

Дрожжи как фабрика для получения лекарств

М.А. Эльдаров, Н.В. Равин

Центр «Биоинженерия» РАН

Одним из наиболее ярких и убедительных достижений современной биотехнологии, несомненно, стало создание и бурное развитие в последние десятилетия новой области мировой экономики – биофармацевтической промышленности, направленной на производство принципиально нового класса лекарств – рекомбинантных белков медицинского назначения. Различные интерфероны, эритропоэтины, факторы роста, антитела, вакцинные белки, промышленные ферменты, доступные ранее лишь в аналитических количествах, входят теперь в перечень жизненно-важных медицинских препаратов, производятся в объемах до нескольких тонн в год, и прочно вошли в повседневную практику современной медицины, фундаментальных исследований, пищевой и фармацевтической промышленности.

По оценкам Американской организации биопромышленности к 2011 году более 500 миллионов людей во всем мире прошли лечение либо иммунопрофилактику с использованием 300 биотехнологических препаратов и вакцин. Почти две трети из этих биопрепаратов были разрешены к применению в последние 15 лет. Еще около четырехсот биопрепаратов направленных на борьбу с более чем 200 различными болезнями, такими как различные виды рака, сердечно-сосудистых заболеваний, диабет, СПИД и т.д. находятся в стадии клинических испытаний. Общий объем мирового рынка рекомбинантных белков в 2011 году составил около 100 миллиардов долларов, растет высокими темпами (около 19% в год) и составляет около 17% общемирового фармацевтического рынка.

Среди широко используемых биофармацевтиков можно выделить следующие категории: факторы крови, тромболитики и антикоагулянты, гормоны, ферменты, факторы роста, интерфероны и интерлейкины, вакцины и моноклональные антитела. Из 211 биофармацевтиков, разрешенных к применению к концу 2011 года, 66 (31 %) были получены с использованием клеток бактерий, 31 (15 %) в дрожжах (из них 30 в клетках *Saccharomyces cerevisiae* и 1 – в *Pichia pastoris*) и 91 препарат (43 %) в клетках млекопитающих. В совокупности в *Escherichia coli*, дрожжах и клетках млекопитающих получают 89 % разрешенных к применению биофармацевтиков.

Выбор системы экспрессии зависит от свойств целевого белка и способности хозяйской клетки продуцировать белок нужного качества при соблюдении минимального набора требований. Клетки бактерий *E. coli* – наиболее простая и экономичная система экспрессии, но ее использование ограничено проблемами образования неправильно свернутых белков и отсутствием посттрансляционных модификаций, характерных для белков эукариот. Дрожжи являются простыми эукариотами и тем самым обладают преимуществами в плане фолдинга и посттрансляционных модификаций белка, хотя во многих случаях характер гликозилирования белков является неоптимальным в случае экспрессии белков человека. Клетки млекопитающих – наиболее сложная и дорогостоящая система экспрессии, которая обеспечивает наиболее высокое качество самого белка и его посттрансляционных модификаций, включая гликозилирование.

Характеристика и оптимизация дрожжевых экспрессионных систем

Дрожжи являются просто организованными одноклеточными эукариотическими организмами, обладающими сходной с высшими эукариотами субклеточной организацией. Клетки дрожжей содержат ядро, митохондрии, эндоплазматический ретикулум (ЭР), аппарат Гольджи, секреторные везикулы, вакуоль и пероксисомы. Пекарские дрожжи-сахаромицеты (*Saccharomyces cerevisiae*) на протяжении тысячелетий использовались в качестве компонента человеческой пищи.

Дрожжи общепринято считаются безопасными организмами («generally recognized as safe», GRAS), и такой статус с регуляторной точки зрения является существенным преимуществом. Более того, дрожжи превосходно изучены методами биохимии и молекулярной биологии, для них разработаны эффективные методы генетической инженерии. Помимо *S. cerevisiae* в качестве «биофабрик» для получения рекомбинантных белков используются и другие виды дрожжей, – *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* и *Schizosaccharomyces pombe*. *P. pastoris* – второй после сахаромицетов по популярности вид дрожжей. Метилотрофные (т.е.использующие в качестве субстрата метанол) дрожжи *P. pastoris* широко используется для получения рекомбинантных белков в исследовательских и прикладных целях, поскольку обеспечивает более высокий выход биомассы, целевого белка и более эффективную секрецию по сравнению с *S. cerevisiae*. Первый биофармацевтический препарат, полученный в *P. pastoris*, был зарегистрирован для применения в 2009 году, несколько других в настоящее время проходят клинические испытания.

