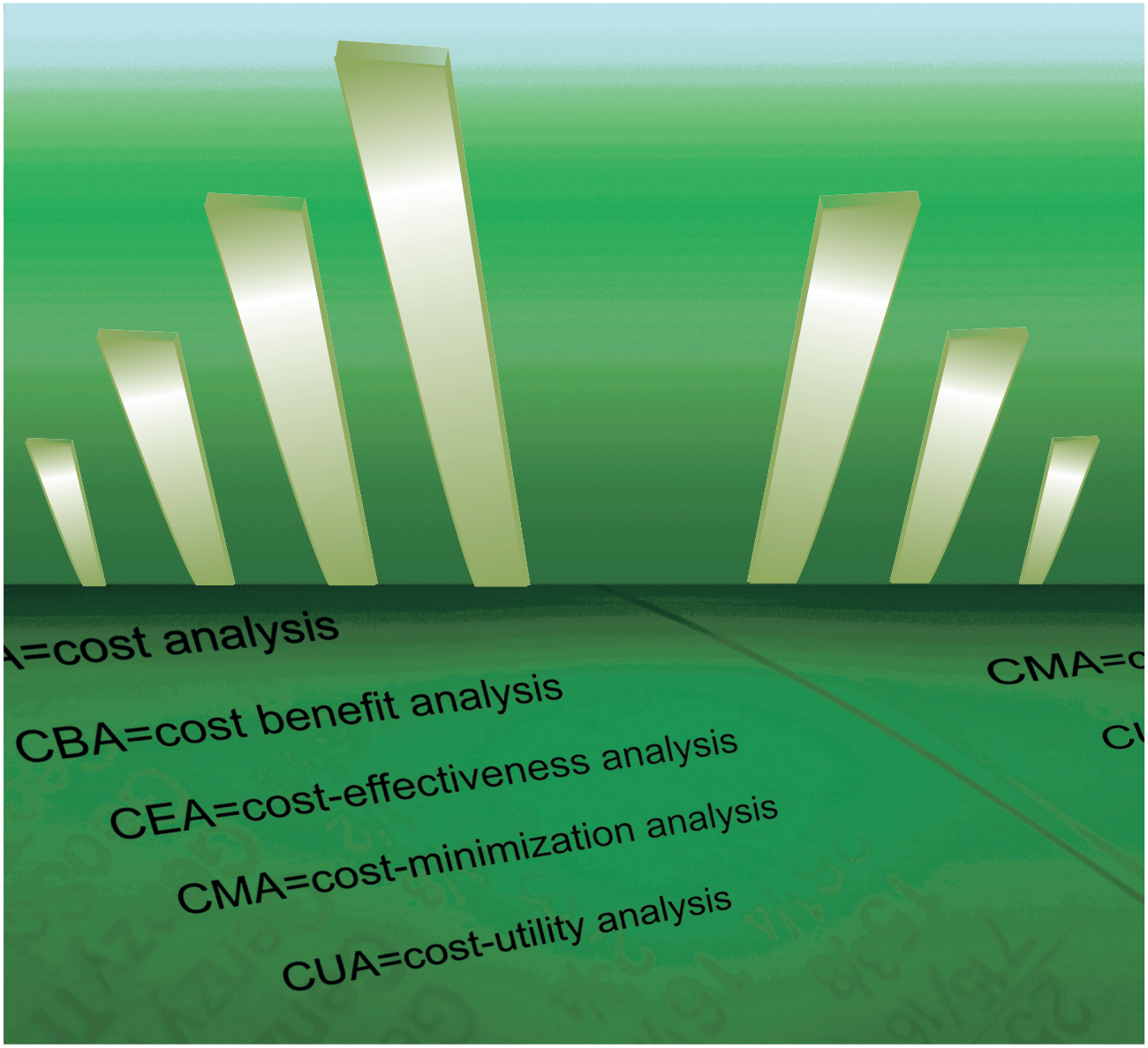
Фармакоэкономика

современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология



PHARMACOECONOMICS. Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology
ISSN 2070-4909
2018 Vol. 11 No3
www.pharmacoeconomics.ru

- Концепция многокритериального анализа принятия решений в текущей системе оценки технологий в здравоохранении России
- Моноклональное антитело окрелизумаб для терапии рассеянного склероза у взрослых пациентов: систематический обзор

№3
Том 11
2018

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта http://www.pharmacoeconomics.ru. Не предназначено для использования в коммерческих целях.
Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru. Copyright © 2018. Издательство ИРБИС. Все права охраняются.

© Пономаренко С. В.
ISSN 2070-4909
DOI: 10.17749/2070-4909.2018.11.3-058-066

Экономические барьеры, тормозящие производство терапевтического рекомбинантного трипсина человека. Применение инновационных технологий для их преодоления

Пономаренко С. В.

SophiGen (Бенен, Германия)

Аннотация

Цель обзора – проанализировать причины высокой стоимости рекомбинантного трипсина человека, технологические и экономические препятствия, ограничивающие его производство и применение, а также практические подходы для решения этих проблем. Материалы и методы. Поиск информации о свойствах трипсина человека, методах производства рекомбинантной протеазы, ее рынке и типах энзимотерапии был проведен в различных открытых источниках. В обзор включены четыре ссылки на русском и английском языках. Особое внимание было уделено методам, повышающим продукцию рекомбинантного трипсина. Результаты. Трипсин, полученный из экстракта поджелудочной железы млекопитающих, используется более 80 лет в энзимотерапии различных болезней. Человеческий генно-инженерный трипсин должен применяться как инновационная, безопасная и эффективная терапевтическая протеаза. Пока медицинское назначение ограничивает очень высокая цена и недостаточное производство рекомбинантного трипсина. Следует применять новейшие технологии биофармацевтики, а также комбинировать оптимальные методы up-stream- и down-stream-процессов, чтобы повысить во много раз выход активного рекомбинантного трипсина, и значительно снизить производственные затраты на единицу протеина. Рекомбинантный трипсин человека, близкий по цене к аналогам из тканей животных, является предпочтительным для всех типов энзимотерапии. Заключение. Применение инновационных биофармацевтических технологий в сочетании с новейшими методами значительно снизят затраты в производстве рекомбинантного трипсина человека, что стимулирует его использование в энзимотерапии, а также в производстве других терапевтических протеинов.

Ключевые слова

Протеазы животных, производство рекомбинантного трипсина, энзимотерапия, биофармацевтики, фармакоэкономика.

Статья поступила: 09.07.2018 г.; **в доработанном виде:** 16.08.2018 г.; **принята к печати:** 21.09.2018 г.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии необходимости раскрытия финансовой поддержки или конфликта интересов в отношении данной публикации.

Для цитирования

Пономаренко С. В. Экономические барьеры, тормозящие производство терапевтического рекомбинантного трипсина человека. Применение инновационных технологий для их преодоления. ФАРМАКОЭКОНОМИКА. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология. 2018; 11 (3): 058-066. DOI: 10.17749/2070-4909.2018.11.3-058-066.

Economic barriers restraining the production of therapeutic recombinant human trypsin. Use of innovative technologies to overcome them

Ponomarenko S. V.

SophiGen (42 Siemensstraße, Bönen 59199, Germany)

Summary

The aim of this review is to analyze reasons for the high cost of recombinant human trypsin, technological and economic obstacles limiting trypsin production and implementation, as well as practical means to solve these problems. Materials and methods. The properties of human trypsin, the recombinant technology for its production, the marketing aspects and the prospective of enzyme therapy are addressed in this review that contains 44 references in Russian and English. Particular attention is paid to the methods that can boost the production of recombinant trypsin. Results. Trypsin purified from the mammalian pancreas has been used for over 80 years in the enzyme therapy in various diseases. Genetically engineered human trypsin is proposed to be an innovative, safe and effective therapeutic protease. However the medical use of recombinant trypsin is slowed by its very high price and insufficient production. There is a need for novel biopharmaceutical technologies, as well optimized up-stream and down-stream processes to increase the yield of active recombinant trypsin and significantly reduce the production costs. Recombinant human trypsin that is priced similar to its animal analogues is preferable in all types of enzyme therapy. Conclusion. Innovative biopharmaceutical technologies are expected to significantly reduce the production costs of recombinant human trypsin and stimulate its wider use in enzyme therapy and also in production of other therapeutic proteins.

