

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ / ORIGINAL ARTICLES

УДК 615.355+577.152.344

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-106-113>

ШИФР

03.01.06

СПЕЦИАЛЬНОСТЬ

Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)



Трипсин. Свойства и применение в производстве биологических лекарственных препаратов

С. М. Суханова*, Е. М. Петручук, А. А. Генералов

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

Производство биологических лекарственных препаратов, применяемых в профилактических, диагностических и лечебных целях, включает в себя использование биологических процессов и материалов, характеризующихся вариабельностью. Для обеспечения качества готового биопрепарата необходимо определять источник, происхождение и пригодность исходного сырья и материалов для последующего их использования, включая реагенты, питательные среды, буферные растворы, сыворотки, ферменты. В работе обобщены данные литературы о строении, свойствах и механизме действия трипсина, фермента животного происхождения, широко используемого при производстве биологических лекарственных препаратов. Представлены материалы по источникам, способам получения, требованиям к свойствам препаратов трипсина различной степени очистки, предназначенных для медицинского и ветеринарного применения, а также для использования в качестве реагента при производстве вакцин, лекарственных средств передовой терапии и генно-инженерных препаратов. Показана роль трипсина в системе пищеварительных ферментов желудочно-кишечного тракта животных и человека, в диссоциации клеток в культуре при использовании его в процессе клеточного пассирования, в механизме протеолитической активации и инактивации широкого спектра вирусов, а также изучении первичной структуры белков.

Ключевые слова: трипсин; биологические лекарственные препараты; культура клеток; активация вирусов; производство вакцин

Для цитирования: Суханова СМ, Петручук ЕМ, Генералов АА. Трипсин. Свойства и применение в производстве биологических лекарственных препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2018;18(2):106–113. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-106-113>

* **Контактное лицо:** Суханова Светлана Михайловна; SuhanovaSM@expmed.ru

Trypsin. Properties and Use in the Production of Biological Medicinal Products

S. M. Sukhanova*, E. M. Petrushuk, A. A. Generalov

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

The production of biological medicinal products used for prophylactic, diagnostic and therapeutic purposes includes the use of inherently variable biological processes and materials. In order to ensure the quality of the finished biological product it is necessary to determine the source, nature and fitness for use of the starting materials, including reagents, culture media, buffer solutions, sera, and enzymes. The article summarises literature data on the structure, properties and mode of action of the animal-derived reagent trypsin — proteolytic enzyme widely used in the production of biological medicinal products. The article dwells upon the sources of trypsin, methods of its production, requirements for trypsin products of different purity grades intended for human and veterinary use as well as for use as reagents in the production of vaccines, advanced therapy medicinal products and genetically engineered products. The article describes the role that trypsin plays in the human and animal intestinal digestive enzyme systems, in dissociation of cells in cultures in the process of cell passaging, in the mechanism of proteolytic activation and inactivation of a wide range of viruses, and in the examination of proteins primary structure.

Key words: trypsin; biological medicinal products; cell culture; virus activation; vaccine production

For citation: Sukhanova SM, Petrushuk EM, Generalov AA. Trypsin. Properties and Use in the Production of Biological Medicinal Products. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2018;18(2):106–113. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-106-113>

* **Contact person:** Svetlana M. Sukhanova; SuhanovaSM@expmed.ru

Биологические лекарственные препараты (БЛП) — средства биологического происхождения, применяемые в профилактических, диагностических и лечебных целях. К биологическим лекарственным препаратам относятся иммунобиологические лекарственные препараты (ИЛП) (вакцины, анатоксины, токсины, сыворотки, иммуноглобулины и аллергены), лекарственные препараты, полученные из крови, плазмы крови человека и животных, биотехнологические лекарственные препараты, генотерапевтические лекарственные препараты, применяемые для профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней [1]. Производство биопрепаратов намного сложнее, чем других лекарственных средств, поскольку включает в себя использование биологических процессов и материалов, таких как культивирование клеток или экстрагирование материала из живых организмов. Указанные биологические процессы могут проявлять свойственную им изменчивость, поэтому принципы управления рисками для качества особенно важны для данного класса материалов и должны соблюдаться при разработке методов контроля на всех стадиях производства. Следует четко определять источник, происхождение и пригодность исходного сырья и материалов для последующего их использования, включая реагенты, питательные среды, буферы, сыворотки, ферменты. Одним из широко используемых в производстве БЛП реагентов является фермент трипсин — реагент животного происхождения, требующий тщательного анализа и проверки [2, 3].

Целью настоящей работы является анализ данных литературы об источниках получения, свойствах и механизме действия трипсина, а также требований к его свойствам при использовании в производстве биологических лекарственных препаратов.

Впервые трипсин был открыт Ж. Корвизаром в 1857 г. и спустя 10 лет в 1867 г. описан и назван В. Кюне «трипсином» (от греч. *thrypsis* — разжижение) [4].

Трипсин — эндогенный протеолитический фермент класса гидролаз, синтезируемый экзокринными клетками поджелудочной железы млекопитающих в виде неактивного предшественника — профермента трипсиногена, который в двенадцатиперстной кишке под действием энтеропептидазы, самого трипсина и ионов Ca^{2+} превращается в трипсин. Схема меха-

низма активации на примере трипсиногена быка представлена на рисунке 1 [5].

Трипсин относится к группе сериновых протеаз и характеризуется узкой субстратной специфичностью, обусловленной присутствием в субстратсвязывающем участке активного центра остатка аспарагиновой кислоты. Он избирательно гидролизует связи, образованные карбоксильными ($-COOH$) группами основных аминокислот аргинина и лизина (рис. 2). Трипсин сохраняет термоустойчивость и стабильность в кислой, слабощелочной среде и после кипячения в 0,01 М соляной кислоте, в сильнощелочной среде необратимо денатурируется.

