

Свиной трипсин в производстве биологических лекарственных препаратов. Риски и требования к безопасности

С. М. Суханова*, Е. М. Петручук

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

Трипсин — реагент, широко применяемый в производстве биологических лекарственных препаратов (БЛП). До недавнего времени в качестве основного источника получения препаратов трипсина использовали поджелудочные железы крупного рогатого скота (КРС), свиней и птиц. Обнаружение в конце 80-х годов прошлого века у КРС заболевания, получившего название «трансмиссивная губчатая энцефалопатия» или «коровье бешенство», привело к необходимости ограничения использования данного источника. Учитывая потенциальную опасность использования трипсина, полученного от КРС, в производстве БЛП чаще стал применяться свиной трипсин. Получаемый из животного сырья, фермент может быть контаминирован цирковиррусами, парво- и пестивиррусами, микоплазмами, широко распространенными среди свиней. В связи с высокой устойчивостью к физико-химической обработке они представляют потенциальную опасность для реципиентов вакцин и других БЛП. Для предотвращения контаминации необходимо применять меры по снижению, выявлению и инактивации посторонних агентов как в исходных материалах, так и на стадиях производства БЛП. В обзоре рассмотрены наиболее распространенные виды контаминации трипсина, получаемого из поджелудочных желез свиней, способы ее выявления, снижения и устранения. Представлены сведения о российских и международных требованиях к качеству и безопасности свиного трипсина, используемого в производстве БЛП.

Ключевые слова: трипсин; биологические лекарственные препараты; культура клеток; активация вирусов; производство вакцин; анализ рисков; вирусная безопасность; цирковиррусы; парвовирусы; микоплазмы

Для цитирования: Суханова СМ, Петручук ЕМ. Свиной трипсин в производстве биологических лекарственных препаратов. Риски и требования к безопасности. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2018;18(3):161–167. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-161-167>

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

Porcine Trypsin in the Manufacture of Biological Medicinal Products. Risks and Safety Requirements

S. M. Sukhanova*, E. M. Petruchuk

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

Trypsin is a reagent widely used in the manufacture of biological medicinal products (BMPs). Until recently, pancreata of cattle, pigs and poultry were the main sources of trypsin preparations. The discovery of the disease called «transmissible spongiform encephalopathy» or «cow rabies» (TSE) in cattle in the late 1980s showed a clear need for limiting the use of this source. Given the potential risk of using trypsin obtained from cattle, porcine trypsin became more commonly used in the production of biological medicinal products. Enzymes obtained from raw materials of animal origin can be contaminated with circoviruses, parvo- and pestiviruses, and mycoplasmas that are common to pigs. Due to high resistance to physical and chemical treatment, these contaminants pose a potential risk to recipients of vaccines, as well as to other biological medicinal products. Prevention of contamination requires measures aimed at detection, reduction and inactivation of foreign agents, both in raw materials and during BMP production. The article considers the most common types of porcine trypsin contamination, methods of its detection, reduction and elimination. The article also contains information on the Russian and international requirements for the quality and safety of porcine trypsin used in the production of biological medicinal products.

Key words: trypsin; biological medicinal products; cell culture; virus activation; vaccine production; risk assessment; viral safety; circovirus; parvovirus; mycoplasma

For citation: Sukhanova SM, Petruchuk EM. Porcine trypsin in the manufacture of biological medicinal products. Risks and safety requirements. BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2018;18(3):161–167. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-161-167>

***Corresponding author:** Svetlana M. Sukhanova; SuhanovaSM@expmed.ru

Биологические лекарственные препараты (БЛП) относятся к препаратам, в процессе производства которых могут использоваться материалы животного и человеческого происхождения. Серьезную проблему для безопасности биопрепаратов представляет возможная контаминация вирусами, бактериями, грибами, микоплазмами, источниками которой могут быть исходные материалы, питательные среды, сыворотка, трипсин и другие ингредиенты, используемые при производстве. Контаминация может изменить характер роста клеточных культур — субстрата производства и привести к изменению свойств биологического продукта. Учитывая потенциальные риски, технология производства, контроля и применения БЛП требует соблюдения особых мер предосторожности [1, 2].

