

**ОБЩИЕ ПРОБЛЕМЫ, ОБЗОРЫ**

УДК 575.2.084

doi: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2018.3.5-26

**ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО  
ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ**

Трубицина Т.П., Колоскова Е.М., Езерский В.А., Максименко С.В.,  
Белова Н.В., Кутьин И.В., Рябых В.П.

*ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных - филиал ФНЦ  
животноводства ВИЖ им. Л.К. Эрнста,  
Боровск Калужской обл., Российская Федерация*

В связи с появлением на мировом рынке трансгенных сельскохозяйственных животных (коз, коров), продуцирующих с молоком биологически активные белки человека, в том числе лактоферрин человека, активно обсуждаются вопросы по возможным направлениям развития этой области исследований и обеспечению безопасности применения получаемых продуктов. Как показывают многочисленные исследования, лактоферрин (человека и крупного рогатого скота, рекомбинантный и нативный), обладает большим терапевтическим потенциалом, который до настоящего времени практически не используется из-за дефицитности традиционного источника его получения (женское молоко в ранние сроки лактации) и низкого содержания в коровьем молоке. Цель данной работы – систематизация данных по физико-химическим свойствам и биологическим функциям лактоферрина человека (чЛФ) и его рекомбинантных форм (рчЛФ), применяемых для диагностических и лечебных целей, а также оценка перспектив решения проблемы дефицита ЛФ на основе новых биотехнологий. С 1980 года предпринимались попытки получения рчЛФ с использованием генно-инженерных технологий; наиболее успешные из них – это клонирование гена чЛФ в эукариотическом микроорганизме *Aspergillus* (Agenix, США), создание трансгенного КРС (Pharming, Нидерланды) и трансгенных коз (совместный проект Союзного государства Россия-Белоруссия), продуцирующих молоко с чЛФ. Безопасность рчЛФ из молока трансгенных коров проверена в исследованиях на крысах. Хотя основной состав молока трансгенных и обычных коров практически не отличался, выявлены определённые различия по профилю гликозилирования рчЛФ молока трансгенных коров и чЛФ грудного молока. Получен битрансгенный КРС с одновременной экспрессией с молоком двух биологически активных белков человека – ЛФ и лизоцима. Из-за угрозы бешенства, в Европе есть ограничения на использование коровьего молока; козы не имеют общих с человеком заболеваний. Продолжение научно-исследовательских работ в лабораториях разных стран в мире приводит к совершенствованию технологий получения рчЛФ и открытию новых сфер применения его в био-медицинских технологиях. В связи с этим становится актуальным продолжение исследований по совместному проекту Беларуси и Российской Федерации с целью получения и использования форм рчЛФ фармакологического назначения.

*Ключевые слова: генетическая инженерия, получение рекомбинантных белков с молоком, лактоферрин человека, бычий лактоферрин, рекомбинантный лактоферрин человека*

*Проблемы биологии продуктивных животных, 2018, 4: 5-26*

**Введение**

Лактоферрин человека (чЛФ), длительное время считавшийся одним из самых перспективных белков-кандидатов для экспрессии в молоке сельскохозяйственных животных, привлекает внимание исследователей уже более 70 лет. С 1991 года проходят международные

позиумы, посвященные исследованию функций этого белка, а в 1995 году в США состоялась первая конференция по рекомбинантному чЛФ. Строению, биохимическим и физиологическим свойствам этого белка посвящены многочисленные научные статьи и обзоры (Adlerova et al., 2008; Gonzalez-Chavez et al., 2009; Kanwar et al., 2012; García-Montoya et al., 2012), в том числе на русском языке (Канышкова и др., 2001; Борзенкова и др., 2010). До сих пор исследователи находят всё новые его свойства и возможности применения (Giansanti et al., 2016; Mayeur et al., 2016; Moreno-Expósito et al., 2018).

### Физико-химические свойства лактоферрина

Лактоферрин (ЛФ или лактотрансферрин) – негемовый железо-связывающий гликопротеин из семейства трансферринов, молекула которого способна обратимо связывать два иона  $Fe^{3+}$ . ЛФ присутствует не только в молоке и молозиве млекопитающих, но и в секретах слизистых–всезах, слюне, вагинальной и семенной жидкостях, секретах бронхов и носовых полостей, желчи, желудочно-кишечных средах, моче (табл. 1). В существенных количествах он найден во вторичных нейтрофильных гранулоцитах, в плазме крови и околоплодных водах.

Таблица 1. Сравнительные характеристики и содержание лактоферрина человека и КРС в биологических жидкостях

Свойства	бЛФ	чЛФ**
Количество аминокислотных остатков	689	710
Молекулярная масса, кДа	77±1,5	78,182
Изоэлектрическая точка	8,5-9,0	8,47
Гликозилированные а.к. остатки		156-497-642
Содержание в биологической жидкости (мг/мл)		
Молозиво	>1,5	>7
Молоко	>0,02-0,2	>1-2
Слезы	?	>2,2
Сперма	?	>0,4- 1,9
Синовиальная жидкость		>0,01- 0,08
Слюна		>0,007- 0,01
Генетические характеристики		
Локализация гена, хромосома		3p21.31
Количество экзонов	17*	18**
Размер кодирующей последовательности	34,5 т.п.н.*	

Адаптировано по: (Rodrigues et al., 2009; \*Seyfert et al., 1994; \*\*Mayeur et al., 2016). бЛФ – лактоферрин крупного рогатого скота (бычий лактоферрин)

Молекула ЛФ состоит из одной полипептидной цепи, образующей два симметричных домена N и C (между ними 33-41% гомологии), каждый из которых имеет сайты связывания железа и N-гликозилирования. Изоэлектрическая точка чЛФ определяет его способность связываться с такими положительно заряженными лигандами как лизоцим, ДНК, гепарин, протеогликаны и некоторые специфические рецепторы. Первичные структуры ЛФ человека и мыши имеют 70 % гомологии, человека и КРС – 69 %, мыши и коровы — 63 % (Baker, Baker, 2009). Число и локализация сайтов гликозилирования среди ЛФ различных животных сильно варьируют. Гетерогенность в числе участков гликозилирования наблюдается даже у отдельных особей. Роль олигосахаридных цепей предположительно заключается в снижении иммуногенности белка и защите его от протеолиза (Legrand et al., 2008). ЛФ может существовать в виде двух форм: апо- (железо-ненасыщенный белок) и холо- (содержит  $Fe^{3+}$  в активном центре). Транскрипция гена ЛФ под действием альтернативных промоторов ведёт к

образованию двух мРНК: ЛФ и дельта-ЛФ ( $\Delta$ -ЛФ).  $\Delta$ -ЛФ не содержит N-концевой сигнальной последовательности, его функции на настоящий момент не вполне ясны.

Изучение 60 последовательностей генов ЛФ у 11 видов млекопитающих показало, что межвидовой полиморфизм у них существенно превышает внутривидовой. У человека в аминокислотных последовательностях ЛФ обнаружено 8 отличий, у мыши (*Mus musculus*) и козы (*Capra hircus*) – по 6, 10 – у КРС (*Bos taurus*), и 20 – у кабана (*Sus scrofa*). Такой разброс может свидетельствовать о функциональных отличиях лактоферринов разных видов (Kang et al., 2008). Различия между ЛФ КРС и чЛФ имеются и в особенностях гликозилирования, что существенно влияет на активность белка и его производных *in vivo*. Лактоферрин человека примерно в 100 раз более устойчив к протеолизу трипсином, чем ЛФ КРС (van Veen et al., 2004). Если чЛФ можно использовать в составе инъекционных лекарственных средств, ЛФ КРС иммунологически безопасен для человека только в составе пищевых продуктов. При расщеплении ЛФ КРС и чЛФ образуются лактоферрицины, обозначаемые соответственно символами В и Н (LFcinB, LFcinH) (Bellamy et al., 1992; Odell et al., 1996), которые также различаются по аминокислотной последовательности и биологической активности.

### Пептиды ЛФ

Во всем мире растёт устойчивость к антибиотикам, и это вызывает необходимость поиска новых классов антимикробных препаратов. Антимикробные пептиды (АМП) представляют собой широкий спектр молекул, производимых практически всеми живыми организмами в качестве естественных барьеров против инфекции. Среди источников АМП наиболее привлекательны биологически активные вещества пищевого происхождения. ЛФ – потенциальный продукт с широким фармацевтическим применением. Эффективных механизмов формирования генетической устойчивости патогенных микроорганизмов к лактоферрину нет.

В желудочно-кишечном тракте ребёнка в результате протеолиза лактоферрина образуется ряд пептидов, получивших название лактоферрицинов, самые известные из которых ЛФ(1-11), лактоферрицин (LFcin) и лактоферрампин обладают более мощным антимикробным действием, чем интактный белок. Их антибактериальная, противогрибковая и противопаразитарная активность может найти применение при заболеваниях человека (от глазных инфекций до костно-суставных, желудочно-кишечных и дерматологических заболеваний) и в ветеринарии (Bruni et al., 2016; Drago-Serrano et al., 2018, Giansanti et al., 2018).

Терапия микобактериоза, вызванного *Mycobacterium avium*, осуществляется длительным курсом комбинации антибиотиков, но общий клинический успех составляет не более 60%. Короткие пептидные последовательности чЛФ и бЛФ (hLFcin1-11 и LFcin17-30), а также некоторые их варианты со специфическими аминокислотными заменами значительно ингибировали рост *M. avium*, при этом пептиды бЛФ проявляли более высокую активность (Silva et al., 2014).

Привлекает внимание ветеринарный аспект исследований (относительно патогенов домашних животных) бычьего и свиного лактоферринов и их лактоферрицинов в условиях *in vitro* и *in vivo*, а также их рекомбинантные варианты из разных источников, в том числе из трансгенных растений (Chahardoli et al., 2018).

### Биологические функции ЛФ

Лактоферрин имеет широчайший диапазон полезных свойств, что вызывает необходимость его присутствия в организме на протяжении всей жизни человека. Ниже приведен перечень только основных биологических функций ЛФ (некоторые из них будут более подробно рассмотрены при описании функций рекомбинантного ЛФ)

*Железосвязывающая* функция – контроль концентрации ионов железа в биологических жидкостях, имеющий большое значение для предупреждения анемии за счёт облегчения транспорта железа и обеспечения его высокой усвояемости из женского молока (наличие

специальных рецепторов для ЛФ с ионами железа в слизистой оболочке кишечника человека). Участие в транспорте ионов цинка и меди, в процессах их всасывания.

*Антиоксидантные свойства* ЛФ как регулятора концентрации свободных ионов железа в крови и секретах, протектора липидов от перекисного окисления, конкурента с мембранными рецепторами бактерий за ионы железа.

*Антибактериальная активность* преимущественно ассоциирована с железом. ЛФ, связывая железо, необходимое для роста и жизнедеятельности бактериальной микрофлоры, проявляет *бактериостатическое действие*. Взаимодействуя со специфическими рецепторами бактериальной оболочки, ЛФ может окислять её с помощью входящего в его состав  $Fe^{3+}$ , что приводит к нарушению проницаемости мембран бактерий и далее – к их гибели (Farnaud, Evans, 2003). Другие механизмы антиинфекционной активности ЛФ связаны со стимуляцией фагоцитоза и активизации комплемента – прямым взаимодействием ЛФ с поверхностью бактерий может непосредственно приводить к лизису клеточной оболочки (Baker, Baker 2009). ЛФ обладает некоторой протеиназной активностью, подавляет способность бактерий к агрегации, блокирует возможность прикрепления к клеточным мембранам и проникновения в клетку (Legrand et al., 2008). У нокаутных по гену лактоферрина мышей потребление чЛФ оказывает защитное действие от экспериментальной бактериемии, вызванной *Streptococcus mutans* (Velusamy et al., 2014).