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта http://www.pharmacoeconomics.ru. Не предназначено для использования в коммерческих целях.
Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru. Copyright © 2018. Издательство ИРБИС. Все права охраняются.

Key words
Animal proteases, recombinant trypsin production, enzyme therapy, biopharmaceuticals, pharmacoeconomics.

Received: 09.07.2018; **in the revised form:** 16.08.2018; **accepted:** 21.09.2018.

Conflict of interests
The author declares no financial support or conflict of interest with respect to this publication.

For citation
Ponomarenko S.V. Economic barriers restraining the production of therapeutic recombinant human trypsin. Use of innovative technologies to overcome them. FARMAKOEKONOMIKA. Modern pharmacoeconomics and pharmacoepidemiology. [*FARMAKOEKONOMIKA. Sovremennaya farmakoekonomika i farmakoepidemiologiya*]. 2017; 11 (3): 058-066 (in Russian). DOI: 10.17749/2070-4909.2018.11.3-058-066.

Corresponding author
Address: 42 Siemensstraße, Bönen 59199, Germany.
E-mail address: ponomarenko@t-online.de (Ponomarenko S.V.).

Введение

Трипсин – это фермент, который относится к классу гидролаз, к группе сериновых протеаз и субсемейству трипсинов (EC:3.4.21.4). Он является очень важным для животных организмов ферментом – гидролизует белки, расщепляя их пептидные цепи на карбоксильном фланге аминокислот лизина или аргинина, за исключением некоторых случаев [1,2]. Установлена трехмерная структура трипсина, которая имеет несколько дисульфидных связей [3]. Трипсины млекопитающих гомологичны по структуре и проявляют одинаковый механизм ферментативной реакции [2,4]. Трипсины животных экстрагируют из их желез и последовательно очищают методами, использующими особенности физико-химических свойств этого протеина [5-9].

Поджелудочная железа (ПЖ) животных производит большое количество трипсина, который у млекопитающих транслируется как неактивный профермент трипсиноген. Он транспортируется в кишечник, где активируется мембранно-связанной протеазой (энтеропептидазой) с формированием активного фермента [10]. Образованный трипсин обладает высокой каталитической активностью и способен активировать как сам трипсиноген, так и другие зимогены [10-12]. Трипсин играет ключевую роль не только в пищеварительном процессе, он также незаменим в ряде важных биохимических реакций организма. У млекопитающих обнаружено несколько изоформ этого энзима [13-15]. В организме человека превалирует производство трипсина 1 бета (Trp1) [11]. Синтез его предшественника, катионического трипсиногена, кодируется геном PRSS1 (или TRP1), который находится в хромосоме 7 генома человека [1].

Чаще всего, особенно для медицинских исследований, рекомбинантный трипсин человека (рТч) экспрессируется как Trp1. Протеолитик Trp1 – наиболее изученный белок из субсемейства трипсинов в генетике, молекулярной биологии, биохимии и физиологии, о нем получено больше клинических данных, чем для других изоформ [15-16].

Трипсин в качестве лекарства применяется с конца 30-х гг. прошлого столетия не только *per os* для улучшения пищеварения, но внутримышечно, внутривенно, а также в виде ингаляций, орошений и аппликаций [17-18]. Его назначают как тромболитический, противовоспалительный, болеутоляющий и противоотечный препарат при лечении тромбозов, ран и ожогов (**табл. 1**). Эта эндопептидаза разрушает некоторые вирусы и бактериальные токсины, а также избирательно расщепляет некротированные ткани [19]. Трипсин используют в терапии генетических болезней, вызванных дефицитом или отсутствием протеаз, таких как муковисцидоз, наследственный панкреатит [20-21]. К сожалению, доступной информации о его применении недостаточно, чтобы прогнозировать рынок терапевтического рТч.

Трипсин используется во многочисленных биотехнологических процессах, таких как производство рекомбинантных белков, в т.ч. фармацевтических. Так, в 2015 г. для производства рекомбинантного инсулина требовалось более 50 кг высокоочищенного, в соответствии с требованиями EMA или FDA, трипсина [22]. Такого же качества протеаза требуется в большом количестве для трипсинолиза в производстве других терапевтических белков и вакцин. Этот энзим используют в анализах разного типа, например, для подтверждения первичной структуры белков, так как он высокоспецефично расщепляет пептиды после аргинина или лизина [2,23].

Почти весь коммерческий трипсин выделяют из ПЖ свиней или крупного рогатого скота (КРС), хотя в последнее время растет количество и качество промышленных протеаз, вырабатываемых из растений или микроорганизмов. Степень очистки промышленного фермента определяется требованиями технологии, самыми строгими для инвазивных фармацевтических препаратов (см. табл. 1). Для снижения контаминации лекарственного трипсина продуктами ПЖ животных, особенно патогенными агентами, такими как вирусы или прионы, требуется направленная многостадийная очистка, что делает процесс изготовления дорогостоящим. Для производства фармацевтически активной субстанции (ФАС) наиболее пригоден рТч, так как его применение исключает контаминацию указанными продуктами ПЖ, другими ферментами или ингибиторами протеаз, а также обеспечивает постоянное и воспроизводимое качество продукта, что очень важно для валидации и GMP биофармацевтического производства. По этим же причинам для процессинга терапевтических белков более пригоден рекомбинантный трипсин и рТч как предпочтительный вариант. Спрос на рТч будет расти, так как производство терапевтических белков, использующих трипсин, увеличивается на 8-10% в год.

Цель обзора – проанализировать область применения и рынок терапевтического трипсина, особенности выработки рекомбинантной протеазы и причины высоких затрат на ее производство, пути совершенствования методов для повышения продуктивности технологического процесса и значительного снижения стоимости рТч.

Применение терапевтического трипсина и его рынок

Только незначительная часть трипсина, вырабатываемого глобально из ПЖ животных, используется для производства лекарственных средств. Значительная масса этого белка производится в странах, входящих в первую десятку по потреблению и производству мясных продуктов. В Европе, Индии и Китае больше производят трипсина из поджелудочной железы свиньи, в Аргентине – из КРС, в США – почти в равной степени из обоих источников. В некоторых странах конфессиальные предпочтения пациентов

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта http://www.pharmacoeconomics.ru. Не предназначено для использования в коммерческих целях.
Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru. Copyright © 2018. Издательство ИРБИС. Все права охраняются.

Таблица 1. Типы лекарственных препаратов, содержащих трипсин, и клинические показания для их назначения.

Table 1. Trypsin-containing medications and clinical indications for their use.

Типы препаратов	Лечебные мероприятия	Показания для энзимотерапии
Трипсин кристаллический	Инъекции	Острые и хронические тромбофлебиты Одонтогенные остеомиелиты Осложнения сахарного диабета
Ферментные смеси	Инъекции или ингаляции	Муковисцидоз Опухоли Бронхоэктатическая болезнь Абсцессы легких Экссудативный плеврит Послеоперационные ателектазы Эмпиема плевры
Протеолитические смеси	Растворы для инъекций, промываний, орошений	Гнойные хронические отиты Гнойные синуситы Воспалительно-дистрофические формы пародонтоза
Глазные капли	Капли в коньюктивный мешок	Непроходимость и воспаление слезо-выводящих путей Ириты и иридоциклиты Отечность окологлазничной области, кровоизлияния в камеру глаза
Панкреатин	Перорально	Муковисцидоз Панкреатит Сниженная секреция ферментов поджелудочной железы
Ферментные растворы, гели или мази	Терапия кожных тканей	Гнойные раны и ожоги Некрэктомия и диабетическая стопа Флегмоны, абсцессы, маститы Язвы, пролежни, склеродермии

имеют радикальное значение. Ведущие производители промышленных ферментов в США и ЕС: Novozymes (Дания), Danisco (Дания), Genencor (США), DSM (Нидерланды) и BASF (Германия) [24]. Эти же фирмы производят трипсин, в т.ч. для терапии разных заболеваний (см. табл. 1). В медицинской практике разрешен трипсин кристаллический (как для местного, так и для парентерального применения) и трипсин аморфный (только для местного применения).

