

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ И АРОМАТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ»
(ФГБНУ ВИЛАР)

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБНУ ВИЛАР,
академик РАН


И.И. Стетельников
15 апреля 2024 г.



ПОЛОЖЕНИЕ О БИОЛОГИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ
СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ *in vitro*

Введение

В ФГБНУ ВИЛАР ведется разработка приоритетного направления создания специфических ферментных биотест-систем *in vitro*, проявляющих высокую избирательность к биологически активным веществам (БАВ), обладающим соответствующими фармакологическими свойствами. Разработаны и запатентованы оригинальные биотест-системы на основе ферментов антиоксидантной защиты (глутатионредуктазы и каталазы), НАДФН-оксидазы, ферментов биотрансформации-система цитохрома P₄₅₀ и глутатионтрансферазы и др. для выявления специфической биологической активности БАВ различного происхождения и агрегатного состояния, в том числе при их скрининге при проведении доклинических исследований.

Оригинальные молекулярные специфические ферментные биотест-системы ФГБНУ ВИЛАР (СФБТС) обладают высокой избирательностью, информативностью, чувствительностью, хорошей воспроизводимостью, быстротой достижения результатов, позволяют оптимизировать доклинические исследования.

Данные, полученные с помощью СФБТС *in vitro*, применяются при фармакологических и фармацевтических исследованиях, в том числе – для направленного скрининга БАВ, изучения молекулярного механизма действия, экспресс-оценки качества растительного сырья и биотехнологических продуктов, оптимизации экстрагирования БАВ из растительного сырья, для поиска маркеров стандартизации объектов растительного происхождения, для оценки их безопасности.

Для оценки целевой биологической активности изучаемого образца, который может быть, как индивидуальным веществом, так и объектом сложного состава, применяют определенную СФБТС, которая позволяет охарактеризовать определенный вид биологической активности. Каждая СФБТС позволяет оценить соединения по одному биологическому параметру, поэтому для выявления активности в отношении патологий с многофакторным механизмом действия необходимо сочетать соответствующие первичные биотест-системы с формированием на их основе вторичных СФБТС.

В состав Биологической коллекции входит 10 специфических ферментных биотест-систем: 4 первичных и 6 вторичных (Приложение 1).

I. Общие положения

1.1. Биологическая коллекция специфических ферментных биотест-систем *in vitro* (БК-СФБТС) ФГБНУ ВИЛАР, началом формирования которой является 1997 год, организационно оформлена в соответствии с Приказами по ВИЛАР № 59а от 17.07.2013 г. и № 79 от 15.06. 2015 г.

1.2. БК-СФБТС функционирует на основании приказов директора ФГБНУ ВИЛАР, нормативных документов, регламентирующих работу с биоресурсами, в соответствии с профилем деятельности, а также Устава ФГБНУ ВИЛАР и настоящего Положения.

1.3. Административное, материально-техническое обеспечение и финансирование деятельности БК-СФБТС осуществляет ФГБНУ ВИЛАР.

II. Основные понятия, термины и определения

Биотест-система (БТС) - это интегрированное сочетание биодатчика (биообъекта) молекулярного, клеточного, тканевого и организменного уровней со считывающим, обрабатывающим и регистрирующим устройством. В качестве биообъекта наибольшее распространение на данный момент получили биомакромолекулы - ферменты, антитела, рецепторные белки, нуклеиновые кислоты, а также целые клетки.

Ферменты или **энзимы** - обычно белковые молекулы, ускоряющие (катализирующие) химические реакции в живых системах. Ферменты специфичны к субстратам. Ферментативная активность регулируется активаторами и ингибиторами реакции.

Ингибитор - вещество, присутствующее в небольших количествах в среде, приводит к предотвращению или замедлению некоторых процессов. Снижает скорость химических реакций или подавляет их.

Активатор - вещество, присутствующее в небольших количествах в среде, приводит к ускорению некоторых процессов. Увеличивает скорость химических реакций.

Субстрат (реакции) - исходный продукт (вещество) преобразуемый ферментом в результате специфического фермент-субстратного взаимодействия в конечный продукт.

III. Цель и основные задачи функционирования БК-СФБТС

3.1. Целью работы с БК-СФБТС является сохранение перспективных специфических ферментных биотест-систем *in vitro* для проведения на молекулярном уровне фундаментальных медико-биологических исследований.

3.2. Задачами БК-СФБТС является:

- хранение и отбор биотест-систем *in vitro*, участвующих при проведении доклинических испытаний лекарственных препаратов, разработанных в ФГБНУ ВИЛАР.

- сохранение специфических ферментных биотест-систем, имеющих утвержденную и зарегистрированную в ФГБНУ ВИЛАР стандартную операционную процедуру и входящие в Реестр СФБТС (Приложение 1).

IV. Компоненты коллекции и перечень работ, осуществляемых с объектами БК-СФБТС

4.1. Компонентами БК-СФБТС являются - биотест-системы, разработанные на основе одного тест-фермента (первичные) и комплексные специфические ферментные биотест-системы *in vitro*, разработанные на основе 2-х и более тест-ферментов (вторичные).

4.2. С использованием БК-СФБТС выполняются работы по формированию, сохранению и обеспечению доступности для подразделений ФГБНУ ВИЛАР коллекционного фонда специфических ферментных биотест-систем *in vitro*, разработанных для оценки фармакологических свойств БАВ, а также качества и безопасности лекарственных средств.

4.3. БК-СФБТС используется в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ, полученными государственными грантами, хозяйственными договорами, указаниями и распоряжениями дирекции ФГБНУ ВИЛАР и настоящим положением.

4.4. БК-СФБТС способствует разработке новых специфических ферментных ферментных биотест-систем, основанных на ключевых ферментах гомеостаза организма человека для выявления биологической активности БАВ различного происхождения.

4.5. Выполнение исследований по выявлению специфической биологической активности БАВ, полученных из лекарственных растений, проводятся в ФГБНУ ВИЛАР в соответствии с СОП, разработанными для каждой специфической ферментной биотест-системы, утвержденными и сохраняемыми в коллекции.

4.6. БК-СФБТС способствует повышению уровня биотехнологических разработок, применяемых в институте; используется при проведении фундаментальных и прикладных исследований сотрудникам ФГБНУ ВИЛАР, студентами, аспирантами и другими специалистами при изучении биологической активности БАВ в пищевых, медицинских, ветеринарных и других целях.

V. Руководство работой с БК

5.1. Руководство работой с БК-СФБТС осуществляет заведующий соответствующего научного подразделения ФГБНУ ВИЛАР (при необходимости назначается куратор БК-СФБТС).

5.2. Руководитель (куратор) БК-СФБТС имеет право:

- подготавливать и представлять в установленном порядке материалы, связанные с выполняемой научно-исследовательской деятельностью БК-СФБТС;
- представлять БК-СФБТС на совещаниях, семинарах, симпозиумах, конференциях;
- представлять ФГБНУ ВИЛАР в вышестоящей и других организациях по вопросам, связанным с профилем БК-СФБТС;
- взаимодействовать с профильными национальными биоресурсными центрами (БРЦ) в вопросах методологии поддержания и идентификации коллекционного фонда, определения уровней риска, сохранения ценных биоресурсов.

5.3. Руководитель (куратор) БК-СФБТС обязан:

- соблюдать нормы действующего законодательства;

- выполнять задания, формулируемые дирекцией ФГБНУ ВИЛАР;
- обеспечивать научную организацию работы;
- осуществлять правильный подбор, расстановку кадров и соблюдение дисциплины.

VI. Требования к БК-СФБТС

6.1. БК-СФБТС используется:

- при выполнении научно-исследовательских и прикладных работ, проводимых ФГБНУ ВИЛАР;
- при формировании открытых баз данных о поддерживаемом коллекционном фонде (при согласовании с директором ФГБНУ ВИЛАР);

6.2. В БК-СФБТС должны быть обеспечены:

- воспроизводимость специфических фармакологических свойств БАВ с применением специфических ферментных биотест-систем *in vitro*;
- учет коллекционного фонда с указанием источника их приобретения/выделения, сведений, характеризующих степень опасности использования коллекционных объектов в исследовательских или прикладных целях для человека и окружающей среды;
- требования нормативных документов, связанных с оборотом биоресурсов, относящихся к профилю его деятельности.

VII. Регистрация и информационное обеспечение объектов БК-СФБТС

7.1. Все объекты БК-СФБТС должны быть зарегистрированы в установленном порядке и содержать необходимый минимум информации.

7.2. Все объекты должны входить в утвержденный Реестр.

7.3. Порядок работы с использованием объектов БК-СФБТС отражен в разработанных нормативных документах:

- 1) Метод расширения БК-СФБТС, М-04868244-111-2024;
- 2) Метод характеристики единиц хранения БК-СФБТС, М-04868244-110-2024;
- 3) СОП 02.01.054.2024 «Коррекция нарушений качества единиц хранения БК-СФБТС»;
- 4) СОП 02.01.055.2024 «Поддержание единиц хранения БК-СФБТС»;

5) СОП 02.01.055.2024 «Контроль качества единиц хранения БК-СФБТС».

VIII. Правовой статус БК-СФБТС

8.1. БК-СФБТС ФГБНУ ВИЛАР принадлежит Российской Федерации, является собственностью государства и общенародным достоянием.