Трипсин широко используется в производстве БЛП при культивировании клеточных линий. До недавнего времени в качестве основного источника получения препаратов трипсина, отвечающего требованиям квалификации «для культур клеток», использовали поджелудочные железы крупного рогатого скота (КРС), свиней и птиц [3, 4]. Обнаружение в конце 80-х годов прошлого века у КРС заболевания, получившего название «трансмиссивная губчатая энцефалопатия» (ТГЭ) или «коровье бешенство», привело к необходимости ограничения использования данного источника. Возбудители ТГЭ представляют собой аномальные, чрезвычайно устойчивые к разнообразным химическим и физическим воздействиям белки — прионы, вызывающие у людей болезнь Крейтцфельда — Якоба — губчатую дегенерацию коры головного мозга. Предполагают, что основной причиной заболевания является употребление мяса животных, болеющих ТГЭ, а также наследственный фактор, связанный с геном PrNP [5]. Кроме того, были отмечены случаи заражения пациентов в медицинских учреждениях через некачественно стерилизованные инструменты или трансплантируемые ткани. В настоящее время не существует валидированного метода, который может быть использован для биологических препаратов или для испытания клеточных линий на присутствие агентов ТГЭ. В связи с этим Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) для производства БЛП рекомендует использовать сырье из стран, классифицированных Всемирной организацией здоровья животных (ВОЗЖ) и Европейским ведомством по безопасности пищевых продуктов (ЕВБП) как обеспечивающих незначительный риск или риск по губчатой энцефалопатии КРС категории III. Биологические фармацевтические субстанции и лекарственные препараты должны проходить контроль на содержание инфекционного прионного белка [3, 6, 7]. Для минимизации риска передачи агентов губчатой энцефалопатии посредством лекарственных препаратов для медицинского и ветеринарного применения научным комитетом Европейского агентства по оценке лекарственных средств (Committee for Proprietary Medicinal Products, CPMP) рекомендовано производителям отдавать предпочтение использованию материалов животных, относящихся к подотряду нежвачных (свинообразные) [8].

Принимая во внимание потенциальную опасность использования трипсина, полученного от КРС, в производстве БЛП чаще стал применяться свиной трипсин. Установление и оценка рисков, связанных с использованием этого сырья, требуют тщательного изучения.

Целью настоящей работы является анализ рисков при использовании свиного трипсина в производстве биологических лекарственных препаратов, а также обзор общих принципов, которые необходимо применять при оценке его качества и безопасности.

В задачи входило рассмотрение наиболее широко распространенных видов контаминации, способов ее выявления,

снижения и устранения, а также обобщение российских и международных требований к качеству свиного трипсина, используемого в производстве БЛП.

Контаминация свиного трипсина. В соответствии с национальными и международными требованиями источником получения свиного трипсина, предназначенного для использования в качестве реагента при производстве биологических лекарственных средств, должно служить сырье, полученное от свиней, признанных пригодными для употребления человеком в пищу на основании результатов их обследования до и после убоя. В Российской Федерации поджелудочные железы (ПЖ) необходимо получать от здоровых свиней, содержащихся в животноводческих хозяйствах в соответствии с системой правил, применяемых для обеспечения благоприятного эпизоотического статуса и предотвращения распространения заразных болезней. Партии ПЖ должны иметь четкую маркировку, позволяющую идентифицировать природу животной ткани, ее происхождение и дату сбора, а также соответствующие документы, выданные компетентными ветеринарными органами [3, 9]. Несмотря на регулярный контроль за безопасностью пищевых продуктов, существует риск того, что исходный материал, полученный от животных, может быть контаминирован посторонними агентами, особенно вирусами доноров, которые сложно удаляются из-за их высокой устойчивости к физико-химической обработке. Контаминация может изменять характер роста клеточных культур и свойства биологических продуктов, в связи с чем теоретически существует риск заражения реципиентов препаратов, а также гибели клеточного субстрата производства [9]. Наиболее серьезными проблемами для промышленных свинок комплексов России и многих стран мира, приводящими к экономическим потерям, являются цирковирусная, парвовирусная, пестивирусная инфекции и энзоотическая пневмония (микоплазмоз) свиней [5, 10].

В 2010 г. появилось сообщение Victoria J.G. и соавт. [11] об обнаружении последовательностей ДНК цирковируса свиней в живой аттенуированной ротавирусной вакцине производства GlaxoSmith Kline Biologicals (Бельгия). В исследованном материале содержалось 98 % подлинного цирковируса свиного (PCV-1 или ЦВС-1). В дальнейшем загрязнение вакцины цирковирусом было подтверждено и показано, что его происхождение может быть связано с коммерческими партиями трипсина Difco, используемыми в производстве препарата [9, 11]. Эксперты Европейского Агентства по оценке лекарственных средств, проанализировав результаты секвенирования, пришли к выводу, что присутствие последовательностей ДНК цирковируса свиней, обнаруженных в живой аттенуированной ротавирусной вакцине, вводимой орально, не представляет риска для здоровья населения, так как данный тип вируса не вызывает заболевания у людей [11, 12].

Впервые цирковирус свиней, обозначенный как ЦВС-1 — нецитопатогенный контаминант, был обнаружен немецкими исследователями в 1974 г. в перевиваемой линии клеток почки поросенка PK-15. В 1998 г. в той же культуре были выделены новые антигенно родственные между собой штаммы, обозначенные как ЦВС-2. В отличие от ЦВС-1, ЦВС-2 вызывает у свиней тяжелые поражения лимфоузлов, селезенки, легких и почек. Цирковирус является одним из самых устойчивых вирусов к обработке дезинфектантами. Он не инактивируется 5 % раствором фенола в течение 2 ч, сохраняет инфекционность при pH 3,0–9,0 и температуре 37 °C в течение 1,5 ч, а также при нагревании до 80 °C в течение 15 мин. Только при кипячении в течение не менее 10 мин и после обработки 10 % раствором йода вирус инактивируется через 2 ч [10, 13].

