

Особенности методического подхода к определению специфической активности интерферона альфа типа

М. Л. Байкова, И. М. Щербаченко*, Л. А. Гайдерова, О. Б. Устинникова, А. А. Мовсесянц

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

Для препаратов интерферона альфа типа (ИФН) одним из наиболее значимых показателей, характеризующих их фармацевтическое качество и фармакологическую эффективность, является специфическая противовирусная активность. Для определения специфической активности используют биологический метод количественного определения противовирусной активности на культуре клеток. **Цель работы:** выбор наиболее оптимальных условий проведения анализа по определению специфической активности препаратов ИФН *in vitro*. **Материалы и методы:** количественное определение специфической противовирусной активности проводили с использованием культур клеток гомологичного и гетерологичного происхождения: Vero; MDBK; Hep-2; A-549 и вирусов: везикулярного стоматита (VSV), штамм Индиана, и энцефаломиокардита мышей (EMC) в дозе 100 ТЦД₅₀/0,1 мл. В качестве образцов ИФН использовали международный стандарт активности рекомбинантного интерферона альфа-2b (Interferon alpha 2b, human, rDNA, *E. coli*-derived 2nd WHO International Standard 1999 NIBSC, code № 95/566) и интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный, субстанция-раствор (серия 040214, ООО «Фармапарк», Россия). **Результаты:** анализ полученных данных позволил определить наиболее чувствительные к действию ИФН комбинации клеточных линий и индикаторного вируса, оптимальную концентрацию эмбриональной сыворотки в среде и временные параметры, предпочтительный способ учета результатов испытания. **Выводы:** выбраны оптимальные условия проведения анализа по определению специфической активности препаратов ИФН — наиболее чувствительными к интерферону альфа являются комбинации клеточная культура/вирус: клетки MDBK/вирус VSV и клетки Hep-2/вирус EMC; время инкубирования интерферона с клеточной культурой — 24 ч; концентрация эмбриональной телячьей сыворотки в питательной среде, используемой для разведений препаратов интерферона, — 2–5%. При учете результатов исследования противовирусной активности интерферона более предпочтительным является инструментальный способ как более современный, объективный, точный и менее трудоемкий.

Ключевые слова: интерферон альфа; оценка качества; биологический метод; специфическая противовирусная активность

Для цитирования: Байкова МЛ, Щербаченко ИМ, Гайдерова ЛА, Устинникова ОБ, Мовсесянц АА. Особенности методического подхода к определению специфической активности интерферона альфа типа. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(1):68–73. https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-68-73

Контактное лицо: Щербаченко Ирина Михайловна; Sherbachenko@expmed.ru

Aspects of a Methodological Approach to Determination of Interferon Alpha Specific Activity

M. L. Baykova, I. M. Shcherbachenko*, L. A. Gayderova, O. B. Ustinnikova, A. A. Movsesyants

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

Specific antiviral activity is one of the key indicators characterising pharmaceutical quality and pharmacological efficacy of interferon alpha products (IFN- α). Specific activity is determined using a bioassay measuring antiviral activity in cell culture. The aim of the study was to select the most appropriate conditions for *in vitro* determination of IFN- α product specific activity. **Materials and methods:** Vero, MDBK, Hep-2, and A-549 homologous and heterologous cell cultures, as well as vesicular stomatitis Indiana virus (VSV) and murine encephalomyocarditis (EMC) virus at a dose of 100 TCD₅₀/0.1 mL were used for determination of specific antiviral activity. The international reference standard of recombinant interferon alpha-2b activity (Interferon alpha 2b, human, rDNA, *E. coli*-derived, 2nd WHO International Standard, 1999, NIBSC Code No. 95/566) and human recombinant interferon alpha 2b in the form of solution (batch No. 040214, Pharmapark LLC, Russia) were used as IFN- α samples. **Results:** the analysis of the obtained data helped to determine: the combinations of cell lines and the indicator virus most sensitive to IFN- α ; the optimal concentration of fetal serum in the medium, and the optimal time parameters; the preferred method of reporting test results. **Conclusions:** the following test conditions were found to be optimal: the MDBK/VSV and Hep-2/EMC combinations proved to be the most sensitive to IFN- α ; the optimal period of interferon and cell culture incubation—24 hours; the optimal concentration of fetal bovine serum in the culture

medium used for diluting interferon products—2–5%. The instrumental procedure is preferred for reporting the results of interferon antiviral activity determination, because it is up-to-date, reliable, accurate and time-efficient.

Key words: interferon alpha (IFN- α); quality control; bioassay; specific antiviral activity

For citation: Baykova ML, Shcherbachenko IM, Gayderova LA, Ustinnikova OB, Movsesyants AA. Aspects of a methodological approach to determination of interferon alpha specific activity. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostics, lechenie = BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2020;20(1):68–73. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-68-73>

Corresponding author: Irina M. Shcherbachenko; Sherbachenko@expmed.ru

Лекарственные препараты, активным компонентом которых является интерферон альфа типа (ИФН), широко представлены на современном фармацевтическом рынке и используются в медицинской практике для лечения вирусных, онкологических и инфекционно-воспалительных заболеваний [1–5]. Согласно информации Государственного реестра лекарственных средств¹ в России зарегистрировано около 50 различных препаратов, активным веществом которых является интерферон, порядка 20% из них составляют лекарственные средства зарубежных производителей.