*Противопаразитарное действие* в отношении *Pneumocystis carinii*, *Entamoeba histolytica*, *Babesia caballi* и *Babesia equi* обусловлено способностью ЛФ к связыванию железа, но, с другой стороны, при недостатке железа *Trichomonas vaginalis* и *Tritrichomonas foetus* могут использовать ЛФ в качестве его источника (Leboffe et al., 2012). При пероральном применении нанокапсулированного ЛФ буйвола мышам, заражённым возбудителем малярии *Plasmodium berghei*, препарат проявлял ингибирующее действие в отношении паразита на фоне поддержания метаболизма железа в организме хозяина (Anand et al., 2016).

Некоторые из своих физиологических функций ЛФ выполняет, взаимодействуя с ДНК, РНК, гепарином и полисахаридами.

*Антивирусная активность* ЛФ обнаружена в отношении широкого ряда РНК- и ДНК-содержащих вирусов, инфицирующих человека и животных – вирус простого герпеса, вирусы гепатита С и В, цитомегаловирус человека, адено-, рота- и полиовирусы, ВИЧ. ЛФ оказывает лечебное действие при респираторных заболеваниях, гриппе, вирусном гастроэнтерите (Wakabayashi et al., 2014), препятствует проникновению вирусов в клетки-мишени, связываясь с глюкозаминогликанами, имеющими анионную природу (с гепаран сульфатом) вирусной оболочки (Gonzalez-Chavez et al., 2009).

*Иммуномодулирующее действие* ЛФ проявляется и на молекулярном, и на клеточном уровне; он стимулирует увеличение титра нормальных клеток-киллеров, усиливает фагоцитарный эффект, активизирует нейтрофилы. В присутствии экзогенного ЛФ изменяется экспрессия ряда цитокинов; его взаимодействие с некоторыми рецепторами приводит к активации иммунных клеток и к синтезу молекул на поверхности эндотелиальных клеток, мобилизующих и направляющих лейкоциты в очаги воспаления (Maueur et al., 2016). Другие механизмы противовоспалительного действия ЛФ связаны с подавлением транскрипционных факторов. ЛФ участвует в работе неспецифического гуморального иммунитета, регулирует жизнедеятельность защитных клеток и является белком, работающим в острый период воспалительного процесса. При воспалениях уровень ЛФ в крови и биологических жидкостях резко повышается (в плазме крови от 0,4-2 до 200 мг/л), и этот белок можно использовать как маркер острой фазы заболевания (Legrand et al., 2005, 2010).

ЛФ – непосредственный участник врожденного иммунитета и посредник клеточного иммунитета. Поступление в организм ребенка лактоферрина с материнским молоком составляет 0,14-0,5 г/кг в сутки (Садчиков, 2016а). При низком содержании ЛФ в молоке матери целесообразно добавление его к грудному молоку. Для детей на искусственном вскармливании назначение лактоферрина особенно актуально.

**Фактор костеобразования.** ЛФ увеличивает количество остеобластов, выполняющих функции костеобразования и поддержания плотности кости, посредством стимуляции пролиферации и дифференциации этих клеток. Как костеобразующий фактор, ЛФ во многих случаях обладает более сильным действием, чем кальций и витамин D. Он повышает способность остеобластов синтезировать и минерализовывать костный матрикс. По-видимому, влияние ЛФ на костный анаболизм обеспечивается наличием в остеобластах специфических рецепторов к ЛФ (Садчиков, 2016б). Эффект костеобразования был отмечен в экспериментах на поросятах, которым выпаивали молоко с рчЛФ (Li et al., 2018).

Выпаивание поросят молоком с рчЛФ, полученного от трансгенных коров, улучшало состояние желудочно-кишечного тракта и их общее состояние (Cooper et al., 2013).

Кроме перечисленных функций, во многих работах отмечены фунгицидное действие ЛФ (Fernandes and Carter, 2017), детоксикационные, радиопротекторные свойства, выявлена повышенная активность некоторых ферментов (Kanyshkova et al., 2003).

### **Лактоферрин как белок фармакологического и диагностического назначения**

Попытки создания на основе чЛФ широкой гаммы терапевтических препаратов для внутривенного, перорального, ректального применения, а также в виде мазей, косметических кремов, глазных капель и пищевых добавок, предпринимались давно. В обзорах, посвящённых ЛФ и его производным пептидам как белкам фармакологического назначения с широким потенциалом применения, всё чаще поднимаются вопросы онкологии и воспалительных процессов (Giansanti et al., 2016, 2018; Mayeur et al., 2016). Значительное внимание уделяется ЛФ как диагностическому белку при ряде заболеваний и компоненту средств таргетной терапии.

**Антиканцерогенные свойства.** В последнее время возрастает интерес к профилактике и/или лечению рака с помощью натуральных продуктов и диетических добавок. Молоко содержит большое количество белков и пептидов, проявляющих химиотерапевтические свойства. Среди множества работ особое место занимают исследования по применению чЛФ и бЛФ в терапии различных типов рака (Wolf et al., 2007; Onishi et al., 2008; Kanwar et al., 2008; Arcella et al., 2015). С помощью ЛФ можно задержать развитие опухолей или использовать его в качестве профилактического средства. Например, ЛФ проявляет ингибирующее действие на пролиферацию раковых клеток, оказывает противомикробное, противовоспалительное и антиоксидантное действие (Rodrigues et al., 2009). Защитное влияние перорального применения ЛФ против химически индуцированного канцерогенеза, роста опухоли и/или метастазирования было продемонстрировано в многочисленных экспериментах на модельных животных, подтвердив большую потенциальную терапевтическую пользу для профилактики и/или лечения онкологических заболеваний.

Исследование молекулярного механизма ингибирующего действия на рост плоскоклеточного рака ротовой полости показало, что бЛФ в концентрациях от 1 до 100 мкг/мл индуцировал активацию гена белка p53 (транскрипционного фактора, регулирующего клеточный цикл). Цикл останавливался в фазе G1/S с последующим апоптозом клетки. Не затрагивая кератиноциты здоровой ротовой полости, бЛФ избирательно воздействовал на раковые клетки (Chea et al., 2018). Цитотоксической активностью в отношении раковых клеток в условиях *in vitro* и *in vivo* обладают и пептиды, полученные из катионной области ЛФ. И лактоферрин, и продукт его кислотного пепсинового гидролиза – катионный пептид лактоферрицин, на клеточных культурах и животных моделях показали антиканцерогенные свойства против таких видов рака, как лейкоз, колоректальный рак, рак молочной железы, легких и другие (Lizzi et al., 2009; Chen et al., 2014; Hu et al., 2016). Этот пептид действует посредством ингибирования пролиферации клеток, индукции апоптоза, подавления ангиогенеза и модуляции экспрессии белков, участвующих в процессах канцерогенеза. Лактоферрицин В (LfсinВ) показал широкий спектр противоопухолевой активности, тогда как аналогичный пептид, производный от чЛФ, оказался не так активен. Однако пептид hLF11

(производный от чЛФ) оказался способным проникать в клетку и, слитый с антимикробной последовательностью LFcInB (RRWQWR), увеличивал его токсичность для клеток *Jurkat* (линия лейкомиических Т-лимфоцитов человека). Библиотека ЛФ-производных пептидов, тестируемых на противоопухолевую активность, расширяется, создаются и выявляются новые химерные пептиды с высокой цитотоксичностью по отношению к раковым клеткам (Arias et al., 2014).

*Компонент таргетной терапии.* Благодаря наличию у человека рецепторов к ЛФ, перспективно его использование в роли носителя для направленной доставки лекарств. В качестве ткани-мишени особый интерес представляет головной мозг. Транспорт ЛФ через гематоэнцефалический барьер происходит в одном направлении, благодаря чему ЛФ может использоваться для преодоления лекарствами (пептидами, белками, генами) гематоэнцефалического барьера.

Среди биоактивных факторов риска заболеваний слизистой шейки матки, лактобациллы и ЛФ в значительной степени находятся под влиянием женских гормонов и паракринной продукции различных цитокинов. Содержание ЛФ в слизистых выделениях женщин, страдающих половой инфекцией (гонорея, хламидиоз, трихомонез) повышено, тогда как лактобацилл – понижено. Поэтому ЛФ и лактобациллы можно рассматривать как биомаркеры измененного микробного биоценоза на вагинальном уровне. Интравагинальное введение ЛФ и лактобацилл может стать новой эффективной терапевтической стратегией и ценным инструментом в восстановлении иммунного гомеостаза слизистых оболочек (Valenti et al., 2018). Фекальный лактоферрин в качестве диагностического биомаркера может быть использован при дифференциальной диагностике воспалительных заболеваний кишечника и синдрома раздраженной кишки и у взрослых, и у детей.

Поскольку с возрастом у человека прогрессирует сухость глаз и возрастает риск инфицирования, ЛФ, как один из важных компонентов слезы, предлагается использовать в составе искусственной слезы в качестве функционального защитного агента глазной поверхности (Rusciano et al., 2018).

В ротовой полости обитают резидентные микроорганизмы, способные изменять баланс между физиологическими и патологическими состояниями. Использование в качестве антимикробного агента ЛФ и его N-концевых активных пептидов показано для группы пероральных и челюстно-лицевых заболеваний, включая бактериальные, грибковые, вирусные инфекции, рак головы и шеи, ксеростомии, имплантологические осложнения в стоматологической практике.

### **Лактоферрин как коммерческий продукт**

В настоящее время в промышленном масштабе доступен только бЛФ. Первой компанией, начавшей крупное производство бЛФ в 1985 г., стала бельгийская *Oleofina Company*. В Германии его стали выделять в 1989 г. из снятого молока и из молочной сыворотки после производства сыра (табл. 2). К 2008 г. промышленное выделение бЛФ было налажено в Нидерландах, Новой Зеландии, Австралии, Франции. С 1986 г в Японии, Корею, Индонезии его начали вводить в продукты детского питания. За 2001-2012 годы объём мирового выпуска бЛФ вырос в 4 раза, к 2017 г. прогнозировалось его увеличение еще в 1,4 раза – до 262 т. Ежегодная ёмкость мирового рынка пищевых применений лактоферрина составляет \$6 млрд., а если рассматривать лекарственные перспективы, особенно учитывая открывшиеся возможности белка в онкологии, то суммарный объём составляет около \$20 млрд (Будевич 2016).

В НИИ онкологии им. Герцена (РФ) на основе ЛФ женского молока ранних сроков лактации разработан коммерческий препарат для внутривенного введения с широким спектром терапевтического действия – лапрот (лактоферрин – протектор) для различных терапевтических целей, в частности, для лечения послеоперационных осложнений у онкологических больных (Чиссов и др., 2001). К его выпуску с осени 2013 года приступило

предприятие «Медгамал». Препарат показал высокую эффективность в лечении токсических состояний, обусловленных гнойно-воспалительными, септическими, вирусными и другими заболеваниями. Цена 50 мг лиофилизированной формы чЛФ (разовая доза препарата) в аптеке составляет более 4000 руб. (на 12.09.2018, <<https://www.pharminindex.ru/laprot.html>, <http://www.medgamal.ru/price>>). Суточная доза – 50-100 мг. Курсовая доза препарата составляет от 50 до 500 мг. Производитель – филиал «Медгамал» НИЦЭМ им. Гамалеи – одно из старейших предприятий в области производства медицинских иммуно-биологических препаратов в России (<<http://www.medgamal.ru>>).