Пероральные таблетированные лекарства, содержащие трипсин, в основной массе являются экстрактом ПЖ животных. Системный подход в энзимотерапии значительно расширил использование протеаз, включая трипсин.

Стоимость трипсина зависит от степени его чистоты, специфической активности и фасовки. Широкий спектр терапевтических трипсинов реализуется через аптечную сеть, как моно- или поликомпонентные препараты под различными брендовыми названиями. Основные производители терапевтического фермента для инъекций или ингаляций поставляют стерильный трипсин лиофилизированный или в виде раствора в ампулах с указанием его каталитической активности, так как эффективность протеазной реакции зависит не только от чистоты фермента, но и от его удельной активности. Каталитическая активность терапевтических энзимов обозначается в фармакопейных единицах.

Цены на протеазные ФАС зависят не только от их каталитической активности и степени очистки, но также от страны-производителя и потребителя. Поэтому в мировых масштабах стоимость 1 г кристаллического терапевтического трипсина может варьировать в пределах 20-200 долл. США в зависимости от региона. Практически 100 мг рекомендуется для 10 дневного инвазивного курса лечения с контролем содержания трипсина в кровяном русле.

Рынок терапевтического трипсина оценить сложнее в отличие от рекомбинантного инсулина или эритропоэтина. Объем производства каждого из этих блокбастеров примерно на два-три порядка выше, чем инъекционных препаратов трипсина. Цена биофармацевтических препаратов может напрямую зависеть от объема производства. На изготовление стерильного трипсина, отвечающего требованиям фармакопеи, глобально используется несколько центнеров этой протеазы, выделенной из ПЖ млекопитающих.

Терапевтический трипсин продолжают получать традиционными технологиями из ПЖ животных часто на оборудовании прошлого века. Препараты, содержащие трипсин, применяются более 80 лет. Чтобы защитить пациентов США от протеазы низкого качества, FDA приняла решение в 2006 г. о регистрации лекарственных препаратов из ПЖ как новых [25]. Развитие биофармацевтических технологий способствует тому, что в скором времени не только трипсин, но и другие новые терапевтические протеазы будут генно-инженерными.

Основные производители и рынок рекомбинантного трипсина

Крупные производители рекомбинантных энзимов – Novozymes, Thermo Fisher, Roche, BBI Group, Merck, Biological Industries, Shanghai Yaxin Biotechnology CoLtd и др. [26] – производят коммерческие генно-инженерные трипсины свиньи, человека, КРС и других животных в зависимости от интересов заказчика, но, как было уже указано, для медицины и процессинга биофармацевтиков наиболее полезен рТч.

Рынок рекомбинантного трипсина составляет незначительную часть от глобального производства этой протеазы. Его применяют для процессинга белков, в т.ч. терапевтических, а также в работе с культурой клеток и для аналитики. Рекомбинантный трипсин, применяемый в протеомике с квалификацией «sequencing grade», самый дорогой (1000-2000 долл. США за 1 мг) [27-28]. Он дороже почти в миллион раз экстракта трипсина из ПЖ [29]. Китайская фирма Shanghai Yaxin Biotechnology CoLtd предлагает 10 мг высокоочищенного (>95%) рТч с удовлетворительной каталитической активностью по цене 8,9 долл. США за 1 мг [30] и может производить до 60 г в год этого фермента указанного качества. Разброс коммерческих цен на очищенный трипсин [30-35] может достигать 3-4 порядков (**рис. 1**).

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта http://www.pharmacoeconomics.ru. Не предназначено для использования в коммерческих целях.
Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru. Copyright © 2018. Издательство ИРБИС. Все права охраняются.

Исходя из объемов продаж рекомбинантного трипсина и данных о решениях FDA и EMA [25], становится ясно, что мировой рынок лекарственного рТч практически не существует. Поэтому еще рано судить об объемах его продаж и прогнозировать непосредственно динамику его потребления. Можно примерно оценить потребность для пула зарегистрированных больных с тромбофлебитом или генетическими нарушениями. Для инвазивных методов терапии (см. табл. 1), особенно сердечно-сосудистых заболеваний, должны использоваться современные рТч, несмотря на высокую стоимость таких препаратов.

Потребление рТч в странах Северной Америки, ЕС и Японии должно быть высоким из-за значительной доли в популяции пожилых пациентов с сердечно-сосудистыми и офтальмологическими заболеваниями, а также диабетом. Ежегодная потребность в применении рТч в этих странах у пациентов, страдающих тромбофлебитом, для которых безопасность и эффективность лечения важнее, чем его цена, должна быть более 100 кг.

Необходимо развивать инновационные технологии для снижения стоимости производства рТч, что приведет к увеличению глобального применения этой протеазы в терапии различных болезней (см. табл. 1).

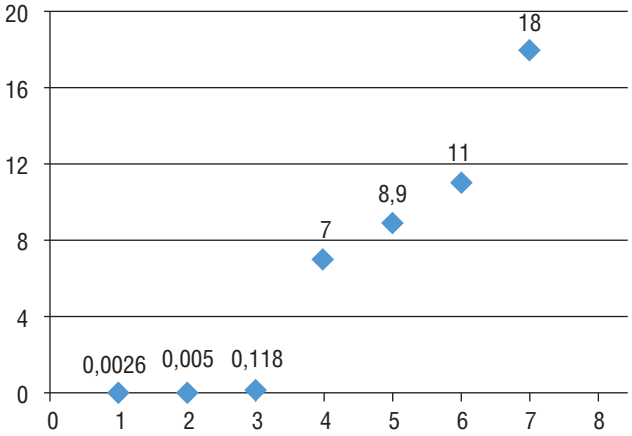


Рисунок 1. Цены на трипсин различных производителей в зависимости от чистоты и ферментативной активности.
Примечание. По оси ординат указана цена 1 мг трипсина (долл. США); по оси абсцисс указаны поставщики: 1-[29], 2-[31], 3-[32], 4-[33], 5-[30], 6-[34], 7-[35].

Figure 1. Prices for trypsin from different manufacturers depend on its purity and enzymatic activity.
Note. The ordinate axis is the price of 1 mg of trypsin (US $); the numbers on the abscissa axis indicate various suppliers: 1- [29], 2- [31], 3- [32], 4- [33], 5- [30], 6- [34], 7- [35].

Особенности производства рекомбинантного трипсина

Trp1 – это белок, состоящий из 224 аминокислотных остатков с молекулярной массой 23 КДа [1], среди которых шесть аргининов и 13 лизинов. В катионическом трипсиногене человека содержится 20 этих диаминокарбоновых аминокислот, по которым фермент способен аутогидролизоваться, и скорость образования может быть для разных пептидных фрагментов очень быстрой, быстрой или медленной в зависимости от структурных особенностей белка [23].