Трипсин обнаружен у всех позвоночных животных и человека. Свиной трипсин содержит четыре остатка гистидина, трипсин быка, овцы, человека и индюка — 3, трипсин человека и индюка — 8 остатков полицистина, а быка, свиньи и овцы — по 12. Фермент, аналогичный трипсину, выделенный у беспозвоночных, растений и микроорганизмов, имеет сходный аминокислотный состав [6].

Впервые в 1931 г. Д.Х. Нортропом и его коллегами трипсин был получен в кристаллическом виде из неочищенных препаратов пепсина крупного рогатого скота (КРС), а позднее из поджелудочной железы свиньи, овцы, индюка [7].

Трипсин представляет собой бесцветное кристаллическое вещество с температурой плавления около 150 °С. Молекула трипсина 23–25 кДа состоит примерно из 223 аминокислотных остатков, образующих одну полипептидную цепь. Оптимум каталитической активности трипсина лежит в диапазоне значительных pH от 7,5 до 8,0.

Роль трипсина в системе пищеварительных ферментов желудочно-кишечного тракта животных и человека заключается в катализе расщепления пептидных связей белков и пептидов, поступающих с пищей, активации всех образуемых в поджелудочной железе проферментов, а также гидролизе сложных эфиров амидов гидрофобных и некоторых карбоновых кислот. При попадании в кровяное русло и при недостаточности соответствующих ингибиторов трипсин может активизировать фактор свертывания крови XII (фактор Хагемана), пламиноген, прекалликреин и «запускать» таким образом каскад реакций свертывающей, фибринолитической и калликреин-кининовой систем [5].

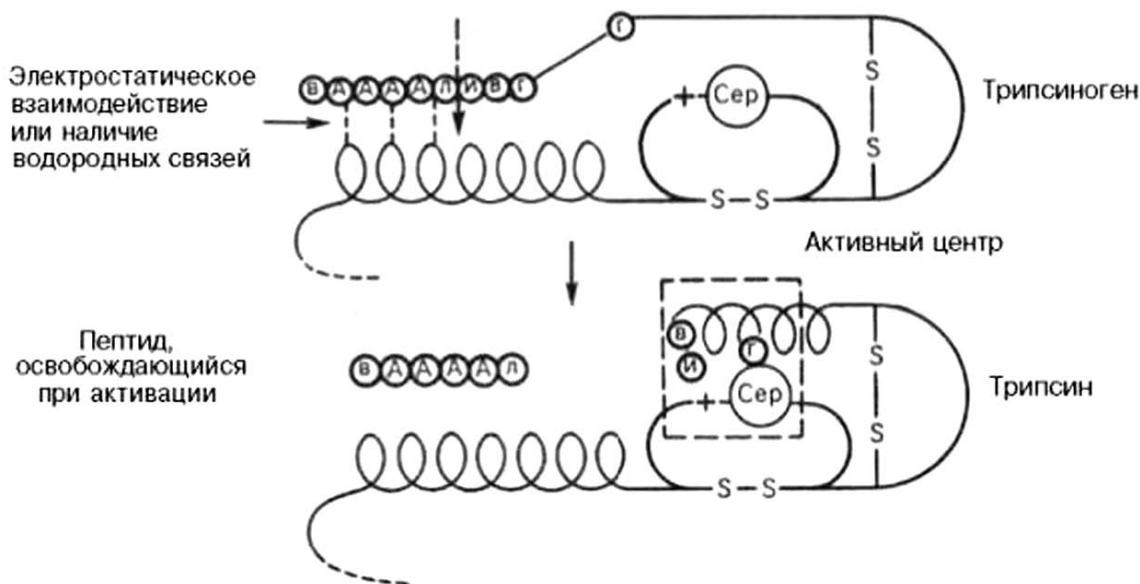


Рис. 1. Механизм активации трипсиногена быка (схема) [5].

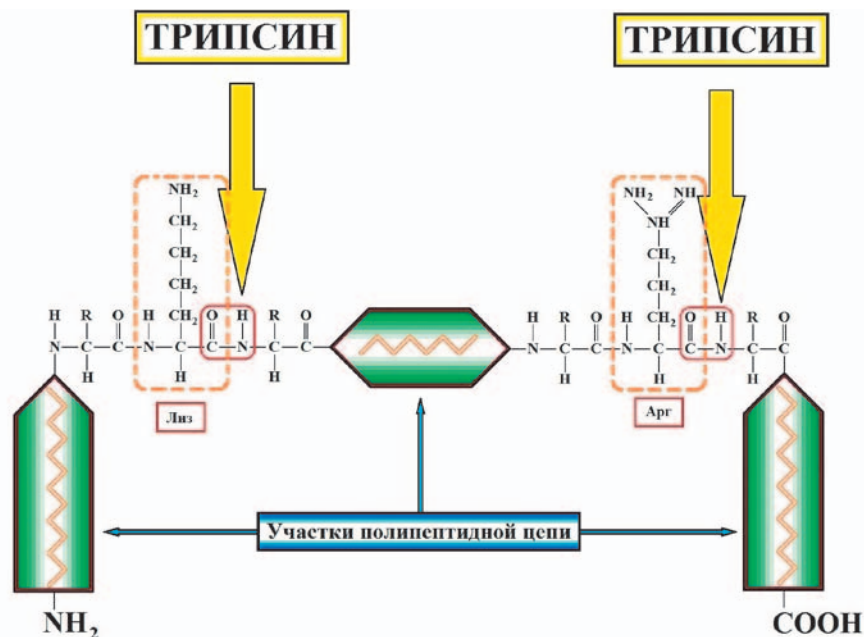


Рис. 2. Расщепление белка трипсином. Гидролиз связей, образованных карбоксильными группами аргинина и лизина.