Таблица 2. Основные этапы исследования и применения лактоферрина\*

Годы	Научно-исследовательские работы, практика
1984	Определена первичная структура чЛФ.
1985	Начало коммерческого производства бЛФ (OleofinaCompany).
1986	Выход на рынок детского питания, обогащенного (Morinaga Milk Industry).
1987	Клонирован и секвенирован ген ЛФ мышши; определена трехмерная структуры чЛФ.
1988	Определена структура гликановой цепи бЛФ.
1989	Начало широкомасштабного производства бЛФ фирмой MILEI GmbH.
1990	Клонированы и секвенированы гены чЛФ и бЛФ.
1992	Обнаружены лактоферрицины В (КРС) и Н (человека). Идентифицирован LRP – рецептор ЛФ в печени. Крупномасштабное производство рЧЛФ компанией Agennix Incorporated.
1993-1995	Выявлено ингибирование разрастания и перемещения кишечных бактерий при пероральном применении бЛГ и bLFhyd.
1995	Идентифицирован активатор транскрипции чЛФ.
1997	Определена 3D структура бЛФ. Начало продаж бЛФ-обогащенного йогурта компанией Morinaga Milk Industry.
1997-2008	Выявлено противоканцерогенное действие перорального применения бЛГ и bLFhyd на животных-моделях.
1998	Определена 3D структура лактоферрицина В.
1999-2008	Выявлено противои инфекционное (антибактериальное) действие бЛФ при пероральном применении у человека.
2000-2008	Установлен механизм противои инфекционного (антибактериального) действия бЛФ при пероральном применении на животных-моделях.
2001	Идентификация интеллектина (intelectin) как рецептора ЛФ в кишечнике.
2003	Получена мышь с нокаутом гена ЛФ.
2003-2008	Установлена связь между однонуклеотидным полиморфизмом чЛФ и болезнями.
2005	Определена 3D структура лактоферрицина Н.
2006	Завершены клинические испытания оральной формы бЛФ на больных с колоректальной аденомой.

Примечание: \*адаптировано по: (Tomita et al., 2008).

Несмотря на очевидную эффективность препарата, из-за невозможности получения женского грудного молока в больших масштабах, промышленное производство пищевых продуктов и лекарственных средств на основе чЛФ женского молока практически неосуществимо. Поэтому в 2004 г к реализации был предложен проект: «Разработка препаратов нового поколения с широким спектром терапевтического действия на основе лактоферрина человека из молока трансгенных сельскохозяйственных животных», одной из задач которого было получение препарата «Лапрот-Т» на основе лактоферрина человека из молока трансгенных с/х животных. В каком состоянии проект находится в настоящее время – доступной информации не найдено.

На основе лактоферрина, получаемого из молозива животных, ЗАО "НПО НАРВАК" совместно с ОАО НТЦ "НовЭнерго" разработали и начали производство инъекционного лечебного ветеринарного препарата (полиферрин-А <<http://lactobio.ru>>).

Для решения проблемы дефицита чЛФ были созданы различные системы экспрессии рекомбинантного ЛФ человека у разных организмов – дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*), грибов (*Aspergillus awamory*), насекомых (*Bombyx mori*), растений (табак, рис, картофель, кукуруза). Рекомбинантный чЛФ (рчЛФ) выделяют также из молока трансгенных животных (мышей, кроликов, коз, коров). В США рчЛФ разрешён к применению и выпускается в качестве пищевой добавки компанией Bio Pharming. Тем не менее, широкого использования в коммерческих продуктах рчЛФ, как генетически модифицированный продукт, не получил.

В мировом биотехнологическом бизнесе конкурируют три основных направления получения рчЛФ: в микроскопических грибах, растениях и в молоке трансгенных животных. Это Agennix Inc (Хьюстон, США), нарабатывающая рчЛФ ферментацией генетически модифицированных плесневых грибов *Aspergillums oryzae*; Pharming Group (Нидерланды) – рчЛФ из молока трансгенных кроликов и коров, Ventra Bioscience (Сакраменто, США), получившая рис, трансгенный по гену лактоферрина человека.

Во всех разработанных продуктах белковая часть рчЛФ была идентична человеческому белку, тогда как гликозидная часть, которая составляет до 10-15% от общей массы природного белка, существенно отличается. Это не позволяет использовать такие белки для разработки инъекционных медицинских препаратов вследствие возможности развития аллергии и риска анафилактического шока у пациента.

Использование генно-модифицированных молочных продуктов, получаемых от животных со встроенной человеческой ДНК, неизбежно вызывают вопросы безопасности конечных препаратов, что в настоящее время существенно осложняет коммерческое продвижение. Однако использование рекомбинантного лактоферрина и его производных пептидов в фармацевтической промышленности имеет большие перспективы: лекарственные белки человека, полученные при помощи ГМО, в мировой практике рассматриваются не как трансгенная пища, а как биологически активная добавка.

С 2003 г на постсоветском пространстве начались интенсивные работы по созданию трансгенных коз (совместный проект Союзного государства Россия-Белоруссия), продуцирующих молоко с чЛФ.

### **Трансгенный КРС – продуцент рчЛФ**

К настоящему времени накоплен огромный опыт европейских исследователей по изучению рчЛФ, получаемому из молока трансгенного крупного рогатого скота (van Berkel et al., 2002; Нувönen et al., 2006). Безопасность рчЛФ из молока трансгенных коров проверена в исследованиях на крысах (Appel et al., 2006). Как выяснилось, гликаны, присоединенные через N-гликозидные связи, способны влиять на функциональную активность лактоферрина. Исследование и сравнение профилей гликозилирования рчЛФ, бЛФ и чЛФ показало высокое разнообразие N-гликановых структур: 23, 27 и 18 N-гликанов соответственно, из них 8 N-гликанов оказались общими. В целом оказалось, что профиль гликозилирования рчЛФ из молока трансгенных коров имел больше общего с таковым у бЛФ, чем с чЛФ (Parc et al., 2017). Почти на десятилетие позднее учеными из Китая были получены трансгенные по чЛФ коровы с содержанием рекомбинантного белка в молоке, значительно превышающем таковое у вышеперечисленных авторов (Wang et al., 2017). Хотя основной состав молока трансгенных и обычных коров практически не отличался, профиль гликозилирования рчЛФ молока трансгенных коров и чЛФ грудного молока также имел различия.

В ряде работ исследована положительная роль рчЛФ из молока трансгенных коров в регуляции кишечной микрофлоры и укреплении иммунитета у поросят (Hu et al., 2012; Li et al., 2014). Трансгенные коровы, инфицированные *Staphylococcus chromogenes*, в отличие от контрольных коров, не имели признаков клинического мастита (Simojoki et al., 2010). Получен



битрансгенный КРС с одновременной экспрессией с молоком двух биологически активных белков человека – ЛФ и лизоцима (Cooper et al., 2015, Kaiser et al., 2017).

### **Трансгенные козы – продуценты рчЛФ**

*Рекомбинантный лактоферрин человека – проект России-Белоруссии.* В рамках Союзного государства (Россия/Беларусь) была разработана специализированная программа: «Биотехнология получения рекомбинантного лактоферрина человека». В 2003-2013 гг. были проведены исследования с целью получить идентичный лактоферрину женского молока рчЛФ, продуцируемый с молоком у трансгенных коз (Goldman et al., 2012). Сначала была создана панель генных конструкций с разными регуляторными элементами и последовательностью гена лактоферрина человека (от кДНК до полноразмерного гена), опробованная на мышах. На основе двух генетических конструкций, показавших лучший результат, в 2007 году учёными Беларуси и России были получены первые трансгенные по чЛФ козлята. Принятое 26 июня 2009 г Постановление Совета Министров Союзного государства утвердило вторую часть программы «Разработка технологий и организация опытного производства высокоэффективных и биологически безопасных лекарственных средств нового поколения и пищевых продуктов на основе лактоферрина человека, получаемого из молока животных-продуцентов» ("БелРосТрансген-2») на период 2009-2013 гг. с финансированием Программы в объеме 500 000 тыс. руб.

Содержание чЛФ в молоке коз первого и последующих поколений составляло 1,5-10,8 г/л. По биологической активности и физико-химическим свойствам рчЛФ соответствовал чЛФ из грудного молока (Goldman et al., 2010). Исследователи из других стран к этому времени уже получали рчЛФ из молока трансгенных коров, но не смогли полностью отделить его от бЛФ (Голландия), что нередко являлось причиной аллергических реакций. Из-за угрозы бешенства, в Европе есть ограничения на использование коровьего молока. Козы не имеют общих с человеком заболеваний.

Была создана компания «Трансгенфарм», ставшая одним из первых резидентов Сколково. На сайте компании (<<http://www.transgen.ru/>>) регулярно появлялась информация о текущем состоянии проекта, но последнее обновление сайта было в 2015 году, а последняя выложенная статья – в 2012 г. По результатам аудита эффективности использования средств бюджета Союзного государства, выделенных в 2009-2013 годах на реализацию совместной программы, в октябре 2014 г. было принято Постановление Совета Министров Союзного государства о завершении Программы. Общий объем средств бюджета Союзного государства, направленных на реализацию совместных программ «БелРосТрансген» и «БелРосТрансген - 2» за 11 лет составил 553503,0 тыс. рублей (13428,5 тыс. евро). (Отчёт о результатах контрольного мероприятия «Аудит эффективности использования средств бюджета Союзного государства, выделенных в 2009-2013 гг. на реализацию совместной программы «Разработка технологий и организация опытного производства высокоэффективных и биологически безопасных лекарственных средств нового поколения и пищевых продуктов на основе лактоферрина человека, получаемого из молока животных-продуцентов»).

На начало 2016 г. в Белоруссии количество трансгенных коз-продуцентов рчЛФ (предложенное коммерческое название – «БелЛактоферрин») составляло 241, а себестоимость 1 л молока – около 100 тыс. руб. К 2018-2020 гг. с увеличением поголовья и молочной продуктивности планировалось повышение удоя от полученного стада до 450-500 кг в сутки. Был создан лабораторно-экспериментальный участок по выделению, очистке и лиофилизации рчЛФ из молока трансгенных коз. В 2016 году при выходе на нормальный режим работы прогнозируемое суточное количество перерабатываемого молока с рчЛФ оценивалось в 150-200 л, в том числе получение 200-250 г целевого белка. В перспективе годовой объем рчЛФ предполагалось довести до 54-67 кг (Будевич, 2016).

На территории РФ на 1 января 2014 г экспериментальное стадо трансгенных животных составляло 56 голов. Содержание рчЛФ в среднем составляло около 3,5 г/л (до 10 г/л в

первых дозах грудного молока, а в зрелом молоке – около 1 г/л). Был создан инновационный продукт «Неолактоферрин» («Неолакт»), представляющий собой комбинацию рчЛФ и лактоферрина козы (кЛФ), присутствующих в молоке ТГ коз в соотношении рчЛФ/кЛФ = 9:1. Полученный рчЛФ был назван «Концентрат сывороточный белковый «Лактоферрин человека из молока животных продуцентов» (ТУ 92223-011-00244660-11, сертификат соответствия РФ на серийный выпуск продукции № С-RU.АГ37.В.30548). Согласно данным исследований, по физико-химическим параметрам и по биологической активности рчЛФ соответствовал природному белку чЛФ. Как в молоке животных-продуцентов, так и в рчЛФ не было обнаружено генетически модифицированных элементов (ФБУ «РОСТЕСТ-Москва», испытательная лаборатория по определению генетически модифицированных источников). За время реализации Программы на территории РФ было получено 2841 г рчЛФ из 4059 л молока (1,6 г/л), на территории Республики Беларусь – 880,4 г рчЛФ из 843,8 л молока (1,04 г/л). При опытной выработке лактоферрина в ЗАО «Лактис» (РФ) минимальная себестоимость на конец 2013 года составляла 0,3 тыс. рублей за грамм (Отчет аудита, 2014 г).

Программой была предусмотрена разработка технологий производства лекарственных средств и пищевых продуктов на основе козьего молока, содержащего рчЛФ с про- и пребиотическими свойствами.

