

## ФИБРИНОЛИТИЧЕСКАЯ ПРОТЕАЗА *ASPERGILLUS OCHRACEUS*: РЕКОМБИНАНТНЫЙ СИНТЕЗ И ПОТЕНЦИАЛ ПРИМЕНЕНИЯ

**К.А. Мирошников<sup>1,2</sup>, С.К. Комаревцев<sup>1</sup>, В.Н. Степаненко<sup>3</sup>, А.А. Осмоловский<sup>2</sup>, Е.В. Локтюшов<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>ГНЦ ФГБУН «Институт биоорганической химии им. М.М. Шенякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», биологический факультет, Москва, Россия

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова», Москва, Россия

<sup>4</sup>ФГБУН ФИЦ «Пуцинский научный центр биологических исследований» РАН, Институт биологического приборостроения РАН, Пуцино, Московская область, Россия

Протеолитические ферменты повсеместно распространены в биосфере. Они присутствуют во всех живых организмах, где участвуют в разнообразных процессах жизнедеятельности. Протеазы применяются в пищевой, фармацевтической, легкой промышленности и составляют почти 60% от общего объема продаж ферментов в мире. В настоящее время рекомбинантный синтез все более широко используется для получения протеолитических ферментов, особенно в фармацевтической промышленности, где предъявляются высокие требования к чистоте препаратов и потенциальной иммуногенности.

Протеаза, синтезируемая штаммом ВКМ F-4104D микромицета *Aspergillus ochraceus*, относится к группе протеиназа-К-подобных субтилизиновых сериновых протеолитических ферментов. Было показано, что эта протеаза способна активировать протеин С плазмы крови [1, 2], один из важных факторов антикоагулянтной (противосвертывающей) системы крови. Анализ активности протеина С плазмы крови, ключевым компонентом которого выступает протеаза-активатор из змеиного яда, назначают при различных заболеваниях сердечно-сосудистой системы, сепсисе, гемодиализе, во время приема антикоагулянтных препаратов, а также при подготовке к беременности [3]. Нами было продемонстрировано, что протеаза микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D может выполнять схожую функцию и поэтому выступает перспективным кандидатом для использования в медицине и ветеринарии, представляет собой более дешевую в получении альтернативу активаторам протеина С из змеиных ядов [4]. Кроме этого, недавно была обнаружена способность данного фермента к эффективному разрушению биопленок, образуемых микроорганизмами *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* [5]. Выявленная противовоспалительная активность рекомбинантной протеазы может служить обоснованием ее применения для разработки препаратов на основе протеолитических ферментов для лечения заболеваний, сопровождающихся воспалением, в частности метритов и маститов. На модели хронического воспаления («фетровая гранулема») выявлена противовоспалительная (антиэкссудативная и антипролиферативная) активность препарата рекомбинантной протеазы микромицета *A. ochraceus* ВМКФ 4104D, сопоставимая с таковой у лекарственного препарата трипсин. На модели острого воспаления (формалиновый отек) у исследуемой протеазы установлены свойства задерживать прирост воспалительного отека и тормозить развитие воспалительной реакции [6].

Ранее нами были успешно разработаны три технологические схемы получения фермента [7, 8]. Первая схема базируется на экспрессии гена PAPS в микромицете *A. ochraceus* ВКМ F-4104D (продукция белка осуществляется непосредственно самим штаммом микромицета-производителя в условиях глубоководного или твердофазного культивирования, либо иммобилизованном на гранулах, состоящих из альгината кальция). Две другие технологические схемы основаны на прокариотической экспрессии фермента либо в растворимой форме, либо в виде телец включения в *E. coli*. Клетки дрожжей *P. pastoris* (*K. phaffii*) часто сравнивают с микробными клеточными фабриками (microbial cell factories) рекомбинантных белков и пептидов за их способность к сверхэкспрессии многих целевых белков [9].

В представленной работе сконструирован экспрессионный вектор pD912-AFSnoEAEA-PAPS, где ген, кодирующий целевой фермент, находится под контролем сильного промотора AOX1, индуцируемого метанолом. Полученным вектором трансформировали клетки *P. pastoris* BG10. Вокруг клонов, секретирующих активный фермент, наблюдали формирование характерных зон гидролиза казеина.