Система экспрессии в клетках *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae сочетает некоторые свойства прокариот (быстрый рост на дешевых питательных средах, простота генетических манипуляций) и эукариот (протеолитический процессинг, фолдинг, образование дисульфидных связей и ряд других эукариотических модификаций белков). Недостатки дрожжей – невозможность их высокоплотного культивирования, ограниченная секреторная способность, избыточный и отличный от клеток млекопитающих характер гликозилирования белков.

Трансформация *S. cerevisiae* векторами экспрессии легко осуществима путем обработки интактных клеток солями лития. Распространенные экспрессионные вектора дрожжей основаны на использовании эндогенной дрожжевой плазмиды 2 мкм ДНК. Обычно это челночные вектора, т.е. способные поддерживаться как в бактериях *E. coli*, так и в дрожжевой клетке. 2 мкм плазида присутствует в клетках *S. cerevisiae* в количестве примерно 100 копий на гаплоидный геном. Она содержит 4 гена (FLP, REP1, REP2 и D), участок начала репликации, локус STB и два инвертированных повтора. FLP кодирует сайт-специфическую рекомбиназу, которая обеспечивает амплификацию плазмиды в ходе клеточных делений. Важный фактор, который нужно учитывать при постановке экспериментов по гетерологичной экспрессии – высокая клональная вариабельность в уровне продукции между отдельными трансформантами.

Для селекции трансформантов используют ауксотрофные селективные маркеры. Такие гены, как LEU2, TRP1, URA3 и HIS3 наиболее часто используются для комплементации мутаций в реципиентных штаммах *S. cerevisiae*, ауксотрофных по лейцину, триптофану, урацилу и гистидину, соответственно, при отборе трансформантов на синтетических минимальных средах. Доминантные маркеры используемые для селекции на богатой среде – это гены резистентности к антибиотикам G418, гигромицину В, блеомицину. Ген CUP1 может быть использован как маркер устойчивости к меди, а ген формальдегид дегидрогеназы – как маркер устойчивости к формальдегиду.

Отсутствие бактериальной ДНК в препаратах полученных в дрожжах рекомбинантных белков является преимуществом с регуляторной точки зрения. Элиминация бактериальной части вектора возможна за счет интеграции кассеты экспрессии в эндогенную 2 мкм плазмиду, или за счет использования челночного вектора с последующем удалением бактериальной части с помощью рекомбинации *in vivo*. Кроме того, более стабильное поддержание чужеродной ДНК может быть достигнуто путем использования интегрирующих векторов YIp. Эти вектора содержат участки хромосомной ДНК дрожжей используемых в качестве мишеней для интеграции,

селективный маркер и бактериальный репликон. Для получения многокопийных трансформантов с помощью таких векторов интеграция может быть осуществлена в повторяющиеся участки хромосомной ДНК *S. cerevisiae*, например, в тандемный повтор генов рРНК или в мобильный ретротранспозон дрожжей (Ту элемент).

Необходимое условие эффективной экспрессии – адекватный подбор промоторов и терминаторов – регуляторных элементов генома дрожжей, обеспечивающих транскрипцию целевого гена. Все промоторы дрожжей содержат три необходимых элемента – активирующую последовательность (UAS), TATA элемент и инициаторный элемент. Сложно организованные промоторы могут содержать множественные UAS и TATA элементы и сайты негативной регуляции. Промоторы генов ферментов гликолиза – алкогольдегидрогеназы I (ADH1), фосфоглицерат киназы (PGK) и глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAP) являются наиболее активными. Они регулируются добавлением глюкозы, но уровень индукции незначителен, что ограничивает их использование. Наиболее сильные строго регулируемые промоторы – промоторы генов метаболизма галактозы GAL1, GAL7 и GAL10. Эти промоторы быстро индуцируются более чем в 1000 раз при добавлении галактозы, и сильно репрессируются глюкозой, которую следует удалять из среды культивирования в условиях индукции. Другие удобные регулируемые промоторы - это промотор гена кислой фосфатазы (PHO5), индуцируемый при голодании по фосфату, терморегулируемые промоторы генов белков теплового шока, индуцируемый ионами меди промотор CUP1.

Прогресс в области оптимизации систем экспрессии для сахаромецетов за три последних десятилетия, прошедших с момента создания технологической платформы экспрессии генов в дрожжах, в основном был направлен на преодоление одного из известных недостатков *S. cerevisiae* как клетки-хозяина - ее ограниченной способности секретировать из клетки в окружающую среду рекомбинантные белки. Для повышения эффективности секреции принципиально можно варьировать следующие параметры: условия культивирования, векторную систему, промотор, использование кодонов, тип сигнального пептида, этапы процессинга и фолдинга. Считается, что эффективность секреции белков дрожжами в 100-1000 раз ниже теоретического максимума.