На территории РФ (Республики Беларусь) была разработана 21 (9) технология, в том числе: на лекарственные средства – 3 (2), на пищевые продукты – 11 (4), на биологические активные добавки к пище – 4 (3), на продукты медицинского назначения – 3. В обеих республиках был разработан план доклинических испытаний рчЛФ и препаратов, содержащих рчЛФ; разработаны методики контроля качества сырья и белка.

*Биологические свойства рчЛФ из молока коз-продуцентов.*

*Исследования, проведенные в Республике Беларусь.* На лабораторных животных было показано, что очищенный рчЛФ оказывает положительное воздействие на микрофлору кишечника, способствует её нормализации при антибиотико-ассоциированных дисбактериозах, активизирует процессы метаболизма, что выражается в снижении уровня глюкозы, холестерина и липопротеинов низкой плотности при увеличении содержания тестостерона, активизирует клетки иммунной системы и секреторные процессы в желудочно-кишечном тракте, снижает выраженность дистрофических и некротических процессов язвообразования в тонкой кишке при экспериментальных колитах, препятствует развитию воспалительных процессов в кишечной стенке.

Биохимические исследования показали эффективность использования рчЛФ молока трансгенных коз с целью снижения негативных изменений активности аминотрансфераз и ЛДГ, процессов перекисного окисления липидов у крыс с экспериментальным доксициклин-индуцированным холестазом, а также для коррекции нарушений работы антиоксидантной системы в модели аллоксанового сахарного диабета. Результаты исследований могут быть использованы в клинической практике для разработки технологий воздействия на процессы обмена веществ в органах и тканях и для совершенствования способов биохимического контроля при развитии медикаментозного внутрипеченочного холестаза с нарушением выработки инсулина поджелудочной железой путём введения рчЛФ (Орел, 2017).

*Противоопухолевое действие.* На первичной культуре клеток атипичной тератоидной/рабдоидной опухоли человека продемонстрирована активация гибели опухолевых клеток после сочетанной аппликации химиопрепаратов и рчЛФ (1, 10, 100 мкг/мл). Обнаружено ингибирующее дозозависимое действие рчЛФ на раковые клетки лёгкого человека линии А549 и (более выраженно) на иммортализованную линию фибробластов человека (Шейко и др., 2016).

Белок способствовал уменьшению количества клеток костного мозга с повреждениями хромосом после воздействия циклофосфана и числа индуцированных уретаном аденом в легких у мышей. На основе разработанной модели подавления циклофосфаном злокачественного роста лимфосаркомы Плисса показано, что рчЛФ:

- проявляет бактерицидный эффект в отношении типичных возбудителей инфекций ЖКТ, уменьшает степень выраженности дисбиотических нарушений микробиоценозов как при наличии злокачественного новообразования, так и при действии циклофосфана;

- способствует восстановлению биохимических показателей сыворотки крови и обладает иммуномодулирующими свойствами;

- оказывает выраженный гепатопротекторный эффект, вызывающий развитие ряда компенсаторных реакций, направленных на восстановление функций пищеварительного тракта (Будевич 2016).

В качестве биологически активной пищевой добавки рчЛФ может быть рекомендован при обнаружении опухоли у онкобольных перед проведением курса химиотерапии, в до- и послеоперационный период

В опытах *in vivo* на крысах показано, что при применении рчЛФ обнаруживаются противовоспалительные эффекты в отношении токсического действия бактериального агента – эндотоксина кишечной палочки (*Escherichia coli*). В условиях *in vitro* на культуре клеток *HeLa* этот белок способен проявлять протекторные эффекты в отношении токсического действия эндотоксина кишечной палочки.

При моделировании железодефицитной анемии (использование рациона, не содержащего железа) внутрижелудочное введение рчЛФ в течение 1 мес. способствовало восстановлению содержания гемоглобина в периферической крови.

Данные *in vivo* о способности рчЛФ увеличивать эндогенные резервы организма могут стать основой для разработки рекомендаций по использованию этого белка в экстремальных ситуациях и с целью повышения устойчивости к неблагоприятным факторам.

На основании лабораторных испытаний, проведенных на вирусе высокопатогенного гриппа птиц, штамм H5N1, установлена умеренная противовирусная активность рчЛФ. Разработан комплексный препарат противовирусного, антибактериального и иммуностимулирующего действия для профилактики и терапии пневмоэнтеритов у молодняка сельскохозяйственных животных с использованием рчЛФ.

В Белоруссии к настоящему времени определены направления использования рчЛФ, разработаны и зарегистрированы технические условия на «Молоко козье с лактоферрином человеческим рекомбинантным», «Лактоферрин человеческий рекомбинантный», добавки к пище биологически активные «Капеллакт-иммуно» и «Фортеллакт-иммуно», осуществляется монтаж линии по выделению лактоферрина, подготовлены сборники рецептов по молоку питьевому с лактоферрином.

В НАН Беларуси разработан комплексный план научно-исследовательских работ по совершенствованию методов получения рчЛФ из молока коз-продуцентов и его использованию в различных целях и сферах жизнедеятельности человека в 2016-2020 гг. Считается целесообразным формирование отдельной программы «Лактоферрин» (Будевич, 2016).

*Исследования, проведенные в Российской Федерации.* Естественная комбинация рчЛФ и козьего ЛФ (90 и 10%), полученная в результате выделения ЛФ из молока трансгенных коз, с российской стороны получила название «неолактоферрин». Ранее рчЛФ, полученный с молоком трансгенных мышей, как и природный чЛФ, показал способность ингибировать рост золотистого стафилококка, устойчивого к ряду антибиотиков; в экспериментах на клетках иммунной системы рчЛФ проявил выраженные иммуномодулирующие свойства (Chernousov et al., 2013). При изучении роста культивируемых микроорганизмов, выделенных при воспалительных заболеваниях полости рта (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Porphyromonas gingivalis*, *Candida albicans*) бЛФ и рчЛФ вызвали существенное снижение роста бактериальных популяций и грибов *Candida*. В высокой концентрации (10 мг/мл) исследованные препараты ЛФ в условиях *in vitro* блокировали развитие бактериальной популяции, в то время как в концентрации около 1 мг/мл они

оказывали бактериостатический эффект, который сохранялся на протяжении до 96 ч. Установлен более выраженный эффект бЛФ по сравнению с рчЛФ (Царев и др., 2016).

Неолактоферрин в дозе 100 и 200 мг/кг массы тела тормозил скорость роста перевиваемой опухоли рака шейки матки (РШМ-5) у мышей. Наиболее эффективной была доза 200 мг/кг, которую начинали вводить за неделю до перевивки. В отличие от контрольной группы, в опытной группе у части мышей произошло рассасывание РШМ-5. Повторная перевивка этим мышам РШМ-5 привела к снижению скорости роста опухоли и увеличению продолжительности их жизни. Но при переведении клеток РШМ-5 в культуру и воздействии на них неолактоферрина в дозе 10 и 100 мкг/мл он не оказывал эффекта на рост клеток опухоли (Кобляков и др., 2016).

Рекомбинантный чЛФ показал себя как стимулятор врожденного и адаптивного иммунитета. Неолактоферрин усиливал выработку интерлейкина  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), определял направление дифференцировки предшественников дендритных клеток, усиливал экспрессию факторов транскрипции, ответственных за дифференцировку Т-хелперных и Т-регуляторных клеток, стимулировал выработку интерферона- $\gamma$  и IL-4. Неолактоферрин показал иммуностропную активность, сдерживал развитие иммунных процессов по воспалительному пути. Обогащенный ионами железа, неолактоферрин усиливал синтез фактора некроза опухолей  $\alpha$ , проявлял провоспалительную активность (Черноусов и др., 2013).

Получены данные по эффективности и безопасности рчЛФ и перспективах его использования в педиатрической практике – в лечении недоношенных и маловесных детей, больных с хронической недостаточностью питания с целью профилактики инфекционных заболеваний и коррекции воспалительных изменений в организме ребенка, в т.ч. при острых респираторных вирусных и кишечных инфекциях. Предлагается применение рчЛФ в хирургической практике для уменьшения степени выраженности острого провоспалительного ответа, а также для профилактики инфекционных осложнений, особенно после полостных операций, в комплексном лечении детей с тяжелой генерализованной инфекцией и полиорганной недостаточностью, для профилактики внутрибольничных инфекций в детских стационарах (Боровик и др., 2014).

Как и природный ЛФ, рчЛФ тормозит формирование остеокластов, предупреждает разрушение костной ткани у овариоэктомированных животных. Клинические наблюдения продемонстрировали увеличение срока заживления костных травм при снижении уровня эндогенного ЛФ (Садчиков и др., 2016).

Системное введение рчЛФ экспериментальным крысам – моделям возрастного гиподинамизма с пониженным уровнем тестостерон/эстрадиолового индекса, в группе двухлетних крыс-самцов оказывало значительное стабилизирующее действие на биосинтез тестостерона, восстанавливая его уровень до физиологических значений у молодых крыс (Рудниченко и др., 2017). Рекомбинантный чЛФ предлагается использовать в виде биологических добавок или лекарственных форм и в следующих ситуациях:

- при дисбактериозах кишечника различной этиологии – как средство, стабилизирующее состав микрофлоры кишечника и нормализующее обменные процессы;
- при гастритах, колитах – как препарат, снижающий выраженность дистрофических и некротических явлений, язвообразования в кишечнике, препятствующий развитию воспаления в стенке кишки;
- для повышения уровня метаболизма и снижения массы тела.

Он может найти применение в спорте, в разных областях медицины, в частности – в стоматологии и гинекологии, при профилактике железодефицитных состояний, в дерматологии – в составе противовоспалительных мазей (ожоги, нарывы). Исследовано воздействие белка на биоплёнку на зубах, состоящую из микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности, вызывающих пародонтоз (Макеева и др., 2012; Царев и др., 2016).

## **Перспективы союзного проекта по получению рекомбинантного лактоферрина человека**

Несмотря на вышеизложенные положительные результаты, для использования рчЛФ в лекарственных формах потребуются обширные и длительные клинические испытания. Но и производство лактоферрина в пищевых целях затягивается из-за юридических, законодательных и финансовых сложностей (Гудок и Дейкин, 2017).

Все заинтересованные министерства и ведомства РФ приняли отчет о результатах контрольного мероприятия «Аудит эффективности использования средств бюджета Союзного государства, выделенных в 2009-2013 гг. на реализацию совместной программы «Разработка технологий и организация опытного производства высокоэффективных и биологически безопасных лекарственных средств нового поколения и пищевых продуктов на основе лактоферрина человека, получаемого из молока животных-продуцентов». В результате было рекомендовано внедрять продукт в производство. В 2014 году на Совмине Союзного государства отметили, что сделана важная для здравоохранения обеих стран работа. Производство рчЛФ в Великом Новгороде на базе компании «Лактис», несколько лет участвовавшей в научно-исследовательской работе по получению многофункционального белка, создании опытно-промышленной линии, получении уникального продукта, прошедшего доклинические испытания и сертификацию, в настоящее время заморожено.

В Беларуси владельцем продукции является Национальная академия наук, в России - Минобрнауки. После завершения программы в 2013 г. никаких попыток продвинуть её результаты в хозяйственный оборот страны Минобрнауки не делало.

Тем временем продолжение научно-исследовательских работ в лабораториях разных стран в мире приводит к совершенствованию технологий получения рчЛФ и открытию новых сфер применения его в био-медицинских технологиях.

