

БИОТЕХНОЛОГИЯ/BIOTECHNOLOGY

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.158.22>

РАЗРАБОТКА ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНАЗ: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ОБЗОР СОВРЕМЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И МЕТОДИК

Обзор

Полякова А.О.^{1,*}, Терлецкий В.П.²

¹ ORCID : 0009-0004-3553-5926;

² ORCID : 0000-0003-4043-3823;

^{1,2} Ленинградский государственный университет имени А. С. Пушкина, Пушкин, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (anapolyakovaa[at]gmail.com)

Аннотация

Статья посвящена анализу современных подходов к разработке ферментных препаратов на основе коллагеназ — ключевых агентов для лечения ран, ожогов и рубцовых поражений. Актуальность исследования обусловлена ростом числа осложненных ран (диабетических, трофических) и необходимостью импортозамещения в условиях санкционного давления на российскую фармацевтическую отрасль. В работе систематизированы данные о природных и рекомбинантных источниках коллагеназ, включая бактериальные (*Clostridium histolyticum*) и грибные (*Aspergillus*) продуценты, морское животное сырье (гепатопанкреас крабов). Отмечены преимущества и недостатки каждого вида исходного материала для получения коллагеназ. Проведен сравнительный анализ их специфичности, активности и безопасности.

Ключевые слова: коллагеназа, *Clostridium histolyticum*, ферментные препараты.

DEVELOPMENT OF ENZYME DRUGS BASED ON COLLAGENASES: A COMPARATIVE REVIEW OF MODERN TECHNOLOGIES AND METHODS

Review article

Полякова А.О.^{1,*}, Терлецкий В.П.²

¹ ORCID : 0009-0004-3553-5926;

² ORCID : 0000-0003-4043-3823;

^{1,2} Pushkin Leningrad State University, Pushkin, Russian Federation

* Corresponding author (anapolyakovaa[at]gmail.com)

Abstract

The article is devoted to the analysis of modern approaches to the development of enzyme drugs based on collagenases — key agents for the treatment of wounds, burns and scar lesions. The relevance of the study is due to the growing number of complicated wounds (diabetic, trophic) and the necessity of import substitution in the conditions of sanctions pressure on the Russian pharmaceutical industry. The paper systematises data on natural and recombinant sources of collagenases, including bacterial (*Clostridium histolyticum*) and fungal (*Aspergillus*) producers, marine animal raw materials (crab hepatopancreas). Advantages and disadvantages of each type of starting material for collagenase production were noted. A comparative analysis of their specificity, activity and safety was carried out.

Keywords: collagenase, *Clostridium histolyticum*, enzyme drugs.

Введение

Коллагеназы — это ферменты семейства металлизависимых протеиназ матрикса, способные гидролизовать нативный коллаген. Эти ферменты играют решающую роль при развитии таких физиологических процессов, как морфогенез, резорбция и ремоделирование тканей, миграция, адгезия, дифференцировка и пролиферация клеток, а также при патологических состояниях (ревматоидный артрит, гломерулонефрит, пародонтиты, изъязвление роговой оболочки глаз и др.) [1].

Актуальность исследований в этой области подчеркивается растущей распространенностю патологий, требующих применения коллагеназ: хронические раны (диабетические, трофические), ожоги, гипертрофические рубцы, некротические поражения и заболевания опорно-двигательного аппарата. По данным ВОЗ, только в 2022 году в мире зарегистрировано более 10 млн случаев осложненных ран, требующих ферментативной терапии, что ставит вопрос о необходимости совершенствования существующих препаратов и поиска инновационных решений в этой области.

Классификация и источники коллагеназ

Коллагеназы подразделяются на несколько групп в зависимости от структуры, механизма действия и происхождения:

- Микробные и грибные коллагеназы. Продуцируются бактериями рода *C. histolyticum*, грибами *Aspergillus*, *Penicillium* и актиномицетами. Они характеризуются высокой активностью, но могут вызвать иммунный ответ из-за примесей бактериальных эндотоксинов [2].

- Животные коллагеназы. Выделяются из тканей крабов (гепатопанкреас), рыб (поджелудочная железа), пиявок (*Hirudo medicinalis*). Они более специфичны к коллагену I типа, но сложны в очистке.