Значительное повышение уровня секреции возможно за счет оптимизации процесса культивирования. Точный контроль температуры и pH среды приводит к увеличению плотности культуры и снижает степень деградации белка. Более сложные подходы к оптимизации секреции нацелены на направленную инженерию штаммов-реципиентов с целью модификации ключевых этапов секреции белка на генетическом уровне.

Полость ЭР содержит многочисленные белки, отвечающие за корректность сворачивания белка, процессинг сигнальных последовательностей, формирование дисульфидных связей и т.д. Процессы белкового фолдинга строго регулируются, и целый ряд механизмов используются дрожжевой клеткой для предотвращения неправильного фолдинга или удаления неправильно свернутых белков. Оверэкспрессия белковых шаперонов является разумной стратегией для повышения эффективности белкового фолдинга и, следовательно, секреции белка. Шаперон BiP способствует правильному сворачиванию белка, однако, продолжительное связывание с BiP приводит к активации ответа на неправильно-свернутые белки и в конечном счете к транслокации неправильно свернутого белка в цитозоль, где он подвергается деградации. Таким образом, оверэкспрессия BiP может иметь неоднозначные эффекты, которые зависят от свойств экспрессируемого целевого белка. Так, оверэкспрессия BiP привела к 26-кратному повышению экспрессии прохимозина быка, 5-кратному усилению секреции эритропоэтина, но снижала секрецию глюкозооксидазы в *H. polymorpha*. Совместная оверэкспрессия шаперонов Jem1p, Sll1p, Lhs1p и Scy1p приводила к увеличенной секреции ряда фармацевтически-важных белков.

Промежуточный этап секреции состоит в перемещении белков в составе окруженных мембранами транспортных везикул от эндоплазматического ретикулума к Аппарату Гольджи, и далее от Гольджи к плазматической мембране либо к вакуоли. Неэффективность этих процессов приводит к внутриклеточному накоплению белков и подавляет секрецию. Для попадания в полость ЭР белок должен содержать сигнальную последовательность секреции. Наиболее часто используемый сигнальный пептид – препросегмент дрожжевого феромона дрожжей альфа-фактора.

Ошибочный сортинг белка в вакуоль на пути от аппарата Гольджи к плазматической мембране приводит к накоплению секретируемого полипептида внутри клеток и опосредуется вакуолярным сортирующим рецептором Vps10p. Делеция гена *vps10* либо других вакуолярных рецепторов - *vps4*, *vps8*, *vps13*, *vps35* *vps36* в ряде случаев приводит к увеличению секреции целевого белка.

Также к усилению секреции может приводить оверэкспрессия синтаксинов *Sso1p* и *Sso2p*, которые функционируют в качестве адресных молекул, обеспечивающих слияние транспортных везикул с плазматической мембраной. Эти данные показывают важность регулирования транспорта от Гольджи к плазматической мембране, но направленное воздействие на этот процесс представляется весьма сложным из-за значительного количества вовлеченных в регуляцию генов (Рисунок 1).

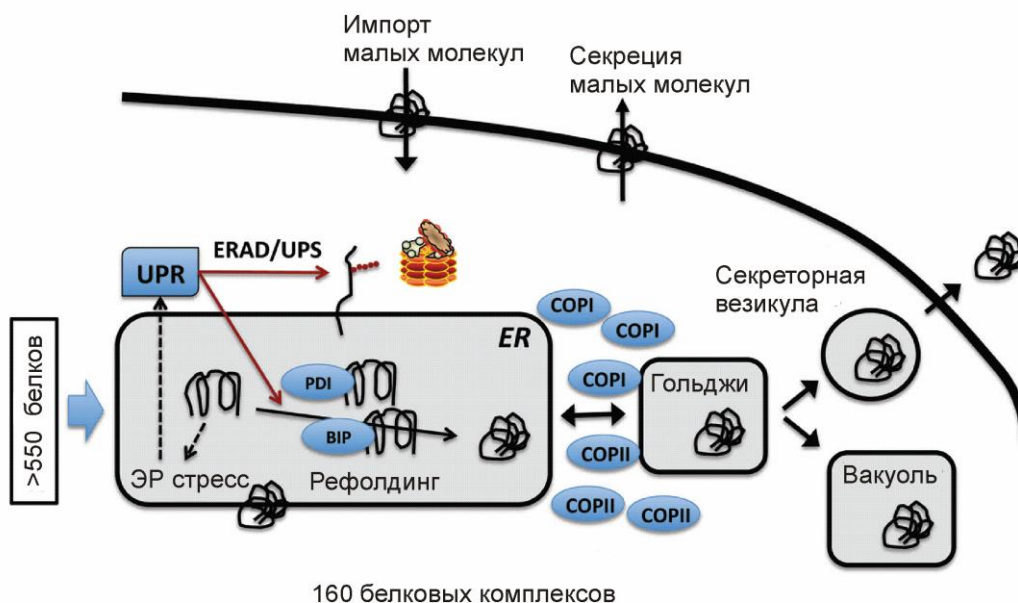


Рисунок 1. Секреторный путь дрожжевой клетки.