В ряде стран мира с развитым свиноводством (Великобритания, Германия, Бельгия, Испания, Канада, США) при обследовании животных в 25–98 % случаев были найдены антитела к ЦВС-1. В нашей стране ЦВС-2 был выявлен в 2000 и 2008 гг., антитела к нему обнаружены почти во всех свиноводческих хозяйствах. Экономические потери, связанные с нарушениями репродуктивной функции у свиноматок, вызывающими аборт, мертворождение, гибель поросят вскоре после рождения, мумификацию, составляют 80–100 % [13, 14].

Похожие симптомы наблюдали при инфекции, вызываемой парвовирусом. Это заболевание, описанное в 1965 г. в США Дан и соавт. и названное СМЕДИ, характеризовалось рождением мертвых или нежизнеспособных поросят (stillbirth), мумификацией плодов (mummified fetuses), гибелью эмбрионов (embryonic death) и бесплодием (infertility) (SMEDI). В России инфекция была выявлена в 1982 г. В естественных и экспериментальных условиях к парвовирусу чувствительны только свиньи [15, 16]. Вирус обладает тератогенной активностью, проходит через плаценту, вызывая у потомства деформации зубов и костей, образование расщелины губы и неба. Возбудитель устойчив к действию различных физико-химических факторов среды, сохраняет инфекционность при pH 3,0–9,0 и температуре 37 °C в течение 1,5 ч и после обработки 10–50 % растворами хлороформа и эфира в течение 10–30 мин. Инактивируется при 80 °C в течение 5 мин, чувствителен к УФ-излучению и действию 2–3 % растворов формалина и гидроксида натрия [15, 17]. Вследствие высокой устойчивости к воздействию физико-химических факторов среды парвовирусы представляют большую опасность как контаминанты клеточных культур и готовых БЛП. Предполагают, что источником контаминации парвовирусом свиней, выявленной в первичных культурах клеток почек, щитовидной железы и тестикул поросят, в перевиваемых культурах клеток свиней (ППК, РК-15, БТ) и человека (HeLa, Her-2, KB, FL-Amnion) является трипсин, полученный из ПЖ инфицированных свиней. Выделение парвовируса свиней из коммерческой партии трипсина подтверждает эту гипотезу и свидетельствует о высокой устойчивости вируса к действию различных факторов в процессе его получения [17].

Вирус классической чумы (КЧС) вызывает в популяции свиней эпидемии и отличается высокой патогенностью и смертностью среди поголовья (80–100 %) через 1–2 нед. после появления клинических признаков заболевания. В 1999 г. инфекция была зарегистрирована в хозяйствах Австрии, Албании, Болгарии, Германии, Китая, Латвии, Молдовы, России, Словакии, Словении, Хорватии, Чехии. Источником заболевания является вирус, относящийся к роду пестивирусов семейства Flaviviridae, который, накапливаясь в сосудах, костном мозге, лимфатических узлах, вызывает кровоизлияния, воспаления и некроз тканей и органов. Классическая чума свиней по Международной классификации заразных болезней животных относится к списку А особо опасных инфекций и наносит значительный экономический ущерб как в развивающихся странах, так и в странах с хорошо организованной системой мер безопасности. Заболевание характеризуется появлением у животных лихорадки постоянного типа, резким угнетением, отказом от корма, апатией, конъюнктивитом, появлением точечных или пятнистых кровоизлияний, паралича задних конечностей. Большое количество вируса выделяют животные, инфицированные высокоvirulentными штаммами КЧС, и поросята с врожденной инфекцией. Животные, перенесшие инфекцию, не представляют опасности в связи с образованием у них специфических антител. При хронической инфекции, вызванной низкоvirulentными штаммами,

поросята выделяют вирус непрерывно или периодически в течение всей жизни (2,5–11 месяцев) [18, 19].

Весьма ощутимый экономический ущерб свиноводческим комплексам приносит микоплазменная (энзоотическая) пневмония или респираторный микоплазмоз — хроническое заболевание, характеризующееся воспалением легких, серозных покровов и нарушением воспроизводительной функции у свиноматок. В некоторых хозяйствах микоплазмоз поражает до 30–50 % животных. Возбудителями заболевания могут быть *Mycoplasma suis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae*, *M. hyorhinis*, *M. granularum*, *M. fermentas*. Микоплазмы способны существовать в организме животных в анабиотическом состоянии длительное время, поэтому возбудители встречаются в большинстве популяций свиней [20, 21].

Для профилактики вирусных и микоплазменных инфекций свиней применяют как общие меры безопасности, так и вакцинацию здоровых животных, лечение антибиотиками, гипериммунными сыворотками и симптоматическими препаратами. Общие меры безопасности включают технологические, ветеринарно-санитарные, зооигиенические и зоотехнические мероприятия для оптимизации условий содержания, полноценное кормление и разрыв эпизоотической цепи. Особое внимание должно уделяться предотвращению и мониторингу инфекционных заболеваний у животных, ткани которых используются в качестве сырья [22].