### **Лактоферрин в новых технологиях получения трансгенных животных-продуцентов биологически активных белков с молоком**

Применение новых эндонуклеазных технологий (CRISPR/Cas9, TALEN, ZFN) с использованием механизма репарации ДНК методом гомологичной рекомбинации (HDR) открывает новые возможности для замещения у сельскохозяйственных животных генов эндогенных молочных белков генами таких же белков молока человека для улучшения их лечебных и потребительских качеств – из состава молока стало возможным исключить какой-либо белок, или заменить его другим, более ценным белком. Появляется возможность модификации самих молочных белков с целью повышения их питательной ценности и усвояемости или переработки в разные молочные продукты. Молочные белки можно модифицировать и для получения из них биологически активных пептидов в качестве вакцин (Whitelaw et al. 2016). Относительно недавно с использованием технологии TALEN китайскими учеными были получены козы, дающие «гуманизированное» молоко с улучшенными пищевыми характеристиками – с отсутствием эндогенного β-лактоглобулина (BLG), вместо которого с молоком экспрессируется лактоферрин человека. Экспрессия βЛГ в молоке F0  $BLG^{+/-}$  моноаллельных коз была значительно меньше, чем у коз дикого типа. В молоке коз  $BLG^{+/hLF}$  содержание чЛФ было 2,3-2,4 г/л, а в молоке  $BLG^{-/-}$  и  $BLG^{-/hLF}$  коз βЛГ отсутствовал. При этом уровень чЛФ в молоке  $BLG^{-/hLF}$  коз составлял 3,2 г/л (Cui et al., 2015; Zhu et al., 2016).

### **Заключение**

Лактоферрин, обладающий огромным лечебно-терапевтическим потенциалом, до настоящего времени практически не используется из-за дефицитности традиционного источника его получения (женское молоко в ранние сроки лактации). С 1980 года предпринимались попытки получения рчЛФ с использованием генно-инженерных технологий; наиболее успешные из них – это клонирование гена чЛФ в эукариотическом

микроорганизме *Aspergillus* (Agenix, США), создание трансгенного КРС (Pharming, Нидерланды) и трансгенных коз (совместный проект Союзного государства Россия-Белоруссия), продуцирующих молоко с чЛФ. Безопасность рчЛФ из молока трансгенных коров проверена в исследованиях на крысах. Хотя основной состав молока трансгенных и обычных коров практически не отличался, существуют определённые различия по профилю гликозилирования рчЛФ молока трансгенных коров и чЛФ грудного молока. К настоящему времени получен битрансгенный КРС с одновременной экспрессией с молоком двух биологически активных белков человека – ЛФ и лизоцима. Тем не менее, из-за угрозы бешенства, в Европе есть ограничения на использование коровьего молока. Козы не имеют общих с человеком заболеваний, поэтому полученные трансгенные козы имеют шансы стать основным продуцентом рчЛФ в мировой биотехнологии. Продолжение научно-исследовательских работ в лабораториях разных стран в мире приводит к совершенствованию технологий получения рчЛФ и открытию новых сфер применения его в биомедицинских технологиях. В связи с этим становится актуальным продолжение исследований по совместному проекту Беларуси и Российской Федерации с целью получения форм рчЛФ фармакологического назначения и более интенсивного их внедрения в медико-биологическую практику.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Борзенкова Н.В., Балабушевич Н.Г., Ларионова Н.И. Лактоферрин: физико-химические свойства. Биологические функции, системы доставки, лекарственные препараты и биологически активные добавки (обзор) // Биофармацевтический журнал. – 2010. – Т. 2. – № 3. – С. 3-19.
2. Боровик Т.Э., Яцык Г.В., Намазова-Баранова Л.С., Звонкова Н.Г., Семёнова Н.Н., Лукоянова О.Л., Садчиков П.Е., Гольдман И.Л., Садчикова Е.Р., Беляева И.А., Бушуева Т.В. Возможности использования лактоферрина человека в педиатрической практике // Вопросы современной педиатрии. – 2014. – Т. 13. – № 4. – С. 12-19.
3. Будевич А. Перспективы рекомбинантного лактоферрина человека, получаемого из молока коз-продуцентов // Наука и инновации. – 2016. – № 6. – С. 29-32.
4. Гудок А.А., Дейкин А.В. Лактоферрин - перспективы использования и анализ имеющихся результатов. // Russian Scientist. – 2017. – Т. 1. – № 1. – С. 3-12.
5. Каньшкова Т.Г., Бунева В.Н., Невинский Г.А. Лактоферрин и его биологические функции // Биохимия. – 2001. – Т. 66. – № 1. – С. 5-13.
6. Кобляков А.В., Антошина Е.Е., Горькова Т.Г., Гольдман И.Л., Труханова Л.С., Садчикова Е.Р. Тормозящее действие лактоферрина человека (неолактоферрина) на рост перевиваемой опухоли шейки матки мышей // Вопросы онкологии. – 2012. – Т. 58. – № 5. – С. 668-673.
7. Макеева И.М., Смирнова Т.Н., Черноусов А.Л., Романченко А.И., Гольдман И.Л., Садчикова Е.Р. Применение лактоферрина в комплексном лечении стоматологических заболеваний (обзор) // Стоматология. – 2012. – Т. 91. – № 4. – С. 66-71.
8. Орёл Н.М. Эффективность использования рекомбинантного лактоферрина для коррекции биохимических нарушений у крыс в моделях доксициклинового холестаза и аллоксанового диабета // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. – 2017. – № 2. – С. 72-79.
9. Рудниченко Ю. А., Лукашевич В. С.; Залуцкий И. В., Коррекция рекомбинантным лактоферрином человека гормонально-метаболических сдвигов возрастного гипогонадизма у крыс-самцов. // Биомедицина. – 2017. – № 1. – С. 52-62.
10. Садчиков П.Е., Гольдман И.Л., Намазова-Баранова Л.С., Яцык Г.В., Боровик Т.Э., Черноусов А.Д., Романченко А.И., Садчикова Е.Р., Лукоянова О.Л., Звонкова Н.Г., Беляева И.А. Лактоферрин в проблеме противoinфекционной защиты детей первого года жизни // Педиатрическая фармакология. – 2016а. – Т. 13. – № 6. – С. 607-613. doi: 10.15690/pf.v13i6.1677
11. Садчиков П.Е., Гольдман И.Л., Намазова-Баранова Л.С., Яцык Г.В., Боровик Т.Э., Черноусов А.Д., Романченко А.И., Садчикова Е.Р., Лукоянова О.Л., Звонкова Н.Г., Беляева И.А. Молекулярный механизм влияния лактоферрина на костеобразование. Критический обзор // Остеопороз и остеопатии. – 2016б. – № 3. – С. 12-22.

12. Царев В.Н., Гольдман И.Л., Садчикова Е.Р., Ипполитов Е.В., Подпорин М.С. Оценка влияния рекомбинантного лактоферрина человека на характеристики кривых роста бактериальных популяций патогенов // Национальные приоритеты России. – 2016. – Т. 20. – № 2. – С.130-133.
13. Черноусов А.Д., Никонова М.Ф., Шарова Н.И., Митин А.Н., Литвина М.М., Садчиков П.Е., Гольдман И.Л., Ярилин А.А., Садчикова Е.Р. Неолактоферрин как стимулятор врожденного и адаптивного иммунитета // Acta naturae. – 2013. – Т.5. – № 4. – С. 78-84.
14. Чиссов В.И., Якубовская Р.И., Немцова Е.Р., Бойко А.В., Сергеева Т.В., Осипова Н.А. Антибактериальный, антиоксидантный, иммуномодулирующий и антиканцерогенный препарат и способ его применения: патент РФ 2165769. – 2001.
15. Шейко Я.И., Балашенко Н.А., Квитко О.В., Конева И.И., Дромашко С.Е. Долговременная видеомикроскопия живых клеток *in vitro*: возможности и перспективы // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2016. – Т. 14. – № 1. – С. 79-91.
16. Adlerova L., Bartoskova A., Faldyna M.. Lactoferrin: a review // Veterinarni Medicina. – 2008. – Vol. 5. – No. 9. – P. 457-468.
17. Anand N., Kanwar R.K, Sehga R., Kanwar J.R. Antiparasitic and immunomodulatory potential of oral nanocapsules encapsulated lactoferrin protein against *Plasmodium berghei* // Nanomedicine (Lond.). – 2016. – Vol. 11. – No. 1. – P. 47-62.
18. Appel M.J, van Veen H.A., Vietsch H., Salaheddine M., Nuijens J.H., Ziere B., de Loos F. Sub-chronic (13-week) oral toxicity study in rats with recombinant human lactoferrin produced in the milk of transgenic cows // Food Chem. Toxicol. – 2006. – Vol. 44. – No.7. – P. 964-973.
19. Arcella A., Oliva M.A., Staffieri S., Alberti S., Grillea G., Madonna M., Bartolo M., Pavone L., Giangaspero F., Cantore G., and Frati A. In vitro and in vivo effect of human lactoferrin on glioblastoma growth // J. Neurosurg. – 2015. – Vol. 123. – P. 1026-1035.
20. Arias M., McDonald L.J., Haney E.F., Nazmi K., Bolscher J.G., Vogel H.J. Bovine and human lactoferrin peptides: chimeras and new cyclic analogs // Biometals. – 2014. – Vol. 27. – No. 5. – P. 935-948. doi: 10.1007/s10534-014-9753-4
21. Baker E.N., Baker H.M. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin // Biochimie. – 2009. – Vol. 91. – P. 3-10.
22. van Berkel P.H.C., Welling M.M., Geerts M., van Veen H.A., Ravensbergen B., Salaheddine M. et al. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows // Nat. Biotechnol. – 2002. – Vol. 20. – P. 484-487.
23. Bruni N., Capucchio M.T., Biasibetti E., Pessione E., Cirrincione S., Giraud L., Corona A., Dosio F. Antimicrobial activity of lactoferrin-related peptides and applications in human and veterinary // Medicine Molecules. – 2016. – Vol. 21. – No. 6. – P. 752. doi:10.3390/molecules21060752
24. Chahardoli M., Fazeli A., Ghabooli M. Recombinant production of bovine lactoferrin-derived antimicrobial peptide in tobacco hairy roots expression system // Plant. Physiol. Biochem. – 2018. – Vol. 123. – P. 414-421. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.12.037.
25. Chea C., Miyauchi M., Inubushi T., Febriyanti A.N., Subarnbhesaj A., Nguyen P.T., Shrestha M., Haing S., Ohta K., Takata T.. Molecular mechanism of inhibitory effects of bovine lactoferrin on the growth of oral squamous cell carcinoma // PLoS ONE. – 2018. – Vol. 13. – No. 1. – e0191683. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191683>>
26. Chen H.Y., Mollstedt O., Tsai M.H., Kreider R.B. Potential clinical applications of multi-functional milk proteins and peptides in cancer management // Curr. Med. Chem. – 2014. – Vol. 21. – No. 21. – P. 2424-2437.
27. Cooper C.A., Nelson K.M., Maga E.A., Murray J.D. Consumption of transgenic cows' milk containing human lactoferrin results in beneficial changes in the gastrointestinal tract and systemic health of young pigs // Transgenic Res. – 2013. – Vol. 22. – No. 3. – P. 571-578. doi: 10.1007/s11248-012-9662-7.
28. Cooper C.A., Maga E.A., Murray J.D. Production of human lactoferrin and lysozyme in the milk of transgenic dairy animals: past, present, and future // Transgenic Res. – 2015. – Vol. 24. – No. 4. – P. 605-614. doi: 10.1007/s11248-015-9885-5
29. Cui C., Song Y., Liu J., Ge H., Li Q., Huang H., Hu L., Zhu H., Jin Y., Zhang Y. Gene targeting by TALEN-induced homologous recombination in goats directs production of  $\beta$ - lactoglobulin-free, high-human lactoferrin milk // Scientific reports. – 2015. – Vol. 5. – No. 10482. doi:10.1038/srep10482
30. Donovan S.M. The role of lactoferrin in gastrointestinal and immune development and function: a preclinical perspective // J. Pediatr. – 2016. – Vol. 173. – P. 16-28. doi: 10.1016/j.jpeds.2016.02.072