Обычно в производстве терапевтических белков наиболее затратным является down-stream-процесс и его оптимизация позволяет в значительной мере снизить производственные затраты [22]. Цены на высокоочищенный трипсин в несколько тысяч раз выше [29-35], чем на первичный (см. рис. 1), что свидетельствует о гигантских потерях целевого белка в down-stream-процессе. Конечный выход высокоочищенного рекомбинантного трипсина в тысячи раз ниже, чем других биофармацевтиков [22]. Основной причиной таких потерь целевого белка является ферментативный аутокатализ трипсина по указанным аминокислотным остаткам [10,12]. Поэтому блокирование или значительное замедление аутокаталитической реакции эндопептидазы необходимо для предотвращения губительных потерь целевого продукта при производстве и хранении [10,36]. Для этого в первую очередь следует блокировать высокоскоростной гидролиз диаминокарбоновых остатков трипсина [23,37].

Трипсин, как и другие рекомбинантные полипептиды, синтезируют в гетерологичных клетках, затем его выделяют и очищают

Таблица 2. Основные фазы up-steam- и down-steam-процессов при производстве терапевтического трипсина.

Table 2. The main phases of the up-steam- and down-steam processes in production of therapeutic trypsin.

Источник клеток / Фаза процесса	ПЖ животных	Дрожжи	*E. coli*
Up-stream	–	Культивирование рекомбинантных клеток при низком pH	Культивирование рекомбинантных клеток
Выделение клеток	Гомогенизация ПЖ животных	Осаждение клеток или фильтрация культуральной смеси	Фильтрация культуральной смеси или осаждение клеток
Down-steam	Экстракция белков	Ультрафильтрация трипсиногена	Лизис клеток, очистка телец включения
	Фильтрация белка или осаждение крупных примесей	Концентрирование трипсиногена	Солюбилизация белка
	Высаливание или преципитация белка	Очистка трипсиногена	Очистка трипсиногена
	–	–	Фолдинг трипсиногена
	–	–	Очистка уложенного протеина
	–	Процессинг трипсиногена	Процессинг трипсиногена
	–	Активация эндопептидазы	Активация эндопептидазы
	Очистка трипсина	Очистка трипсина	Очистка трипсина
	Концентрирование трипсина	Концентрирование трипсина	Концентрирование трипсина
	Кристаллизация трипсина	Кристаллизация трипсина	Кристаллизация трипсина
	Лиофилизация ФАС	Лиофилизация ФАС	Лиофилизация ФАС

Примечание. ПЖ – поджелудочная железа; ФАС – фармацевтически активная субстанция.

Note. ПЖ – pancreas; ФАС – pharmaceutically active substance.

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта http://www.pharmacoeconomics.ru. Не предназначено для использования в коммерческих целях.
Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru. Copyright © 2018. Издательство ИРБИС. Все права охраняются.

Таблица 3. Принципиальные преимущества и недостатки технологий производства трипсина.

Table 3. Principal advantages and disadvantages of trypsin production technologies.

Источник сырья / Характеристики	ПЖ животных	Дрожжи	*E. coli*
Недостатки	Аутокатализ активного энзима. Опасные для человека контаминанты. Примесь других ферментов и ингибиторов протеаз. Низкий выход высокоочищенного целевого белка. Иммунный ответ или аллергия у пациентов на чужеродный белок	Некоторые аминокислотные остатки полипептида подвергаются посттрансляционной модификации. Невысокий уровень титра рекомбинантного белка из-за низкой pH культуральной среды и деградации протеазами клетки хозяина. Заданная экспрессия белка не всегда воспроизводима из-за разбалансировки сложного внутриклеточного процесса биосинтеза, транспорта и экскреции белка.	Большие потери в down-stream-фазах. Высокозатратный фолдинг трипсиногена
Преимущества	Выделяют и очищают натуральный, биологически активный трипсин	Не требуется фолдинг полипептида *in vitro*. Вырабатывается рекомбинантный трипсин	Высокая экспрессия и продукция белка, идентичного трипсину человека
Ссылки	[5-9]	[37-38]	[39-41]

традиционными методами [24], однако в технологии его производства имеется несколько проблемных фаз (**табл. 2**).

Для биосинтеза рекомбинантного трипсина в промышленных масштабах применяются преимущественно две системы экспрессии. Одна система использует синтез белка в дрожжах, таких как *Saccharomyces cerevisiae* или *Pichia pastoris* [37-38], когда продукт экспрессии секретируется в культуральную среду, из которой отделяются клетки-хозяина и затем белок подвергается последовательной очистке (см. табл. 2). Однако производство трипсина биосинтезом его предшественника в дрожжах нестабильно (**табл. 3**) и, как правило, приводит к очень низким выходам целевого продукта.

Более продуктивная система экспрессии протеазы – это биосинтез в прокариотических клетках, таких как *Escherichia coli* (*E. coli*). Эта бактерия является основной биосинтетической машиной для производства рекомбинантных белков, так как клетки *E. coli* хорошо изучены, быстро делятся и растут на простой среде, с высокой скоростью синтезируют гетерологичные белки и их можно легко лизировать. Поэтому бактериальная экспрессионная система экономически выгодна для многих терапевтических биофармацевтиков и также для производства рТч (см. табл. 3) [22,39-41].

Общая технологическая схема изготовления рекомбинантных ферментов экспрессией в микроорганизмах приведена в работе [24]. В таблице 2 сравниваются три способа производства трипсина, их up-steam- и down-steam-процессы. Технология производства трипсина, экспрессированного в бактериях, имеет больше down-steam-фаз (см. табл. 2.).

Процесс биосинтеза, транспорта и экскреции белка в эукариотах более сложный, чем при образовании телец включения в прокариотах, поэтому воспроизводимость метода ниже, чем в клетках *E.coli*. Преимущества и недостатки каждого из трех способов коммерческого производства протеазы приведены в **таблице 3**.

Технология оптимизации производства рекомбинантных биофармацевтических ферментов

Как было уже указано, каждый из способов производства терапевтических трипсинов имеет свои достоинства и недостатки (см. табл. 3). Производство трипсина, в котором 8,5% аминокислотных остатков представлены аргинином и лизином, имеет свою особенность, то есть не исключается опасность высокой протеазной активности целевого белка в различных фазах down-stream-процесса. Следует отметить, что угроза аутогидролиза сохраняется для трипсина всех животных [11-12] и для описанных технологий производства протеазы. Однако аутокаталитическая деградация трипсиногена в 10 раз ниже, чем активного трипсина, что объясняет большие потери целевого продукта из животного сырья [6-7]. Для промышленных целей производят трипсин и очень редко – трипсиноген из ПЖ [7]. Практика показывает, что аутопротеолиз выделяемых протеаз трудно предотвратить, поэтому методы, принципиально снижающие аутокатализ трипсина, можно использовать в производстве других рекомбинантных энзимов. Новейшие биофарма-технологии повышают эффективность up-stream- и down-stream-процессов различными подходами. Модернизированные комплексы обеспечивают стабильный и качественный процесс ферментации культуры клеток. Новые экспрессионные системы позволяют получать высокий титр полипептида рТч. Два этих улучшения значительно повышают выход целевого белка на единицу объема биотехнологической культуры [40-41]. Современные технологии предотвращают гетерологичных белков, снижают уровень аутокатализа протеазы во время культивирования клеток, что принципиально важно, так как пептидные фрагменты этой молекулы остаются энзиматически активными. Для производства рекомбинантного трипсина запатентованы методы оптимальных up-stream-процессов [40-41], то есть получение высокого титра устойчивого к аутогидролизу фермента практически возможно.

Гигантские потери целевого белка, наблюдаемые разными исследовательскими группами и производителями (см. рис. 1), требуют радикального усовершенствования down-stream-процесса в производстве трипсина. Количество фаз down-stream-процесса рТч обычно превышает 20 и на каждой из них происходит непреодолимая, в той или иной степени, потеря целевого продукта. Критически высокозатратными являются при получении рекомбинантного белка из *E. coli* несколько фаз down-stream-процесса: фолдинг трипсиногена, очистка и полишинг, а также кристаллизация трипсина (см. табл. 2).