В настоящее время выпускаются коммерческие препараты трипсина, предназначенные для медицинского и ветеринарного применения, а также для использования в качестве реагента при производстве вакцин, лекарственных средств передовой терапии и генно-инженерных препаратов.

В медицинской практике применяют трипсин кристаллический (для местного и парентерального применения) и трипсин аморфный (только для местного применения), который, выступая в роли биоантисептика, оказывает выраженное противовоспалительное, противоотечное (при внутривенном и внутримышечном введении), регенерирующее и избирательное некротическое действие при воспалительных заболеваниях дыхательных путей, при тромбофлебите, воспалительно-дистрофических формах пародонтоза, при лечении ожогов. Трипсин обладает свойствами расщепления фибриновых образований, омертвевших участков тканей, вязких экссудатов и секретов. Для лечения гнойных ран может быть использован трипсин кристаллический, иммобилизованный на диальдегидцеллюлозе или на активированном трикожажном полиамидном полотне. В офтальмологии трипсин применяют в виде глазных капель и ванночек при кровоизлияниях в камеру глаза, отеках окологлазных тканей, непроходимости слезоотводящих путей, удалении катаракт. При патологическом снижении экзокринной функции поджелудочной железы в составе других ферментных препаратов трипсин используют для заместительной терапии у людей и животных [8, 9].

Трипсин широко применяется в медицине, пищевой и легкой промышленности [10]. Основные области применения препаратов трипсина представлены на рисунке 3.

Внедрение метода клеточных культур в системе *in vitro* в конце 50-х годов прошлого столетия нашло широкое применение в производстве диагностических, лечебных и профилактических лекарственных средств. Для производства и контроля БЛП в качестве субстратов в настоящее время широко применяют первичные и перевиваемые (диплоидные и гетероплоидные) клеточные линии [11]. Большинство нетрансформированных клеток млекопитающих могут расти только прикрепленными к субстрату-подложке. Клетки прикрепляются и образуют монослой с помощью поверхностных гликопротеидов клеточной

мембраны — фибронектина и ламинина, играющих ведущую роль в клеточной адгезии. Фибронектин обнаруживается на поверхности клеток и при остановке клеточной пролиферации. Удаление фибронектина 0,01 % раствором трипсина приводит к откреплению клеток от субстрата и обеспечивает возможность их субкультивирования [12].

Для диспергирования и дезагрегации клеток применяют неочищенные препараты трипсина или химопсина, коллагеназу, эластазу, проназу, диспазу, ДНКазу и гиалуронидазу. Эти препараты можно использовать самостоятельно или в различных комбинациях, например, эластазу с ДНКазой, коллагеназу с диспазой или с гиалуронидазой. Для получения и пассирования первичных, перевиваемых, стволовых клеток используются и другие ферменты неживотного происхождения, такие как TrypZean® (Sigma-Aldrich) — рекомбинантный кукурузный трипсин, TrypLE (Invitrogen) — рекомбинантная грибная трипсин-подобная протеаза и смеси ферментов Accutase™ и Accutax™ (Innovative Cell Technologies) [13]. Учитывая, что альтернативные реагенты нуждаются в тщательном изучении и оценке пригодности, в настоящее время для культивирования клеток чаще используется трипсин животного происхождения.

В качестве исходного сырья для получения препаратов трипсина используют поджелудочные железы КРС, свиней и птиц. Как правило, проводят экстракцию пулов замороженных желез с различными дополнительными стадиями очистки, такими как осаждение и адсорбция с последующей сушкой различными методами [14].

Трипсин высокой чистоты получают хроматографическими методами и используют для специфического расщепления белков и анализа их первичной структуры, вызывая селективный гидролиз связей после остатков положительно заряженных аминокислот лизина и аргинина [15]. Препараты свиного трипсина применяют в качестве катализаторов при производстве человеческого инсулина полусинтетическим способом в процессе ферментного превращения проинсулина с использованием транспептидазной техники [16].

Препараты трипсина, предназначенные для культур клеток, несмотря на жесткие условия обработки, при выделении могут содержать примеси из исходного сырья, например,

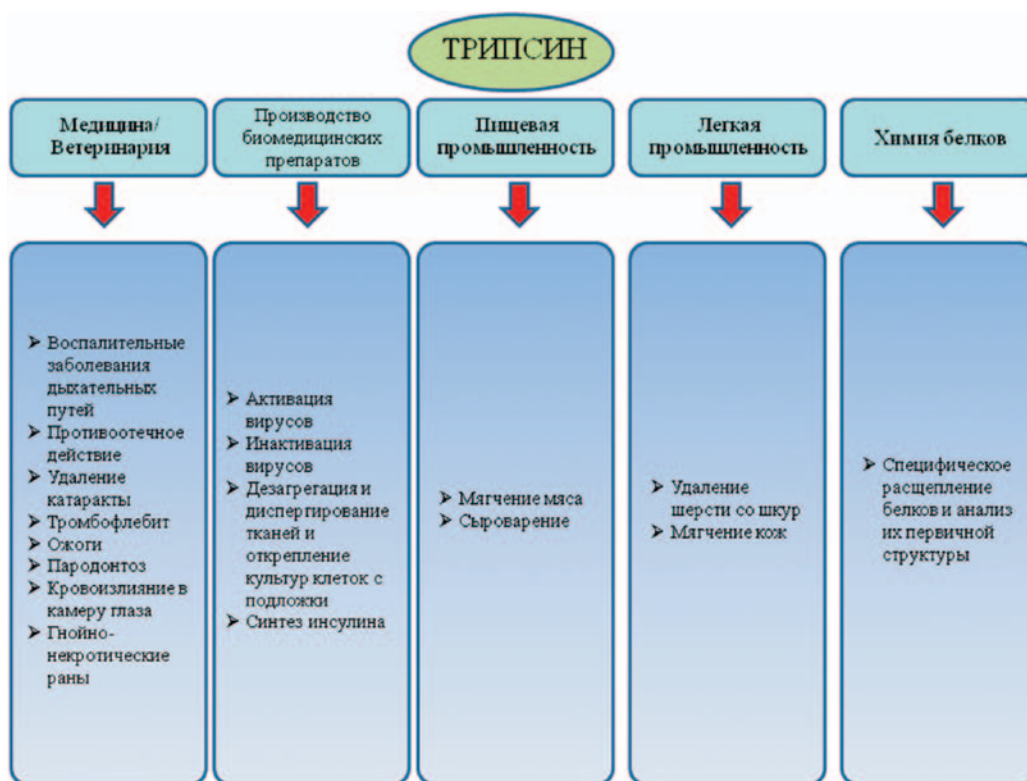


Рис. 3. Применение препаратов трипсина.