- Рекомбинантные коллагеназы. Получают методами генной инженерии (например, экспрессия гена *colH* в *E.coli*) Имеют преимущество в высокой чистоте.

2.1. Микробные коллагеназы

Среди микробных коллагеназ, продуцируемых бактериями рода *Clostridium*, известны коллагеназы *C. histolyticum*, *C. perfringens*, *C. tetani*, также применяют бактерии *Achromobacter iophagus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptomyces lavandulae*. Среди микроорганизмов наиболее изученными продуцентами коллагеназы являются анаэробные бактерии рода *Clostridium*, особенно *C. histolyticum* [3].

Коллагеназы, полученные из *C. histolyticum*, наиболее часто используются для получения лекарственных средств. Микробные протеазы представляют собой одноцепочечные белки с массами от 68 кДа до 130 кДа [4]. На данный момент современные биотехнологические стратегии активно смещаются в сторону растительных альтернатив питательных сред для *C. histolyticum*. Этот тренд обусловлен не только этическими требованиями, но и необходимостью исключить риски контаминации прионами при использовании животных компонентов в производстве лекарственных препаратов [2].

C. histolyticum является «золотым» стандартом для производства коллагеназ (препарат «Коллализин») — продуцирует коллагеназу типа I (*ColH*) и типа II (*ColG*), расщепляющих разные участки коллагена. Фермент селективно расщепляет перекрёстные связи коллагена в бляшках, не повреждая эластин и гладкомышечные волокна [5].

Преимущества: микробные коллагеназы отличаются от коллагеназ животных тем, что они проявляют более широкую субстратную специфичность, расщепляют нативный и денатурированный коллаген, и имеет более высокую коллагеназную активность. Бактериальная коллагеназа уникальна тем, что она может разрушать нативные коллагены и водорастворимые денатурированные коллагены. Она может воздействовать практически на все типы коллагена и способна образовывать множественные углубления в областях тройной спирали [6]. В качестве дополнительных преимуществ следует отметить неограниченность источников получения, возможность экзогенной регуляции, отсутствие прионов, относительная простота процессов выделения и очистки, возможность генно-инженерных манипуляций [7]. В свою очередь, микробные ферменты — наиболее эффективные деструкторы коллагена [8].

Недостатки: токсичность бактериальных лизатов, необходимость многоступенчатой очистки, патогенность и анаэробность продуцента, повышенные требования безопасности на всех стадиях производства и реализации.

2.2. Грибные коллагеназы

Для синтеза коллагеназы используют мицелиальные грибы рода *Aspergillus*, которые имеют выход ферmenta до 15–20 мг/л, термостабильность 45°C [9].

Преимущества: мицелиальные грибы являются источниками многих гидролаз и обладают способностью изменять качественный и количественный состав секреируемых ферментов в ответ на введение в состав питательных сред тех или иных субстратов-индукторов [10], высокая активность по отношению к коллагену I типа.

Недостатки: длительный период культивирования, включение коллагена в питательную среду для частичного замещения сахарозы и обеспечения специфичных условий, не все микроорганизмы могут расти в условиях пониженной влажности; не полностью обеспечивается доступность компонентов среды; биосинтетические процессы протекают медленнее из-за влияния диффузационных ограничений; трудно контролировать параметры процесса, высокая стоимость, которая определяет и стоимость получаемого продукта; большой выброс сточных вод [11], [12].

2.3. Животные коллагеназы

Гепатопанкреас камчатского краба (*Paralithodes camtschatica*) используется в препарате «Дигестол» с известной активностью 120–150Ед/мг. Выделяют так же коллагеназы из внутренностей рыбы [4], [13].

Преимущества: Препараты на основе крабовой коллагеназы характеризуются меньшей частотой побочных реакций, включая аллергические реакции и локальное раздражение, что подтверждает их преимущество для длительной терапии патологических рубцов [14], [15].

Недостатками такого способа получения коллагеназы является неспособность полученных ферментов расщеплять нативный коллаген, что сужает сферу их применения. Кроме того, использование такого сырья усложняет получение высокоочищенных коллагеназ [9].