Секретируемые из клетки белки могут подвергаться деградации протеазами, которые также секретируются клеткой-хозяином. Делеция генов основных протеаз вакуоли PEP4 и PRB1 нарушает созревание других вакуолярных протеаз и приводит к заметному снижению общей протеолитической активности. В других беспротеазных штаммах дрожжей удаляют гены CPY1, YPS1 и KEX2. Делеция митохондриальной эндопротеазы CYM1 также снижает протеолиз и повышает эффективность секреции. Создание штаммов, дефектных одновременно по многим протеазам может привести к кумулятивному усилению эффективности секреции.

Перспективы исследований по выбору генов мишеней для дальнейшей оптимизации секреции белков в дрожжах связаны с использованием современных постгеномных подходов, методов высокопроизводительной геномики, протеомики, транскриптомики, метаболомики.

Система экспрессии на основе клеток метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*

P. pastoris - вид метилотрофных дрожжей, который на протяжении десятилетий широко используется для фундаментальных и прикладных исследований. Некоторые продуцируемые в *P. pastoris* биофармацевтики, например, человеческий альбумин и ряд вакцин уже выведены на рынок. Для разработки биоинженерных штаммов *P. pastoris*, обеспечивающих высокий уровень продукции белка и его секрецию при отсутствии протеолиза, необходимо знание путей метаболизма микроорганизма, механизмов синтеза, процессинга и секреции белков. Основой для этих исследований является

расшифровка полной геномной последовательности, дающая доступ ко всей генетической информации организма. Опубликованная в 2009г работа (De Schutter et al. 2009) в которой представлен полный 9,43 млн. нт геном *P. pastoris* штамма GS115 открыла новый этап в разработке биотехнологических платформ для экспрессии рекомбинантных белков в *P. pastoris*.

Как и другие метилотрофные дрожжи, *P. pastoris* содержат характерный метаболический путь утилизации метанола, состоящий из обильно представленных в клетке и резко индуцируемых при росте на метаноле ферментов, локализованных в специализированных внутриклеточных органеллах – пероксисомах (или микротельцах), подвергающихся интенсивной пролиферации при росте на метаноле (Рисунок 2).

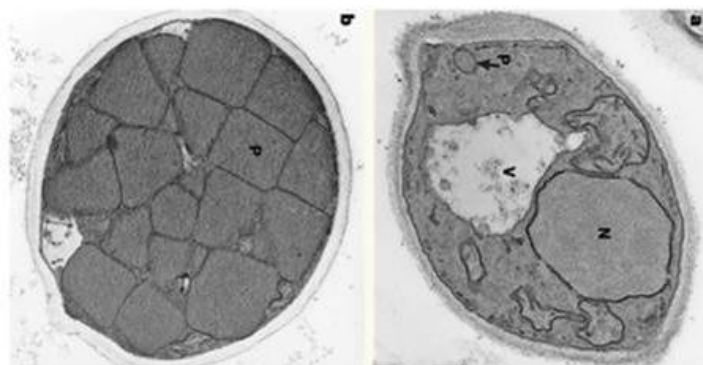


Рисунок 2. Клетка *Pichia pastoris* под электронным микроскопом. Слева – клетки, выращенные на метаноле, справа – на глюкозе.

Промоторы генов ферментов утилизации метанола – одни из наиболее эффективных и строго регулируемых. Для *P. pastoris* хорошо разработаны методы генетических манипуляций, - высокоэффективная трансформация с помощью электропорации, интеграция в геном, методы замещения гена, клонирование с помощью функциональной комплементации. Эти свойства, а также такие характеристики *P. pastoris*, как возможность высокоплотного культивирования на минимальной среде, незначительное количество собственных секретируемых белков, делают эти дрожжи популярным организмом-хозяином для экспрессии рекомбинантных белков.

Челночные экспрессионные вектора для *P. pastoris* содержат участки начала репликации и селективные маркеры, которые функционируют в клетках *E. coli* и *P. pastoris* (Рисунок 3). Селективные маркеры для *P. pastoris* – это гены метаболизма аминокислот и оснований (HIS4, ARG4, ADE1, URA3) или доминантные маркеры устойчивости к антибиотикам (зеоцин, G418).

