ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК АРМЕНИИ
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF ARMENIA
ДОКЛАДЫ ԶԵԿՈՒՅՑՆԵՐ REPORTS

Հատոր Том Volume 113 2013 № 1

ԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ

УДК 616.547.962.3+61

Ս. Ս. Դաղբաշյան[1], Պ. Ա. Ղազարյան[1,2], Մ. Մ. Գինովյան[1]

Մարդու շիճուկային ալբումինի արտադրության կենսատեխնոլոգիական եղանակները և հեռանկարները

(Ներկայացված է ՀՀ ԳԱԱ թղթ. անդամ Ա. Հ. Թռչունյանի կողմից 20/VIII 2012)

Առանցքային բառեր. *մարդու շիճուկային ալբումին, տրանսգենային բրինձ, էքսպրեսիա, ալկոհոլօքիդազ ֆերմենտ, Pichia pastoris:*

Մարդու շիճուկային ալբումինը (*Human serum albumin-HSA*) արյան պլազմայի հիմնական սպիտակուցն է, որի կոնցենտրացիան արյան սպիտակուցների կազմում ամենաբարձր տոկոսն է կազմում և ապահովում է պլազմայի օսմոտիկ ճնշումը [1]: Այն իրականացնում է մի շարք նյութերի փոխադրումը, այդ թվում՝ որոշ սպիտակուցների և տարբեր իոնների, պիգմենտների (բիլիռուբին), հորմոնների (վահանաձև գեղձի հորմոններ), ստերոիդների, ազատ ճարպաթթուների, ինչպես նաև օրգանիզմ մտած սինթետիկ դեղանյութերի փոխադրումը [2]: Մարդու շիճուկային ալբումինի երրորդ կարևոր ֆունկցիան այն է, որ ալբումինը հարուստ և արագ իրացվող սպիտակուցային պահեստ է: Ալբումինը օժտված է նաև կոնյուգացնող և ինակտիվացնող հատկություններով, հետևաբար նրա կոնցենտրացիայի իջեցումը մեծացնում է արյան պլազմայում պարունակվող ազատ, կենսաբանորեն ակտիվ միացությունների, այդ թվում նաև ագրեսիվ նյութերի քանակությունը [2,3]:

Այսպիսով, մարդու արյան պլազմայի շիճուկային ալբումինը բազմաֆունկցիոնալ, բացասական լիցքավորված, ածխաջրածնային մնացորդ չպարունակող լուծելի սպիտակուց է: Այն կազմված է 585 ամինաթթվային մնացորդ պարունակող շղթայից, որոնցից 35-ը ցիստեինն է, որոնք առաջացնում են դիսուլֆիդային կապեր՝ կայունացնելով ալբու-

մինի երրորդային կառուցվածքը: *HSA*-ի մոլեկուլային զանգվածը կազմում է 66,5 կԴա [3,4]:

Հետազոտությունների արդյունքները [4] ցույց են տվել, որ արյան շիճուկային ալբումինը կոդավորող գենն օժտված է բարձր պոլիմորֆիզմով, և ներկայումս հայտնաբերված են նրա ավելի քան 30 գենետիկական տարբերակներ (ալլոալբումիններ):

Առողջ մարդկանց արյան պլազմայում *HSA*-ի կոնցենտրացիան հասնում է մինչև 42±3.5 գ/լ-ի: Յուրաքանչյուր պահի արյան հոսքում շրջանառվում է մոտ 160 գ շիճուկային ալբումին [5], և նրա կիսատրոհման տևողությունը 19-20 օր է:

Արյան շիճուկային ալբումինը լայն կիրառություն ունի գործնական բժշկության տարբեր ոլորտներում՝ բուժական պրակտիկայում՝ խոշոր այրվածքների, հեմորագիկ շոկի, հիպոպրոտեինեմիայի և պտղի էրիթրոբլաստոզի, ինչպես նաև լյարդի ցիրոզի հետևանքով առաջացած ասցիտի բուժման, արյան պլազմայի օսմոտիկ ճնշման վերականգնման նպատակով: Որպես հավելում այն օգտագործվում է նաև պատվաստանյութերի և սպիտակուցային բուժիչ պրեպարատների, ինչպես նաև վերջիններիս ստացման համար օգտագործվող սննդային միջավայրերի կազմի մեջ [4,5]:

Շիճուկային ալբումինը հիմնականում ստանում են դոնորական արյունից: Սակայն, ներկայումս ամբողջ աշխարհում դոնորական արյան խիստ պակաս է զգացվում, ինչը կապված է դոնորների թվի փոքրացման և դոնորական արյան նկատմամբ պահանջարկի մեծացման հետ [4-6]: Դոնորական արյունից ստացված ալբումինի կիրառման սահմանափակումները պայմանավորված են ոչ միայն նրա բարձր ինքնարժեքով, այլ նաև այն հանգամանքով, որ դրանից ստացված պրեպարատների միջոցով ռեցիպիենտին հնարավոր է ինֆեկցիոն ագենտներ փոխանցել, մասնավորապես իմունային անբավարարության (*ՄԻԱՎ*), հեպատիտի և մի շարք այլ վիրուսներ [7]:

Վերոհիշյալի հետ կապված կլինիկական և տնտեսական տեսանկյունից առավել մեծ նշանակություն է ստանում ***ժամանակակից կենսատեխնոլոգիական եղանակներով*** ստացված սպիտակուցային պրեպարատների օգտագործումը: Ներկայումս աշխարհում առկա միտումներից կարելի է ենթադրել, որ մոտ ժամանակներս տեղի կունենա արյունից ստացված պրեպարատների աստիճանական փոխարինում ռեկոմբինանտային սպիտակուցային արտադրանքներով:

Ներկայումս կենսատեխնոլոգիական ճանապարհով մարդու շիճուկային ալբումինի ստացման համար մշակվել են և շարունակվում են աշխատանքները մի շարք արդյունավետ արտադրական եղանակների ստեղծման ուղղությամբ: Այսպես, վերջին տասնամյակում մշակվել են մարդու արյան շիճուկային ալբումինի ստացման նոր եղա-

նակներ, որոնք հիմնված են *Escherichia coli* [11], *Kluyveromyces lactis* [12] (պատենտ US 6,686,179, 2004 թ.), *Saccharomyces cerevisiae* [13] (պատենտ *US 7,045,318*, 2006թ.), *Pichia pastoris միկրոորգանիզմների,* տրանսգենային կենդանիների [14] և բույսերի [15] միջոցով այդ սպիտակուցի սինթեզի վրա: Բակտերիաները, լինելով պրոկարիոտիկ օրգանիզմներ, ընդունակ չեն իրականացնելու էուկարիոտ օրգանիզմների սպիտակուցներին բնորոշ հետտրանսլացիոն մոդիֆիկացիա: Բացի այդ պրոդուցենտ պրոկարիոտիկ շտամների պայմանական ախտածնությամբ օժտված լինելու պայմաններում ռեկոմբինանտային սպիտակուցները կարող են պարունակել էնդոտոքսինների խառնուրդներ, որի հետևանքով բակտերիալ ծագման ռեկոմբինանտային սպիտակուցների երկարատև օգտագործումն ուղեկցվում է անցանկալի կողմնակի ազդեցություններով և սահմանափակում է արդյունաբերական եղանակի վերածվելու հնարավորությունը [8,14]:

1981 թ. ամերիկյան *Genentch* ընկերության կողմից առաջին անգամ *rHSA*-ի գենը հաջողությամբ էքսպրեսիայի է ենթարկվել *E. coli* էքսպրեսիոն համակարգում և պատենտավորվել, սակայն էքսպրեսիայի մակարդակը այնքան ցածր էր, որ չէր կարող օգտագործվել արդյունաբերական նպատակներով: Ավելի ուշ ամերիկյան մեկ այլ ընկերության կողմից օգտագործվեց *P. pastoris* էքսպրեսիոն համակարգը, որը տվեց 4-5 գ/լ արդյունք և կարող էր արդյունաբերական եղանակ հանդիսանալ: 1990 թ. ճապոնական մի ընկերություն լիցենզիա (իրավունք) ստացավ այս եղանակի հիման վրա արտադրություն կազմակերպելու համար, որի առաջին արտադրանքը միջազգային շուկա դուրս եկավ 1999 թ. [4-6]:

Մարդու ռեկոմբինանտային ալբումինի արտադրության առաջին գործարանը գործարկվել է Ճապոնիայում, որը տարեկան տալիս էր 40 տ արտադրանք: Այն սկսել է աշխատել 2000 թվականից [6]: Ավելի ուշ Չինաստանում ստեղծվեց ևս մեկ արդյունաբերական եղանակ, որը հիմնված է տրանսգենային բրնձից ստանալու վրա: Գտնում են, որ տրանսգենային բրնձից *HSA*-ի ստացման եղանակը շատ կարևոր է Չինաստանի համար, քանի որ այդ երկրում սննդային սպիտակուցների մեծ պահանջարկ կա: *HSA*-ի գենի ներմուծումը *Oryza sativa*-ի գենում իրականացվում է *Agrobacterium* ցեղի բակտերիաների սպեցիֆիկ պլազմիդների միջոցով: Ընդ որում տրանսգեն բրնձի հատիկում պարունակվող լուծելի սպիտակուցի կազմում *OsrHSA*-ի պարունակությունը բարձր է (մինչև 10,58%): Այս եղանակը հնարավորություն է տալիս 1 կգ սովորական բրնձի (*Oryza sativa*) տրանսգենային տարբերակից ստանալու 99% մաքրությամբ 2,75 գ մարդու շիճուկային ալբումին (*OsrHSA*): Ստացված*OsrHSA*-ն էկվիվալենտ է *pHSA*-ին ինչպես կենսաքիմիական հատկություններով, այնպես էլ ֆիզիկական

կառուցվածքով, ֆունկցիաներով և իմունոգենությամբ (նրանց մոլեկուլային զանգվածները նույնն են, նույնն են նաև ամինաթթվային հաջորդականությունը, *N* և *C* ծայրերը, մոլեկուլի երկրորդային և երրորդային կառուցվածքները): *OsrHSA*-ն մեծ քանակությամբ կուտակվում է տրանսգենային բրնձի սերմերի էնդոսպերմում: Այդ եղանակով մարդու շիճուկային ալբումինի ստացումը տնտեսապես շահավետ է: Ստացված ալբումինի մշակումն ընդգրկում է նրա անջատումը և քրոմատոգրաֆիայի երեք փուլերը՝ *Capto-MMC, Q-Sepharose* և *Phenyl-HP,* որոնք իրականացվում են համապատասխանաբար խտացման, աղազրկման և լիոֆիլիզացման համար:

Մաքրման գործընթացը տևում է մոտավորապես 48 ժամ, և արդյունքում կարող է վերականգնվել սպիտակուցի 45-50%-ը, ինչը համարժեք է 1 կգ բրնձից 2,75 գ *OsrHSA*-ի ստացմանը (մաքրության աստիճանը տատանվում է 99,45 ± 0,19%-ի միջակայքում), որը վկայում է մաքրման տեխնոլոգիայի հուսալիության և բարձր արտադրողականության մասին:

Ռեկոմբինանտային ալբումինի ստացման եղանակներից մեկն է մեթիլոտրոֆ *Pichia pastoris* տեսակի խմորասնկերի բջջի մեջ մարդու շիճուկային ալբումինի գենի ներմուծման միջոցով ռեկոմբինանտային շիճուկային ալբումինի սինթեզը, որը առաջին անգամ փորձարկվել է 1993 թ.: Այն շատ հարմար, համեմատաբար էժան և տեխնիկապես հասանելի եղանակ է, որի հարմարավետությունը կապված է նաև այն հանգամանքի հետ, որ ստացված ալբումինն արտազատվում է միջբջջային տարածություն, ինչը հնարավորություն է տալիս հեշտությամբ անջատել այն [9]:

Pichia pastoris-ը մեթիլոտրոֆ խմորասունկ է, որը լայնորեն կիրառվում է ռեկոմբինանտային սպիտակուցների արտադրության համար: Նրա առավելություններն են.