31. Drago-Serrano M.E., Campos-Rodriguez R., Carrero J.C., de la Garza M. Lactoferrin and peptide-derivatives: antimicrobial agents with potential use in nonspecific immunity modulation // *Curr. Pharm. Des.* – 2018. – Vol. 24. – No.10. – P. 1067-1078. doi: 10.2174/1381612824666180327155929
32. Fernandes K.E., Carter D.A. The antifungal activity of lactoferrin and its derived peptides: mechanisms of action and synergy with drugs against fungal pathogens // *Front. Microbiol.* – 2017. – Vol. 8. – No. 2. doi: 10.3389/fmicb.2017.00002 <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00002>>
33. García-Montoya I.A., Cendón T.S., Arévalo-Gallegos S., Rascón-Cruz Q. Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2012. – Vol. 1820. – No. 3. – P. 226-236.
34. Giansanti F., Panella G., Leboffe L., Antonini G. Lactoferrin from milk: nutraceutical and pharmacological properties // *Pharmaceuticals.* – 2016. – Vol. 9. – No. 4. – P. – 61. doi:10.3390/ph9040061
35. Giansanti F., Panella G., Arienzo A., Leboffe L., Antonini G. Nutraceutical peptides from lactoferrin // *J. Adv. Dairy Res.* – 2018. – Vol. 6. – No. 1. –P. 199. doi: 10.4172/2329-888X.1000199
36. Goldman I., Deikin A., Sadchikova E. Human lactoferrin can be alternative to antibiotics // In: *Proceedings of the world medical conference.* — WSEAS Press Malta, 2010. – P. 27-38.
37. Goldman I.L., Georgieva S.G., Gurskiy Ya.G., Krasnov A.N., Deykin A.V., Popov A.N., Ermolkevich T.G., Budzevich A.I., Chernousov A.D., Sadchikova E.R. Production of human lactoferrin in animal milk // *Biochemistry and Cell Biology.* – 2012. – Vol. 90. – No. 3. – P. 513-519. doi: 10.1139/o11-088
38. Gonzalez-Chavez S. A., Arevalo-Gallegos S., and Rascon-Cruz Q. Lactoferrin: Structure, function and applications // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2009. – Vol. 33. – No. 3. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857908003440?via%3Dihub>>
39. Hyvönen P., Suojala L., Haaranen J., von Wright A., Pyörälä S. Human and bovine lactoferrins in the milk of recombinant human lactoferrin-transgenic dairy cows during lactation // *Biotechnol. J.* – 2006. – Vol.1. – No. 4. – P. 410-412.
40. Hu W., Zhao J., Wang J., Yu T., Wang J., Li N. Transgenic milk containing recombinant human lactoferrin modulates the intestinal flora in piglets // *Biochem. Cell Biol.* – 2012. – Vol. 90. – P. 485-496.
41. Hu L., Gao C.H., Hong C., Zhong Q., Dong H.L., Gao X.M. Expression, purification, and breast cancer cell inhibiting effect of recombinant human lactoferrin C-lobe // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2016. – Vol. 80. – No. 2. – P. 257-263. doi: 10.1080/09168451.2015.1088376
42. Kaiser G.G., Mucci N.C., González V., Sánchez L., Parrón J.A., Pérez M.D., Calvo M., Aller J.F., Hozbor F.A., Mutto A.A. Detection of recombinant human lactoferrin and lysozyme produced in a bitransgenic cow // *J. Dairy. Sci.* – 2017. – Vol. 100. – No. 3. – P. 1605-1617. doi: 10.3168/jds.2016-11173
43. Kang J.F., Li X.L., Zhou R.Y., Li L.-H., Feng F.-J., Guo X.-L. Bioinformatics analysis of lactoferrin gene for several species // *Biochemical Genetics.* – 2008. – Vol. 46. – No. 5-6. – 312-322.
44. Kanwar J.R., Palmano K.P., Sun X., Kanwar R.K., Gupta R., Haggarty N., Rowan A., Ram S., Krissansen G.W. 'Iron-saturated' lactoferrin is a potent natural adjuvant for augmenting cancer chemotherapy // *Immunol. Cell Boil.* – 2008. – Vol. 86. – P. 277-288.
45. Kanwar J.R., Samarasinghe R.M., Sehgal R., Kanwar R.K. Nano-lactoferrin in diagnostic, imaging and targeted delivery for cancer and infectious diseases // *J. Cancer Sci. Ther.* – 2012. – Vol. 4. – P. 31-42. doi:10.4172/1948-5956.1000107
46. Kanyshkova T.G., Babina S.E., Semenov D.V., Isaeva N., Vlassov A.V., Neustroev K.N., Kul'minskaya A.A., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Multiple enzymic activities of human milk lactoferrin // *Eur. J. Biochem.* – 2003. – Vol. 270. – P. 3353-3361.
47. Leboffe L., Giansanti F., Antonini G. Antifungal and antiparasitic activities of lactoferrin // *Anti-infect. agents med. chem.* – 2009. – Vol. 8. – P. 114-127.
48. Legrand D., Ellass E., Carpentier M., Mazurier J. Lactoferrin: A modulator of immune and inflammatory responses // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2005. – Vol. 62. – P. 2549-2559.
49. Legrand D., Pierce A., Ellass E., Carpentier M., Mariller C., Mazurier J. Lactoferrin structure and functions // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2008. – Vol. 606. – P. 163-194.
50. Legrand D., Mazurier J. A critical review of the roles of host lactoferrin in immunity // *Biometals.* – 2010. – Vol. 23. – P. 365-376.
51. Li Q., Hu W., Zhao J., Wang J., Dai Y., Zhao Y., Meng Q., Li N. Supplementation transgenic cow's milk containing recombinant human lactoferrin enhances systematic and intestinal immune responses in piglets // *Mol. Biol. Rep.* – 2014. – Vol. 41. – No. 4. – P. 119-128. doi: 10.1007/s11033-014-3061-5



52. Li Q., Zhao J., Hu W., Wang J., Yu T., Dai Y., Li N. Effects of recombinant human lactoferrin on osteoblast growth and bone status in piglets // *Anim. Biotechnol.* – 2018. – Vol. 3. – No. 2. – P. 90-99. doi: 10.1080/10495398.2017.1313269.
53. Lizzi A.R., Carnicelli V., Clarkson M.M., Di Giulio A., Oratore A. Lactoferrin derived peptides: mechanisms of action and their perspectives as antimicrobial and antitumoral agents // *Medicinal Chemistry* . – 2009. – Vol. 9. – P. 687-695.
54. Mayeur S., Spahis S., Pouliot Y., Levy E. Lactoferrin, a pleiotropic protein in health and disease // *Antioxid. Redox Signal.* – 2016. – Vol. 24. – P. 813-836. doi: 10.1089/ars.2015.6458
55. Onishi J., Roy M.K., Juneja L.R., Watanabe Y., Tamai Y. A lactoferrin-derived peptide with cationic residues concentrated in a region of its helical structure induces necrotic cell death in a leukemic cell line (HL-60) // *J. Pept. Sci.* – 2008. – Vol. 14. – P. 1032-1038. <<https://doi.org/10.1002/psc.1039>>
56. Parc A.L., Karav S., Rouquie Â. C., Maga E.A., Bunyatrchata A., Barile D. Characterization of recombinant human lactoferrin N-glycans expressed in the milk of transgenic cows // *PLoS ONE*. – 2017. – Vol. 12. – No. 2. – e0171477. doi: 10.1371/journal.pone.0171477
57. Rodrigues L., Teixeira J., Schmitt F., Paulsson M., Månsson H.L. Lactoferrin and cancer disease prevention // *Critical reviews in food science and nutrition*. – 2009. – Vol. 49. – P. 203-217. doi: 10.1080/10408390701856157.
58. Rusciano D., Pezzino S., Olivieri M., Cristaldi M., Gagliano C., Lupo G., Anfuso C.D. Age-related dry eye lactoferrin and lactobionic acid // *Ophthalmic Res.* – 2018. – Vol. 60. – P. 94-99. <<https://doi.org/10.1159/000489093>>
59. Seyfert H.M., Tuckoricz A., Interthal H., Koczan D., Hobom G. Structure of the bovine lactoferrin-encoding gene and its promoter // *Gene*. – 1994. – Vol. 143. – No. 2. – P. 265-269.
60. Silva T., Magalhães B., Maia S., Gomes P., Nazmi K., Bolscher J.G. M., Rodrigues P.N., Bastos M., Gomesa M.S. Killing of *Mycobacterium avium* by lactoferricin peptides: improved activity of arginine- and d-amino-acid-containing molecules // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2014. – Vol. 58. – No. 6. – P. 3461-3467.
61. Simojoki H., Hyvönen P., Orro T., Pyörälä S. High concentration of human lactoferrin in milk of rhLf-transgenic cows relieves signs of bovine experimental *Staphylococcus chromogenes* intramammary infection // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 2010. – Vol. 15. – No. 136. – P. 265-271. doi: 10.1016/j.vetimm.2010.03.017.
62. Tomita M., Wakabayashi H., Shin K., Yamauchi K., Yaeshima T., Iwatsuki K. Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications // *Biochimie*. – 2008. – Vol. 91. – No. 1. – P. 52-57. doi: 10.1016/j.biochi.2008.05.021
63. Valenti P., Rosa L., Capobianco D., Lepanto M.S., Schiavi E., Cutone A., Paesano R., Mastromarino P. Role of lactobacilli and lactoferrin in the mucosal cervicovaginal defense // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 376. doi: 10.3389/fimmu.2018.00376
64. van Veen H.A., Geerts M.E., van Berkel P.H., Nuijens J.H. The role of N-linked glycosylation in the protection of human and bovine lactoferrin against tryptic proteolysis // *Eur. J. Biochem.* – 2004. – Vol. 271. – No. 4. – P. 678-684. doi: 10.1111/j.1432-1033.2003.03965.x
65. Velusamy S.K., Fine D.H., Velliyagounder K. Prophylactic effect of human lactoferrin against *Streptococcus mutans* bacteremia in lactoferrin knockout mice // *Microbes Infect.* – 2014. – Vol. 16. – No. 9. – P. 762-767. doi: 10.1016/j.micinf.2014.07.009
66. Wakabayashi H., Uchida K., Yamauchi K., Teraguchi S., Hayasawa H., Yamaguchi H. Lactoferrin given in food facilitates dermatophytosis cure in guinea pig models // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2000. – Vol. 46. – No. 4. – P. 595-602.
67. Wang M., Sun Z., Yu T., Ding F., Li L., Wang X., Fu M., Wang H., Huang J., Li N. & Dai Y. Large-scale production of recombinant human lactoferrin from high-expression, marker-free transgenic cloned cows // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – No.1. – P. 10733. doi:10.1038/s41598-017-11462-z
68. Whitelaw C.B.A., Joshi A., Kumar S., Lillico S.G., Proudfoot C. Genetically engineering milk // *J. Dairy Res.* – 2016. – Vol. 83. – No. 1. – P. 3-11. doi:10.1017/s0022029916000017
69. Wolf J.S., Li G., Varadhachary A., Petrak K., Schneyer M., Li D., Ongkasuwan J., Zhang X., Taylor R.J., Strome S.E., O'Malley B.W.Jr. Oral lactoferrin results in T cell-dependent tumor inhibition of head and neck squamous cell carcinoma in vivo // *Clin. Cancer Res.* – 2007. – Vol. 13. – No. 5. – P. 1601-1610.
70. Zhu H., Liu J., Cui C., Song Y., Ge H., Hu L., Li Q., Jin Y., Zhang Y. Targeting human  $\alpha$ -lactalbumin gene insertion into the goat  $\beta$ -lactoglobulin locus by talen-mediated homologous recombination // *PLoS ONE*. – 2016. – Vol. 11. – No. 6. – e0156636. doi:10.1371/journal.pone.0156636