8.2. Любая деятельность с БК-СФБТС должна гарантировать ее сохранность.

8.3. Деятельность с БК-СФБТС не должна наносить ущерба окружающей среде.

8.4. При регулировании отношений в области использования БК-СФБТС общепризнанные нормы международного права и международные соглашения применяются в соответствии с законодательством Российской Федерации.

8.5. В случае угрозы сохранения объектов БК-СФБТС, при наличии решения директора ФГБНУ ВИЛАР предложить такие объекты для открытого распространения - коллекционные объекты могут передаваться в профильный БРЦ (по согласованию между ФГБНУ ВИЛАР и профильным БРЦ).

Положение разработано:

Руководитель Центра доклинических

исследований, канд.биол.наук

Заведующий отделом

экспериментальной фармакологии, д-р

мед. наук



Лупанова И.А.



Ферубко Е.В.

Положение согласовано:

И.о. заместителя директора,

канд.фарм.наук



Сёмкина О.А.

РЕЕСТР
БИОКОЛЛЕКЦИИ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ
БИОТЕСТ-СИСТЕМ *IN VITRO*

№	Название биотест-системы <i>in vitro</i>	Выявляемые свойства БАВ	Нормативные документы
1.	Вторичная ферментная биотест-система <i>in vitro</i> на основе каталазы и глутатионредуктазы	Адаптогенные свойства БАВ	<p>1. Патент №2181890. «Способ выявления веществ, обладающих адаптогенными свойствами, <i>in vitro</i>». Быков В.А., Минеева М.Ф., Дубинская В.А., Ребров Л.Б., Колхир В.К.</p> <p>2. СОП 01.01.049.2024 «Определение антиоксидантных, адаптогенных и антимикробных свойств растительных биологически активных веществ с применением комбинированной специфической ферментной биотест-системы на основе каталазы и глутатионредуктазы <i>in vitro</i>», 11 стр.</p>
2.	Вторичная ферментная биотест-система <i>in vitro</i> на основе каталазы и глутатионредуктазы	Антиоксидантные свойства БАВ	<p>1. Патент РФ № 2181892. «Способ выявления веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, <i>in vitro</i>» Быков В.А.; Дубинская В.А.; Минеева М.Ф.; Ребров Л.Б.; Колхир В.К.</p> <p>2. СОП 01.01.049.2024 «Определение антиоксидантных, адаптогенных и антимикробных свойств растительных биологически активных веществ с применением комбинированной специфической ферментной биотест-системы на основе каталазы и глутатионредуктазы <i>in vitro</i>», 11 стр.</p>
3.	Вторичная ферментная биотест-система <i>in vitro</i> на основе каталазы и глутатионредуктазы	Антимикробные свойства БАВ	<p>1. Патент № 2181891. «Способ выявления веществ, обладающих противомикробными и противовирусными свойствами, <i>in vitro</i>» Быков В.А., Дубинская В.А., Минеева М.Ф., Ребров Л.Б., Колхир В.К.</p> <p>2. СОП 01.01.049.2024 «Определение антиоксидантных, адаптогенных и антимикробных свойств</p>

			растительных биологически активных веществ с применением комбинированной специфической ферментной биотест-системы на основе каталазы и глутатионредуктазы in vitro», 11 стр.
4.	Первичная НАДФН-оксидазная ферментная биотест-система in vitro	Иммуномодулирующие свойства БАВ	1. Патент №2194077. «Способ выявления веществ с потенциальной иммуномодулирующей активностью in vitro с применением НАДФН -оксидазной тест-системы» Быков В.А., Минеева М.Ф., Попова Н.Б. 2. СОП 02.01.050.2024 «Определение иммуномодулирующих свойств растительных биологически активных веществ с применением специфической ферментной биотест-системы на основе НАДФН-оксидазы», 6 стр.
5.	Первичная тирозингидроксилазная ферментная биотест-система in vitro	Дофаминергические (нейротропные) свойства БАВ	1. СОП 02.01.052.2024 «Определение скорости тирозингидроксилазной реакции методом прямого спектрофотометрического измерения»), используемые в экспериментальных исследованиях», 5 стр.
6.	Первичная пируваткиназная ферментная биотест-система in vitro	Энергизирующие свойства БАВ	1. Методика: «Выявление активаторов субстратного фосфорилирования в объектах растительного происхождения путем определения скорости пируваткиназной реакции на биохимическом анализаторе «Clima M-15» для исследований по направленному поиску и созданию венотонизирующих средств». М. ГНУ ВИЛАР, 2010 - 5стр.
7.	Вторичная ферментная биотест-система in vitro на основе глутатионредуктазы и пируваткиназы	Венотонизирующие свойства БАВ	1. СОП 43 от 15.09.2023 «Определение венотонизирующих свойств биологически активных веществ с применением комплекса специфических ферментных биотест-систем in vitro», 6 стр.
8.	Вторичная биотест-система на основе цитохрома P450 и глутатионтрансферазы	Выявление БАВ с антиоксидескими свойствами	1. Патент РФ №2316597 «Способ выявления антиоксидеских свойств биологически активных веществ» Быков В.А., Минеева М.Ф., Стрелкова Л.Б., Колхир В.К., Ребров Л.Б. 2. СОП 02.01.051.2024 «Определение антиоксидеских свойств

			растительных биологически активных веществ с применением комбинированной специфической ферментной биотест-системы на основе цитохрома P450 и глутатионтрансферазы <i>in vitro</i> », 6 стр.
9.	Первичная ферментная биотест-система <i>in vitro</i> на основе индуцибельной NO-синтазы (iNOS)	Противовоспалительные свойства БАВ	1. Методика: «Выявление противовоспалительных свойств БАВ с помощью ферментной биотест-системы <i>in vitro</i> на основе индуцибельной NO-синтазы» № М04868244-37-2014. М. ФБГНУ ВИЛАР, 2014 г., 19 стр. 2. СОП 02.01.053.2024 «Определение противовоспалительных свойств биологически активных веществ с применением специфической ферментной биотест-системы на основе индуцибельной NO-синтазы <i>in vitro</i> », 10 стр.
10.	Первичная ферментная биотест-система <i>in vitro</i> на основе тиреопероксидазы	Тиреотропные свойства БАВ	1. СОП 02.01.048.2024, «Определение тиреотропных свойств биологически активных веществ с применением специфической ферментной биотест-систем на основе тиреопероксидазы (ТПО) <i>in vitro</i> », 10 стр.

Куратор биоколлекции специфических ферментных биотест-систем,
руководитель Центра доклинических исследований, канд. биол. наук

 И.А. Лупанова

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
 ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
 «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
 ЛЕКАРСТВЕННЫХ И АРОМАТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ»
 (ФГБНУ ВИЛАР)

Метод расширения коллекции	М-04868244-111-2024
Метод расширения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 1/3



УТВЕРЖДАЮ
 Директор ФГБНУ ВИЛАР,
 академик РАН

Н.И. Сидельников
 2024 г.

МЕТОД РАСШИРЕНИЯ
 БИОЛОГИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ
 СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ *in vitro*

Согласовано:	И.о.зам. директора, канд. фарм. наук	Сёмкина О.А.		26.04.2024
Разработано:	Руководитель Центра доклинических исследований, канд. биол. наук	Лупанова И.А.		23.04.2024
	Заведующий отделом экспериментальной фармакологии, д-р мед. наук	Ферубко Е.В.		23.04.2024

Метод расширения коллекции	М-04868244-111-2024
Метод расширения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 2/3

1. ВВЕДЕНИЕ:

2. Для оценки БАС различного происхождения и агрегатного состояния целесообразно использовать биологические методы, которые включают исследования с применением биотест-систем молекулярного, клеточного и организменного уровней. При этом акцент смещается к методам *in vitro*, так как они обладают высокой скоростью достижения результатов, а также точностью, воспроизводимостью, и являются экспресс-методами анализа.

Информационно-аналитический поиск по существующим биологическим тест-системам для оценки БАС (патентный и литературный) показал перспективность выбора в качестве тест-объектов ключевых / лимитирующих ферментов гомеостаза и необходимость формирования коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro* на их основе, позволяющих на молекулярном уровне выявлять биологическую активность различных соединений.

Они позволяют на молекулярном уровне избирательно выявлять целевую биологическую активность, играющую главенствующую роль в искомой (целевой) фармакологической активности, проявляющейся на уровне физиологических процессов в организме. В опытах *in vitro*, то есть при добавлении изучаемого соединения непосредственно к ферменту, выбранному в качестве тест-объекта, и последующем измерении скорости ферментативной реакции в присутствии БАС, измеряется его прямое, непосредственное действие на фермент, которое зависит от способности соединений взаимодействовать с данным ферментом, то есть наличием или отсутствием его сродства к ферменту. Кроме того, изучение непосредственного (прямого) действия БАС на конкретные (целевые) биохимические мишени позволяет выявить молекулярную основу его фармакологического эффекта, которая играет ведущую роль в молекулярном механизме действия.

2. ЦЕЛЬ:

2.1. данные методы разработаны для расширения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro* (БК-СФБТС).