В обзоре Marcus-Sekura С. и соавт. [23], посвященном анализу рисков при использовании контаминированного свиного трипсина, было сообщено о существовании 55 видов вирусов свиней, принадлежащих к 17 различным семействам, которые могут представлять опасность для человека. Данные были подтверждены сведениями о заражении человека в природных очагах, обнаружением антител в организме людей и/или способностью вирусов инфицировать культуры клеток животных и человека. Около 60 % этих вирусов могут реплицироваться в линии клеток почки африканской зеленой мартышки Vero, широко используемой для выращивания вирусных культур при производстве и тестировании БЛП [11, 23].

Наличие контаминации в свином трипсине требует от производителя проведения оценки потенциальных рисков, контроля готовых БЛП и использования в производстве дополнительных стадий для снижения вирусной нагрузки. Особенно актуальна эта задача для препаратов, в производственном цикле которых вирусная инактивация не проводится, например, для живых вакцин или для препаратов, тестирование которых на наличие контаминации на заключительных стадиях производственного цикла затруднено, например, при производстве лекарственных препаратов на основе культур клеток [9].

В связи с тем, что производство некоторых лекарственных препаратов невозможно без использования материалов животного происхождения, необходимо применять меры по снижению рисков их контаминации. В соответствии с требованиями Евразийского экономического союза (ЕАЭС) и Документов регуляторных органов Европейского экономического сообщества (ЕЭС) трипсин как реагент животного происхождения, используемый в производстве БЛП, должен быть изготовлен в рамках систем качества GMP (Надлежащая производственная практика), HACCP (Анализ опасностей и критических контрольных точек) и ISO (Система менеджмента безопасности и производства пищевой продукции). Производители и испытательные лаборатории должны обладать исчерпывающей информацией о безопасности трипсина и нести ответственность за то, чтобы тестирование проводилось в соответствии с требуемыми стандартами качества. Необходимо изучить эпидемиологическую

ситуацию, оценить состояние животных, от которых было получено сырье, подобрать наиболее чувствительные и эффективные методы для выявления, инактивации или элиминации возможных вирусных агентов, предусмотреть вероятность их попадания и размножения в используемые для производства культуры клеток. Если вирусная контаминация обнаружена, то партия трипсина не должна использоваться для производства БЛП до тех пор, пока тщательная оценка риска не будет свидетельствовать о том, что инфекционный агент надежно инактивирован или удален [8, 24].

Тестирование трипсина на наличие вирусов может проводиться поставщиком трипсина, изготовителем лекарственного средства и испытательной лабораторией. Тестирование исходных материалов или промежуточных продуктов на наличие вирусного заражения является важной мерой обеспечения безопасности БЛП. Стадии, на которых проводятся испытания, должны быть четко определены и оправданы. По экономическим и организационным причинам не представляется возможным проверить каждую поджелудочную железу до ее объединения, и материал от одного инфицированного животного может войти в большую производственную партию. Чувствительность последующих тестов в этом случае может оказаться недостаточной для выявления «разбавленного» загрязняющего агента в объединенном материале. Тестирование пула исходного материала на наличие контаминантов должно проводиться перед каждой стадией вирусной инактивации/элиминации, в то время как готовый препарат в некоторых случаях можно не проверять. Такие стадии производства трипсина, как спиртовая экстракция из замороженных тканей, нагревание или инкубирование при низком значении pH, могут привести к дезактивации ряда вирусов. Кроме того, благодаря собственной ферментативной активности трипсин способен инактивировать некоторые контаминанты, например ретровирусы [3]. Если эффективность вирусной инактивации, проведенной в процессе производства, доказана, то контроль на наличие искомых вирусов в готовом препарате может не проводиться [9].

Для выявления вирусной контаминации трипсина могут быть использованы методы исследования цитопатического действия (ЦПД) на клеточных культурах в системе *in vitro*, заражение чувствительных животных, серологические реакции гемагглютинации, гемадсорбции, флуоресцирующих антител (МФА), твердофазный метод иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих диагностикумов [25, 26]. Для проведения экспресс-анализа и скрининга готового препарата трипсина может применяться метод ПЦР (полимеразная цепная реакция) [9, 15].

В связи с тем что вирусы свиней, представляющие опасность для человека, могут реплицироваться в линии клеток Vero, используемой в производстве БЛП, рекомендуется проводить общий тест *in vitro* с использованием двух различных клеточных линий, одна из которых человеческого или обезьяньего происхождения, а другая должна быть получена от свиньи. Для индикации предполагаемых контаминирующих вирусов, обладающих гемадсорбирующими, гемагглютинирующими свойствами или вызывающими цитопатическое действие, необходимо отбирать наиболее чувствительные к ним клеточные линии [2, 9, 25].

Для выявления цирковирусов используют монослойные и органные культуры клеток кишечника эмбриона свиньи (КЭС), первичные и перевиваемые клетки почек эмбриона свиньи (ПЭС, СПЭВ), тестикулов поросенка (ТП), щитовидной железы свиньи (ЩС). Обнаружить цирковирусы также можно в культурах моноцитов/макрофагов, полученных из костного

мозга свиней, периферической крови, легких, лимфатических узлов и в перевиваемой культуре клеток сетчатки плода свиньи [13, 16]. Репродукция вируса в первичных и перевиваемых культурах клеток сопровождается развитием цитопатического эффекта (ЦПЭ), характеризующегося диффузной зернистостью, округлением клеток, отделением их от стекла и частичным или полным разрушением монослоя [27].