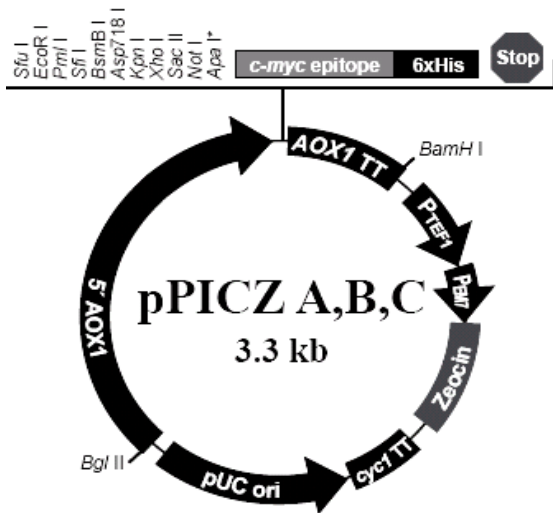


Рисунок 3. Схема коммерческого вектора компании Invitrogen для экспрессии чужеродных генов в *P. pastoris*. Указано положение промотора гена метанолоксидазы (5'-АОХ), терминатора этого гена (3'-АОХ), маркерного гена устойчивости к зеоцину, участка полилинкера, другие элементы вектора.

Стабильная интеграция вектора экспрессии в хромосому клетки-хозяина может достигаться за счет линейаризации вектора по сайту рестрикции, расположенному в промоторе или в маркерном гене и трансформации такой ДНК реципиентного ауксотрофного штамма. В полученных трансформантах за счет эффективной рекомбинации между гомологичными плазмидными и хромосомными последовательностями происходит корректная интеграция вектора в участок хромосомного локуса-мишени (Рисунок 4).

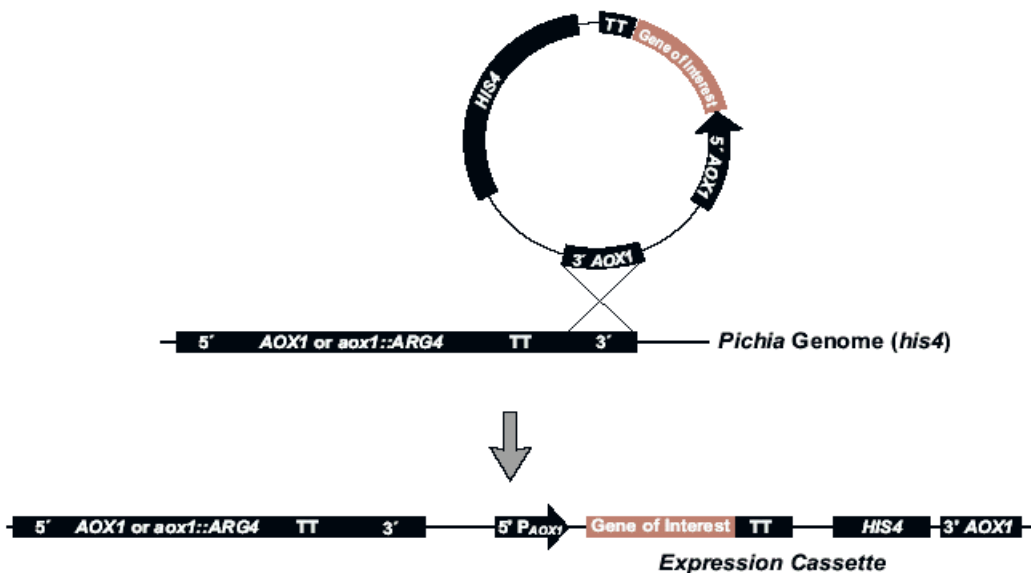


Рисунок 4. Схема интеграции коммерческого вектора экспрессии в хромосому *P. pastoris* по участкам гомологии.

Схема пути метаболизма метанола в клетках *P. pastoris* представлена на рисунке 5. Первый этап утилизации метанола – его окисление с образованием формальдегида и перекиси водорода катализируется пероксисомальной алкоголь-оксидазой (АОХ). АОХ - наиболее обильно представленный в клетке метилотрофов фермент этого пути. Перекись водорода разрушается пероксисомальной каталазой до кислорода и воды. Формальдегид либо присоединяется к ксилулозо-5-фосфату под действием дигидроксиацетонсинтазы (DAS) либо диссимилируется в цитозоле до CO₂ под действием глутатион-зависимой формальдегид дегидрогеназы (FLD), S-формилглутатион гидролазы (FGH) и формиат-дегидрогеназы (FDH). Высокоэффективные строго регулируемые промоторы генов ферментов утилизации метанола, в первую очередь алкоголь-оксидазы, широко используются в исследованиях по генной экспрессии и по получению рекомбинантных белков. В качестве конститутивного промотора используют промотор гена глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы.