химотрипсин, проназу. Содержание примесей в отдельных препаратах бычьего трипсина может достигать 40–50 %, свиного трипсина — около 30 %. Вместе с тем препараты грубой очистки нередко более эффективны. Так, например, обработка трипсином с примесями проназы вызывает более полную дезагрегацию клеток [14]. В течение многих лет для дезагрегации тканей и отделения клеток монослоя от субстрата использовали ацетоновый порошок из надпочечников свиньи или КРС. Эти препараты содержали трипсин, химотрипсин и эластазу. Для получения первично-трипсинизированных клеточных культур применяют обработку различных тканей 0,25 % раствором неочищенного или 0,01–0,05 % раствором очищенного трипсина. Метод холодной трипсинизации обычно дает более высокий выход жизнеспособных клеток и повышает их выживаемость после 24 ч культивирования. Вместе с тем жидкая форма трипсина (0,2–0,25 % раствор) нестабильна при положительных значениях температуры (при 18–20 °C срок хранения не более 10 суток; при 4–6 °C — не более 2 месяцев; в замороженном состоянии — 6 месяцев и один год при температуре минус 20 °C) при pH 7,0–11,0 вследствие автолиза фермента, приводящего к инаktivации или снижению его каталитических свойств и загрязнению неактивными продуктами [17–19].

Как правило, в качестве дезагрегирующего агента используют препараты трипсина в виде нестерильного лиофилизированного порошка, выпускаемые такими фирмами как Difco, Serva, Ferak, Fluka, Sigma-Aldrich, из которого готовят раствор разведением его в физиологическом растворе с последующей фильтрацией через мембраны с диаметром пор 0,22 мкм. Технология изготовления сухого трипсина отечественного производства освоена в ОАО «Синтез» (г. Курган), на Алма-Атинском и Омском биокомбинах [6].

Препараты трипсина могут быть использованы в производстве вирусных вакцин, при диагностике *in vitro* вирусных

инфекций и в вирусологических исследованиях. Важным свойством трипсина является стимуляция репродукции некоторых вирусов, которые не вызывают развития специфических цитопатических изменений и феноменов гемагглютинации и гемадсорбции при диагностике вирусных инфекций в системе *in vitro* в связи с присутствием в ростовых и поддерживающих средах сывороточных ингибиторов. Способы адаптации вирусов к клеточным культурам под действием трипсина известны и применяются достаточно давно, как в научных исследованиях, так и при производстве профилактических препаратов. В присутствии трипсина повышается активность роста и размножения ротавирусов, ортомиксовирусов, парамиксовирусов, парвовирусов, коронавируса и астровирусов (рис. 4). Впервые о влиянии трипсина на выделение бычьего ротавируса из клинического материала сообщили L.A. Babiuk и соавт. в 1977 г. Размножение вируса в культуре клеток почек обезьян (BSC-1) характеризовалось цитопатическими изменениями при культивировании клинического материала в среде Игла при добавлении глютамина, аминокислот, бикарбоната натрия, 10 % инаktivированной телячьей сыворотки и 10 мкг трипсина фирмы Difco [20]. Ротавирусы могут служить классическим примером протеолитической активации, выделение и культивирование которых стало возможным благодаря применению трипсина. При разработке вакцины против ротавирусной инфекции для детей были предприняты попытки размножения ротавируса 2-го типа в первичной культуре почек африканских зеленых мартышек (AGMK). В культуре клеток цитопатические изменения наблюдались только после введения инфекционного вируса в смеси с трипсином, полученного после 11-кратного пассирования в организме гнотобионтов и инкубирования при 37 °C в течение 1 ч [21, 22].

H. Suzuki и соавт. [23] при сравнении скорости проникновения ротавируса человека в культуру клеток почки эмбриона макаки резус (MA-104), активированного и неактивиро-