Трипсин человека для своей биологически активной структуры образует пять дисульфидных мостиков [3]. Такое количество цистеинов затрудняет реакцию правильной укладки молекулы *in vitro*, а также ведет к образованию большого числа структурных изоформ. Требуется инновационный метод для повышения эффективности фолдинга трипсиногена, образующего тельца вклю-

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта http://www.pharmacoeconomics.ru. Не предназначено для использования в коммерческих целях. Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru. Copyright © 2018. Издательство ИРБИС. Все права охраняются.

Таблица 4. SWOT-анализ проекта производства рТч.

Table 4. SWOT-analysis of the recombinant human trypsin production project.

Факторы	Сильные стороны (S)	Слабые стороны (W)
Внутренние факторы	Использование инновационных технологий значительно повышает выход целевого белка	Низкий выход целевого продукта
	Производитель определяет цену на продукт В высокие цены на современные терапевтические рекомбинантные белки включается маржа, удовлетворяющая запросам инвестора и производителя, при высокой цене продукта	Высокие цены для терапии рТч
	Производство рекомбинантных биофармацевтиков является высокоприбыльным	Большая часть инвестиций до начала коммерческого производства
Внешние факторы	**Благоприятные возможности (O)**	**Угрозы (T)**
	Трипсин применяется более 80 лет для лечения различных болезней. Для инъекций и ингаляций должен использоваться не трипсин из животного сырья, а рТч, который идентичен человеческому. Большое количество рТч будет использоваться для производства дорогих генно-инженерных терапевтиков	Отсутствует опыт применения рТч в медицине Могут возникнуть проблемы с продвижением продукта на рынок
	Защита патентом инновационной технологии. Отсутствие конкуренции продукту более 10 лет	Инвестиции со старта проекта Возможные задержки по срокам регистрации препарата
	Ноу-хау могут быть применены для производства ряда необходимых рекомбинантных терапевтических протеаз	Потребность в высококвалифицированных кадрах

чения при экспрессии в прокариотах. Исследования в этом направлении ведутся [40] и технология производства будет совершенствоваться как для рТч, так и для других ферментов.

Оптимизация down-stream-процесса является общей технической задачей в промышленном производстве протеаз. Для систем с экспрессией в прокариотах необходимо сократить число фаз, блокировать аутопротеолиз, кардинально повысить выход белка после фолдинга, замедлить олигомеризацию и уменьшить потери при очистке и кристаллизации конечного продукта ФАС трипсина.

Применяя новейшие методы, исследователи получают эндопептидазу с повышенной удельной активностью [34,36].

Приведенные методы улучшения производства рекомбинантной протеазы: повышение скорости биосинтеза и увеличение титра целевого белка; сокращение фаз процесса; более эффективный фолдинг полипептида; блокирование аутокатализа и снижение скорости деградации энзима; уменьшение потерь при очистке и кристаллизации при их совокупном применении позволят во много раз повысить количество полученного в итоге высокоочищенного рекомбинантного продукта.

Преодоление экономических барьеров для производства рекомбинантного трипсина

Технология фармацевтических комплексов для выработки генно-инженерных белков разработана более 30 лет назад, но, несмотря на значительный прогресс, цены на современные рекомбинантные терапевтики остаются высокими, а организация их производства является высоко затратным бизнесом. Производство значительного сегмента рекомбинантных биофармацевтиков требует длительный горизонт инвестиций, так как необходимы: крупномасштабное финансирование от начала проекта; большие производственные расходы и высококвалифицированные специалисты [22,42].

Сравнивалась эффективность энзимных препаратов при терапии муковисцидоза [21]. Было показано, что рТч и трипсин КРС проявляют одинаковое сродство к рецепторам клеток человека и близкую скорость их активации [13]. Фармакоэкономический анализ трипсиновых препаратов, включая инвазивный рТч, является задачей для заинтересованных организаций. Отсутствие фармакоэкономических и других исследований, подтверждающих потребность и преимущество терапии рТч, как это было выполнено для других рекомбинантных терапевтиков, вызывает у инвестора определенный уровень неуверенности в выгодной реализации проекта.

Современное производство биофармацевтиков является высоко рентабельным, однако сомнения в успешном завершении, финансовые риски проекта являются основными причинами, которые тормозят инвестиции в производство новых биофармацевтиков. Для финансирования проекта для производства новой рекомбинантной протеазы необходимо реально оценить факторы «затраты-выгода» и «затраты-эффективность». Информация, полученная в ходе SWOT-анализа, помогает в выработке стратегических целей и планировании механизмов финансирования производства рекомбинантных терапевтических пептидов [43]. SWOT – это акроним английских слов Strengts (силы), Weaknesses (слабости), Opportunities (благоприятные возможности) и Threats (угрозы). В **таблице 4** анализируются основные сильные и слабые стороны проекта, а также потенциальные возможности и внешние угрозы при продвижении нового биофармацевтика на рынок. Детальный анализ влияния внутренних (S и W) и/или внешних факторов (O и T) является важным этапом в разработке маркетинговой стратегии. Приведенная структурированная оценка SWOT, а также анализ PEST-факторов должны помочь в решении о финансировании производства рТч. PEST обозначает анализ, используемый для выявления политических (Political), экономических (Economic), социальных (Social) и технологических (Technological) внешних факторов, которые будут влиять на производство и рынок терапевтического рТч.

Применение современных производственных комплексов, новейшего оборудования и инновационных методов в up-stream- и down-stream-фазах оптимизирует производство рТч, что способствует снижению стоимости рТч до трипсина из животных источников и позволит использовать в энзимотерапии преимущественно трипсин человека.

Если экономические барьеры преодолены, то появляется главный стимул для производства и применения рТч – это безопасность лекарственных препаратов и качество терапии, которые яв-

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта http://www.pharmacoeconomics.ru. Не предназначено для использования в коммерческих целях.
Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru. Copyright © 2018. Издательство ИРБИС. Все права охраняются.

ляются приоритетными для QALY пациентов [44]. Абревиатура QALY происходит от английского Quality-Adjusted Life Year (добавленные годы жизни с поправкой на ее качество).

Заключение

Процесс производства рекомбинантного трипсина является очень дорогостоящим, что отражается на цене высокоочищенного фермента (см. рис. 1). На рынке эта терапевтическая протеаза в основном представлена в виде продукта, очищенного из экстракта поджелудочной железы КРС или свиней. Трипсин человека коммерчески доступен в небольших объемах в виде генно-инженерного белка, полученного биотехнологическими методами, но именно он должен использоваться как современное, безопасное и эффективное лекарственное средство. Пока такое применение ограничивают очень высокая цена и недостаточное производство трипсина человека.

Исходя из современных данных, проанализированы: применение, потребность и рынок терапевтического трипсина; основные факторы, ограничивающие производство рТч; пути повышения эффективности up-stream- и down-stream-процессов для радикального снижения потерь и стоимости целевого продукта; а также ценность проекта для здравоохранения, негативные и позитивные экономические предпосылки для его реализации. Данные, приведенные в последних публикациях, показывают, что применение новых методов позволяет достигать высокого уровня экспрессии рекомбинантного трипсиногена, блокировать аутопротеолиз и значительно сократить потери целевого белка при очистке, рефолдинге и кристаллизации [36,40,41]. Это свидетельствует о реальной возможности снизить в значительной мере производственные затраты на рТч, применяя комплекс улучшенных методов и инновационные технологии.

Новая технология изготовления рекомбинантного трипсина, отвечающего требованиям фармакопеи, должна использовать самое современное оборудование и коммуникации, а также последние достижения генной инженерии, биохимии, биотехнологии, инжиниринга и управления производственными процессами. При использовании новой технологии, в сочетании с оптимальными методами для up-stream- и down-stream-процессов, возможно увеличить в 15-20 раз выход рекомбинантного белка, что приведет к радикальному снижению производственных затрат на единицу продукции. С такой стоимостью рТч станет привлекательным не только для процессинга дорогих терапевтических белков, но и для производителей лекарств на базе этой протеазы, особенно инвазивных форм (см. табл. 1), что послужит реальным драйвером для инвестиций в производство биофармацевтика. Применение SWOT и PEST для анализа и оценки негативных и стимулирующих факторов поможет определиться с типом и планом инвестиций в производство рТч.