Некоторые недостатки использования животного сырья для синтеза коллагеназы: неспособность полученных ферментов расщеплять нативный коллаген, что сужает сферу применения коллагеназы; сложности с получением высокоочищенной коллагеназы, образование большого количества отходов при получении коллагеназы из гепатопанкреаса, которые необходимо утилизировать; использование высоких концентраций поверхностно-активных веществ и солей в процессе выделения коллагеназы, способных разрушить экологическое равновесие окружающей среды; отсутствие стадии удаления липидов, содержащихся в гепатопанкреасе крабов, высокое содержание которых оказывается на стабильности конечного продукта из-за окисления липидов и эффективности проведения ультрафильтрации, так как рабочие мембранны быстро выходят из строя и длительность процесса получения коллагеназы, что снижает выход продукта и уровень его активности.

2.4. Рекомбинантные коллагеназы

Для синтеза рекомбинантной коллагеназы используют системы экспрессии *E. coli* для генных конструкций коллагеназы T из *C. tetani*, коллагеназы G и H из *C. histolyticum*. Разработанные способы получения показали свою эффективность.

Преимущества применения *E. coli* для синтеза коллагеназы: возможность получения большого количества белка (не менее 10 мг высокочистого моноизоформного белка на литр культуры); гибкая платформа для очистки; возможность скрининга рекомбинантных коллагеназ; быстрота, экономичность и простота установки производственной платформы.

Недостатки: потеря плазмиды и антибиотических свойств; отсутствие посттрансляционных модификаций, в том числе способности образовывать дисульфидные связи; неправильная укладка белка; редкое использование некоторых кодонов; загрязнение эндотоксином; для получения полностью функциональных полипептидов при использовании *E. coli* требуется сложная и обширная обработка [16]. В качестве продуцентов коллагеназы используются различные микроорганизмы (Табл.)

Таблица 1 - Источник и основные свойства коллагеназ

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.158.22.1>

| Источник | Активность (ед/мг) | Специфичность | Риск аллергенности |
|--|--------------------|---------------------|--------------------|
| <i>Clostridium histolyticum</i> | 200-250 | коллаген I-IV типов | высокий |
| Гепатопанкреас краба | 120-150 | коллаген I типа | умеренный |
| Рекомбинантные бактерии <i>E. coli</i> | 180-200 | коллаген I-III типа | низкий |
| Мицелиальные грибы рода <i>Aspergillus</i> | 80-100 | коллаген I типа | низкий |

Заключение

У ферментных препаратов на основе коллагеназы имеется огромный потенциал использования. Уже сейчас фермент применяется в различных областях медицины, включая хирургию, дерматологию и регенеративную медицину. На основании данного анализа, было показано, что бактериальные коллагеназы из *Clostridium histolyticum* наиболее изучены и имеют преимущества перед коллагеназами животных и грибов. Такие ферменты имеют достаточно широкую субстратную специфичность, расщепляют нативный и денатурированный коллаген, проявляют более высокую коллагеназную активность, что для разработки ферментного препарата является важнейшим параметром.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы / References

1. Насибов Э.Н. Получение и свойства коллагенолитической протеиназы *Aspergillus fumigatus*. / Э.Н. Насибов, З.К. Никитина // Химико-фармацевтический журнал. — 2023. — № 7. — С. 38–42.
2. Полякова А.О. Анализ состава растительных питательных сред для продуктивности *Clostridium histolyticum*/ А.О. Полякова // Молодая фармация – потенциал будущего : Сборник материалов XIV всероссийской научной конференции с международным участием Молодежного научного общества СПХФУ; — Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, 2024.
3. Конон А.Д. Особенности биотехнологий клостридиальных коллагеназ — перспективных ферментов медицинского назначения. / А.Д. Конон // Медицина экстремальных ситуаций. — 2016. — № 2 (16). — С. 45–57.
4. Тихонов С.Л. Технология производства и биокаталитические свойства протеолитического ферментного препарата. / С.Л. Тихонов, Н.В. Брашко, Н.В. Тихонова // Вестник Южно-Уральского государственного университета. — 2021. — № 2. — С. 26–35. — DOI: 10.14529/food210203
5. Favorito L.A. Editorial Comment: Risk Factors for Penile Fracture After Intralesional Collagenase Clostridium histolyticum in Peyronie's Disease. / L.A. Favorito // International Brazilian Journal of Urology. — 2024. — № 2. — P. 223–224.
6. Майорова А.В. Коллагеназы в медицинской практике: современные средства на основе коллагеназы и перспективы их совершенствования. / А.В. Майорова, Б.Б. Сысуев, Ю.О. Иванкова // Фармация и фармакология. — 2019. — № 7 (5). — С. 260–270.
7. Wanderley M.C.A. Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review. / M.C.A. Wanderley // Brasilian J. Microbiology. — 2017. — № 48. — Р. 13–24. — DOI: 10.1016/j.bjm.2016.08.001
8. Сухих С.А. Изучение коллагеназной активности ферментов микробного, растительного и животного происхождения. / С.А. Сухих // АгроЭкоИнженерия. — 2021. — № 2 (107). — С. 142–148.
9. Можина Н.В. Коллагенолитические ферменты патогенных микроорганизмов. / Н.В. Можина, Г.Н. Руденская // Биомедицинская химия. — 2004. — № 50 (6). — С. 539–554.
10. Шлегель Г. Общая микробиология / Г. Шлегель. — Москва: Мир, 1987. — 556 с.