3. МЕТОДЫ РАСШИРЕНИЯ БК-СФБТС:

3.1. Определение целевой биологической активности и ключевого фермента для разработки новой специфической ферментной биотест-системы с помощью программы PASS [1]. При создании СФБТС в качестве тест-объектов методом *in silico* (PASS) выбирают ключевые и/или лимитирующие ферменты гомеостаза с наиболее вероятной активностью ($P_a - P_i > 0,5$) БАВ для выбора конкретного тест-фермента и учитывают возможность получения легко фиксируемого сигнала.

Метод расширения коллекции	М-04868244-111-2024
Метод расширения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 3/3

3.2. Определение возможности закупки рекомбинантных ферментов, в случае необходимости разработка методики его выделения и подтверждения активности.

3.3. Разработка методики определения специфической биологической активности БАВ с применением новой ферментной биотест-системы – определение условий для получения максимальной скорости ферментативной реакции: подобрать оптимальный буферный раствор, субстрат, ко-факторы, время проведения реакции, температурный режим и т.д.

3.4. Для оценки целевой биологической активности объекта исследования, который может быть, как индивидуальным веществом, так и объектом сложного состава, применяют определенную СФБТС, которая позволяет охарактеризовать определенный вид биологической активности. Каждая СФБТС позволяет оценить соединения по одному биологическому параметру, поэтому для выявления активности в отношении патологий с многофакторным механизмом действия сочетают соответствующие первичные биотест-системы (на основе одного тест-фермента) и формируют на их основе вторичные СФБТС.

3.5. Выбрать стандартный образец и референтный препарат (должен быть зарегистрирован) для обязательного использования их в качестве положительного контроля.

3.6. Утверждение стандартной операционной процедуры на определение соответствующей биологической активности БАВ в ФГБНУ ВИЛАР.

3.7. Включение методики в Реестр СФБТС.

3.8. Проведение исследований биологической активности БАВ различного происхождения на экспериментальных моделях с использованием лабораторных животных для подтверждения работоспособности и приемлемости разработанной СФБТС.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ (ФАНО РОССИИ)
 ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
 «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И
 АРОМАТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ» ФГБНУ ВИЛАР

Метод характеристики единиц хранения	М-04868244-110-2024
Метод характеристики единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 1/8



УТВЕРЖДАЮ
 Директор ФГБНУ ВИЛАР,
 академик РАН

Н.И. Сидельников
 2024 г.

МЕТОД ХАРАКТЕРИЗАЦИИ ЕДИНИЦ ХРАНЕНИЯ
 БИОЛОГИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ
 СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ *in vitro*

Согласовано:	И.о.зам. директора, канд. фарм. наук	Сёмкина О.А.		26.04.2024
Разработано:	Руководитель Центра доклинических исследований, канд. биол. наук	Лупанова И.А.		23.04.2024
	Заведующий отделом экспериментальной фармакологии, д-р мед. наук	Фсрубко Е.В.		23.04.2024

Метод характеристики единиц хранения	М-04868244-110-2024
Метод характеристики единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 2/8

1. ВВЕДЕНИЕ:

1.1. Создание специфических ферментных биотест-систем в ФГБНУ ВИЛАР базируется на фундаментальных представлениях фармакологии и биохимии, прежде всего – на представлениях о специфических фармакофорах, присущих каждой фармакологической группе биологически активных веществ (БАВ), комплиментарных структуре соответствующего рецептора и определяющих вид фармакологической активности. Фармакофоры БАВ избирательно взаимодействуют с соответствующими мишенями, в качестве которых чаще всего выступают лимитирующие ферменты, играющие важную роль в биохимических процессах. Ключевые / лимитирующие ферменты очень быстро реагируют на изменения внешней среды изменением своей активности.

2. ЦЕЛЬ:

2.1. данные методы разработаны для характеристики единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro* (БК СФБТС).

3. МЕТОДЫ ХАРАКТЕРИЗАЦИИ ЕДИНИЦ ХРАНЕНИЯ БК:

3.1. Используют коммерческие рекомбинантные ферменты.

3.1.1. На препараты должны быть обязательные сертификаты анализа от производителя, подтверждающие качество закупаемого фермента.

3.1.2. Используют в работе высокоочищенные ферменты фирмы Merck KGaA (Германия) или Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd. (Индия):

- каталаза из бычьей печени (CAS 9001-05-2), лиофилизированный порошок, 2,000-5,000 ед/мг белка (спецификация на продукт в Приложении 1);

- глутатионтредуктаза из пекарских дрожжей (*S. cerevisiae*) (CAS 9001-48-3), суспензия в сульфате аммония, 100-300 ед/ мг белка (спецификация на продукт в Приложении 2);

- NO-синтаза, индуцибельная, мышьяная, рекомбинантная, экспрессированная в *E.coli* (CAS 125978-95-2), в буферном растворе, $\geq 2,9$ ед/ мг белка (спецификация на продукт в Приложении 3).

- пируваткиназа, рекомбинантная из мышц кроликов (CAS 9001-59-6), тип III, лиофилизированный порошок, 350-600 ед/ мг белка (спецификация на продукт в Приложении 4);

- лактатдегидрогеназа, (CAS 9001-60-9), тип II, суспензия в сульфате аммония, 800-1,200 ед/ мг белка (спецификация на продукт в Приложении 5). ключевого фермента для определения целевой биологической активности разрабатываемой СФБТС.

3.2. В случае самостоятельного выделения фермента (например, НАДФН-оксидаза, цитохром P450, тирозингидроксилаза) согласно методикам, необходимо обязательное определение

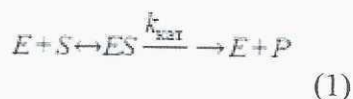
Метод характеристики единиц хранения	М-04868244-110-2024
Метод характеристики единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 3/8

их концентрации и подтверждение их активности с использованием стандартных образцов и зарегистрированных референтных препаратов с известной биологической активностью.

3.3. Особенности измерения активности ферментов, определяется их принадлежностью к тому или иному классу.

Принцип, положенный в основу всех методов определения активности фермента (E), заключается в регистрации скорости убыли субстрата (S) (то есть вещества, на которое действует фермент) или скорости образования продукта реакции (P).

Простейшей схемой для описания кинетики ферментативных реакций является так называемая двухстадийная схема:



где: E - фермент;

S - субстрат;

P - продукты реакции;

$k_{\text{кат}}$ - каталитическая константа.

Начальная скорость (U_0) катализируемой ферментом реакции, при которой расходом субстрата можно пренебречь, описывается уравнением Михаэлиса-Ментен (2):

$$U_0 = \frac{k_{\text{кат}} \cdot [E]_0 \cdot [S]_0}{K_m + [S]_0} = \frac{V_{\text{макс}} \cdot [S]_0}{K_m + [S]_0}, \quad (2)$$

где: $V_{\text{макс}} = k_{\text{кат}} \cdot [E]_0$ - максимальная скорость реакции;

$[E]_0$ - начальная концентрация фермента;

K_m - константа Михаэлиса.

Для аллостерических ферментов начальная скорость ферментативной реакции не подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен.

Для определения скорости ферментативной реакции через определенные промежутки времени отбирают пробы из реакционной смеси и проводят количественное определение методами, основанными чаще всего на спектральных свойствах субстрата или продукта реакции.

3.4. Требования к условиям проведения ферментативной реакции

Ферментативная реакция должна проводиться в строго определенных условиях с учетом следующих факторов:

Метод характеристики единиц хранения	М-04868244-110-2024
Метод характеристики единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 4/8

3.4.1. начальная скорость реакции (U_0). Скорость ферментативной реакции количественно можно измерить по убыли субстрата или по образованию продукта реакции.

3.4.1.1. Типичные кинетические кривые ферментативной реакции приведены на рис. 1. Для каждой ферментативной реакции могут быть подобраны условия, при которых начальный участок кривой линеен, т.е. зависимость концентрации образовавшегося продукта или израсходованного субстрата от времени наблюдения имеет прямо пропорциональный характер.

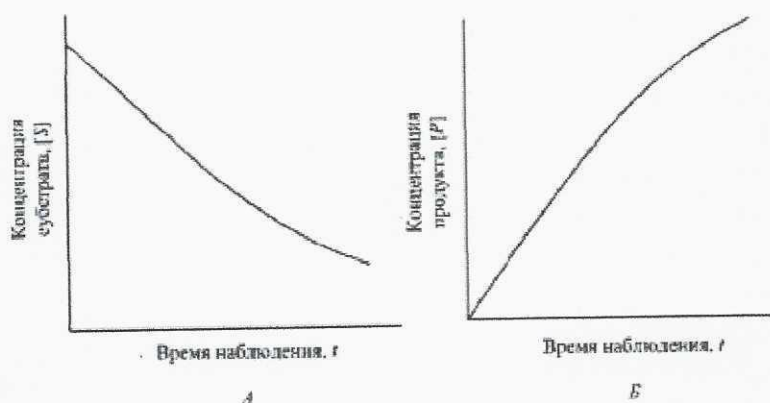


Рисунок 1 – Типичные кинетические кривые ферментативной реакции:
 А – регистрация по скорости исчезновения субстрата реакции;
 Б – регистрация по скорости образования продукта реакции

3.4.1.2. Начальная скорость реакции (U_0) определяется как тангенс угла наклона линейного участка кривой.