Когда фармакоэкономические исследования подтвердят преимущества использования рТч в лечении ряда заболеваний, включая сердечно-сосудистые, то его востребованность станет высокой и будет возрастать во всех регионах, что принципиально улучшит терапию многих болезней. Поэтому инвазивный рТч в скором времени вытеснит трипсин свиньи или КРС, так как определяющим фактором для пациента является сочетание эффективности терапии с ее безопасностью и QALY.

Литература:

1. UniProtKB – P07477 (TRY1_HUMAN). [Электронный ресурс]. URL: https://www.uniprot.org/uniprot/P07477/. Дата обращения: 08.07.2018.
2. Vandermarliere E., Mueller M., Martens L. Getting intimate with trypsin, the leading protease in proteomics. Mass Spectrometry Reviews. 2013; 32: 453-465.
3. Gaboriaud C., Serre L., Guy-Crotte O., Forest E., Fontecilla-Camps J.C. Crystal structure of human trypsin 1: unexpected phosphorylation of Tyr151. J. Mol. Biol. 1996; 259 (5): 995-1010. Doi: 10.1006/jmbi.1996.0376.
4. Rypniewski W., Pirrakis A., Vorgias C.E., Wilson K.S. Evolutionary Devergence and Concervation of Trypsin. Protein Engineering. 1994; 7 (1): 57-64.
5. Патент RU(11) 2 265 053(13) C2 МПК C 12 N 9/76. Способ получения трипсина. Албулов А.И., Самуйленко А.Я., Фоменко А.С. и др. Патентообладатель – ВНИТИБП. Заявка: 2002134730/13, 24.12.2002. Опубликовано: 27.11.2005. Бюл. N 33.
6. Кислицин Ю.А., Ребриков Д.В., Дунаевский Я.Е., Руденская Г.Н. Выделение и первичная структура трипсина камчатского краба Paralithodes camtschaticus. Биоорганическая химия. 2003; 29 (3): 269-276.
7. Brodrick J.W., Largman C., Johnson J.H., Geokas M.C. Human Cation Trypsinogen Purification, Characterization, and Characteristic of Autoactivation. J. Biol. Chem. 1978; 253 (8): 2732-2736.
8. Iannucci N.B., Albanesi G.J., Marani M.M., Fernández H.M. Isolation of Trypsin from Bovine Pancreas Using Immobilized Benzamidine and Peptide CTPR Ligands in Expanded Beds. Separat. Sci. Techn. 2005; 40: 3277-3287. DOI: 10.1080/01496390500423631.
9. Goudarzi B. Gh., Talebi M., Bagherian R., Haji Hosseini R. A simple, fast and commercial method for trypsin purification from bovine pancreas. Vet. Res. Biol. Prod. 2011; 24 (1-90): 33-39.
10. Buettner K., Kreisig T., Sträter N., Zuchner T. Protein surface charge of trypsinogen changes its activation pattern. BMC Biotechnology. 2014; 14 (960): 1-11. DOI: 10.1186/s12896-014-0109-5.
11. Hegyi E., Sahin-Toth M. Genetic Risk in Chronic Pancreatitis: The Trypsin-Dependent Pathway. Dig. Dis. Sci. 2017; 62: 1692-1701. DOI: 10.1007/s10620-017-4601-3.
12. Németh B.C., Wartmann T., Halangk W., Sahin-Tóth M. Autoactivation of Mouse Trypsinogens Is Regulated by Chymotrypsin C via Cleavage of the Autolysis Loop. J. Biol. Chem. 2013; 288 (33): 24049-62. DOI: 10.1074/jbc.M113.478800.
13. Grishina Z., Ostrowska E., Halangk W., Sahin-Toth M., Reiser G. Activity of recombinant trypsin isoforms on human proteinase-activated receptors (PAR): mesotrypsin cannot activate epithelial PAR-1, -2, but weakly activates brain PAR-1. British J. Pharmacology. 2005; 146: 990-999.
14. Yousef G.M., Elliott M.B., Kopolovic A.D., Serry E., Diamandis E.P. Sequence and evolutionary analysis of the human trypsin subfamily of serine peptidases. Bioch. Bioph. Acta. 2004; 1698: 77-86.
15. Németh B.C., Sahin-Tóth M. Human cationic trypsinogen (PRSS1) variants and chronic pancreatitis. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Phyiol. 2014; 306: G466-G473. doi: 10.1152/ajpgi.00419.2013.
16. Hu C., Wen L., Deng L., Zhang C., Lugea A., Su H.Y., Waldron R.T., Pandol S.J., Xia Q. The Differential Role of Human Cationic Trypsinogen (PRSS1) p.R122H Mutation in Hereditary and Nonhereditary Chronic Pancreatitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. Gastroenterol. Res. Pract. 2017; ID 9505460: 1-7. doi: 10.1155/2017/9505460.
17. Roxas M. The Role of Enzyme Supplementation in Digestive Disorders. Altern. Med. Rev. 2008; 13 (4): 307-314.
18. Ianiro G., Pecere S., Giorgio V., Gasbarrini A. and Cammarota G. Digestive Enzyme Supplementation in Gastrointestinal Diseases. Current Drug Metabolism. 2016; 17 (2): 187-193.
19. Shah D., Mital K. The Role of Trypsin:Chymotrypsin in Tissue Repair. Adv. Ther. 2018; 35 (1): 31-42.
20. Konstan M.W., Frank J., Accurso F.J., Nasr S.Z., Ahrens R.C., Graff G.R. Efficacy and safety of a unique enteric-coated bicarbonate-buffered pancreatic enzyme replacement therapy in children and adults with cystic fibrosis. Clin. Invest. 2013; 3 (8): 723-729.

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта http://www.pharmacoeconomics.ru. Не предназначено для использования в коммерческих целях. Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru. Copyright © 2018. Издательство ИРБИС. Все права охраняются.

21. Taylor C. J., Thieroff-Ekerdt R., Shiff S., Magnus L., Fleming R., Gommoll C. Comparison of two pancreatic enzyme products for exocrine insufficiency in patients with cystic fibrosis. J. Cystic Fibrosis. 2016; 15: 675-680.

22. Petrides D. Bioprocess Design and Economics. Bioseparations Science and Engineering 2nd Edition (ed by: Harrison R. G., Todd P. W., Rudge S. R., Petrides D. P.). Oxford University Press. 2015; 11.1-83.

23. Pan Y., Cheng K., Mao J., Liu F., Liu J., Ye M., Zou H. Quantitative proteomics reveals the kinetics of trypsin-catalyzed protein digestion. Anal. Bioanal. Chem. 2014; 406: 6247-6256.

24. Sarrouch B., Santos T. M., Miyoshi A., Dias R., Azevedo V. Up-To-Date Insight on Industrial Enzymes Applications and Global Market. J. Bioproces. Biotechniq. 2012; (S4:002): 1-10.

25. Guidance for Industry Exocrine Pancreatic Insufficiency Drug Products – Submitting NDAs U. S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) April 2006 Clinical/Medical.

26. Global Recombinant Trypsin Solution Market Report 2018 by Manufacturer, Region, Type and Application, Forecast to 2023. [Электронный ресурс]. URL: https://www.marketresearchstore.com/report/global-recombinant-trypsin-solution-market-report-2018-by-250199. Дата обращения: 09.07.2018.

27. Trypsin recombinant, Proteomics Grade. [Электронный ресурс]. URL: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/RTRYPRO?lang=de&region=DE RTRYP-RO Roche. Дата обращения: 09.07.2018.