11. Contesini F.J. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. / F.J. Contesini, R.R. Melo, H.H. Sato // Critical reviews in biotechnology. — 2018. — № 38 (3). — P. 321–334. — DOI: 10.1080/07388551.2017.1354354
12. Sharma K.M Microbial alkaline proteases: optimization of production parameters and their properties. / K.M Sharma, R. Kumar, S. Panwar // Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. — 2017. — № 15 (1). — P. 115–126. — DOI: 10.1016/j.jgeb.2017.02.001
13. Стосман К.И. Изучение возможности применения коллагеназы из африканского сома *Clarias gariepinus* при ожогах и рубцах в экспериментах ex vivo и in vivo. / К.И. Стосман, К.В. Сивак, Е.Ю Калинина // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2022. — № 5. — С. 29–35.
14. Парамонов Б.А. Сравнительная оценка эффективности коллагеназ различного происхождения, применяемых для лечения ожогов и рубцов кожи. / Б.А. Парамонов, Е.М. Пожарская, К.В. Сивак // Гены и Клетки. — 2022. — № 3. — С. 172–173.
15. Богачев В.Ю. Консервативные методы лечения и профилактики рубцов кожи. / В.Ю. Богачев, Б.В. Болдин, Г.А. Варич // Амбулаторная хирургия. — 2021. — № 18 (2). — С. 39–44.
16. Siew Y.Y. Downstream processing of recombinant human insulin and its analogues production from *E. coli* inclusion bodies. / Y.Y. Siew, W. Zhang // Bioresour. Bioprocess. — 2021. — № 8 (65). — DOI: 10.1186/s40643-021-00419-w