Поскольку длительность прямолинейного участка кинетической кривой от опыта к опыту несколько изменяется, время инкубации (при использовании метода отбора проб) должно составлять не более 70% и не менее 20% времени соответствующего прямолинейного участка.

3.4.2. Концентрация субстрата $([S]_0)$. В большинстве случаев зависимость начальной скорости ферментативной реакции (U_0) от начальной концентрации субстрата $([S]_0)$, согласно уравнению Михаэлиса-Ментен (2) описывается гиперболической функцией (рис. 2).

Метод характеристики единиц хранения	М-04868244-110-2024
Метод характеристики единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 5/8

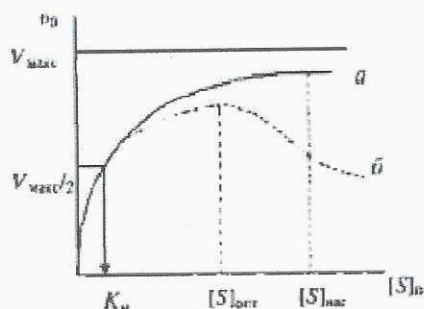


Рисунок 2 – Зависимость начальной скорости реакции v_0 от начальной концентрации субстрата $[S]_0$.

a – ферментативный процесс, подчиняющийся уравнению Михаэлиса-Ментен;
b – процесс, для которого характерно ингибирование фермента субстратом;
 $[S]_0$ – начальная концентрация субстрата;
 $[S]_{нас}$ – насыщающая концентрация субстрата;
 $[S]_{opt}$ – оптимальная концентрация субстрата;
 V_{max} – максимальная скорость реакции;

Начальная скорость реакции (v_0) зависит от начальной концентрации субстрата ($[S]_0$) вплоть до его насыщающей концентрации. Под насыщающей концентрацией ($[S]_{нас}$) понимают такую концентрацию субстрата, при которой начальная скорость реакции практически перестает повышаться при дальнейшем увеличении концентрации субстрата, стремясь к своему предельному значению, называемому максимальной скоростью реакции V_{max} (рис. 2). Отрезок на оси абсцисс, соответствующий скорости, равной половине максимальной, будет представлять собой K_m . При проведении ферментативной реакции реакционная смесь должна содержать такое количество субстрата, которое обеспечит насыщение фермента в течение всего хода определения (количество субстрата, взятого для проведения ферментативной реакции, должно быть примерно на 30% выше насыщающей концентрации).

Если форма кривой зависимости начальной скорости реакции (v_0) от начальной концентрации субстрата ($[S]_0$) отличается от гиперболической, определение параметров по уравнению Михаэлиса-Ментен невозможно. Такие отклонения наблюдаются в случае ингибирования или активации фермента субстратом, а также при работе с аллостерическими ферментами. В этом случае оптимальной является та концентрация субстрата, при которой начальная скорость реакции максимальна V_{max} - точка перегиба на экспериментальной кривой зависимости начальной скорости реакции от начальной концентрации субстрата (рис. 2).

После выбора насыщающей концентрации субстрата необходимо проверить, сохраняется ли при ней линейная зависимость $[P]$ от t .

Метод характеристики единиц хранения	М-04868244-110-2024
Метод характеристики единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 6/8

В качестве субстратов используются как природные вещества, такие как альбумин, казеин, крахмал, так и синтетические. Природные субстраты ферментов используют большей частью для подтверждения подлинности. Синтетические субстраты обеспечивают более высокую точность и лучшую воспроизводимость при количественном определении ферментативной активности.

3.4.3. Концентрация фермента ($[E]_0$). В соответствии с уравнением Михаэлиса-Ментен начальная скорость ферментативной реакции (U_0) в подавляющем большинстве случаев линейно зависит от концентрации фермента ($[E]_0$). Выбор оптимальной для каждого метода концентрации фермента осуществляется экспериментально при помощи построения кривой зависимости начальной скорости реакции от концентрации фермента (рис. 3). После выбора начальной концентрации фермента необходимо проверить, сохраняется ли при ней линейная зависимость $[P]$ от t при выбранном значении насыщающей концентрации субстрата.

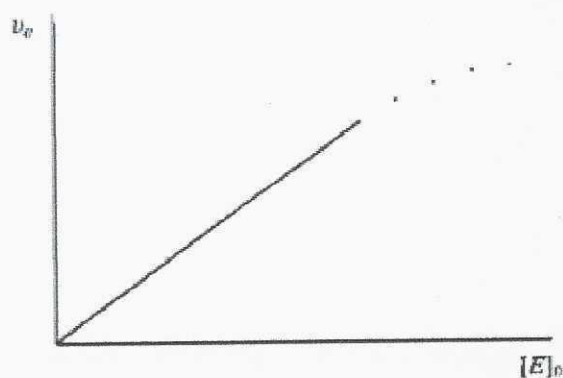


Рисунок 3 - Зависимость начальной скорости реакции U_0 от начальной концентрации фермента $[E]_0$

3.4.4. Температура. Особенностью ферментативных реакций является наличие колоколообразной зависимости скорости реакции от температуры в достаточно широком интервале температур, которая характеризуется "температурным оптимумом" реакции. Эта особенность объясняется наложением 2 эффектов: возрастанием скорости реакции при увеличении температуры и ускорением тепловой денатурации белковой молекулы, приводящей к инактивации фермента при достаточно высоких температурах. Обычно ферментативную реакцию рекомендуется проводить в термостате при температуре $37 \pm 0,1$ °С, если нет иных указаний в фармакопейной статье. Предварительно каждый из реагентов нагревают до температуры 37°С.

Метод характеристики единиц хранения	М-04868244-110-2024
Метод характеристики единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 7/8

3.4.5. Значение рН. Типичная кривая, описывающая для большинства ферментов рН-зависимость начальной скорости ферментативной реакции при наличии 2 ионогенных групп в активном центре фермента, приведена на рис. 4.

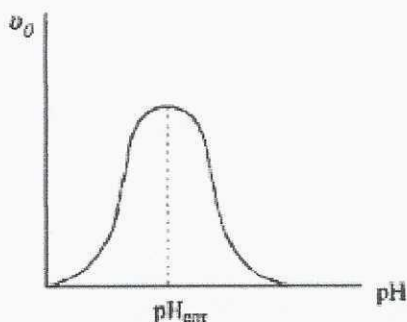


Рисунок 4 – Зависимость начальной скорости реакции v_0 от значения pH

Определение активности следует проводить при оптимальном значении pH, определенном при выбранных значениях концентрации фермента и насыщающей концентрации субстрата; использовании буферного раствора того состава, который не ингибирует фермент и температуре $37 \pm 0,1$ °C, если нет других указаний.

После выбора оптимального значения pH необходимо проверить, сохраняется ли при этом pH линейная зависимость $[P]$ от t при выбранных значениях концентрации фермента и насыщающей концентрации субстрата.

3.4.6. Кофакторы. Существуют ферменты, для проявления каталитических свойств которых необходимо присутствие кофакторов - веществ, с помощью которых происходит активация ферментов. Кофакторами могут выступать один или несколько неорганических ионов, таких как Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} или комплексная органическая или металлорганическая молекула, называемая коферментом.

Для определения оптимальной концентрации кофактора следует построить кривую зависимости начальной скорости реакции от начальной концентрации кофактора, аналогичную зависимости начальной скорости реакции от начальной концентрации субстрата, и по этой кривой выбрать насыщающую концентрацию кофактора.

После выбора насыщающей концентрации кофактора необходимо проверить, сохраняется ли при ней линейная зависимость $[P]$ от t .

3.5. Способы детекции

Метод характеристики единиц хранения	М-04868244-110-2024
Метод характеристики единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 8/8

Для количественной регистрации скорости ферментативной реакции используют спектрофотометрические методы детекции, основанные на спектральных свойствах субстрата или продукта реакции. Для одних видов анализа детекция может проводиться непрерывно в ходе реакции, для других - после ее остановки.

Способ остановки ферментативной реакции должен быть указан в соответствующих СОП (СОП 01.01.049.2024, СОП 02.01.050.2024, СОП 02.01.052.2024, СОП 02.01.057.2024, СОП 02.01.051.2024, СОП 02.01.053.2024, СОП 02.01.048.2024).

3.6. Единицы измерения ферментативной активности

Активность фермента измеряется количеством субстрата, преобразованного в продукт в единицу времени, и выражается в Международных единицах (МЕ) или единицах действия (ЕД).

МЕ - это такое количество фермента, которое при заданных условиях катализирует превращение одного микромоля субстрата за 1 мин (или одного микроэквивалента затронутых реакцией групп в тех случаях, когда атакуется более одной группы в каждой молекуле субстрата).

ЕД - это условная единица активности фермента, величина которой указывается в фармакопейной статье.

Нормируются:

- удельная активность препарата, которая выражается в единицах энзимной активности фермента (МЕ или ЕД) на 1 мг препарата или на 1 мг ферментного белка (в последнем случае удельная активность характеризует чистоту препарата). Определение содержания белка в препарате проводят одним из методов, указанных в соответствующих СОП.