Вирус КЧС культивируется в первичных культурах клеток легких, селезенки, почки, тестикул и лейкоцитов свиней. В связи с тем что он не вызывает видимого ЦПД, его обнаруживают с помощью МФА, по ярко-зеленому свечению в цитоплазме инфицированных клеток. Идентификацию вируса КЧС проводят методами флуоресцирующих антител, иммуноферментного анализа или нейтрализации флуоресцирующих микробляшек [18].

Для обнаружения микоплазм применяют микробиологический метод (посев на питательные среды), метод индикаторной клеточной культуры (цитохимический) с использованием флуоресцирующего красителя ДНК. В качестве альтернативных могут быть использованы гистологические методы исследования, реакция связывания комплемента (РСК), метод ПЦР [22].

Наиболее трудно выявляется контаминация латентными вирусами, не вызывающими деструкции в клеточных культурах, для которых требуются дополнительные, более чувствительные и информативные тесты. В этих случаях рекомендуется использовать несколько чувствительных клеточных линий [23]. Специальные тесты на наличие вирусов свиней, которые не были обнаружены в ходе общего теста на клеточной культуре, должны быть определены для каждого конкретного случая после анализа типичных рисков для продукта, учитывая весь производственный процесс и способ применения БЛП [9]. Следует также учитывать соотношение риска и пользы при определении пригодности клеточного субстрата для производства конкретного препарата. При оценке риска необходимо следовать общим принципам, изложенным в Европейской фармакопее (ЕФ) [28]. Подробные рекомендации по вирусной безопасности, включая валидационные исследования, представлены, в частности, в Рекомендациях по вирусным валидационным исследованиям Комитета по патентованным лекарственным препаратам и Руководстве ICH Q5A: Оценка вирусной безопасности биотехнологических продуктов, полученных с использованием линий клеток человека или клеток животного происхождения [24, 29].

Снижение контаминации. Процесс производства трипсина, включающий высокоэффективные стадии очистки (спиртовое осаждение, высаливание, хроматография, длительная инкубация при низких значениях pH), должен надлежащим образом контролироваться не только в отношении сохранения активности ферментного препарата, но и отсутствия посторонних агентов. Основным способом, обеспечивающим безопасность трипсина, является удаление микробиологических агентов. Выбранные стадии производственного процесса должны быть тщательно валидированы и подтверждена их эффективность [9, 30]. Учитывая ограничения на проведение сплошного контроля сырья и тестирования на наличие вирусов, целесообразно включать специальную стадию для вирусной редукции. Для этой цели могут быть использованы УФ-С (коротковолновое) или гамма-облучение (45 кГр), нанофильтрация, обработка detergentами, преципитация, воздействие температуры и низких значений pH, хроматография. Данные методы обработки зарекомендовали себя как эффективные, значительно снижающие контаминацию, но не оказывающие при этом влияния на активность трипсина.

Гамма-лучи (γ -лучи), обладающие чрезвычайно малой длиной волны — менее $2 \cdot 10^{-10}$ м и большой проникающей способностью, могут применяться для обработки лиофилизированных или замороженных жидких препаратов трипсина, вызывая разрывы водородных и ковалентных связей между нуклеиновыми кислотами и белковой оболочкой вируса. Что касается парвовирусов, то они обладают устойчивостью к воздействию рН и имеют относительно низкую чувствительность к гамма-облучению.

УФ-излучение обладает наиболее высокой энергией в интервале длин волн от 205 до 315 нм с максимумом при 265 нм. Под влиянием УФ-излучения происходят изменения в структуре нуклеиновых кислот вирусов. Вместе с тем γ - и УФ-излучение не оказывают существенного влияния на белковую оболочку, поэтому инактивированные вирусы сохраняют свою антигенную и иммуногенную активность. При применении γ - и УФ-облучения необходимо подбирать дозы таким образом, чтобы они были достаточно высокими для инактивации/элиминации вирусов и достаточно низкими для сохранения протеолитических свойств трипсина [3, 9].

Наиболее эффективным и надежным способом устранения контаминации является нанофильтрация. Для удаления вирусов применяют мембранные лабораторные фильтры Millipore с размером пор от 0,025 до 8 мкм, для удаления микоплазм — фильтры Dugapore с размером пор от 0,1 до 5 мкм.

Для инактивации вирусов, покрытых липопротеиновой оболочкой, возможно использование неионных детергентов типа Тритон X-100 и Твин 80, под действием которых происходит дезинтеграция клеточных мембран и отделение от них вируса. Сложные или оболочечные вирусы инактивируются при низких значениях рН (4,0), а для безоболочечных вирусов этот метод необходимо совмещать с воздействием повышенной температуры.

Метод преципитации (осаждения) эффективен для удаления и капсидных, и некапсидных вирусов, в частности, парвовируса В19 с применением органических растворителей — этанола и трибутилового эфира, а также фосфорной кислоты. Возможно применение аффинной хроматографии с использованием голубого красителя (например, Blue Dye Sepharose, GE Healthcare, Швейцария) [31].