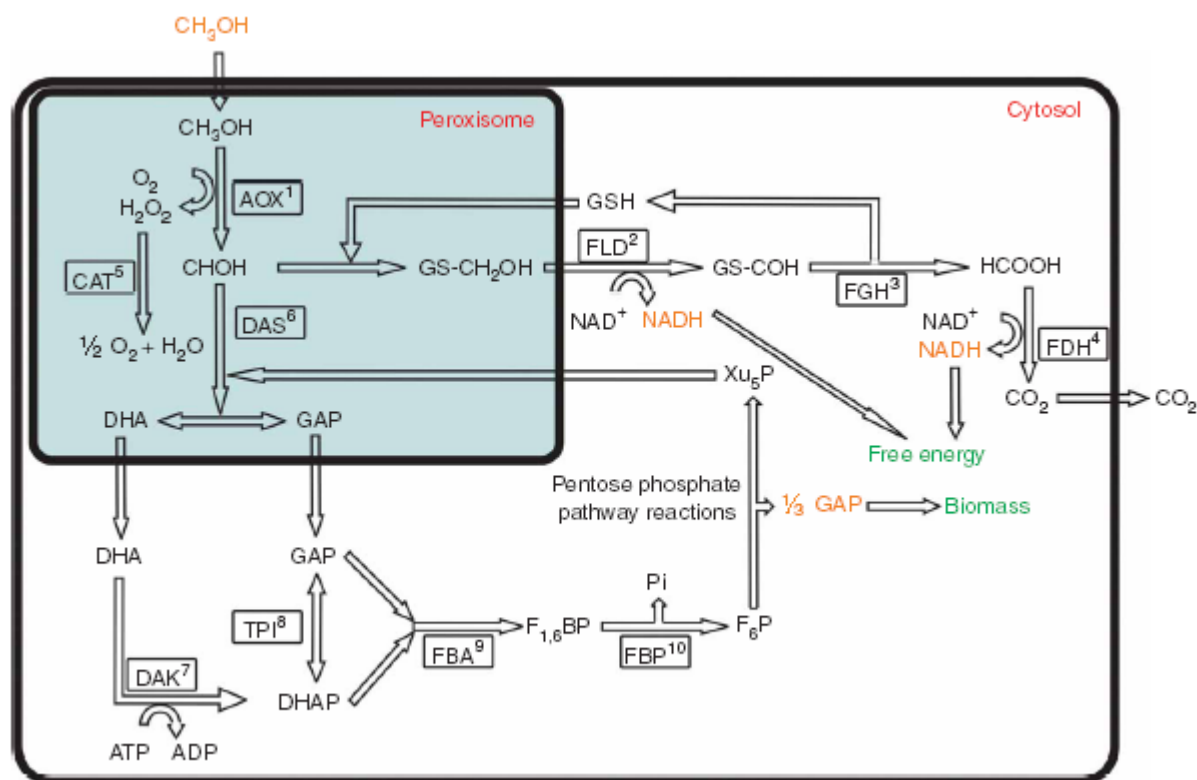


Рисунок 5. Путь утилизации метанола у метилотрофных дрожжей *P. pastoris*. Обозначения ферментов и субстратов: АОХ, алкоголь-оксидаза; FLD, формальдегид дегидрогеназа; FGH, S-формилглутатион гидролаза; FDH, формиат дегидрогеназа; CAT, каталаза; DAS, дигидроксиацетон синтаза; DAK, дигидроксиацетон киназа; TPI, триозофосфат изомераза; FBA, фруктоза-1,6-бифосфат альдолаза; FBP, фруктоза-1,6-бифосфатаза; DHA, дигидроксиацетон; GAP, глицеральдегид-3-фосфат; DHAP, дигидроксиацетон фосфат; F_{1,6}BP, фруктоза-1,6-бифосфат; F₆P, фруктоза-6-фосфат; Pi, фосфат; Xu₅P, ксилулозо-5-фосфат; GSH, глутатион. Модифицирован рисунок из работы De Schutter et al., 2009.

Повышение уровня экспрессии рекомбинатных белков в *P. pastoris* возможно за счет ингибирования протеолитической деградации. Как и для *S. cerevisiae*, для *P. pastoris* получены штаммы, не содержащие протеаз PEP4 и PRB1. Недостаток таких штаммов – их медленная скорость роста и низкая эффективность трансформации. Значительную роль играет оптимизация условий культивирования. Использование ферментеров необходимо для контроля pH, температуры, аэрации и подпитки. Эти параметры следует подбирать для каждого индивидуального белка.

Другая характеристика, которая в последнее время привлекает особое внимание – это способность к гликозилированию секретируемых рекомбинантных белков. Это особенно важно для получения биофармацевтиков, многие из которых нуждаются в аутентичном (т.е. характерном для исходного организма, белок которого необходимо получить, в большинстве случаев человека) гликозилировании для проявления полной биологической активности. Характер гликозилирования белков в дрожжах значительно отличается от гликозилирования в клетках млекопитающих.