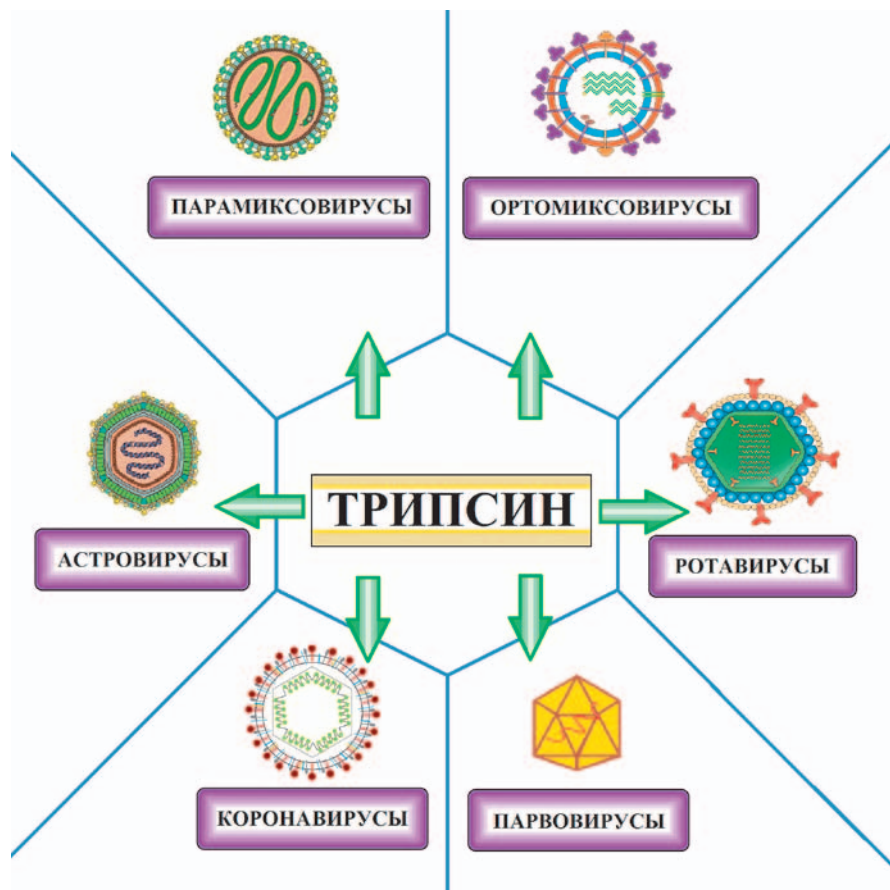


Рис. 4. Примеры семейств вирусов, активируемых трипсином.

ванного трипсином показали, что однокапсидные частицы активированного вируса обнаруживались в цитоплазме уже через 5 мин после заражения, а неактивированные попадали в клетку путем эндоцитоза через 20 мин. После обработки трипсином ротавирус свиней был адаптирован к первичным клеткам почки эмбриона свиньи и к перевиваемой культуре почки поросенка РК-15, применяемой для диагностики вируса классической чумы свиней. Аналогичные результаты были получены при изучении размножения ротавируса обезьян SA-11 в первичных культурах почек африканских зеленых мартышек AGMK, СК, Vero и 455, используемых для разработки методов лабораторной диагностики гастроэнтеритов человека и животных. При внесении 100 мкг/мл трипсина в поддерживающую среду цитопатические изменения в клеточных культурах появлялись уже через 24 ч, в то время как его отсутствие не изменяло инфекционную активность вирусов и увеличивало время их культивирования. Полагают, что при добавлении трипсина происходит диспергирование вируса, в результате чего повышается проницаемость клеточных мембран, вызывая инактивацию интерферона. В составе вириона происходит протеолитическое расщепление крупного полипептида VP3 на полипептиды VP5 и VP8 и повышение инфекционности вируса. Обработка ротавируса КРС трипсином в концентрации 1 мкг/мл приводит к увеличению титра вируса почти в 4 раза. В клетках почек африканской зеленой мартышки BSC-1 и CV-1 при добавлении в агаровую среду 4–10 мкг/мл трипсина и 4 % нормальной сыворотки кур ротавирус КРС вызывал образование бляшек (обесцвеченные участки монослоя). При отсутствии трипсина образование бляшек не наблюдалось [24].

Феномен протеолитической активации характерен для орто- и парамиксовирусов, однако только расщепление трипсином и трипсиноподобными ферментами приводит к образованию высокоинфекционного вируса гриппа А. Обработка вируса гриппа А трипсином до заражения клеток и добавление трипсина в культуральную среду в процессе репликации повышают его инфекционность. Одним из факторов, обуславливающих инфекционность вируса гриппа, является расщепление эндогенными клеточными протеазами гемагглютинаина (ГА) на молекулы меньшего размера ГА1 и ГА2. Из более пятисот протеаз, которые участвуют в обмене веществ в организме человека и могут вызывать расщепление ГА-предшественника на фрагменты ГА1 и ГА2, только расщепление трипсином и трипсиноподобными ферментами вызывает образование высокоинфекционного вируса гриппа в некоторых типах клеток, не имеющих подобных протеаз. В исследованиях по совершенствованию инактивированных вакцин против вирусов гриппа птиц было показано действие трипсина на повышение репродукции подтипов H3, H4, H5, H7 в системах *in vitro* и *in vivo*. Эти штаммы активно размножались в клетках почек собаки MDCK и Vero. Максимальный выход вируса гриппа птиц этих подтипов зависит от концентрации трипсина и дозы заражения, которые могут быть различными для отдельных штаммов [25]. При одновременном внесении инфекционного материала с трипсином существенно повышаются как инфекционные титры, так и уровни гемагглютинирующей активности вируса [26, 27].

Повышение инфекционной активности после обработки трипсином установлено для вируса Сендай в перевиваемых линиях клеток мукоэпидермальной карциномы легкого человека (NCL-H 292) в результате расщепления гликопротеина F

(65 кДа) на субъединицы F1 (51 кДа) и F2 (15 кДа) [28]. Гемолитическая, геагглютинирующая и нейраминидазная активность вируса Ньюкасла птиц усиливается вследствие протеолиза трипсином предшественников гликопротеинов HN₀ и F₀ [29]. Обработка парвовируса свиней трипсином в конечной концентрации 0,05 % в течение 1 ч при 37 °С приводит к увеличению инфекционности вируса в результате расщепления вирусных агрегатов [30]. Трипсин стимулирует репликацию коронавируса эпидемической диареи свиней (ЭДС), вызывающего острые заболевания, поражающие на фермах до 100 % животных, из которых 50 % погибает [31].

Астровирусы вызывают у людей острый гастроэнтерит, у птиц — энтериты, нефриты и гепатиты и являются вторым-третьим по значимости этиологическим объектом, приводящим к развитию острых кишечных инфекций, преимущественно у детей младшего возраста в основном первого года жизни и у пожилых людей с ослабленным иммунитетом. Они с трудом размножаются в первичных культурах клеток гомологичных видов животных, не вызывая видимых цитопатических изменений. Размножение астровирусов было получено в культуре клеток карциномы толстого кишечника человека Сасо-2, а также в первичной культуре клеток эмбриона человека и обезьян только в присутствии 10 мкг/мл трипсина [32].