## REFERENCES

1. Adlerova L., Bartoskova A., Faldyna M.. Lactoferrin: a review. *Veterinarni Medicina - Veterinary medicine*. 2008, 5(9): 457-468.
2. Anand N., Kanwar R.K, Sehga R., Kanwar J.R. Antiparasitic and immunomodulatory potential of oral nanocapsules encapsulated lactoferrin protein against *Plasmodium berghei*. *Nanomedicine (Lond.)*. 2016, 11(1): 47-62.
3. Appel M.J, van Veen H.A., Vietsch H., Salaheddine M., Nuijens J.H., Ziere B., de Loos F. Sub-chronic (13-week) oral toxicity study in rats with recombinant human lactoferrin produced in the milk of transgenic cows. *Food Chem. Toxicol.* 2006, 44(7): 964-973.
4. Arcella A., Oliva M.A., Staffieri S., Alberti S., Grillea G., Madonna M., Bartolo M., Pavone L., Giangaspero F., Cantore G., Frati A. In vitro and in vivo effect of human lactoferrin on glioblastoma growth. *J. Neurosurg.* 2015, 123: 1026-1035.
5. Arias M., McDonald L.J., Haney E.F., Nazmi K., Bolscher J.G., Vogel H.J. Bovine and human lactoferrin peptides: chimeras and new cyclic analogs. *Biometals*. 2014, 27(5): 935-948. doi: 10.1007/s10534-014-9753-4
6. Baker E.N., Baker H.M. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. *Biochimie*. 2009, 91: 3-10.
7. Borzenkova N.V., Balabushevich N.G., Larionova N.I. [Lactoferrin: physicochemical properties. Biological functions, delivery systems, drugs and dietary supplements (review)]. *Biofarmatsevticheskii zhurnal - Biopharmaceutical Journal*. 2010, 2(3): 3-19. (In Russian)
8. Borovik T.E., Yatsyk G.V., Namazova-Baranova L.S., Zvonkova N.G., Semenova N.N., Lukoyanova O.L., Sadchikov P.E., Gol'dman I.L., Sadchikova E.R., Belyaeva I.A., Bushueva T.V. [The possibility of using human lactoferrin in pediatric practice]. *Voprosy sovremennoi pediatrii - Questions of modern pediatrics*. 2014, 13(4): 12-19. (In Russian)
9. Budevich A.I. [Perspectives of recombinant human lactoferrin derived from goat-producing milk]. *Nauka i innovatsii - Science and innovation*. 2016, 6: 29-32. (In Russian)
10. van Berkel P.H.C., Welling M.M., Geerts M., van Veen H.A., Ravensbergen B., Salaheddine M. et al. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nat. Biotechnol.* 2002, 20: 484-487.
11. Bruni N., Capucchio M.T., Biasibetti E., Pessione E., Cirrincione S., Giraud L., Corona A., Dosio F. Antimicrobial activity of lactoferrin-related peptides and applications in human and veterinary. *Medicine Molecules*. 2016, 21(6): 752. doi:10.3390/molecules21060752
12. Chahardoli M., Fazeli A., Ghabooli M. Recombinant production of bovine Lactoferrin-derived antimicrobial peptide in tobacco hairy roots expression system. *Plant. Physiol. Biochem.* 2018, 123: 414-421. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.12.037
13. Chea C., Miyauchi M., Inubushi T., Febriyanti A.N., Subarnbhesaj A., Nguyen P.T., Shrestha M., Haing S., Ohta K., Takata T.. Molecular mechanism of inhibitory effects of bovine lactoferrin on the growth of oral squamous cell carcinoma. *PLoS ONE*. 2018. 13(1): e0191683. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191683>>
14. Chen H.Y., Mollstedt O., Tsai M.H., Kreider R.B. Potential clinical applications of multi-functional milk proteins and peptides in cancer management. *Curr. Med. Chem.* 2014, 21(21): 2424-2437.
15. Chernousov A.D., Nikonova M.F., Sharova N.I., Mitin A.N., Litvina M.M., Sadchikov P.E., Gol'dman I.L., Yarinin A.A., Sadchikova E.R. [Neolactoferrin as a stimulator of innate and adaptive immunity]. *Acta naturae*. 2013, 5(4): 78-84. (In Russian)
16. Chissov V.I., Yakubovskaya R.I., Nemtsova E.R., Boiko A.V., Sergeeva T.V., Osipova N.A. *Antibakterial'nyi, antioksidantnyi, immunomoduliruyushchii i antikantserogennyi preparat i sposob ego primeneniya* (Antibacterial, antioxidant, immunomodulatory and anticarcinogenic drug and method for its use). RF patent No. 2165769, 2001. (In Russian)
17. Cooper C.A., Nelson K.M., Maga E.A., Murray J.D. Consumption of transgenic cows' milk containing human lactoferrin results in beneficial changes in the gastrointestinal tract and systemic health of young pigs. *Transgenic Res.* 2013, 22(3): 571-578. doi: 10.1007/s11248-012-9662-7. Epub 2012 Oct 17.
18. Cooper C.A., Maga E.A., Murray J.D. *Transgenic Res.* 2015, 24(4): 605-614. doi: 10.1007/s11248-015-9885-5.

19. Cui C., Song Y., Liu J., Ge H., Li Q., Huang H., Hu L., Zhu H., Jin Y., Zhang Y. Gene targeting by TALEN-induced homologous recombination in goats directs production of  $\beta$ -lactoglobulin-free, high-human lactoferrin milk. *Scientific reports*. 2015, 5: 10482. doi:10.1038/srep10482
20. Donovan S.M. The role of lactoferrin in gastrointestinal and immune development and function: a preclinical perspective. *J. Pediatr*. 2016, 173(Suppl): 16-28. doi: 10.1016/j.jpeds.2016.02.072
21. Drago-Serrano M.E., Campos-Rodriguez R., Carrero J.C., de la Garza M. Lactoferrin and peptide-derivatives: antimicrobial agents with potential use in nonspecific immunity modulation. *Curr. Pharm. Des.* 2018, 24(10): 1067-1078. doi: 10.2174/1381612824666180327155929.
22. Fernandes K.E., Carter D.A. The antifungal activity of lactoferrin and its derived peptides: mechanisms of action and synergy with drugs against fungal pathogens. *Front. Microbiol.* 2017, 8(2). doi: 10.3389/fmicb.2017.00002 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5241296/>>
23. García-Montoya I.A., Cendón T.S., Arévalo-Gallegos S., Rascón-Cruz Q. Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012, 1820(3): 226-236.
24. Giansanti F., Panella G., Leboffe L., Antonini G. Lactoferrin from milk: nutraceutical and pharmacological properties. *Pharmaceuticals*. 2016, 9(4): 61. doi:10.3390/ph9040061
25. Giansanti F., Panella G., Arienzo A., Leboffe L., Antonini G. Nutraceutical peptides from lactoferrin. *J. Adv. Dairy Res.* 2018, 6(1): 199. doi: 10.4172/2329-888X.1000199
26. Goldman I., Deikin A., Sadchikova E. Human lactoferrin can be alternative to antibiotics. In: *Proceedings of the world medical conference*. WSEAS Press Malta, 2010, P. 27-38.
27. Goldman I.L., Georgieva S.G., Gurskiy Ya.G., Krasnov A.N., Deykin A.V., Popov A.N., Ermolkevich T.G., Budzevich A.I., Chernousov A.D., Sadchikova E.R. Production of human lactoferrin in animal milk. *Biochemistry and Cell Biology*. 2012, 90(3): 513-519. doi: 10.1139/o11-088
28. Gonzalez-Chavez S.A., Arevalo-Gallegos S., and Rascon-Cruz Q. Lactoferrin: structure, function and applications. *Int J Antimicrob Agents*. 2009, 33(3): 01.e1-301e8. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.07.020
29. Gudok A.A., Deikin A.V. [Lactoferrin - prospects for use and analysis of available results]. *Russian Scientist*. 2017, 1(1): 3-12. (In Russian)
30. Hyvönen P., Suojala L., Haaranen J., von Wright A., Pyörälä S. Human and bovine lactoferrins in the milk of recombinant human lactoferrin-transgenic dairy cows during lactation. *Biotechnol. J.* 2006, 1(4): 410-412.
31. Hu W., Zhao J., Wang J., Yu T., Wang J., Li N. Transgenic milk containing recombinant human lactoferrin modulates the intestinal flora in piglets. *Biochem. Cell Biol.* 2012, 90: 485-496.
32. Hu L., Gao C.H., Hong C., Zhong Q., Dong H.L., Gao X.M. Expression, purification, and breast cancer cell inhibiting effect of recombinant human lactoferrin C-lobe. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2016, 80(2): 257-263. doi: 10.1080/09168451.2015.1088376
33. Kaiser G.G., Mucci N.C., González V., Sánchez L., Parrón J.A., Pérez M.D., Calvo M., Aller J.F., Hozbor F.A., Mutto A.A. Detection of recombinant human lactoferrin and lysozyme produced in a bitransgenic cow. *J. Dairy. Sci.* 2017, 100(3): 1605-1617. doi: 10.3168/jds.2016-11173
34. Kang J.F., Li X.L., Zhou R.Y., Li L.-H., Feng F.-J., Guo X.-L. Bioinformatics analysis of lactoferrin gene for several species. *Biochemical Genetics*. 2008, 46(5-6): 312-322.
35. Kanwar J.R., Palmano K.P., Sun X., Kanwar R.K., Gupta R., Haggarty N., Rowan A., Ram S., Krissansen G.W. 'Iron-saturated' lactoferrin is a potent natural adjuvant for augmenting cancer chemotherapy. *Immunol. Cell Biol.* 2008, 86: 277-288.
36. Kanwar J.R., Samarasinghe R.M., Sehgal R., Kanwar R.K. Nano-lactoferrin in diagnostic, imaging and targeted delivery for cancer and infectious diseases. *J. Cancer Sci. Ther.* 2012, 4: 31-42. doi:10.4172/1948-5956.1000107
37. Kanyshkova T.G., Babina S.E., Semenov D.V., Isaeva N., Vlassov A.V., Neustroev K.N., Kul'minskaya A.A., Buneva V.N. and Nevinsky G.A. Multiple enzymic activities of human milk lactoferrin. *Eur. J. Biochem.* 2003, 270: 3353-3361.
38. Kanyshkova T.G., Buneva V.N., Nevinskii G.A. [Lactoferrin and its biological functions]. *Biokhimiya - Biochemistry*. 2001, 66(1): 5-13. (In Russian)
39. Koblyakov A.V., Antoshina E.E., Gor'kova T.G., Gol'dman I.L., Trukhanova L.S., Sadchikova E.R. [The inhibitory effect of human lactoferrin (neolactoferrin) on the growth of a transplanted cervical tumor of mice]. *Voprosy onkologii - Oncology issues*. 2012, 58(5): 668-673. (In Russian)
40. Leboffe L., Giansanti F., Antonini G. Antifungal and antiparasitic activities of lactoferrin. *Anti-Infect. Agents Med. Chem.* 2009, 8: 114-127.