1. համեմատաբար արագ աճը (ցանքից մինչև կենսասինթեզի ավարտը տևում է 3-5 օր),
2. նպատակային սպիտակուցի բարձր ելքը (մինչև 40 գ/լ),
3. սննդամիջավայրի մատչելիությունը (գլիցերին, մեթանոլ, ամիակ),
4. ֆերմենտացիայի մատչելի գինը,
5. խոշոր պոլիպեպտիդների ստացման հնարավորությունը (>50 կԴԱ),
6. գլիկոլիզացման հնարավորությունը,
7. ստացված սպիտակուցի արտազատումը սննդամիջավայր և պրոտեազների արտազատման ցածր արժեքը:

Թերությունները պայմանավորված են *N*-գլիկոլիզացման ժամանակ իմունոգեն օլիգոսախարիդների առաջացմամբ: Բացի այդ տվյալ

եղանակով ոչ բոլոր սպիտակուցների ստացումն է արդյունավետ, և կան նաև որոշ արտոնագրային սահմանափակումներ՝ արդյունաբերական արտադրության համար:

P. pastoris-ի էքսպրեսիոն համակարգի կիրառումը տալիս է նաև մի շարք այլ առավելություններ, որոնք կապված են գենետիկական մանիպուլյացիաների կատարման հեշտության հետ, տեր բջիջ – վեկտոր արդյունավետ համակարգի առկայության հետ, որը ներառում է հըստակ կարգավորվող և մեծ հարմարվողականությամբ օժտված *AOX1* պրոմոտորի առկայությունը, ինչպես նաև դիսուլֆիդային կապերի և այլ էուկարիոտիկ հետտրանսլյացիոն մոդիֆիկացիաների առաջացման հնարավորությունը:

P. pastoris-ի կենսազանգվածի աճեցումը կատարվում է *BMG* (պեպտոն, խմորասնկային էքստրակտ, գլիցերին) կամ *BMG2* (խմորասնկային էքստրակտ, գլիցերին) սննդամիջավայրերում, իսկ նպատակային նյութի սինթեզն իրականացվում է *BMM* (պեպտոն, մեթանոլ, խմորասնկային էքստրակտ) կամ *BMM2* (մեթանոլ, խմորասնկային էքստրակտ) սննդամիջավայրերում:

P. pastoris-ի բջիջներն ունակ են աճելու 4-37 ^{0} C միջակայքում, սակայն աճեցման օպտիմալ ջերմաստիճանը 30^0 C-ն է: Բջիջներն աերոբ պայմաններում աճեցնելիս միջավայրն աննշան թթվեցնում են (օպտիմալ *pH*-ը՝ 4.5-4.6): Որպես ածխածնի աղբյուր՝ բջիջները կարող են օգտագործել մի շարք պարզ միացություններ՝ գլյուկոզ, գլիցերին, մեթանոլ և այլն: Որպես ազոտի աղբյուր՝ կարող են օգտագործել ամինիֆիկացված հանքային աղերը, ամինաթթուները և միզանյութը (ինչպես աերոբ, այնպես էլ անաերոբ պայմաններում):

HSA-ի գենի ներկառուցման համար ամենահարմարը *P. pastoris*-ի *AOX1* պրոմոտորն է, որը կարգավորում է ալկոհոլօքսիդազ ֆերմենտի էքսպրեսիան, քանի որ մեթանոլի միջավայրում աճեցնելիս այդ ֆերմենտի պարունակությունը կարող է հասնել բջջի ընդհանուր սպիտակուցային կազմի մինչև 30%-ը: Մինչև այժմ մի շարք ռեկոմբինանտային սպիտակուցներ հաջողությամբ էքսպրեսիայի են ենթարկվել *AOX1* պրոմ*ոտորի վերահսկողության տակ:*