Документом ЕМА идентификацию и проверку активности свиного трипсина, используемого в производстве БЛП, рекомендовано проводить в соответствии с требованиями ЕФ. Трипсин, применяемый в качестве реагента для приготовления клеточных культур-субстратов и/или для активации вирусных частиц при производстве вакцин для медицинского применения, должен тестироваться на стерильность, отсутствие микоплазм и вирусов, особенно пестивирусов, цирковирусов и парвовирусов [9, 28].

Требования в Российской Федерации к трипсину, используемому в производстве и при контроле БЛП, согласуются с международными. Он не должен содержать микоплазм, цирко- и парвовирусов свиней, а также должен быть испытан на отсутствие контаминации бактериями и грибами [3, 26]. Испытание на стерильность и присутствие микоплазм проводят с помощью методов, изложенных в ОФС «Стерильность» и ОФС «Испытание на присутствие микоплазм» [32, 33].

Использование альтернативных реагентов для культур клеток

В настоящее время дискутируется вопрос о замене, сокращении использования или исключении из производственного

процесса сырья, полученного от животных и людей. FDA (Food and Drug Administration, Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств) и EMA (European Medicines Agency, Европейское агентство по лекарственным препаратам) при работе с культурами клеток поддерживают использование аналогов свиного трипсина неживотного происхождения, таких как трипсиноподобные растительные и бактериальные протеазы или рекомбинантный трипсин [9].

В настоящее время трипсиноподобные протеазы получены из папаина, фицина, бромелаина, представителей родов *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* и микроскопических грибов родов *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* [34]. Компания Thermo Fisher Scientific, США предлагает аналог трипсина TrypLe™ — рекомбинантную грибную трипсиноподобную протеазу, которая не содержит компонентов животного происхождения, обладает высокой чистотой, щадящим воздействием на клетки и не уступает по показателям протеолитической и дезагрегирующей активности свиному трипсину. Препарат сохраняет свои свойства в течение 6 месяцев при температуре от 15 до 30 °С. Фирма Roche CustomBiotech (Швейцария) выпускает аналог трипсина, синтезированный рекомбинантными штаммами дрожжей *Pichia pastoris* с последовательностями аминокислот, идентичными таковым в трипсине животного происхождения. Использование рекомбинантных препаратов, полученных из бактерий или растений, в принципе сводит к минимуму риск заражения вирусами животных, и поэтому применение таких аналогов более предпочтительно. Однако не следует полагать, что применение рекомбинантного трипсина исключает риск контаминации биопрепаратов. Тем не менее никакие рекомендации по отказу от использования свиного трипсина в настоящее время не могут быть даны в связи с тем, что применение альтернативных реагентов в производстве БЛП требует тщательной оценки их пригодности, качества, стерильности, эффективности, а также других сопутствующих рисков [2, 3]. Существенным ограничением применения трипсиноподобных протеаз в производстве БЛП может быть и их стоимость, в десятки раз превышающая стоимость трипсина, полученного из животного сырья.

Заключение

При использовании свиного трипсина существует риск того, что, несмотря на жесткие условия обработки, исходный материал для производства БЛП может быть загрязнен патогенной микрофлорой доноров. Среди наиболее широко распространенных возбудителей заболеваний свиней, поджелудочные железы которых служат источником трипсина, — цирковирусы, пестивирусы, парвовирусы и микоплазмы, представляющие потенциальную угрозу для потребителей как возможные контаминанты вакцин и других биологических лекарственных препаратов. В соответствии с национальными и международными требованиями к безопасности биопрепаратов для предотвращения контаминации необходимо использовать меры по выявлению и инактивации посторонних агентов как в исходных материалах, так и на этапах производства БЛП. Для обнаружения вирусов свиней могут быть использованы методы исследования ЦПД, реакции гемагглютинации, гем-адсорбции, МФА, ИФА, ПЦР. Удаление цирковирусов и парвовирусов представляет значительные трудности вследствие их высокой устойчивости к физико-химической обработке и требует проведения дополнительных этапов инактивации. Для инактивации резистентных вирусов наиболее эффективно использование УФ-С или гамма-облучения, нанофильтрации, хроматографии, обработки детергентами, рН, преципитации,

воздействия температуры. Трипсин, используемый в качестве реагента для приготовления клеточных культур-субстратов и/или для активации вирусных частиц при производстве вакцин для медицинского применения, должен также соответствовать тесту на стерильность и быть свободным от микоплазм.

Перед применением в производстве БЛП аналогов трипсина необходимо их тщательное изучение в отношении оценки пригодности, эффективности, отсутствия токсичности, а также сопутствующих рисков, вызванных контаминацией специфическими посторонними агентами, в отношении которых могут отсутствовать доказательства или средства для их обнаружения.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00023-18-02 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590046-9).

Acknowledgments. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00023-18-02 and was supported by the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590046-9).