41. Legrand D., Elass E., Carpentier M., Mazurier J. Lactoferrin: A modulator of immune and inflammatory responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 2005, 62: 2549-2559.
42. Legrand D., Pierce A., Elass E., Carpentier M., Mariller C., Mazurier J. Lactoferrin structure and functions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008, 606: 163-194.
43. Legrand D., Mazurier J. A critical review of the roles of host lactoferrin in immunity. *Biometals.* 2010, 23: 365-376.
44. Li Q., Hu W., Zhao J., Wang J., Dai Y., Zhao Y., Meng Q., Li N. Supplementation transgenic cow's milk containing recombinant human lactoferrin enhances systematic and intestinal immune responses in piglets. *Mol. Biol. Rep.* 2014, 41(4): 119-128. doi: 10.1007/s11033-014-3061-5
45. Li Q., Zhao J., Hu W., Wang J., Yu T., Dai Y., Li N. Effects of recombinant human lactoferrin on osteoblast growth and bone status in piglets. *Anim. Biotechnol.* 2018, 3(2): 90-99. doi: 10.1080/10495398.2017.1313269
46. Lizzi A.R., Carnicelli V., Clarkson M.M., Di Giulio A., Oratore A. Lactoferrin derived peptides: mechanisms of action and their perspectives as antimicrobial and antitumoral agents. *Medicinal Chemistry.* 2009, 9: 687-695.
47. Makeeva I.M., Smirnova T.N., Chernousov A.L., Romanchenko A.I., Gol'dman I.L., Sadchikova E.R. [The use of lactoferrin in the complex treatment of dental diseases: a review]. *Stomatologiya - Dentistry.* 2012, 91(4): 66-71. (In Russian)
48. Mayeur S., Spahis S., Pouliot Y., Levy E. Lactoferrin, a pleiotropic protein in health and disease. *Antioxid. Redox Signal.* 2016, 24: 813-836. doi: 10.1089/ars.2015.6458
49. Onishi J., Roy M.K., Juneja L.R., Watanabe Y., Tamai Y. A lactoferrin-derived peptide with cationic residues concentrated in a region of its helical structure induces necrotic cell death in a leukemic cell line (HL-60). *J. Pept. Sci.* 2008, 14: 1032-1038. <<https://doi.org/10.1002/psc.1039>>
50. Orel N.M. [Efficiency of using recombinant lactoferrin for the correction of biochemical disorders in rats in models of doxycycline cholestasis and alloxan diabetes]. *Zhurnal Belorusskogo gos. Universiteta. Biologiya - Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2017, 2: 72-79. (In Russian)
51. Parc A.L., Karav S., Rouquie A. C., Maga E.A., Bunyatratshata A., Barile D. Characterization of recombinant human lactoferrin N-glycans expressed in the milk of transgenic cows. *PLoS ONE.* 2017, 12(2): e0171477. doi: 10.1371/journal.pone.0171477
52. Rodrigues L., Teixeira J., Schmitt F., Paulsson M., Månsson H.L. Lactoferrin and cancer disease prevention. *Critical reviews in food science and nutrition.* 2009, 49: 203-217. doi: 10.1080/10408390701856157
53. Rudnichenko Yu.A., Lukashevich V.S.; Zalutskii I.V. [Correction of human recombinant lactoferrin with hormonal and metabolic shifts of age-related hypogonadism in male rats]. *Biomeditsina - Biomedicine.* 2017, 1: 52-62. (In Russian)
54. Rusciano D., Pezzino S., Olivieri M., Cristaldi M., Gagliano C., Lupo G., Anfuso C.D. Age-related dry eye lactoferrin and lactobionic acid. *Ophthalmic Res.* 2018, 60: 94-99. <<https://doi.org/10.1159/000489093>>
55. Sadchikov P.E., Goldman I.L., Razin S.V., Chernousov A.D., Alekseeva L.I., Sadchikova E.R. [The molecular mechanism of lactoferrin influence on bone formation: a review]. *Osteoporoz i osteopatii - Osteoporosis and Osteopathy.* 2016, 3: 12-22. (In Russian)
56. Sadchikov P.E., Gol'dman I.L., Namazova-Baranova L.S., Yatsyk G.V., Borovik T.E., Chernousov A.D., Romanchenko A.I., Sadchikova E.R., Lukyanova O.L., Zvonkova N.G., Belyaeva I.A. [Lactoferrin in the problem of anti-infective protection of children in the first year of life]. *Pediatriceskaya farmakologiya - Pediatric Pharmacology.* 2016, 13(6): 607-613. doi: 10.15690/pf.v13i6.1677 (In Russian)
57. Seyfert H.M., Tuckoricz A., Interthal H., Koczan D., Hobom G. Structure of the bovine lactoferrin-encoding gene and its promoter. *Gene.* 1994, 143(2): 265-269.
58. Sheiko Ya.I., Balashenko N.A., Kvitko O.V., Koneva I.I., Dromashko S.E. [Long-term living cell microscopy of in vitro: opportunities and prospects]. *Visn. Ukr. tov-va genetikiv i selektsioneriv - Herald of Ukrainian Association of Geneticists and Breeders.* 2016, 14(1): 79-91. (In Russian)
59. Silva T., Magalhães B., Maia S., Gomes P., Nazmi K., Bolscher J.G.M., Rodrigues P.N., Bastos M., Gomes M.S. Killing of Mycobacterium avium by lactoferricin peptides: improved activity of arginine- and d-amino-acid-containing molecules. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2014, 58(6): 3461-3467.

60. Simojoki H., Hyvönen P., Orro T., Pyörälä S. High concentration of human lactoferrin in milk of rhLf-transgenic cows relieves signs of bovine experimental *Staphylococcus chromogenes* intramammary infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2010, 136(3-4): 265-271. doi: 10.1016/j.vetimm.2010.03.017
61. Tomita M., Wakabayashi H., Shin K., Yamauchi K., Yaeshima T., Iwatsuki K. Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. *Biochimie.* 2008, 91(1): 52-57. doi:10.1016/j.biochi.2008.05.021
62. Tsarev V.N., Gol'dman I.L., Sadchikova E.R., Ippolitov E.V., Podporin M.S. [Evaluation of the effect of recombinant human lactoferrin on the characteristics of the growth curves of bacterial populations of pathogens]. *Natsional'nye prioritety Rossii - National priorities of Russia.* 2016, 20(2): 130-133. (In Russian)
63. Valenti P., Rosa L., Capobianco D., Lepanto M.S., Schiavi E., Cutone A., Paesano R., Mastromarino P. Role of lactobacilli and lactoferrin in the mucosal cervicovaginal defense. *Front. Immunol.* 2018, 9: 376. doi: 10.3389/fimmu.2018.00376
64. van Veen H.A., Geerts M.E., van Berkel P.H., Nuijens J.H. The role of N-linked glycosylation in the protection of human and bovine lactoferrin against tryptic proteolysis. *Eur. J. Biochem.* 2004, 271(4): 678-684. doi: 10.1111/j.1432-1033.2003.03965.x
65. Velusamy S.K., Fine D.H., Velliyagounder K. Prophylactic effect of human lactoferrin against *Streptococcus mutans* bacteremia in lactoferrin knockout mice. *Microbes Infect.* 2014, 16(9): 762-767. doi: 10.1016/j.micinf.2014.07.009
66. Wakabayashi H., Uchida K., Yamauchi K., Teraguchi S., Hayasawa H., Yamaguchi H. Lactoferrin given in food facilitates dermatophytosis cure in guinea pig models. *J. Antimicrob. Chemother.* 2000, 46(4): 595-602.
67. Wang M., Sun Z., Yu T., Ding F., Li L., Wang X., Fu M., Wang H., Huang J., Li N., Dai Y. Large-scale production of recombinant human lactoferrin from high-expression, marker-free transgenic cloned cows. *Scientific Reports.* 2017, 7(1): 10733. doi: 10.1038/s41598-017-11462-z
68. Whitelaw C.B.A., Joshi A., Kumar S., Lillico S.G., Proudfoot C. Genetically engineering milk. *J. Dairy Res.* 2016, 83(1): 3-11. doi: 10.1017/s0022029916000017
69. Wolf J.S., Li G., Varadhachary A., Petrak K., Schneyer M., Li D., Ongkasuwan J., Zhang X., Taylor R.J., Strome S.E., O'Malley B.W. Jr. Oral lactoferrin results in T cell-dependent tumor inhibition of head and neck squamous cell carcinoma in vivo. *Clin. Cancer Res.* 2007, 13(5): 1601-1610.
70. Zhu H., Liu J., Cui C., Song Y., Ge H., Hu L., Li Q., Jin Y., Zhang Y. Targeting human  $\alpha$ -lactalbumin gene insertion into the goat  $\beta$ -lactoglobulin locus by TALEN-mediated homologous recombination. *PLoS ONE.* 2016, 11(6): e0156636. doi:10.1371/journal.pone.0156636

### **Problems and prospects of using recombinant human lactoferrin and its derivatives**

Trubitsina T.P., Koloskova E.M., Yezerskii V.A., Maksimenko S.V.,  
Belova N.V., Kut'in I.V., Ryabykh V.P.

*Institute of Animal Physiology, Biochemistry and Nutrition - Branch of Ernst Federal  
Science Center for Animal Husbandry, Borovsk, Kaluga oblast, Russian Federation*

**ABSTRACT.** In connection with the appearance on the world market of transgenic agricultural animals (goats, cows) producing deficient medicinal substances with milk, including human lactoferrin, questions are being actively discussed on the possible directions of development of this field of research and ensuring the safety of the products obtained. As shown by numerous studies, lactoferrin (human and bovine, recombinant and native), has a great therapeutic potential, which until now is practically not used because of the scarcity of the traditional source of its production (human milk in the early periods of lactation). The purpose of this work is to systematize data on the physicochemical properties and biological functions of human lactoferrin (hLF) and its recombinant forms (rhLF) used for diagnostic and therapeutic purposes, as well as to evaluate the prospects for solving the problem of LF deficiency based on new biotechnologies. Since 1980, attempts have been made to obtain rhLF using genetic engineering technologies; the most successful of them are cloning of the hLF gene in the eukaryotic microorganism *Aspergillus* (Agenix, USA), the creation of transgenic cattle (Pharming, the Netherlands) and transgenic goats (a joint project of the Union State of Russia-Belarus), producing milk with hLF. The safety of rhLF from transgenic cows' milk has been tested in rats. Although the main composition of the milk of transgenic and ordinary cows was practically the same, certain differences were found in the glycosylation profile of the rhLF of the milk of transgenic cows and hLF of breast milk. The obtained bitransgenic cattle with simultaneous with milk expression of two biologically active human proteins - LF and lysozyme. Due to the threat of rabies, there are restrictions on the use of cow's milk in Europe. Goats have no illnesses common to humans. The continuation of research work in laboratories in different countries in the world leads to the improvement of technologies for obtaining rhLF and to the discovery of new areas of its application in bio-medical technologies. In this regard, the continuation of research on a joint project of Belarus and the Russian Federation with the aim of obtaining and using rhLF forms of pharmacological purpose becomes relevant.

*Keywords: genetic engineering, recombinant proteins, human lactoferrin, bovine lactoferrin, human recombinant lactoferrin*

**Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh – Problems of Productive Animal Biology, 2018, 4: 5-26**

*Поступило в редакцию: 9.10.2018*

*Получено после доработки: 30.10.2018*

**Трубицына Татьяна Петровна**, к.б.н., с.н.с., 8(906)641-15-72, trubitsina.tp@yandex.ru;  
**Колоскова Елена Михайловна**, к.б.н., с.н.с., 8(910)590-92-83, heleko3@yandex.ru;  
**Езерский Вадим Александрович**, с.н.с., 8(906)642-59-92, ez.vadim@yandex.ru;  
**Максименко Сергей Васильевич**, к.б.н., с.н.с., 8(906)645-02-52; vx136@rambler.ru;  
**Белова Надежда Викторовна**, м.н.с., 8(903)635-83-57;  
**Кут'ин Иван Владимирович**, м.н.с., 8(953)332-86-47;  
**Рябых Владимир Павлович**, д.б.н., зав. лаб.