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ И АРОМАТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ»
(ФГБНУ ВИЛАР)

СОП для поддержания единиц хранения	СОП - 02.01.056.2024, версия 1
СОП для поддержания единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 1/14

УТВЕРЖДАЮ

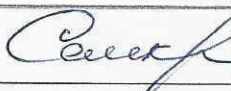


Директор ФГБНУ ВИЛАР,
академик РАН


 Н.И. Сидельников
 «17» апреля 2024 г.



ПОДДЕРЖАНИЕ ЕДИНИЦ ХРАНЕНИЯ
 БИОЛОГИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ
 СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ *in vitro*

Стандартная операционная процедура
СОП – 02.01.056.2024

Согласовано:	И.о.зам. директора, канд. фарм. наук	Сёмкина О.А.		17.04.2024
Разработано:	Руководитель Центра доклинических исследований, канд.биол.наук	Лупанова И.А.		15.04.2024
	Заведующий отделом экспериментальной фармакологии, д-р мед.наук	Ферубко Е.В.		15.04.2024

СОП для поддержания единиц хранения	СОП - 02.01.056.2024, версия 1
СОП для поддержания единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем in vitro	Стр. 2/14

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ.....	3
2. ЦЕЛЬ.....	3
3. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ СОП И ОТВЕТСТВЕННОСТЬ.....	3
4. ПРИЛОЖЕНИЕ 1. РЕЕСТР МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ.....	5
5. ПРИЛОЖЕНИЕ 2. ЛИСТ ОЗНАКОМЛЕНИЯ СОТРУДНИКОВ СО СТАНДАРТНОЙ ПРОЦЕДУРОЙ.....	9
6. ПРИЛОЖЕНИЕ 2. СПЕЦИФИКАЦИЯ НА ПРОДУКТ - КАТАЛАЗА.....	10
7. ПРИЛОЖЕНИЕ 3. СПЕЦИФИКАЦИЯ НА ПРОДУКТ - ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗА.....	11
8. ПРИЛОЖЕНИЕ 4. СПЕЦИФИКАЦИЯ НА ПРОДУКТ - ИНДУЦИБЕЛЬНАЯ НО-СИНТАЗА.....	12
9. ПРИЛОЖЕНИЕ 5. СПЕЦИФИКАЦИЯ НА ПРОДУКТ - ПИРУВАТКИНАЗА.....	13
10. ПРИЛОЖЕНИЕ 6. СПЕЦИФИКАЦИЯ НА ПРОДУКТ - ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА...	14

СОП для поддержания единиц хранения	СОП - 02.01.056.2024, версия 1
СОП для поддержания единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 3/14

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. Специфические ферментные биотест-системы *in vitro*, составляющие биокolleкцию ФГБНУ ВИЛАР, разработаны для поиска специфической биологической активности биологически активных веществ различного происхождения в пищевых, медицинских, ветеринарных и других целях. Биологическая коллекция специфических ферментных биотест-систем *in vitro* (БК) поддерживается постоянно.

1.2. СОП для поддержания единиц хранения БК составлена согласно Положению о биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем от 25 января 2017 г. с изменениями от 03.04.2024 г.

2. ЦЕЛЬ:

2.1. Данная стандартная операционная процедура описывает процедуру поддержания единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro* (тест-ферментов).

3. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ СОП И ОТВЕТСТВЕННОСТЬ:

3.1. СОП предназначена сотрудникам (согласно Приложению 2), выполняющим манипуляции по поддержанию единиц хранения БК. Сотрудники должны обеспечивать сохранение специфических ферментных биотест-систем.

3.2. Ответственность за поддержание БК несет куратор БК или руководитель структурного подразделения.

4. ОПИСАНИЕ

4.1. Компонентами БК являются специфические ферментные биотест-системы, разработанные на основе одного тест-фермента (первичные) и вторичные специфические ферментные биотест-системы *in vitro*, разработанные на основе 2-х и более тест-ферментов.

4.2. В состав БК входит 10 специфических ферментных биотест-систем *in vitro*, согласно Приложению 1.

4.3. Принципы:

4.3.1 Процедура выполняется одним сотрудником.

4.4. Стандартная процедура поддержания единиц хранения:

4.5. куратор БК или руководитель структурного подразделения хранит нормативные документы по работе с единицами хранения БК в папке «БК-СФБТС» в отделе экспериментальной фармакологии Центра Доклинических исследований ФГБНУ ВИЛАР и в научно-организационном отделе ФГБНУ ВИЛАР (номер и название методик и патентов указаны в Приложении 1);

СОП для поддержания единиц хранения	СОП - 02.01.056.2024, версия 1
СОП для поддержания единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем in vitro	Стр. 4/14

4.6. сотрудники по согласованию с куратором БК проводят исследования биологической активности биологически активных веществ различного происхождения только согласно СОП и методикам, разработанным для каждой специфической биотест-системы, утвержденным и поддерживаемым в коллекции (согласно реестру в Приложении 1) на поверенном оборудовании (соответствующие документы должны находиться в соответствующей папке для каждого прибора);

4.7. сотрудники для поддержания БК проводят поверку оборудования раз в год,

4.8. пересматривают и переутверждают СОП и методики один раз в пять лет,

4.9. передают информацию в патентный отдел о заканчивающих свое действие патентах,

4.10. раз в 2 года, если другой информации не указано в спецификации на продукт) закупать новые тест-ферменты или проводить их ретест на соответствие параметрам: «Внешний вид, цвет и вид), «Количество белка» (нормативное значение указано в спецификации на продукт, Приложения 3-7).

СОП для поддержания единиц хранения	СОП - 02.01.056.2024, версия 1
СОП для поддержания единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 5/14

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

**РЕЕСТР БИОЛОГИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ
СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ *in vitro***

№	Название биотест-системы <i>in vitro</i>	Выявляемые свойства БАВ	Нормативные документы
1.	Вторичная ферментная биотест-система <i>in vitro</i> на основе каталазы и глутатионредуктазы	Адаптогенные свойства БАВ	1. Патент №2181890. «Способ выявления веществ, обладающих адаптогенными свойствами, <i>in vitro</i> ». Быков В.А., Минеева М.Ф., Дубинская В.А., Ребров Л.Б., Колхир В.К. 2. СОП 01.01.049.2024 «Определение антиоксидантных, адаптогенных и антимикробных свойств растительных биологически активных веществ с применением комбинированной специфической ферментной биотест-системы на основе каталазы и глутатионредуктазы <i>in vitro</i> », 11 стр.
2.	Вторичная ферментная биотест-система <i>in vitro</i> на основе каталазы и глутатионредуктазы	Антиоксидантные свойства БАВ	1. Патент РФ № 2181892. «Способ выявления веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, <i>in vitro</i> » Быков В.А.; Дубинская В.А.; Минеева М.Ф.; Ребров Л.Б.; Колхир В.К. 2. СОП 01.01.049.2024 «Определение антиоксидантных, адаптогенных и антимикробных свойств растительных биологически активных веществ с применением комбинированной специфической ферментной биотест-системы на основе каталазы и глутатионредуктазы <i>in vitro</i> », 11 стр.

СОП для поддержания единиц хранения	СОП - 02.01.056.2024, версия 1
СОП для поддержания единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 6/14

3.	Вторичная ферментная биотест-система <i>in vitro</i> на основе каталазы и глутатионредуктазы	Антимикробные свойства БАВ	<p>1. Патент № 2181891. «Способ выявления веществ, обладающих противомикробными и противовирусными свойствами, <i>in vitro</i>» Быков В.А., Дубинская В.А., Минеева М.Ф., Ребров Л.Б., Колхир В.К.</p> <p>2. СОП 01.01.049.2024 «Определение антиоксидантных, адаптогенных и антимикробных свойств растительных биологически активных веществ с применением комбинированной специфической ферментной биотест-системы на основе каталазы и глутатионредуктазы <i>in vitro</i>», 11 стр.</p>
4.	Первичная НАДФН-оксидазная ферментная биотест-система <i>in vitro</i>	Иммуномодулирующие свойства БАВ	<p>1. Патент №2194077. «Способ выявления веществ с потенциальной иммуномодулирующей активностью <i>in vitro</i> с применением НАДФН -оксидазной тест-системы» Быков В.А., Минеева М.Ф., Попова Н.Б.</p> <p>2. СОП 02.01.050.2024 «Определение иммуномодулирующих свойств растительных биологически активных веществ с применением специфической ферментной биотест-системы на основе НАДФН-оксидазы», 6 стр.</p>
5.	Первичная тирозингидроксилазная ферментная биотест-система <i>in vitro</i>	Дофаминергические (нейротропные) свойства БАВ	<p>1. СОП 02.01.052.2024 «Определение скорости тирозингидроксилазной реакции методом прямого спектрофотометрического измерения»), используемые в экспериментальных исследованиях», 5 стр.</p>

СОП для поддержания единиц хранения	СОП - 02.01.056.2024, версия 1
СОП для поддержания единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 7/14