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

Conflict of interest. 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.)]
2. Recommendations for the Evaluation of Animal Cell Cultures as Substrates for the Manufacture of Biological Medicinal Products and for the Characterization of Cell Banks. *WHO Technical Report*. Series 978, Annex 3; 2013.
3. Суханова СМ, Петручук ЕМ, Генералов АА. Трипсин. Свойства и применение в производстве биологических лекарственных препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(2):106–13. [Sukhanova SM, Petruchuk EM, Generalov AA. Trypsin. Properties and Use in the Production of Biological Medicinal Products. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2018;18(2):106–13 (In Russ.)]
4. Попова ВМ, Кочиш ИИ, Беро ИЛ, Самуйленко АЯ, Гуславский АИ. Разработка и оптимизация биотехнологий производства ветеринарных препаратов и ферментов. *Сельскохозяйственная биология*. 2010;(4):45–50. [Popova VM, Kochish II, Bero IL, Samuilenko AY, Guslavskii AI. Development and optimization of biotechnology of manufacturing of veterinary preparation and enzymes. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya = Agricultural Biology*. 2010;(4):45–50 (In Russ.)]
5. Гребенникова ТВ. Современные аспекты диагностики прионных болезней. *Симпозиум «Фундаментальные и прикладные исследования в области инфекционных болезней, эпидемиологии и микробиологии»*. Сочи; 2016. [Grebennikova TV. Modern aspects of diagnosis of prion diseases. *Symposium «Basic and Applied Research in the Range of Infectious Diseases, Epidemiology and Microbiology»*. Sochi; 2016 (In Russ.)] Available from: <http://ia-rf.ru/upload/iblock/ff8/ff85571904332a82859b870740670bc2.pdf>
6. Note for Guidance on Minimising the Risk of Transmitting Animal Spongiform Encephalopathy Agents via Human and Veterinary Medicinal Products (EMA/410/01 rev. 3). EMA; 2011.
7. 5.2.8. Minimising the Risk of Transmitting Animal Spongiform Encephalopathy Agents Via Human and Veterinary Medicinal Products. European Pharmacopoeia 9.0.

8. Guideline on the Use of Bovine Serum in the Manufacture of Human Biological Medicinal Products (EMA/CHMP/BWP/457920/2012). European Medicines Agency; 2013.
9. Guideline on the Use of Porcine Trypsin Used in the Manufacture of Human Biological Medicinal Products (EMA/CHMP/BWP/814397/2011). EMA; 2014.
10. Сатина ТА. *Цирковирусные инфекции свиней: обзор литературы*. Владимир: ФГУ ВНИИЗЖ; 2003. [Satina TA. *Porcine Circovirus Diseases: Literature review*. Vladimir: FGU VNIIZZH; 2003 (In Russ.)]
11. Victoria JG, Wang C, Jones MS, Jaing C, McLoughlin K, Gardner S, Delwart EL. Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: detection of minority variants and an adventitious virus. *J Virol*. 2010;84(12):6033–40. <https://doi.org/10.1128/JVI.02690-09>
12. European Medicines Agency Confirms that Presence of Unexpected Viral DNA in Live Attenuated Vaccines Does not Raise Public Health Concerns. Press release (EMA/732522/2010). EMA; 2010.
13. Бутенков АИ. Патогенетическое обоснование развития и прогнозирования течения цирковирусной инфекции у поросят: дис. ... д-ра вет. наук. Новочеркасск; 2010. [Butenkov AI. Pathogenetic substantiation of the development and prediction of the severity of the course of circovirus infection in piglets. Dr. Vet. Sci. [dissertation]. Novocherkassk; 2010 (In Russ.)]
14. Семенов ВИ, Болоцкий ИА, Васильев АК, Пруцаков СВ. Цирковирусные болезни свиней (ЦВБС). *Ветеринария Кубани*. 2009;(5):8–10. [Sementsov VI, Bolotsky IA, Vasilyev AK, Prutsakov SV. Porcine circovirus diseases (PCVD). *Veterinariya Kubani*. 2009;(5):8–10 (In Russ.)]
15. Орлянкин БГ, Сергеев ВА, Седов ВА. Парвовирусная болезнь свиней. *Ветеринария*. 1987;10:72–6. [Orlyankin BG, Sergeev VA, Sedov VA. Porcine Parvovirus Infection. *Veterinariya*. 1987;10:72–6 (In Russ.)]
16. Brown TT Jr, Paul PS, Mengeling WL. Response of conventionally raised weanling pigs to experimental infection with a virulent strain of porcine parvovirus. *Am J Vet Res*. 1980;41(8):1221–4.
17. Ерофеев СГ. Парвовирусная инфекция свиней: эпизоотология, диагностика и специфическая профилактика: дис. ... канд. вет. наук. Владимир; 2002. [Erofeev SG. Porcine parvovirus infection: epizootology, diagnosis and specific prophylaxis. Cand. Vet. Sci. [dissertation]. Vladimir; 2002 (In Russ.)]
18. Сидоров МА, Крупальник ВЛ. Чума свиней. В кн.: Бессарабов ВФ, Вашутин АА, Воронин ЕС. *Инфекционные болезни животных*. М.: КолосС; 2007. С. 362. [Sidorov MA, Krupalnik VL. Swine Fever. In: Bessarabov VF, Vashutin AA, Voronin ES. *Infectious Diseases of Animals*. Moscow: KolosS; 2007. P. 362 (In Russ.)]
19. Род пестивирусов. *Медицинский справочник 4medical.in*; 2012. [Pestiviruses. *Medical Guide 4medical.in*; 2012 (In Russ.)] Available from: <http://4medical.in/rod-pestivirusov/>
20. Жонголович АЕ. Этио-эпизоотологические особенности микоплазмоза свиней и усовершенствование методов его диагностики и лечения: дис. ... канд. вет. наук. Омск; 2008. [Zhongolovich AE. Ethio-epizootological features of swine mycoplasmosis and improvement of methods of its diagnosis and treatment. Cand. Vet. Sci. [dissertation]. Omsk; 2008 (In Russ.)]
21. Ефанова ЛИ, Степанов АВ, Свиридов ММ, Манжурина ОА. Микоплазменная инфекция у свиней. *Достижения науки и техники АПК*. 2012;(1):35–6. [Efanova LI, Stepanov AV, Sviridov MM, Manzhurina OA. Mycoplasma infection in pigs. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC*. 2012;(1):35–6 (In Russ.)]
22. Титов МА, Караулов АК, Шевцов АА, Бардина НС, Гуленкин ВМ, Дудников СА. *Методические рекомендации по оценке безопасности на свиноводческих предприятиях в Российской Федерации*. Владимир; 2010. [Titov MA, Karaulov AK, Shevtsov AA, Bardina NS, Gulen-

