (8). doi: 10.1371/journal.pone.0134723.
41. Landowski C. P., Mustalahti E., Wahl R., Croute L., Sivasiddharthan D., Westerholm-Parvinen A., Sommer B., Ostermeier C., Helk B., Saarinen J., Saloheimo M. Enabling low cost biopharmaceuticals: high level interferon alpha-2b production in *Trichoderma reesei*. *Microb. Cell Fact.* 2016, 15 (1). doi: 10.1186/s12934-016-0508-5.
42. El-Ayouty Y., El-Manawy I., Nasih S., Hamdy E., Kebeish R. Engineering *Chlamydomonas reinhardtii* for expression of functionally active human interferon- α . *Mol. Biotechnol.* 2019, 61 (2): 134—144. doi: 10.1007/s12033-018-0143-y.