Трипсин, благодаря собственной ферментативной активности, не только активирует, но и инактивирует многие вирусы, например, ретровирусы. Обработка 0,3 % раствором трипсина, вызывающая инактивацию вирусов катаральной лихорадки овец и инфекционного ринотрахеита КРС, может быть использована при производстве БЛП [33].

В соответствии с требованиями ОФС 1.7.2.0011.15 при производстве ИЛП путем культивирования клеточных культур должен использоваться трипсин, разрешенный в производстве иммунобиологических препаратов. Получение ферментного препарата трипсина для масштабного культивирования клеток должно проводиться в стерильных условиях и требует изучения его физико-химических и диспергирующих свойств, разработки требований к исходному сырью, способам очистки, позволяющих получить квалификацию «для культур клеток» в связи с возможной контаминацией посторонними агентами, представляющими потенциальную опасность для реципиентов препаратов [34]. Исходное сырье должно быть получено из хозяйств, в которых не регистрируются опасные для человека возбудители и прионовые заболевания. В соответствии с нормативными правовыми актами в сфере обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза реagenты, используемые при производстве профилактических препаратов в медицине и ветеринарии, должны быть свободны от посторонних агентов [35].

В настоящее время на предприятиях Российской Федерации в соответствии с утвержденной нормативно-технической документацией выпускаются препараты трипсина, предназначенные для дезагрегации эмбриональных и постнатальных тканей человека, животных и птиц в процессе получения первичных и перевиваемых культур клеток в виде сухого порошка или раствора. Качество препаратов трипсина оценивается по показателям: pH, буферная емкость, стерильность, токсичность, специфическая активность. Специфическая активность оценивается по способности дезагрегировать и диспергировать ткани. При дезагрегации ткани выход из 1 г должен составлять не менее 30 млн жизнеспособных клеток, при полном отделении монослойных клеток от субстрата в течение 2–3 мин. Срок годности сухого препарата при температуре от 2 до 8 °С составляет 2 года [36]. Препараты жидкого трипсина выпускаются

в виде смеси трипсина (0,25 %) и неорганических солей, растворенных в воде очищенной или для инъекций, стерилизованной методом мембранной фильтрации. Срок годности раствора при температуре от 2 до 8 °С составляет 6 или 12 месяцев при температуре минус 10–20 °С [37–39].

Российские требования к трипсину, используемому в качестве реагента для культур клеток или для активации вирусов, согласуются с требованиями ЕФ и рекомендациями Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и Европейского медицинского агентства (ЕМА) в соответствии с которыми трипсин должен быть стерильным, свободным от микоплазм и посторонних агентов [14, 34, 40].

Заключение

Проведенный анализ данных литературы показал, что препараты трипсина, благодаря своим протеолитическим свойствам, нашли широкое применение в различных областях науки и промышленности. В производстве биологических лекарственных препаратов трипсин используется в качестве реагента в процессе клеточного пассирования для диссоциации клеток в культуре и получения первичных культур из тканей, для протеолитической активации и инактивации вирусов, а также для синтеза других ферментов. Учитывая, что альтернативные реагенты нуждаются в тщательном изучении и оценке пригодности, в настоящее время для производства трипсина чаще используется сырье животного происхождения. Для обеспечения качества БЛП препараты трипсина из животного и растительного сырья должны отвечать требованиям безопасности национальных и международных регуляторных органов.

Информация об отсутствии конфликта интересов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература / References

1. Федеральный закон Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». [Federal Law of the Russian Federation of April, 12, 2010, No. 61-FZ «On Circulation of Medicines» (in Russ.)] Available from: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99350
2. Быковский СН, Василенко ИА, Максимова СВ, ред. Комментарий к Руководству Европейского Союза по надлежащей практике производства лекарственных средств для человека и применения в ветеринарии. М.: Перо; 2014. [Bykovsky SN, Vasilenko IA, Maksimova SV, eds. Comment on the European Union Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Moscow: Pero; 2014 (in Russ.)]
3. Дьяконов ЛП, ред. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии). М.: Спутник+; 2009. [Dyakonov LP, ed. Animal Cell in Culture (Methods and Applications in Biotechnology). Moscow: Sputnik+; 2009 (in Russ.)]
4. Жан-Никола Корвизар. В кн.: БРЭС. М.: Большая Российская энциклопедия; 2003. С. 736. [Jean-Nicolas Corvizar. In: BRES. Moscow: Bolshaya Rossijskaya ehnciklopediya; 2003. P. 736 (in Russ.)]
5. Березов ТТ, Коровкин БФ. Биологическая химия. Учебник. 3-изд. М.: Медицина; 2008. [Berezov TT, Korovkin BF. Biological Chemistry. Textbook. 3rd ed. Moscow: Meditsina; 2008 (in Russ.)]
6. Попова ВМ. Усовершенствование технологии изготовления и изучения свойств трипсина сухого для вирусологических целей: дис. ... канд. биол. наук. М.; 1999. [Popova VM. Improvement of the Technology of Manufacturing and