- kin VM, Dudnikov SA. *Methodological recommendations for the assessment of safety in pig farming enterprises in the Russian Federation*. Vladimir; 2010 (In Russ.)]
23. Marcus-Sekura C, Richardson JC, Harston RK, Sane N, Sheets RL. Evaluation of the human host range of bovine and porcine viruses that may contaminate bovine serum and porcine trypsin used in the manufacture of biological products. *Biologicals*. 2011;39(6):359–69. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.08.003>
 24. Правила надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза (утв. Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 77). [Rules of Good Manufacturing Practice of the Eurasian Economic Union (app. by the Council of the Eurasian Economic Commission of November 3, 2016 No. 77) (In Russ.)]
 25. 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, Petrushuk EM, Semenova IS, Volgin AR, Trousov GA. Requirements for cell cultures, used for manufacture and quality control of immunobiological medicines. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2013;(1):28–32 (In Russ.)]
 26. Общая фармакопейная статья 1.7.2.0011.15 Требования к клеточным культурам — субстратам производства 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 13th ed. V. 2. Moscow; 2015 (In Russ.)]
 27. Петрова ОГ, Донник ИМ, Исаева АГ, Крысенко ЮГ. Диагностика цирковирусной инфекции свиней. *Аграрный вестник Урала*. 2014;(3):27–31. [Petrova OG, Donnik IM, Isaeva AG, Krysenko YuG. Diagnostics of circovirus infection of pigs. *Agrarnyj vestnik Urala = Agrarian Bulletin of the Urals*. 2014;(3):27–31 (In Russ.)]
 28. 01/2011:0694 Trypsin. European Pharmacopoeia 9.0.
 29. 5.1.7. Viral safety. European Pharmacopoeia 9.0.
 30. Note for Guidance on Virus Validation Studies: The Design, Contribution and Interpretation of Studies Validating the Inactivation and Removal of Viruses (CPMP/BWP/268/95). EMA; 1996.
 31. Гусаров ДА. Разработка научных основ создания технологии выделения и очистки генно-инженерных белков: дис. ... д-ра хим. наук. М.; 2014. [Gusarov DA. Development of scientific bases of technology of isolation and purification of genetically engineered proteins. Dr. Chem. Sci. [dissertation]. Moscow; 2014 (In Russ.)]
 32. Общая фармакопейная статья 1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1, М.; 2015. [General monograph 1.2.4.0003.15 Sterility. The State Pharmacopoeia of Russian Federation 13th ed. V. 1. Moscow; 2015 (In Russ.)]
 33. Общая фармакопейная статья 1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2, М.; 2015. [General monograph 1.7.2.0031.15 Test for the presence of mycoplasma. The State Pharmacopoeia of Russian Federation 13th ed. V. 2. Moscow; 2015 (In Russ.)]
 34. Производство протеолитических ферментных препаратов. [Manufacture of proteolytic enzyme preparations (In Russ.)] Available from: https://vuzlit.ru/716933/proizvodstvo_proteoliticheskikh_fermentnyh_preparatov

Об авторах

Суханова Светлана Михайловна, канд. биол. наук, начальник лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6621-4384>

Петручук Елена Мидатовна, канд. биол. наук, эксперт 1 категории лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-7893-4933>

Поступила 11.05.2018
Принята к публикации 09.08.2018

Authors

Svetlana M. Sukhanova, Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Bacteriological Culture Media and Cell Cultures of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6621-4384>

Elena M. Petrushuk, Candidate of Biological Sciences, 1st Professional Category Expert of the Laboratory of Viral Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-7893-4933>

Received 11 May 2018
Accepted 9 August 2018