28. Trypsin recombinant Pig. [Электронный ресурс]. URL: https://www.mybiosource.com/prods/Recombinant-Protein/Trypsin/ RYP/datasheet.php?products_id=9422455. Дата обращения: 09.07.2018.

29. Trypsin Powder, Porcine 1:250. [Электронный ресурс]. URL: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/85450c?lang=de&region=DE. Дата обращения: 09.07.2018.

30. Recombinant Human Trypsin [Электронный ресурс]. URL: https://www.made-in-china.com/showroom/yaxinbio/product-detailrqpQzZOjMCWe/China-Recombinant-Human-Trypsin.html. Дата обращения: 08.07.2018.

31. Trypsin from bovine pancreas. [Электронный ресурс]. URL: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t1005?lang=de&region=DE&cm_sp=Insite-_-prodRecCold_xviews-_-prodRecCold10-6. Дата обращения: 09.07.2018.

32. Trypsin from bovine pancreas. [Электронный ресурс]. URL: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t9201?lang=de&region=DE&cm_sp=Insite-_-prodRecCold_xviews-_-prodRecCold5-5. Дата обращения: 09.07.2018.

33. Trypsin Bovine. [Электронный ресурс]. URL: https://www.prospecbio.com/Trypsin_Bovine. Дата обращения: 09.07.2018.

34. Recombinant- Protein Trypsin. [Электронный ресурс]. URL: https://www.mybiosource.com/prods/ Recombinant-Protein/Trypsin/datasheet.php?products_id=143731. Дата обращения: 09.07.2018.

35. Porcine Trypsin. [Электронный ресурс]. URL: https://www.prospecbio.com/Trypsin_Porcine Trypsin Porcine. Дата обращения: 09.07.2018.

36. Zhang Y., Huang H., Yao X., Du G., ChenJ., Kang Z. High-yield secretory production of stable, active trypsin through engineering of the N-terminal peptide and self-degradation sites in Pichia pastoris. Bioresource Technology. 2018; 247: 81-87. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.006.

37. Patent WO2011/030347 A1. Novel prolipase-bovine trypsinogen fusion proteins. Govindappa N., Nataraj N., Tiwari S., Hazra P., Patale M. B., Jothiraman G., Sastry K. Original Assignee Biocon Ltd. Priority date: 10.09.2009; Filled 26.10.2009 PCT/IN2009/000603.

38. Patent US 7,666,629 B2. Method for producing recombinant trypsin. Muller R., Glaser S., Geipel F., Thalhofer J.-P., Rexer B., Schneider C., Ratka M., Ronning S., Eckstein H., Giessel C.; Assignee Roche Diagnostics Operations, Inc.- N. 11/853,483; Filled: 11.09.2007; PCT/EP02/01072

39. Hohenblum H., Vorauer-Uhl K., Katinger H., Mattanovich D. Bacterial expression and refolding of human trypsinogen. J. Biotechnology. 2004; 109 (1-2): 3-11.

40. Patent WO2012/104099 A1. Process for the production of recombinant trypsin. König P. Applicant GlucoMetrix AG. 1100899.2 Priority Date: 04.02.2011; International Filling 03.02.2012, PCT/EP2012/000497.

41. Patent WO2016/081289 A1. Process for producing recombinant trypsin. Sleevi M. C., Lile J.; Original Assignee Merck Sharp & Dohme Corp. Priority date: 18.11.2014; International Filling: 13.112015 PCT/US2015/060505.

42. 42. Rasmussen B. Innovation and Commercialisation in the Biopharmaceutical Industry: Creating and Capturing Value. Edward Elgar Publishing Ltd. 2010; 326 p.

43. Fosgerau K., Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions. Drug Discovery Today. 2015; 20 (1): 122-128.

44. Ягудина Р. И., Куликов А. Ю., Литвиненко М. М. QALY: история, методология и будущее метода. Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология. 2010; 3 (1): 7-11.

References:

1. UniProtKB – P07477 (TRY1_HUMAN). [Electronic resource]. URL: https://www.uniprot.org/uniprot/P07477/. Accessed: 08.07.2018.

2. Vandermarliere E., Mueller M., Martens L. Getting intimate with trypsin, the leading protease in proteomics. *Mass Spectrometry Reviews*. 2013; 32: 453-465.

3. Gaboriaud C., Serre L., Guy-Crotte O., Forest E., Fontecilla-Camps J. S. Crystal structure of human trypsin 1: unexpected phosphorylation of Tyr151. *J. Mol. Biol*. 1996; 259 (5): 995-1010. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0376.

4. Rypniewski W., Pirrakis A., Vorgias C. E., Wilson K. S. Evolutionary Devergence and Concervation of Trypsin. *Protein Engineering*. 1994; 7 (1): 57-64.

5. Patent RU (11) 2 265 053 (13) C2 IPC C 12 N 9/76. The method of obtaining trypsin. Albulov AI, Samuylenko A. Ya., Fomenko A. S. and others. The patent holder is VNITIBP. Application: 2002134730/13, December 24, 2002. Published on: 27.11.2005. Bul. N 33. [*Patent RU(11) 2265053(13) C2 MPK C 12 N 9/76. Sposob polucheniya tripsina. Albulov A. I., Samuylenko A.YA., Fomenko A. S. et al. Patentoobladatel' – VNITIBP. Zayavka: 2002134730/13, 24.12.2002. Opublikovano: 27.11.2005. Byul. N 33* (in Russian)].

6. Kislitsin Yu.A., Rebrikov D. V., Dunaevskiy Ya.E., Rudenskaya G. N. *Bioorganicheskaya himiya* (in Russian). 2003; 29 (3): 269-276.

7. Brodrick J. W., Largman C., Johnson J. H., Geokas M. C. Human Cation Trypsinogen Purification, Characterization, and Characteristic of Autoactivation. *J. Biol. Chem*. 1978; 253 (8): 2732-2736.

8. Iannucci N. B., Albanesi G. J., Marani M. M., Fernández H.M. Isolation of Trypsin from Bovine Pancreas Using Immobilized Benzamidine and Peptide CTPR Ligands in Expanded Beds. *Separat. Sci. Techn*. 2005; 40: 3277-3287. DOI: 10.1080/01496390500423631.

9. Goudarzi B. Gh., Talebi M., Bagherian R., Haji Hosseini R. A simple, fast and commercial method for trypsin purification from bovine pancreas. *Vet. Res. Biol. Prod*. 2011; 24 (1-90): 33-39.

10. Buettner K., Kreisig T., Sträter N., Zuchner T. Protein surface charge of trypsinogen changes its activation pattern. *BMC Biotechnology*. 2014; 14 (960): 1-11. DOI: 10.1186/s12896-014-0109-5.

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта http://www.pharmacoeconomics.ru. Не предназначено для использования в коммерческих целях.
Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru. Copyright © 2018. Издательство ИРБИС. Все права охраняются.

11. Hegyi E., Sahin-Toth M. Genetic Risk in Chronic Pancreatitis: The Trypsin-Dependent Pathway. *Dig. Dis. Sci.* 2017; 62: 1692-1701. DOI: 10.1007/s10620-017-4601-3.

12. Németh B.C., Wartmann T., Halangk W., Sahin-Tóth M. Autoactivation of Mouse Trypsinogens Is Regulated by Chymotrypsin C via Cleavage of the Autolysis Loop. *J. Biol. Chem.* 2013; 288 (33): 24049-62. DOI: 10.1074/jbc.M113.478800.

13. Grishina Z., Ostrowska E., Halangk W., Sahin-Toth M., Reiser G. Activity of recombinant trypsin isoforms on human proteinase-activated receptors (PAR): mesotrypsin cannot activate epithelial PAR-1, -2, but weakly activates brain PAR-1. *British J. Pharmacology*. 2005; 146: 990-999.

