

НОВЫЕ И УЛУЧШЕННЫЕ БИОКАТАЛИЗАТОРЫ ДЛЯ СИНТЕЗА ЛЕКАРСТВ И МЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

Тишков В.И.^{1,2,3}, Пометун А.А.^{1,3}, Степашина А.В.^{1,3}, Каргов И.С.^{2,3}, Зарубина С.А.^{2,3}, Атрошенко Д.Л.^{2,3}, Паршин П.Д.^{2,3}, Ковалевский Р.П.^{2,3}, Виролайнен Т.С.^{2,3}, Авданина Д.А.^{1,3}, Лобанова Е.А.^{1,3}, Жгун А.А.^{1,3}, Эльдаров М.А.^{1,3}, Чубарь Т.А.^{2,3}, Бойко К.¹, Федорчук Е.А.², Федорчук В.В.², E. D'Oronzio⁴, S. Facheris⁴, F. Secundo⁴, Савин С.С.^{2,3}

¹Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, Москва, Россия.

²Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия.

³ООО "Инновации и высокие технологии МГУ", Москва, Россия.

⁴Институт химии молекулярного распознавания, CNR, Италия

Ферменты в силу их высокой каталитической активности и субстратной специфичности все шире используются на практике. Однако природные ферменты не удовлетворяют требованиям практики в силу высокой стоимости получения, низкой стабильности и адаптации к природным соединениям. В нашей лаборатории проводятся систематические исследования взаимосвязи структура-функция физиологически и практически важных ферментов. За последние 3 года нами были получены новые и улучшенные формы различных биокатализаторов.

1. Формиатдегидрогеназа (ФДГ). Клонированы новые гены ФДГ из бактерий *Moraxella* sp.C1 (MorFDH), *Stathylococcus aureus* (StaFDH), дрожжей *Ogataea parapolyomorpha* (OpaFDH), *Saccharomyces cerevisiae* (SacFDH), осуществлена суперэкспрессия генов этих ФДГ в клетках *E.coli*. Рекомбинантные ферменты были выделены и охарактеризованы, для некоторых получены кристаллы и решены структуры. Показано, что StaFDH обладает самой высокой активностью из описанных ФДГ (минимум в 2,5 раза), а OpaFDH имеет низкие значения K_m по субстратам. Оба фермента по стабильности уступают только ферменту из бактерий *Pseudomonas* sp.101 (PseFDH). Получены мутантные формы этих ферментов, а также ФДГ из других источников с улучшенными каталитическими свойствами и стабильностью. Получена химерная форма MorFDH и PseFDH. Разработана методика определения стабильности ФДГ в мочевины, позволяющая сравнивать стабильность в обратимых условиях. Предложен метод бесхроматографической очистки ФДГ в двухфазных системах вода-полиэтиленгликоль-соль. Проведено сравнительное изучение активности и стабильности природных ФДГ и их мутантов в ионных жидкостях - альтернативной среде для проведения биокаталитических процессов.

2. Оксидоза D-аминокислот (DAAO). Продолжены эксперименты по белковой инженерии DAAO из дрожжей *Trigonopsis variabilis*. Получены мутанты с повышенной стабильностью и активностью с цефалоспорином C, а также мутанты с узкой субстратной специфичностью для медицинской диагностики D-аминокислот, участвующих в регуляции нервной деятельности. Клонированы новые гены DAAO из дрожжей *Hansenula polymorpha* (*Ogataea parapolyomorpha*). Получены нокаутные по данному ферменту штаммы *H.polymorpha*.

3. Ферменты синтеза пенициллиновых антибиотиков. Клонирован ген одной из самых термостабильных пенициллиназ (PA) из *Alcaligenes faecalis* DSMZ 30030. Получена одноцепочечная форма такого фермента, которая не отличается по каталитическим свойствам от природного гетеродимера. Клонирован ген альтернативного фермента синтеза альфа-аминопенициллинов и цефалоспоринов - гидролазы эфиров альфа-аминокислот. Показано, что при оптимальных условиях данный фермент исключительно эффективен в синтезе ряда пенициллинов и цефалоспоринов.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант 16-14-00043) и Российским фондом фундаментальных исследований (гранты 15-54-78035-Итал_а, 16-34-01320-мол_а, 17-04-01469а, 17-04-01487а, 17-04-01662а).