Далее клоны проверяли на способность секретировать целевой фермент в культуральную жидкость и сохранять эту способность после 60 генераций. Результаты анализа показали, что в процессе культивирования отобранных клонов наблюдается наработка и секреция в культуральную

жидкость белка молекулярной массой ~30 кДа, что соответствует расчетной массе активной формы целевого фермента, при этом эндогенные белки клеток *P. pastoris* практически отсутствовали. При продолжительном культивировании штамм не утратил способность к продукции белка, вставка стабильна и без давления отбора. Более того, штамм показал высокую гомогенность, что критически важно для дальнейшего увеличения объемов наработки и/или проведения ферментации, а малое количество собственных белков продуцента в культуральной жидкости сильно облегчает последующую очистку. Секретируемая форма белка также снимает вопрос дорогостоящего этапа разрушения биомассы.

Ежедневный анализ культуральной жидкости показал, что накопление целевого фермента начинается уже на первые сутки после индукции белкового синтеза метанолом. На третьи-четвертые сутки культивирования после индукции наблюдали выход на максимальный уровень накопления РАРС, который составил 640 ед./мл. Наблюдаемый выход целевого фермента в пересчете на объем культуры сопоставим с ранее полученными значениями в системе экспрессии *E. coli*, однако он может быть потенциально увеличен при проведении культивирования в ферментере с повышенным уровнем аэрации. При этом высокая обогащенность культуральной жидкости активным ферментом и простота его дальнейшей очистки при получении в *P. pastoris* дает значительное преимущество перед бактериальной системой экспрессии.

**Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 25-24-00020)**

#### Литература

1. Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Baranova N.A. et al. Fungal proteases as promising biocatalysts for various industries // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2013. Vol. 49. № 6. P. 581–586. doi: 10.1134/S0003683813060148
2. Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Kurakov A.V. et al. Proteolytic activity of soil micromycetes // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2012. Vol. 48. № 5. P. 488–492. doi: 10.1134/S0003683812050109
3. Mohammed S., Favalaro E.J. Laboratory tests for von Willebrand factor // *Methods in Molecular Biology*. 2017. Vol. 1646. P. 137–143. doi: 10.1007/978-1-4939-7196-1\_10
4. Osmolovskiy A.A., Orekhova A.V., Kreyer V.G. et al. Proteolytic enzymes of microscopic fungi as potential agents for antimicrobial therapy // *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2018. Vol. 64. № 1. P. 115–118.
5. Nasr A.R., Komarevtsev S.K., Baidamshina D.R. et al. Antifungal activity of *Bacillus subtilis* strains and their potential for biocontrol of phytopathogens // *Biochimie*. 2025. Vol. 230. P. 33–42. doi: 10.1016/j.biochi.2024.11.002
6. Osmolovskiy A.A., Orekhova A.V., Kreyer V.G. et al. Antimicrobial potential of fungal proteases against drug-resistant bacteria // *Life*. 2021. Vol. 11. № 8. 782. doi: 10.3390/life11080782
7. Komarevtsev S.K., Evseev P.V., Shneider M.M. et al. Genomic analysis of *Bacillus subtilis* strains with antifungal activity // *Microorganisms*. 2021. Vol. 9. № 9. 1936. P. 1–13. doi: 10.3390/microorganisms9091936
8. Komarevtsev S.K., Popova E.A., Kreyer V.G. et al. Protease complex from *Bacillus subtilis*: isolation and properties // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2020. Vol. 56. № 1. P. 32–36. doi: 10.1134/S0003683820010093
9. Pan Y., Yang J., Wu J. et al. Recent advances in microbial proteases for industrial applications // *Frontiers in Microbiology*. 2022. Vol. 13. 1059777. doi: 10.3389/fmicb.2022.1059777

УДК 616-006

DOI: <http://doi.org/10.20914/2304-4691-2025-2-41-42>

## ПРИМЕНЕНИЕ ЯДЕРНОЙ МЕДИЦИНЫ В ОНКОЛОГИИ

**Васильева А.С.**

*ФГБОУ ВО Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко, г. Воронеж*

Ядерная медицина — это раздел медицины, использующий радиоактивные изотопы для диагностики и лечения заболеваний. В онкологии ядерная медицина играет ключевую роль в раннем выявлении, стадировании, оценке эффективности лечения и паллиативной помощи. Благодаря уникальной способности визуализировать молекулярные процессы в организме, ядерная медицина предоставляет информацию, недоступную другим методам визуализации.

Принцип диагностики в ядерной медицине основан на введении в организм радиофармпрепарата (РФП), который избирательно накапливается в определенных тканях или органах. Затем с помощью специальных камер (гамма-камер или ПЭТ-сканеров) регистрируется распределение РФП, что позволяет получить изображение, отражающее функциональное состояние тканей.