14. Yousef G.M., Elliott M.B., Kopolovic A.D., Serry E., Diamandis E.P. Sequence and evolutionary analysis of the human trypsin subfamily of serine peptidases. *Bioch. Bioph. Acta*. 2004; 1698: 77-86.

15. Németh B.C., Sahin-Tóth M. Human cationic trypsinogen (PRSS1) variants and chronic pancreatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Phyiol*. 2014; 306: G466-G473. DOI: 10.1152/ajpgi.00419.2013.

16. Hu C., Wen L., Deng L., Zhang C., Lugea A., Su H.Y., Waldron R.T., Pandol S.J., Xia Q. The Differential Role of Human Cationic Trypsinogen (PRSS1) p.R122H Mutation in Hereditary and Nonhereditary Chronic Pancreatitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterol. Res. Pract*. 2017; ID 9505460: 1-7. DOI: 10.1155/2017/9505460.

17. Roxas M. The Role of Enzyme Supplementation in Digestive Disorders. *Altern. Med. Rev*. 2008; 13 (4): 307-314.

18. Ianiro G., Pecere S., Giorgio V., Gasbarrini A. and Cammarota G. Digestive Enzyme Supplementation in Gastrointestinal Diseases. *Current Drug Metabolism*. 2016; 17 (2): 187-193.

19. Shah D., Mital K. The Role of Trypsin: Chymotrypsin in Tissue Repair. *Adv. Ther*. 2018; 35 (1): 31-42.

20. Konstan M.W., Frank J., Accurso F.J., Nasr S.Z., Ahrens R.C., Graff G.R. Efficacy and safety of a unique enteric-coated bicarbonate-buffered pancreatic enzyme replacement therapy in children and adults with cystic fibrosis. *Clin. Invest*. 2013; 3 (8): 723-729.

21. Taylor C.J., Thieroff-Ekerdt R., Shiff S., Magnus L., Fleming R., Gommoll C. Comparison of two pancreatic enzyme products for exocrine insufficiency in patients with cystic fibrosis. *J. Cystic Fibrosis*. 2016; 15: 675-680.

22. Petrides D. Bioprocess Design and Economics. Bioseparations Science and Engineering 2nd Edition (ed by: Harrison R.G., Todd P.W., Rudge S.R., Petrides D.P.). Oxford University Press. 2015; 11.1-83.

23. Pan Y., Cheng K., Mao J., Liu F., Liu J., Ye M., Zou H. Quantitative proteomics reveals the kinetics of trypsin-catalyzed protein digestion. *Anal. Bioanal. Chem*. 2014; 406: 6247-6256.

24. Sarrouch B., Santos T.M., Miyoshi A., Dias R., Azevedo V. Up-To-Date Insight on Industrial Enzymes Applications and Global Market. *J. Bioproces. Biotechniq*. 2012; (S4:002): 1-10.

25. Guidance for Industry Exocrine Pancreatic Insufficiency Drug Products – Submitting NDAs U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) April 2006 Clinical/Medical.

26. Global Recombinant Trypsin Solution Market Report 2018 by Manufacturer, Region, Type and Application, Forecast to 2023. [Electronic resource]. URL: https://www.marketresearchstore.com/report/global-recombinant-trypsin-solution-market-report-2018-by-250199. Accessed: 09.07.2018.

27. Trypsin recombinant, Proteomics Grade. [Electronic resource]. URL: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/ RTRYPRO?lang=de®ion=DE RTRYP-RO Roche. Accessed: 09.07.2018.

28. Trypsin recombinant Pig. [Electronic resource]. URL: https://www.mybiosource.com/prods/Recombinant-Protein/Trypsin/ RYP/datasheet.php?products_id=9422455. Accessed: 09.07.2018.

29. Trypsin Powder, Porcine 1:250. [Electronic resource]. URL: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/85450c?lang=de®ion= DE. Accessed: 09.07.2018.

30. Recombinant Human Trypsin [Electronic resource]. URL: https://www.made-in-china.com/showroom/yaxinbio/product-detailrqpQzZOjMCWe/China-Recombinant-Human-Trypsin.html. Accessed: 08.07.2018.

31. Trypsin from bovine pancreas. [Electronic resource]. URL: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t1005?lang=de®ion=DE&cm_sp=Insite-_-prodRecCold_xviews-_-prodRecCold10-6. Accessed: 09.07.2018.

32. Trypsin from bovine pancreas. [Electronic resource]. URL: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t9201?lang=de®ion=DE&cm_sp=Insite-_-prodRecCold_xviews-_-prodRecCold5-5. Accessed: 09.07.2018.

33. Trypsin Bovine. [Electronic resource]. URL: https://www.prospecbio.com/Trypsin_Bovine. Accessed: 09.07.2018.

34. Recombinant – Protein Trypsin. [Electronic resource]. URL: https://www.mybiosource.com/prods/ Recombinant-Protein/Trypsin/datasheet.php?products_id=143731. Accessed: 09.07.2018.

35. Porcine Trypsin. [Electronic resource]. URL: https://www.prospecbio.com/Trypsin_Porcine Trypsin Porcine. Accessed: 09.07.2018.

36. Zhang Y., Huang H., Yao X., Du G., ChenJ., Kang Z. High-yield secretory production of stable, active trypsin through engineering of the N-terminal peptide and self-degradation sites in Pichia pastoris. *Bioresource Technology*. 2018; 247: 81-87. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.006.

37. Patent WO2011/030347 A1. Novel prolipase-bovine trypsinogen fusion proteins. Govindappa N., Nataraj N., Tiwari S., Hazra P., Patale M.B., Jothiraman G., Sastry K. Original Assignee Biocon Ltd. Priority date: 10.09.2009; Filled 26.10.2009 PCT/IN2009/000603.

38. Patent US 7,666,629 B2. Method for producing recombinant trypsin. Muller R., Glaser S., Geipel F., Thalhofer J.-P., Rexer B., Schneider C., Ratka M., Ronning S., Eckstein H., Giessel C.; Assignee Roche Diagnostics Operations, Inc.- N. 11/853,483; Filled: 11.09.2007; PCT/EP02/01072

39. Hohenblum H., Vorauer-Uhl K., Katinger H., Mattanovich D. Bacterial expression and refolding of human trypsinogen. *J. Biotechnology*. 2004; 109 (1-2): 3-11.

40. Patent WO2012/104099 A1. Process for the production of recombinant trypsin. König P. Applicant GlucoMetrix AG. 1100899.2 Priority Date: 04.02.2011; International Filling 03.02.2012, PCT/EP2012/000497.

41. Patent WO2016/081289 A1. Process for producing recombinant trypsin. Sleevi M.C., Lile J.; Original Assignee Merck Sharp & Dohme Corp. Priority date: 18.11.2014; International Filling: 13.112015 PCT/US2015/060505.42. Rasmussen B. Innovation and Commercialisation in the Biopharmaceutical Industry: Creating and Capturing Value. Edward Elgar Publishing Ltd. 2010; 326 p.

43. Fosgerau K., Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today*. 2015; 20 (1): 122-128.

44. Yagudina R.I., Kulikov A.Yu., Litvinenko M.M. QALY: history, methodology and method future. FARMAKOEKONOMIKA. Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology. 2010; 3 (1): 7-11.

Сведения об авторе:

Пономаренко София Васильевна – руководитель проектов фирмы SophiGen в г. Бенен, Германия. Тел: (49) 23819411914. E-mail: ponomarenko@t-online.de.

About the author:

Ponomarenko Sofiya Vasil'evna – Project Manager at SophiGen, Boenen, Germany. Tel.: (49) 23819411914. E-mail: ponomarenko@t-online.de.

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта http://www.pharmacoeconomics.ru. Не предназначено для использования в коммерческих целях.
Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru. Copyright © 2018. Издательство ИРБИС. Все права охраняются.