- Studying the Properties of Dry Trypsin for Virological Purposes. *Cand. Biol. Sci. [dissertation]. Moscow; 1999 (in Russ.)*
- Джон Хауард Нортроп. В кн.: БРЭС. М.: Большая Российская энциклопедия; 2003. С. 1065. [John Howard Northrop. In: BRES. Moscow: Bolshaya Rossijskaya ehnciklopediya; 2003. P. 1065 (in Russ.)]
 - Трипсин (Trypsin). Регистр лекарственных средств России. [Trypsin. Registr lekarstvennykh sredstv Rossii (in Russ.)] Available from: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_2130.htm
 - Экзокринная недостаточность поджелудочной железы у собак и кошек. [Exocrine Pancreatic Insufficiency in Dogs and Cats (in Russ.)] Available from: http://www.bkvet.ru/pancreatic_insufficiency_dog
 - Чешкова АВ. Ферменты и технологии для текстиля, моющих средств, кожи, меха. Учеб. пособие для вузов. Иваново: ГОУВПО ИГХТУ; 2007. [Cheshkova AV. Enzymes and Technologies for Textiles, Detergents, Leather, Fur. Tutorial. Ivanovo: GOUVPO IGHTU; 2007 (in Russ.)]
 - Шалунова НВ, Меркулов ВА, Комратов АВ, Петручук ЕМ, Семенова ИС, Волгин АР, Трусов ГА. Требования к клеточным культурам, используемым для производства и контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2013;(1):28–32.* [Shalunova NV, Merkulov VA, Comratov AV, Petruchuk EM, Semenova IS, Volgin AR, Trousov GA. Requirements for Cell Cultures, Used for Manufacture and Quality Control of Immunobiological Medicines. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2013;(1):28–32 (in Russ.)*]
 - Фрешни Р. Культура животных клеток. М.: Бином, лаборатория знаний; 2014. С. 158–60. [Freshni R. Culture of Animal Cells. Moscow: Binom, knowledge laboratory; 2014. P. 158–60 (in Russ.)]
 - Дергилев КВ, Рубина КА, Сысоева ВЮ, Акчурин РС, Парфенова ЕВ, Ткачук ВА. Способ получения резидентных стволовых клеток сердца млекопитающего из образцов миокарда. Патент Российской Федерации, № 2505602; 2014. [Dergilev KV, Rubina KA, Sysoeva VYu, Akchurin RS, Parfyonova EV, Tkachuk VA. Method of Obtaining Resident Mammalian Heart Stem Cells From Myocardial Samples. Patent RF, N 2505602; 2014 (in Russ.)]
 - Guideline on the Use of Porcine Trypsin Used in the Manufacture of Human Biological Medicinal Products (EMA/CHMP/BWP/814397/2011). European Medicines Agency; 2014.
 - Овчинников ЮА. Биоорганическая химия. М.: Просвещение; 1987. [Ovchinnikov UA. Bioorganic Chemistry. Moscow: Prosveschenije; 1987 (in Russ.)]
 - Лазарев АП, Пояркова СА, Луцив ВР, Гавриш ОГ, Мельник ВН, Рыбачук ВН. Способ получения полусинтетического инсулина человека. Патент Российской Федерации, № 2252225; 2005. [Lazarev AP, Poyarkova SA, Lutsiv VR, Gavrish OG, Melnik VN, Rybachuk VN. A Method for Producing Semisynthetic Human Insulin. Patent of the Russian Federation, No. 2252225; 2005 (in Russ.)]
 - Веремеенко КН. Ферменты протеолиза и их ингибиторы в медицинской практике. Киев: Здоров'я; 1971. [Vereteenko KN. Enzymes of Proteolysis and Their Inhibitors in Medical Practice. Kiev: Zdorov'ya; 1971 (in Russ.)]
 - Луговой ВИ. Первичные механизмы криоповреждений ферментов. В кн. 2 Всесоюзная конференция по теоретическим и прикладным вопросам криобиологии. Тезисы докладов. Харьков; 1984. С. 49. [Lugovoi VI. Primary Mechanisms of Cryopreservation of Enzymes. In: 2 All-Union Conference on Theoretical and Applied Problems of Cryobiology. Theses of Reports. Kharkiv; 1984. P. 49 (in Russ.)]
 - Богрянцева МП, Трошкова ГП, Камший ЛП, Мартынец ЛД, Величко АВ, Ночевный ВТ. Способ получения стерильного раствора трипсина для культур клеток. Патент Российской Федерации, № 214503; 1999. [Bogryantseva MP, Troshkova GP, Kamshy LP, Martynets LD, Velichko AV, Nochevny VT. Method for Obtaining a Sterile Solution of Trypsin for Cell Cultures. Patent of the Russian Federation, No. 214503; 1999 (in Russ.)]
 - Babiuk LA, Mohammed K, Spence L, Fauvel M, Petro R. Rotavirus Isolation and Cultivation in the Presence of Trypsin. *J Clin Microbiol.* 1977;6(6):610–7.
 - Wyatt RG, James WD, Bohl EH, Theil KW, Saif LJ, Kalica AR, et al. Human Rotavirus Type 2: Cultivation in vitro. *Science* 1980;207(4427):189–91.
 - Дроздов СГ, Шекоян ЛА, Королев МБ, Анджапаридзе АГ. Ротавирус человека в культуре клеток: выделение и пассирование. *Вопросы вирусологии 1979;(4):389–92.* [Drozdov SG, Shekoyan LA, Korolyov MB, Andzhaparidze AG. Human Rotavirus in Cell Culture: Allocation and Passaging. *Problems of Virology 1979;(4):389–92 (in Russ.)*]
 - Suzuki H, Kitaoka S, Konno T, Sato T, Ishida N. Two Modes of Human Rotavirus Entry into MA 104 Cells. *Arch Virol.* 1985;85(1–2):25–34.
 - Ротавирусная инфекция крупного рогатого скота. [Rotavirus Infection of Cattle (in Russ.)] Available from: <https://goo.gl/1zLDyu>
 - Васильев ЮМ. Оптимизация размножения вирусов гриппа птиц в различных субстратах и совершенствование вакцин против вирусов гриппа птиц; дис. ... канд. биол. наук. М.; 2010. [Vasilyev YuM. Optimization of the Multiplication of Avian Influenza Viruses in Various Substrates and the Improvement of Vaccines against Avian Influenza Viruses. *Cand. Biol. Sci. [dissertation]. Moscow; 2010 (in Russ.)*]
 - Васильев ЮМ, Руднева ИА, Коптыева ИБ. Сравнительное изучение размножения вирусов гриппа птиц в культуре клеток и куриных эмбрионах. *Вопросы вирусологии 2009;54(4):18–23.* [Vasilyev YuM, Rudneva IA, Koptyaeva IB. Comparative Study of Avian Influenza Virus Propagation in the Cell Culture and Chick Embryos. *Problems of Virology 2009;54(4):18–23 (in Russ.)*]
 - Klenk HD, Rott R, Orlich M, Blodorn J. Activation of Influenza A Viruses by Trypsin Treatment. *Virology* 1975;68(2):426–39.
 - Сюрин ВН, Самуйленко АЯ, Соловьев ВБ, Фомина НВ. Вирусные болезни животных. М.: ВНИТИБП; 2001. [Syurin VN, Samuylenko AY, Soloviev VB, Fomina NV. Viral Diseases of Animals. Moscow: VNITIBP; 2001 (in Russ.)]
 - Силко НЮ, Шаршов КА, Дурьмалов АГ, Шестопалов АМ, Шестопалова ЛВ. Штамм вируса болезни Ньюкасла для использования при серодиагностике болезни Ньюкасла в РТГА. Патент Российской Федерации, № 2482184; 2013. [Silko NU, Sharshov KA, Duramalov AG, Shestopalov AM, Shestopalova LV. Strain of the Newcastle Disease Virus for Use in the Serodiagnosis of Newcastle Disease in the RTGA. Patent of the Russian Federation, No. 2482184; 2013 (in Russ.)]
 - Орлянкин БГ, Сергеев ВА, Седов ВА. Парвовирусная болезнь свиней. *Ветеринария 1987;10:72–6.* [Orlyankin BG, Sergeev VA, Sedov VA. Parvoviral Disease of Pigs. *Veterinariya 1987;10:72–6 (in Russ.)*]
 - Сергеев ОВ. Эпизоотическая диарея свиней. *Вопросы вирусологии 2009;54(2):4–7.* [Sergeev OV Epizootic Diarrhea of Pigs. *Problems of Virology 2009;54(2):4–7 (in Russ.)*]
 - Тикунов АЮ, Жираковская ЕВ, Юн ТЭ, Боднев СВ, Нетесов СВ, Тикунова НВ. Молекулярно-генетическая характеристика астровирусов, циркулирующих в Новосибирске. *Вопросы вирусологии 2010;55(6):19–23.* [Tikunov AY, Zhirakovskaya EV, Yun TE, Bodnev SA, Netesov SV, Tikunova NV. Molecular Genetic Characteristics of Astroviruses Circulating in Novosibirsk. *Problems of Virology 2010;55(6):19–23 (in Russ.)*]
 - Бессарабов ВФ, Вашутин АА, Воронин ЕС. Инфекционные болезни животных. М.: КолосС; 2007. [Bessarabov VF, Vashutin AA, Voronin ES. Infectious Diseases of Animals. Moscow: KolosS; 2007 (in Russ.)]
 - Общая фармакопейная статья 1.7.2.0011.15 Требования к клеточным культурам — субстратам производ-