6.	Первичная пируваткиназная ферментная биотест-система <i>in vitro</i>	Энергизирующие свойства БАВ	1. Методика: «Выявление активаторов субстратного фосфорилирования в объектах растительного происхождения путем определения скорости пируваткиназной реакции на биохимическом анализаторе «Clima М-15» для исследований по направленному поиску и созданию венотонизирующих средств». М. ГНУ ВИЛАР, 2010 - 5стр.
7.	Вторичная ферментная биотест-система <i>in vitro</i> на основе глутатионредуктазы и пируваткиназы	Венотонизирующие свойства БАВ	1. СОП 43 от 15.09.2023 «Определение венотонизирующих свойств биологически активных веществ с применением комплекса специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i> », 6 стр.
8.	Вторичная биотест-система на основе цитохрома P ₄₅₀ и глутатионтрансферазы	Выявление БАВ с антиоксидантными свойствами	1. Патент РФ №2316597 «Способ выявления антиоксидантных свойств биологически активных веществ» Быков В.А., Минеева М.Ф., Стрелкова Л.Б., Колхир В.К., Ребров Л.Б. 2. СОП 02.01.051.2024 «Определение антиоксидантных свойств растительных биологически активных веществ с применением комбинированной специфической ферментной биотест-системы на основе цитохрома P ₄₅₀ и глутатионтрансферазы <i>in vitro</i> », 6 стр.
9.	Первичная ферментная биотест-система <i>in vitro</i> на основе индуцибельной NO-синтазы (iNOS)	Противовоспалительные свойства БАВ	1. Методика: «Выявление противовоспалительных свойств БАВ с помощью ферментной биотест-системы <i>in vitro</i> на основе индуцибельной NO-синтазы» № М04868244-37-2014. М. ФБГНУ ВИЛАР, 2014 г., 19 стр. 2. СОП 02.01.053.2024 «Определение противовоспалительных свойств биологически активных веществ с применением специфической ферментной биотест-системы на основе индуцибельной NO-синтазы <i>in vitro</i> », 10 стр.

СОП для поддержания единиц хранения	СОП - 02.01.056.2024, версия 1
СОП для поддержания единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 8/14

10.	Первичная ферментная биотест-система <i>in vitro</i> на основе тиреопероксидазы	Тиреотропные свойства БАВ	1. СОП 02.01.048.2024, «Определение тиреотропных свойств биологически активных веществ с применением специфической ферментной биотест-систем на основе тиреопероксидазы (ТПО) <i>in vitro</i> », 10 стр.
-----	---	---------------------------	--

СОП для поддержания единиц хранения	СОП - 02.01.056.2024, версия 1
СОП для поддержания единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 8/8

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Лист ознакомления сотрудников со стандартной операционной процедурой

№№ п/п	Фамилия И.О.	Ознакомлен(а)	Дата ознакомления с СОП	Подпись
1.	Лупанова И.А.			
2.	Ферубко Е.В.			
3	Тимохина А.С.			

СОП для поддержания единиц хранения	СОП - 02.01.056.2024, версия 1
СОП для поддержания единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 8/8

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Спецификация на продукт - каталаза

SIGMA-ALDRICH

sigmaaldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sigmaaldrich.com

Outside USA: eurtechserv@sigmaaldrich.com

Product Specification

Product Name:
Catalase from bovine liver - lyophilized powder, 2,000-5,000 units/mg protein

Product Number: C9322
CAS Number: 9001-05-2
MDL: MFCD00081483

Storage Temperature: -20 °C

TEST	Specification
Appearance (Color)	Dark Green to Very Dark Green and Dark Beige to Very Dark Beige to Very Dark Brown
Appearance (Form)	Powder
Protein by Biuret units/mg protein	≥ 55 % 2000 - 5000
One unit will decompose 1.0 micromole of hydrogen peroxide per minute at pH 7.0 at 25 deg C, while the hydrogen peroxide concentration falls from 10.3 to 9.2 millimolar.	
Recommended Retest Period	2 Years
Specification: PRD.2.ZQ5.10000034857	

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

СОП для коррекции нарушений	СОП - 02.01.056.2024, версия 1
СОП для коррекции нарушений качества единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 7/10

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Спецификация на продукт – глутатионредуктаза

SIGMA-ALDRICH

sigmaaldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sigmaaldrich.com

Outside USA: eurtechserv@sigmaaldrich.com

Product Specification

Product Name:
Glutathione Reductase from baker's yeast (*S. cerevisiae*) - ammonium sulfate suspension, 100-300 units/mg protein (Biuret)

Product Number: G3664

MDL: MFCD00131196

Storage Temperature: 2 - 8 °C

TEST	Specification
Appearance (Color)	Faint Yellow to Dark Yellow
Appearance (Form)	Suspension
mg protein/ml (Biuret)	≥ 1.0
units/mg protein	100 - 300
One unit will reduce 1.0 micromole of Oxidized Glutathione per min at pH 7.6 at 25 deg C.	
Impurity	≤ 0.1 %
Lipoamide Dehydrogenase	
Impurity	≤ 0.01 %
Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase	
Impurity	≤ 0.01 %
6-Phosphogluconic Dehydrogenase	
Impurity	≤ 0.01 %
NADPH Oxidase	
Recommended Retest Period	_____
2 Years	

Specification: PRD.3.ZQ5.10000050073

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

СОП для коррекции нарушений	СОП - 02.01.056.2024, версия 1
СОП для коррекции нарушений качества единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 8/10

ПРИЛОЖЕНИЕ 5

Спецификация на продукт – индуцибельная NO-синтаза

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sigmaaldrich.com

Outside USA: eurtechserv@sigmaaldrich.com

Product Specification

Product Name:

Nitric Oxide Synthase, Inducible from mouse – recombinant, expressed in E. coli, buffered aqueous solution

Product Number: N2783

MDL: MFCD00803363

Storage Temperature: -70 °C

TEST

Specification

Protein by Bradford

≥ 1 mg/ml

Enzymatic Activity

≥ 4.0 UN/mg

Unit Definition: One unit will produce 1.0 umol of nitric oxide per minute at 37 deg C in 50 mM HEPES, pH 7.4, containing 1 mM Arginine, 1 mM magnesium acetate, 0.15 mM NADPH, 4.5 uM oxyhemoglobin, 18 uM tetrahydrobiopterin and 180 uM DTT.

Specification: PRD.2.ZQ5.10000020772

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

СОП для коррекции нарушений	СОП - 02.01.056.2024, версия 1
СОП для коррекции нарушений качества единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 9/10

ПРИЛОЖЕНИЕ 6

Спецификация на продукт – пируваткиназа

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sigmaaldrich.com

Outside USA: eurtechserv@sigmaaldrich.com

Product Specification

Product Name:

Pyruvate Kinase from rabbit muscle – Type III, lyophilized powder, 350–600 units/mg protein

Product Number:

P9136

CAS Number:

9001-59-8

MDL:

MFC000081946

Storage Temperature:

-20 °C

TEST	Specification
Appearance (Color)	White
Appearance (Form)	Powder
% Protein (Biuret)	> 80
units/mg protein	350 - 600
Enzymatic Activity: One unit will convert 1.0 micromole of Phospho(enol)pyruvate to Pyruvate per min at pH 7.6 at 37 deg C.	
Lactic Dehydrogenase	< 0.01 %
Creatine Phosphokinase	< 0.01 %
Phosphoglucumutase	< 0.01 %
Myokinase	< 0.01 %

Specification: PRD.1.ZQ5.10000039660

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

СОП для коррекции нарушений	СОП - 02.01.056.2024, версия 1
СОП для коррекции нарушений качества единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 10/10

ПРИЛОЖЕНИЕ 7

Спецификация на продукт – лактатдегидрогеназа

SIGMA-ALDRICH

sigmaaldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sigma.com

Outside USA: eurtechserv@sigma.com

Product Specification

Product Name:

L-Lactic Dehydrogenase from rabbit muscle - Type II, ammonium sulfate suspension, 800-1,200 units/mg protein

Product Number:

L2500

CAS Number:

9001-80-9

MDL:

MFC000131466

Storage Temperature:

2 - 8 °C

TEST	Specification
mg protein/ml (Biuret)	5.0 - 20.0
units/mg protein	800 - 1200
One unit will reduce 1.0 micromole of pyruvate to L-lactate per minute at pH 7.5 at 37 deg C.	
Pyruvate Kinase	≤ 0.01 %
Myokinase	≤ 0.01 %
Malic Dehydrogenase	≤ 0.01 %
Glutamic-Pyruvic Transaminase	≤ 0.01 %
Glutamic Oxaloacetic Transaminase	≤ 0.01 %
A-Glycerophosphate Dehydrogenase	≤ 0.01 %
Recommended Retest Period	_____
1 year	

Specification: PRD.1.ZQ5.10000043015

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ И АРОМАТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ»
(ФГБНУ ВИЛАР)

СОП для коррекции нарушений	СОП – 02.01.054.2024, версия 1
СОП для коррекции нарушений качества единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 1/10

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБНУ ВИЛАР,
академик РАН

Сидельников
 Н.И. Сидельников
 «17» апреля 2024 г.



КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ КАЧЕСТВА ЕДИНИЦ ХРАНЕНИЯ
 БИОЛОГИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ
 СПЕЦИФИЧЕСКИХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ *in vitro*

Стандартная операционная процедура
 СОП - 02.01.054.2024,
 Версия 1

Согласовано:	И.о.зам. директора, канд. фарм. наук	Сёмкина О.А.	<i>Сёмкина</i>	17.04.2024
Разработано:	Руководитель Центра доклинических исследований, канд.биол.наук	Лупанова И.А.	<i>Лупанова</i>	15.04.2024
	Заведующий отделом экспериментальной фармакологии, д-р мед.наук	Ферубко Е.В.	<i>Ферубко</i>	15.04.2024

Москва – 2024 г.