Список литературы на английском языке / References in English

1. Nasibov E.N. Poluchenie i svojstva kollagenoliticheskoy proteinazy' *Aspergillus fumigatus* [Production and properties of collagenolytic proteinase of *Aspergillus fumigatus*]. / E.N. Nasibov, Z.K. Nikitina // Chemical and Pharmaceutical Journal. — 2023. — № 7. — P. 38–42. [in Russian]
2. Polyakova A.O. Analiz sostava rastitelnykh pitatelnykh sred dlya produktivnosti *Clostridium histolyticum* [Analysis of the composition of plant nutrient media for the productivity of *Clostridium histolyticum*] / A.O. Polyakova // Young Pharmacy — Future Potential : Proceedings of the XIV All-Russian Scientific Conference with International Participation of the SPCPU Youth Scientific Society; — St. Petersburg State University of Chemistry and Pharmacy, 2024. (accessed: 02.07.25). [in Russian]
3. Konon A.D. Osobennosti biotekhnologij klostridial'nyx kollagenaz — perspektivnyx fermentov medicinskogo naznacheniya [Features of biotechnology of clostridial collagenases — promising enzymes for medical use]. / A.D. Konon // Emergency medicine. — 2016. — № 2 (16). — P. 45–57. [in Russian]
4. Tixonov S.L. Texnologija proizvodstva i biokataliticheskie svojstva proteoliticheskogo fermentnogo preparata [Production technology and biocatalytic properties of proteolytic enzyme drug]. / S.L. Tixonov, N.V. Brashko, N.V. Tixonova // Bulletin of South Ural State University. — 2021. — № 2. — P. 26–35. — DOI: 10.14529/food210203 [in Russian]
5. Favorito L.A. Editorial Comment: Risk Factors for Penile Fracture After Intralesional Collagenase Clostridium histolyticum in Peyronie's Disease. / L.A. Favorito // International Brazilian Journal of Urology. — 2024. — № 2. — P. 223–224.
6. Majorova A.V. Kollagenazy' v medicinskoj praktike: sovremenny'e sredstva na osnove kollagenazy' i perspektivny' ix sovershenstvovaniya [Collagenases in medical practice: current collagenase-based agents and prospects for their improvement]. / A.V. Majorova, B.B. Sy'suev, Yu.O. Ivankova // Pharmacy and pharmacology. — 2019. — № 7 (5). — P. 260–270. [in Russian]
7. Wanderley M.C.A. Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review. / M.C.A. Wanderley // Brasilian J. Microbiology. — 2017. — № 48. — P. 13–24. — DOI: 10.1016/j.bjm.2016.08.001
8. Suxix S.A. Izuchenie kollagenaznoj aktivnosti fermentov mikrobnogo, rastitel'nogo i zhivotnogo proisxozhdeniya [Study of collagenase activity of enzymes of microbial, plant and animal origin]. / S.A. Suxix // AgroEcoEngineering. — 2021. — № 2 (107). — P. 142–148. [in Russian]
9. Mozhina N.V. Kollagenoliticheskie fermenty' patogenn'yx mikroorganizmov [Collagenolytic enzymes of pathogenic microorganisms]. / N.V. Mozhina, G.N. Rudenskaya // Biomedical chemistry. — 2004. — № 50 (6). — P. 539–554. [in Russian]
10. Shlegel' G. Obshhaya mikrobiologiya [General microbiology] / G. Shlegel'. — Moscow: Mir, 1987. — 556 p. [in Russian]
11. Contesini F.J. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. / F.J. Contesini, R.R. Melo, H.H. Sato // Critical reviews in biotechnology. — 2018. — № 38 (3). — P. 321–334. — DOI: 10.1080/07388551.2017.1354354
12. Sharma K.M Microbial alkaline proteases: optimization of production parameters and their properties. / K.M Sharma, R. Kumar, S. Panwar // Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. — 2017. — № 15 (1). — P. 115–126. — DOI: 10.1016/j.jgeb.2017.02.001
13. Stosman K.I. Izuchenie vozmozhnosti primeneniya kollagenazy' iz afrikanskogo soma *Clarias gariepinus* pri ozhogax i rubczax v e'ksperimentax ex vivo i in vivo [Study of the possibility of using collagenase from the African catfish *Clarias gariepinus* for burns and scars in ex vivo and in vivo experiments]. / K.I. Stosman, K.V. Sivak, E.Yu Kalinina // Experimental and clinical pharmacology. — 2022. — № 5. — P. 29–35. [in Russian]
14. Paramonov B.A. Sravnitel'naya ocenka effektivnosti kollagenaz razlichnogo proisxozhdeniya, primenyaemyx dlya lecheniya ozhogov i rubcov kozhi [Comparative evaluation of the efficacy of collagenases of different origin used for the treatment of burns and skin scars]. / B.A. Paramonov, E.M. Pozharskaya, K.V. Sivak // Genes and Cells. — 2022. — № 3. — P. 172–173. [in Russian]
15. Bogachev V.Yu. Konservativny'e metody' lecheniya i profilaktiki rubcov kozhi [Conservative methods of treatment and prevention of skin scars]. / V.Yu. Bogachev, B.V. Boldin, G.A. Varich // Outpatient surgery. — 2021. — № 18 (2). — P. 39–44. [in Russian]

16. Siew Y.Y. Downstream processing of recombinant human insulin and its analogues production from *E. coli* inclusion bodies. / Y.Y. Siew, W. Zhang // Bioresour. Bioprocess. — 2021. — № 8 (65). — DOI: 10.1186/s40643-021-00419-w