Одним из наиболее существенных достижений в этой области является создание генно-инженерного штамма *P. pastoris*, способного осуществлять N- гликозилирование белков, характерное для клеток человека. Первый этап гликозилирования, протекающий в ЭР, одинаков для клеток дрожжей и человека – белки, поступающие в аппарат Гольджи содержат коровий гликан Man8GlcNAc2. У человека эта структура обрезается до Man3GlcNAc2, затем превращается в GlcNAc2Man3GlcNAc2, галактозилируется и, в конце концов, сиалируется до Sia2Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2. В дрожжах Man8GlcNAc2 не обрезается, но далее маннозилируется, что приводит к образованию гликанов более чем с 30 маннозными остатками. Первый этап «гуманизации» (т.е. преобразования дрожжевого пути гликозилирования в человеческий) заключается в делеции гена *och1*, кодирующего α -1,6-маннозилтрансферазу, ответственную за перенос новых остатков маннозы на интермедиат Man8GlcNAc2, что создает субстрат для других маннозилтрансфераз. Одновременное удаление генов *och1* и *mnn1* (последний кодирует α -1,3-маннозилтрансферазу) позволило получить штамм, в котором синтезировался только гликан Man8GlcNAc2, который являлся исходной точкой для дальнейшей гуманизации. Последующие этапы включали введение генов гликозидаз и глукосилтрансфераз MnsI, GnTI, GnTII, SiaT в клетки *P. pastoris* за счет скрининга комбинаторных библиотек трансмембранных доменов известных резидентных для ЭР и аппарата Гольджи белков, слитых с последовательностями различных гликозил трансфераз и гликозидаз. Этот высокопроизводительный подход позволил получить штамм способный к продукции интермедиата Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2.

Последний этап гликозилирования, перенос сиаловой кислоты, был осложнен тем что этот сахар не синтезируется в дрожжах. Ген фермента, необходимого для биосинтеза сиаловой кислоты был перенесен в *P. pastoris* вместе с сиалилтрансферазой. Использование такого штамма позволило получить в клетках дрожжей эритропоэтин с человеческим профилем гликозилирования. О-гликозилирование также было модифицировано в дрожжах за счет введения путей образования таких модификаций, как присоединение остатков муцина и фукозина. Гуманизация аппарата гликозилирования клеток дрожжей открывает новые возможности для получения биофармацевтиков.

Наряду с *P. pastoris* для продукции рекомбинантных белков широко используются и другие виды метилотрофных дрожжей. К числу наиболее перспективных биофабрик относятся факультативно метилотрофные дрожжи *Hansenula polymorpha*. Такие физиологические особенности, как термотолерантность, устойчивость к тяжелым металлам и окислительному стрессу, отсутствующие у *P. pastoris*, делают эти дрожжи перспективным биотехнологическим объектом. Системы экспрессии в *H. polymorpha* используются не только для продукции белков медицинского назначения, но и промышленных ферментов. Благодаря способности сбраживать ксилозу и расти при 40С *H. polymorpha* рассматривается как перспективный продуцент биотоплива из лигноцеллюлозного сырья. Расшифровка полной геномной последовательности *H. polymorpha* является актуальной задачей и создает основу для разработки биотехнологических процессов на основе этого вида метилотрофных дрожжей, предполагающих модификацию штамма-продуцента методами биоинженерии и метаболической инженерии.

Современный рынок полученных в дрожжах биофармацевтиков

В настоящее время в дрожжах получают ряд рекомбинантных терапевтических белков медицинского назначения, используемых в больших объемах. В стоимостном выражении на первом месте находятся инсулин и его аналоги. Рынок инсулина составил 12 миллиардов долларов в 2011 году и согласно прогнозам вырастет более чем вдвое – до 32 миллиардов долларов к 2018 году. Другие важные биофармацевтики, получаемые в дрожжах – это сывороточный альбумин человека, вакцины против вируса гепатита Б и вируса папилломы человека (Таблица 1).