СОП для коррекции нарушений	СОП – 02.01.054.2024, версия 1
СОП для коррекции нарушений качества единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 2/10

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ.....	3
2. ЦЕЛЬ.....	3
3. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ СОП И ОТВЕТСТВЕННОСТЬ.....	3
4. ПРИЛОЖЕНИЕ 1. ЛИСТ ОЗНАКОМЛЕНИЯ СОТРУДНИКОВ СО СТАНДАРТНОЙ ПРОЦЕДУРОЙ.....	5
5. ПРИЛОЖЕНИЕ 2. СПЕЦИФИКАЦИЯ НА ПРОДУКТ - КАТАЛАЗА.....	6
6. ПРИЛОЖЕНИЕ 3. СПЕЦИФИКАЦИЯ НА ПРОДУКТ - ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗА.....	7
7. ПРИЛОЖЕНИЕ 4. СПЕЦИФИКАЦИЯ НА ПРОДУКТ - ИНДУЦИБЕЛЬНАЯ НО-СИНТАЗА.....	8
8. ПРИЛОЖЕНИЕ 5. СПЕЦИФИКАЦИЯ НА ПРОДУКТ - ПИРУВАТКИНАЗА.....	9
9. ПРИЛОЖЕНИЕ 6. СПЕЦИФИКАЦИЯ НА ПРОДУКТ - ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА...	10

СОП для коррекции нарушений	СОП – 02.01.054.2024, версия 1
СОП для коррекции нарушений качества единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 3/10

1. ВВЕДЕНИЕ:

1.1. В ФГБНУ ВИЛАР в течение ряда лет ведется разработка приоритетного направления создания молекулярных специфических биотест-систем *in vitro*, проявляющих высокую избирательность к биологически активным веществам (БАВ), обладающим соответствующими фармакологическими свойствами. Разработаны и запатентованы оригинальные биотест-системы на основе ферментов антиоксидантной защиты (каталазы, глутатионредуктазы), иммунной системы (НАДФН-оксидазы), ферментов биотрансформации – системы цитохрома P₄₅₀ и глутатионтрансферазы. Оригинальные биотест-системы ФГБНУ ВИЛАР обладают высокой избирательностью, информативностью, чувствительностью, хорошей воспроизводимостью, быстротой достижения результатов, позволяют оптимизировать доклинические исследования.

1.2. Коррекция нарушений качества единиц хранения производится по необходимости при выявлении нарушений.

1.3. СОП для коррекции нарушений качества единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro* составлена согласно Положению о биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем от 25 января 2017 г. с изменениями от 03.04.2024 г.

2. ЦЕЛЬ:

2.1. Данная стандартная операционная процедура описывает процедуру коррекции нарушений качества единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro* (БК).

3. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ СОП И ОТВЕТСТВЕННОСТЬ:

3.1. СОП предназначена сотрудникам (согласно Приложению 1), выполняющим манипуляции по коррекции нарушений качества единиц хранения БК. Сотрудники должны поддерживать качество входящих в БК биотест-систем.

3.2. Ответственность за коррекцию нарушений качества единиц хранения БК несет куратор БК или руководитель структурного подразделения.

4. ОПИСАНИЕ

4.1. Компонентами БК являются специфические ферментные биотест-системы, разработанные на основе одного тест-фермента (первичные) и вторичные специфические ферментные биотест-системы *in vitro*, разработанные на основе 2-х и более тест-ферментов.

СОП для коррекции нарушений	СОП – 02.01.054.2024, версия 1
СОП для коррекции нарушений качества единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 4/10

4.2. В состав БК входит 11 специфических ферментных биотест-систем *in vitro*.

4.3. Принципы:

4.3.1. Процедура выполняется одним сотрудником.

4.4. Стандартная процедура коррекции нарушений качества единиц хранения:

4.5. водные растворы реагентов, используемых в экспериментах, готовят на дистиллированной воде (рН 5,0-7,0);

4.6. используют в работе высокоочищенные ферменты фирмы Merck KGaA (Германия) или Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd. (Индия):

- каталаза из бычьей печени (CAS 9001-05-2), лиофилизированный порошок, 2,000-5,000 ед/мг белка (спецификация на продукт в Приложении 2);

- глутатионредуктаза из пекарских дрожжей (*S. cerevisiae*) (CAS 9001-48-3), суспензия в сульфате аммония, 100-300 ед/ мг белка (спецификация на продукт в Приложении 3);

- NO-синтаза, индуцибельная, мышьяная, рекомбинантная, экспрессированная в *E.coli* (CAS 125978-95-2), в буферном растворе, $\geq 2,9$ ед/ мг белка (спецификация на продукт в Приложении 4).

- пируваткиназа, рекомбинантная из мышц кроликов (CAS 9001-59-6), тип III, лиофилизированный порошок, 350-600 ед/ мг белка (спецификация на продукт в Приложении 5);

- лактатдегидрогеназа, (CAS 9001-60-9), тип II, суспензия в сульфате аммония, 800-1,200 ед/ мг белка (спецификация на продукт в Приложении 6).

4.7. реактивы марки ХЧ или ЧДА;

4.8. хранят реактивы при соответствующей температуре хранения (указана в паспорте безопасности на реактивы);

4.9. строго поддерживают температуру хранения ферментов (указана в паспорте безопасности на фермент, Приложения 2-6);

4.10. исключают повторное размораживание-замораживание стандартного раствора фермента в экспериментах;

4.11. все исследования проводят строго в соответствии с СОП по определению биологической активности объектов исследования, описанные в соответствующих СОП (СОП 01.01.049.2024, СОП 02.01.050.2024, СОП 02.01.052.2024, СОП 02.01.057.2024, СОП 02.01.051.2024, СОП 02.01.053.2024, СОП 02.01.048.2024).

СОП для коррекции нарушений	СОП – 02.01.054.2024, версия 1
СОП для коррекции нарушений качества единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 5/10

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Лист ознакомления сотрудников со стандартной операционной процедурой

№№ п/п	Фамилия И.О.	Ознакомлен(а)	Дата ознакомления с СОП	Подпись
1.	Лупанова И.А.			
2.	Ферубко Е.В.			
3.	Тимохина А.С.			

СОП для коррекции нарушений	СОП – 02.01.054.2024, версия 1
СОП для коррекции нарушений качества единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 6/10

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Спецификация на продукт - каталаза

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sigmaaldrich.com

Outside USA: eurtechserv@sigmaaldrich.com

Product Specification

Product Name:
Catalase from bovine liver – lyophilized powder, 2,000–5,000 units/mg protein

Product Number: C9322
CAS Number: 9001-05-2
MDL: MFCD00081483

Storage Temperature: -20 °C

TEST	Specification
Appearance (Color)	Dark Green to Very Dark Green and Dark Beige to Very Dark Beige to Very Dark Brown
Appearance (Form)	Powder
Protein by Biuret units/mg protein	≥ 55 % 2000 - 5000
One unit will decompose 1.0 micromole of hydrogen peroxide per minute at pH 7.0 at 25 deg C, while the hydrogen peroxide concentration falls from 10.3 to 9.2 millimolar.	
Recommended Retest Period	2 Years
Specification: PRD.2.ZQ5.10000034857	

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

СОП для коррекции нарушений	СОП – 02.01.054.2024, версия 1
СОП для коррекции нарушений качества единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 7/10

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Спецификация на продукт – глутатионредуктаза

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sigmaaldrich.com

Outside USA: eurtechserv@sigmaaldrich.com

Product Specification

Product Name:
Glutathione Reductase from baker's yeast (*S. cerevisiae*) - ammonium sulfate suspension, 100-300 units/mg protein (bluret)

Product Number: G3664

MDL: MFCD00131196

Storage Temperature: 2 - 8 °C

TEST	Specification
Appearance (Color)	Faint Yellow to Dark Yellow
Appearance (Form)	Suspension
mg protein/ml (Bluret)	≥ 1.0
units/mg protein	100 - 300
One unit will reduce 1.0 micromole of Oxidized Glutathione per min at pH 7.6 at 25 deg C.	
Impurity	≤ 0.1 %
Lipoamide Dehydrogenase	
Impurity	≤ 0.01 %
Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase	
Impurity	≤ 0.01 %
6-Phosphogluconic Dehydrogenase	
Impurity	≤ 0.01 %
NADPH Oxidase	
Recommended Retest Period	
2 Years	

Specification: PRD.3.ZQS.10000050073

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

СОП для коррекции нарушений	СОП – 02.01.054.2024, версия 1
СОП для коррекции нарушений качества единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 8/10

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Спецификация на продукт – индуцибельная NO-синтаза

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sigma.com

Outside USA: eurtechserv@sigma.com

Product Specification

Product Name:

Nitric Oxide Synthase, Inducible from mouse – recombinant, expressed in *E. coli*, buffered aqueous solution

Product Number:

N2783

MDL:

MFC000803383

Storage Temperature:

-70 °C

TEST

Specification

Protein by Bradford

≥ 1 mg/ml

Enzymatic Activity

≥ 4.0 UN/mg

Unit Definition: One unit will produce 1.0 μ mol of nitric oxide per minute at 37 deg C in 50 mM HEPES, pH 7.4, containing 1 mM Arginine, 1 mM magnesium acetate, 0.15 mM NADPH, 4.5 μ M oxyhemoglobin, 18 μ M tetrahydrobiopterin and 180 μ M DTT.