AOX1 պրոմոտորի թերությունը կապված է կենսազանգվածը մեթանոլի միջավայրում աճեցման հետ, քանի որ վերջինս շատ դյուրավառ է, թունավոր:

Բացի այդ մեթանոլում աճող բջիջները թթվածնի մեծ ծախս են պահանջում, ինչը պահանջում է սննդամիջավայրին մաքուր թթվածնի ավելացում՝ մեծացնելով գործընթացի ծախսատարությունը, և սահմանափակում մեծ մասշտաբներով աճեցման հնարավորությունը: Մեթանոլի անհրաժեշտության խնդրի շրջանցման համար, որպես սննդամիջավայր, կարելի է օգտագործել այլընտրանքային պրոմոտոր-

ներ, օրինակ՝ գլիցերալդեհիդ դեհիդրոգենազի պրոմոտորը (*pGAP*), ֆորմալդեհիդ դեհիդրոգենազի պրոմոտորը (*pFLD*) և այլն:

Ամփոփելով վերոհիշյալը՝ պետք է ընդգծել, որ մարդու շիճուկային ալբումինի ստացման կենսատեխնոլոգիական եղանակների կիրառումը համարվում է ժամանակակից, արդյունավետ, հեռանկարային ուղղություն, և ՀՀ-ում գործնական առողջապահության ոլորտում նրա ներդրումը կարող է ստանալ հանրապետական նշանակություն և ունենալ մեծ հեռանկարներ:

[1]ՀՀ ԱՆ պրոֆ. Ռ. Յոլյանի անվան արյունաբանական կենտրոն
[2]Երևանի պետական հաալսարան

Ս. Ս. Դաղբաշյան, Պ. Ա. Ղազարյան, Մ. Մ. Գինովյան

Մարդու շիճուկային ալբումինի արտադրության կենսատեխնոլոգիական եղանակները և հեռանկարները

Բերված են կենսատեխնոլոգիական մեթոդներով մարդու շիճուկային ալբումինի ստացման նորագույն արդյունաբերական եղանակների համեմատական բնութագրերը:

С. С. Дагбашян, П. А. Казарян, М. М. Гиновян

Биотехнологическое производство человеческого сывороточного альбумина и его перспективы

Дана сравнительная характеристика новейших промышленных биотехнологических методов получения человеческого сывороточного альбумина.

S. S. Daghbashyan, P. A. Ghazaryan, M. M. Ginovyan

Production Human Serum Albumin by Biotechnological Methods and Perspectives

The newest data of the comparative characteristics of the productive biotechnological methods of obtaining the human serum albumin are presented.

Գրականություն

1. *Smith B. et al.* - Bioconjugate Chem. 2001. V.12. P.750-756.
2. *Halpem W. et al.* - Pharm. Res. 2002. V.19. P.1720-1729.
3. *He Y. et al.* - Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. P. 19078–19083.
4. *Bollok M., Resina1 D. et al.* – Recent Patents on Biotechnology. 2009. V. 3. P. 192-201.
5. *Xie T, Liu Q., Xie F. et al.* – Prep. Biochem. Biotechnol. 2008. V. 38. P. 308-317.

6. *Бобик Т. В., Воробьев И. И., Шемякина М. М. и др.* - Биоорганическая химия. 2008. Т. 34. №1. С. 56-62.
7. *Primrose S.B.* - J. Appl. Bacteriol. 1986. V.61. P.99-116.
8. *Cregg J.M., Vedvick T.S., Raschke W.C.* - Nature Biotechnology. 1993. V. 11. P. 905–910.
9. *Latta L, et al.* – Nature Biotechnology. 1987. V. 5. P.1309–1314.
10. *Fleer R, et al.* – Nature Biotechnology. 1991. V. 9. P. 968–975.
11. *Sleep D., Belfield G. P., Goodey A. R.* – Nature Biotechnology. 1990. V. 8. P. 42–46.
12. *Barash I. et al.* - Transgenic Res. 1993. V. 2. P. 266–276.
13. *Huang L. F., Liu Y. K., Lu C. A., Hsieh S. L.* - Transgenic Res. 2005. V. 14. P. 569.