Таблица 1. Терапевтические рекомбинантные белки, получаемые в клетках дрожжей

<i>Зарегистрированные препараты</i>			
Торговая марка	Рекомбинантный белок	Компания	Система экспрессии
Actrapid	Инсулин	NovoNordisk	<i>S. cerevisiae</i>
Ambrix	HBsAg	GlaxoSmithKline	<i>S. cerevisiae</i>
Comvax	HBsAg	Merck	<i>S. cerevisiae</i>
Elitex	Уреат оксидаза	Sanofi-Synthelabo	<i>S. cerevisiae</i>
Glucagen	Глюкагон	NovoNordisk	<i>S. cerevisiae</i>
HBVAXPRO	HBsAg	AventisPharma	<i>S. cerevisiae</i>
Hexavac	HBsAg	AventisPharma	<i>S. cerevisiae</i>
Infanrix-Penta	HBsAg	GlaxoSmithKline	<i>S. cerevisiae</i>
Leukine	ГМ-КСФ	Berlex	<i>S. cerevisiae</i>
Novolog	Инсулин	NovoNordisk	<i>S. cerevisiae</i>
Pediarix	HBsAg	GlaxoSmithKline	<i>S. cerevisiae</i>
Procomvax	HBsAg	AventisPharma	<i>S. cerevisiae</i>
Refuldan	Гирудин	Hoechst	<i>S. cerevisiae</i>
Regranexrh	Фактор роста тромбоцитов	Janssen-Cilag	<i>S. cerevisiae</i>
Revasc	Гирудин	AventisPharma	<i>S. cerevisiae</i>
Twinrix	HBsAg	GlaxoSmithKline	<i>S. cerevisiae</i>
<i>Препараты в стадии разработки</i>			
Заболевание/назначение	Рекомбинантный белок	Компания-разработчик	Система экспрессии
Антиангиогенный фактор	Ангиостатин	EntreMed	<i>P. pastoris</i>
Кистозный фиброз	Ингибитор эластазы	Duax	<i>P. pastoris</i>
Антиангиогенный фактор	Эндостатин	EntreMed	<i>P. pastoris</i>
Диабет	Фактор роста эпидермиса	TransitionTherapeutix	<i>P. pastoris</i>
Дефицит ИФР-1	Инсулиноподобный фактор роста	Cephalon	<i>P. pastoris</i>
Кровопотери	Сывороточный альбумин человека	Welfide	<i>P. pastoris</i>
Ангиодема	Ингибитор калликреина	Duax	<i>P. pastoris</i>

Заключение

Рекомбинантные белки медицинского назначения, получаемые в метилотрофных дрожжах, в первую очередь *Pichia pastoris*, все в больших количествах проходят клинические испытания и выходят на фармацевтический рынок. Можно ожидать, что успешная «гуманизация» процессов гликозилирования белков, аналогичная описанной для дрожжей *S. cerevisiae*, будет способствовать развитию этой платформы экспрессии. Однако, ряд ограничений, в первую очередь связанных с процессами фолдинга белка и

его секреции, до настоящего времени сдерживают применение метилотрофных дрожжей в качестве биофабрик. Расшифровка полного генома *P. pastoris* существенно расширила возможности исследования физиологии и генетики этих дрожжей и создания на их основе систем экспрессии рекомбинантных белков, предполагающих модификацию штамма-продуцента методами биоинженерии и метаболической инженерии. Помимо экспрессии рекомбинантных белков метилотрофные дрожжи привлекают все больший интерес как модельные системы для фундаментальных исследований механизмов фолдинга и секреции белков у эукариот.

Принимая во внимание то, что в настоящее время *P. pastoris* и другие метилотрофные дрожжи на порядок чаще используются для гетерологичной экспрессии белков, чем *S. cerevisiae* или другие дрожжи согласно научной литературе, можно предположить, что и биофармацевтическое использование этой системы будет активно развиваться. Уже в ближайшие годы *P. pastoris* может войти в тройку наиболее широко используемых платформ продукции фармацевтических белков наряду с клетками китайского хомячка и *E. coli*.

Дополнительная литература:

- 1) Blazeck J, Alper H. (2010) Systems metabolic engineering: genome-scale models and beyond. *Biotechnol. J.* 5(7), 647–659.
- 2) Brodsky JL, Skach WR. (2011) Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum: recent lessons from yeast and mammalian cell systems. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23(4), 464–475.
- 3) Cos O, Ramyn R, Montesinos J, Valero F. (2006) Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. *Microb. Cell Fact.* 5, 17.
- 4) Damasceno LM, Huang CJ, Batt CA. (2012) Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93(1), 31–39.
- 5) De Schutter K, Lin YC, Tiels P *et al.* (2009) Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nat. Biotechnol.* 27(6), 561–566.
- 6) Gasser B. *et al.* (2013) *Pichia pastoris*: protein production host and model organism for biomedical research. *Future Microbiol.* 8 (2), 191–208
- 7) Hamilton S, Gerngross T. (2007) Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18(5), 387–392.
- 8) Hardy, E. *et al.* (2000) Large-scale production of recombinant hepatitis B surface antigen from *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* 77, 157–167.
- 9) Jacobs, P.P., Geysens, S., Vervecken, W., Contreras, R. & Callewaert, N. (2009) Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology. *Nat. Protoc.* 4, 58–70.
- 10) Watanabe, H. *et al.* (2001) In vitro and in vivo properties of recombinant human serum albumin from *Pichia pastoris* purified by a method of short processing time. *Pharm. Res.* 18, 1775–1781.