Specification: PRD.2.ZQ5.10000020772

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

СОП для коррекции нарушений	СОП – 02.01.054.2024, версия 1
СОП для коррекции нарушений качества единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 9/10

ПРИЛОЖЕНИЕ 5

Спецификация на продукт – пируваткиназа

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sigmaaldrich.com

Outside USA: eurtechserv@sigmaaldrich.com

Product Specification

Product Name:

Pyruvate Kinase from rabbit muscle - Type III, lyophilized powder, 350-600 units/mg protein

Product Number:

P9136

CAS Number:

9001-59-8

MDL:

MFC000081946

Storage Temperature:

-20 °C

TEST

Specification

Appearance (Color)

White

Appearance (Form)

Powder

% Protein (Biuret)

≥ 80

units/mg protein

350 - 600

Enzymatic Activity: One unit will convert 1.0 micromole of Phospho(en)pyruvate to Pyruvate per min at pH 7.6 at 37 deg C.

Lactic Dehydrogenase

< 0.01 %

Creatine Phosphokinase

< 0.01 %

Phosphoglucomutase

< 0.01 %

Myokinase

< 0.01 %

Specification: PRD.1.ZQ5.10000039660

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

СОП для коррекции нарушений	СОП – 02.01.054.2024, версия 1
СОП для коррекции нарушений качества единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 10/10

ПРИЛОЖЕНИЕ 6

Спецификация на продукт – лактатдегидрогеназа

SIGMA-ALDRICH

sigmaaldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sigmaaldrich.com

Outside USA: eurotechserv@sigmaaldrich.com

Product Specification

Product Name:

L-Lactic Dehydrogenase from rabbit muscle – Type II, ammonium sulfate suspension, 800–1,200 units/mg protein

Product Number:

L2500

CAS Number:

9001-80-9

MDL:

MFCD00131466

Storage Temperature:

2 - 8 °C

TEST

Specification

mg protein/ml (Biuret)	5.0 - 20.0
units/mg protein	800 - 1200
One unit will reduce 1.0 micromole of pyruvate to L-lactate per minute at pH 7.5 at 37 deg C.	
Pyruvate Kinase	≤ 0.01 %
Myokinase	≤ 0.01 %
Malic Dehydrogenase	≤ 0.01 %
Glutamic-Pyruvic Transaminase	≤ 0.01 %
Glutamic Oxalacetic Transaminase	≤ 0.01 %
A-Glycerophosphate Dehydrogenase	≤ 0.01 %
Recommended Retest Period	_____
1 year	

Specification: PRD.1.ZQ5.10000043015

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of Invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
 ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
 «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
 ЛЕКАРСТВЕННЫХ И АРОМАТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ»
 (ФГБНУ ВИЛАР)

СОП контроля качества	СОП – 02.01.055.2024, версия 1
СОП контроля качества единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 1/5

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБНУ ВИЛАР,
академик РАН

Н.И. Сидельников
 «17» апреля 2024 г.



КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЕДИНИЦ ХРАНЕНИЯ
 БИОЛОГИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ
 СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ *in vitro*

Стандартная операционная процедура
 СОП - 02.01.055.2024

Согласовано:	И.о.зам. директора, канд. фарм. наук	Сёмкина О.А.	<i>Сёмкина</i>	17.04.2024
Разработано:	Руководитель Центра доклинических исследований, канд.биол.наук	Лупанова И.А.	<i>Лупанова</i>	15.04.2024
	Заведующий отделом экспериментальной фармакологии, д-р мед.наук	Ферубко Е.В.	<i>Ферубко</i>	15.04.2024

Москва – 2024 г.

СОП контроля качества	СОП – 02.01.055.2024, версия 1
СОП контроля качества единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 2/5

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ.....	3
2. ЦЕЛЬ.....	3
3. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ СОП И ОТВЕТСТВЕННОСТЬ.....	3
4. ПРИЛОЖЕНИЕ 1. РЕЕСТР МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ.....	5
5. ПРИЛОЖЕНИЕ 2. ЛИСТ ОЗНАКОМЛЕНИЯ СОТРУДНИКОВ СО СТАНДАРТНОЙ ПРОЦЕДУРОЙ.....	8

СОП контроля качества	СОП – 02.01.055.2024, версия 1
СОП контроля качества единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 3/5

1. ВВЕДЕНИЕ:

1.1. Биологическая коллекция специфических ферментных биотест-систем (БК СФБТС) объединяет оригинальные специфичные ферментные биотест-системы *in vitro*, разработанные и используемые в отделе экспериментальной и клинической фармакологии и в отделе медико-биологических проблем ФБГНУ ВИЛАР. Разработаны и запатентованы оригинальные биотест-системы на основе ферментов антиоксидантной защиты (каталазы, глутатионредуктазы), иммунной системы (НАДФН-оксидазы), ферментов биотрансформации – системы цитохрома Р450 и глутатионтрансферазы. Оригинальные биотест-системы ФГБНУ ВИЛАР обладают высокой избирательностью, информативностью, чувствительностью, хорошей воспроизводимостью, быстротой достижения результатов, позволяют оптимизировать доклинические исследования.

1.2. Контроль качества единиц хранения БК-СФБТС проводится один раз в год.

1.3. СОП для контроля качества единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro* составлена согласно Положению о биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем от 25 января 2017 г. с изменениями от 03.04.2024 г.

2. ЦЕЛЬ:

2.1. Данная стандартная операционная процедура описывает процедуру контроля качества единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro* (тест-ферментов).

3. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ СОП И ОТВЕТСТВЕННОСТЬ:

3.1. СОП предназначена для сотрудников (согласно Приложению 1), выполняющих манипуляции по контролю качества единиц хранения БК. Сотрудники должны обеспечивать качество входящих в БК биотест-систем.

3.2. Ответственность за контроль качества единиц хранения БК несет куратор БК или руководитель структурного подразделения.

4. ОПИСАНИЕ

4.1. Компонентами БК являются специфические ферментные биотест-системы, разработанные на основе одного тест-фермента (первичные) и вторичные специфические ферментные биотест-системы *in vitro*, разработанные на основе 2-х и более тест-ферментов.

4.2. В состав БК-СФБТС входит 10 специфических ферментных биотест-систем *in vitro*: 4 первичных и 6 вторичных (см. Реестр СФБТС).

СОП контроля качества	СОП – 02.01.055.2024, версия 1
СОП контроля качества единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 4/5

4.3. Стандартная процедура контроля качества единиц хранения:

4.4. Куратор БК или руководитель структурного подразделения для обеспечения воспроизводимости специфических фармакологических свойств БАВ с применением специфических ферментных биотест-систем *in vitro* (см. Реестр СФБТС) организуют:

4.4.1. один раз в 2 года при соблюдении условия хранения тест-ферментов (указаны в спецификациях на продукт) проведение оценки качества сохраняемых ферментов, путем определения ферментативной активности стандартных образцов с известной биологической активностью по описанным в соответствующих СОП методикам (СОП 01.01.049.2024, СОП 02.01.050.2024, СОП 02.01.052.2024, СОП 02.01.057.2024, СОП 02.01.051.2024, СОП 02.01.053.2024, СОП 02.01.048.2024);

4.4.2. один раз в год проводят поверку и калибровку оборудования: биохимического анализатора, спектрофотометра, рН-метров, весов и других приборов, используемых для работы, с получением подтверждающих документов, которые хранятся в папках к соответствующему прибору;

4.5. используют в работе высокоочищенные ферменты фирмы Merck KGaA (Германия) или Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd. (Индия) с обязательным наличием подтверждающего качество сертификата анализа на фермент:

- каталаза из бычьей печени (CAS 9001-05-2), лиофилизированный порошок, 2,000-5,000 ед/мг белка;

- глутатионтредуктаза из пекарских дрожжей (*S. cerevisiae*) (CAS 9001-48-3), суспензия в сульфате аммония, 100-300 ед/ мг белка;

- NO-синтаза, индуцибельная, мышьяная, рекомбинантная, экспрессированная в *E.coli* (CAS 125978-95-2), в буферном растворе, $\geq 2,9$ ед/ мг белка;

- пируваткиназа, рекомбинантная из мышц кроликов (CAS 9001-59-6), тип III, лиофилизированный порошок, 350-600 ед/ мг белка;

- лактатдегидрогеназа, (CAS 9001-60-9), тип II, суспензия в сульфате аммония, 800-1,200 ед/ мг белка.

4.5.2. реактивы марки ХЧ или ЧДА с обязательным сертификатом анализа на каждый реактив. Условия хранения реактивов должны соответствовать нормам, установленным в соответствующих нормативных документах.

СОП контроля качества	СОП – 02.01.055.2024, версия 1
СОП контроля качества единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>	Стр. 5/5

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Лист ознакомления сотрудников со стандартной операционной процедурой

№№ п/п	Фамилия И.О.	Ознакомлен(а)	Дата ознакомления с СОП	Подпись
1.	Лупанова И.А.			
2.	Ферубко Е.В.			
3	Тимохина А.С.			