- ства иммунобиологических лекарственных препаратов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2, М.; 2015. [General Monograph 1.7.2.0011.15 Requirements for Cell Cultures — Substrates for the Production of Immunobiological Drugs. The State Pharmacopoeia of Russian Federation 13 ed. V. 2. Moscow; 2015 (in Russ.)] Available from: <http://www.femb.ru/feml>
35. Производство и дистрибуция лекарственных средств. Нормативные правовые акты в сфере обращения лекарственных средств в рамках евразийского экономического союза 2017;(1):163–80. *Manufacture and Distribution of Medicines. Normative Legal Acts in the Sphere of Medicinal Products Circulation within the Framework of the Eurasian Economic Union 2017;(1):163–80.*
36. Трипсин сухой стерильный для культур клеток, порошок для приготовления раствора. ТУ 9385-004-05664012-07. [Trypsin is Dry Sterile for Cell Cultures, a Powder for Making a Solution. TU 9385-004-05664012-07 (in Russ.)]
37. Трипсина раствор ТУ 9385-006-45171785-2006. [Trypsin Solution TU 9385-006-45171785-2006 (in Russ.)]
38. Инструкция по применению изделия медицинского назначения «Набора реагентов «Трипсина раствор для культур клеток» ФСП РУ 2007/00039 утв. постановлением Правительства Российской Федерации No. 323.2004. [Instructions for the Use of the Medical Device «Reagent Kit» Trypsin Solution for Cell Cultures» FSR RU 2007/00039 (in Russ.)]
39. Трипсина раствор ТУ 9385-005-13175637-2008. [Trypsin Solution TU 9385-005-13175637-2008 (in Russ.)]
40. 5.2.3. Cell Substrates for the Production of Vaccines for Human Use. *European Pharmacopoeia. 8th ed. European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare (EDQM). 2014. Available from: <http://online6.edqm.eu/ep800>*

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 126051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2

Суханова Светлана Михайловна. Начальник лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук

Петручук Елена Мидатовна. Эксперт 1 категории лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук

Генералов Александр Андреевич. Инженер-лаборант лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук

Поступила 13.03.2018
Принята к публикации 26.04.2018

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8/2 Petrovsky boulevard, Moscow 127051, Russian Federation

Svetlana M. Sukhanova. Head of the Laboratory of Bacteriological Culture Media and Cell Cultures of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences

Elena M. Petrushuk. 1st Professional Category Expert of the Laboratory of Viral Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences

Alexander A. Generalov. Laboratory Technician of the Laboratory of Bacteriological Culture Media and Cell Cultures of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences

Received 13 March 2018
Accepted 26 April 2018