По технологии получения препараты ИФН делятся на природные (ИФН первого поколения) и рекомбинантные (ИФН второго поколения).

Природные интерфероны получают путем воздействия на лейкоциты здоровых доноров вирусами — индукторами интерферона. Рекомбинантные интерфероны производятся охарактеризованными культурами клеток (бактерий, дрожжей, мlekопитающих), в генетический аппарат которых встроен ген, кодирующий синтез определенного вида интерферона человека².

Появление технологии получения рекомбинантных интерферонов привело к сокращению производства природных препаратов. Это связано в первую очередь с дефицитом и высокой ценностью используемого сырья (донорская кровь). Кроме того, препараты лейкоцитарного происхождения, как и любые другие препараты крови, потенциально небезопасны с точки зрения контаминации. Таким образом, в настоящее время в клинической практике используют в основном рекомбинантные интерфероны, что определяет необходимость совершенствования их производства и оценки качества [6, 7].

Общие требования к оценке качества препаратов ИФН сформулированы в ОФС 1.7.1.0012.18 Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд. (ГФРФ)³. Основными показателями качества, гарантирующими эффективность и безопасность лекарственных средств на основе рекомбинантных ИФН, являются: подлинность, количественное определение специфической противовирусной активности, количественное определение целевого белка, анализ чистоты и идентификация примесей [8].

Наиболее значимой характеристикой эффективности лекарственных средств, содержащих ИФН, является их специфическая активность. От точности определения данного показателя в конечном итоге зависит успешное клиническое использование препарата [9, 10]. Для определения специфической активности используют биологический метод количественного определения противовирусной активности на культуре клеток. Проявление специфической противовирусной активности служит также подтверждением подлинности препарата. Описание данного метода в Государственной фармакопее Российской Федерации и в Европейской фармакопее⁴

содержит общие принципы проведения исследования и носит рекомендательный характер. В связи с этим разные производители используют различные модификации метода и разные способы учета результатов определения специфической противовирусной активности.

Цель работы — установить оптимальные условия проведения анализа по определению специфической активности препаратов интерферона альфа типа *in vitro*.

Задачи исследования:

- сравнительное изучение чувствительности различных клеточных линий к действию интерферона и индикаторного вируса;
- выбор временных параметров и концентрации эмбриональной сыворотки в питательной среде;
- сравнительный анализ различных способов учета результатов испытания.

Материалы и методы

Материалы:

- набор реагентов «Питательная среда DMEM для культуры клеток в комплекте с L-глутамином», Россия; гентамицин, раствор для внутривенного и внутримышечного введения 40 мг/мл, Беларусь;
- сыворотка Fetal Bovine Serum, Sigma-Aldrich Co, США;
- кристаллический фиолетовый, Merck, Германия;
- международный стандарт активности рекомбинантного интерферона альфа-2b (Interferon alpha 2b, human, rDNA, *E. coli*-derived 2nd WHO International Standart 1999 NIBSC, code № 95/566) (МСО ИФН альфа-2b);
- интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный, субстанция-раствор (серия 040214, ООО «Фармапарк», Россия);
- линии культур клеток гомологичного и гетерологичного происхождения: Vero — перевиваемая культура клеток почек африканской зеленой мартышки; MDBK — перевиваемая культура почек крупного рогатого скота; Нер-2 — перевиваемая линия эпидермоидной карциномы горлани человека; А-549 — перевиваемая линия карциномы легкого человека из коллекции ФГУП «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского», ООО «БиоЛоТ», Россия;
- вирус везикулярного стоматита (VSV), штамм Индиана, из Государственной коллекции вирусов ФГУП «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» № 29 в дозе 100 ТЦД₅₀/0,1 мл;
- вирус энцефаломиокардита мышей (ЕМС) (ТС адаптированного) в дозе 100ТЦД₅₀/0,1 мл из коллекции ФГБУ «48 ЦНИИ Минобороны России».

Оборудование:

- CO₂-инкубатор JOUAN IG 150;
- шкаф ламинарный БАВп-01-1,2;

¹ <https://grls.rosminzdrav.ru>

² Ершов ФИ, Киселев ОИ. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). М.: ГЭОТАР-Медиа; 2005.

³ Общая фармакопейная статья 1.7.1.0012.18 Интерфероны. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁴ 5.6. Assay of interferons. European Pharmacopoeia 9.2; 2016.

- камера Горяева для счета форменных элементов крови (ООО «МиниМедПром», Россия);
- микроскоп инвертированный ID-03 Opton Feintechnik;
- анализатор фотометрический микропланшетный, Bio-Rad, Венгрия.

Методы

Определение специфической активности основано на способности интерферона подавлять цитопатическое действие индикаторного вируса в культуре клеток. Описание методики приведено в ГФ РФ⁵.

Определение специфической активности препаратов интерферона проводили на монослое культур клеток, полученном при температуре (37 ± 1) °C в атмосфере с (5,0 ± 0,5)% CO₂ в лунках 96-луночных плоскодонных культуральных планшетов.

Готовили серию разведений испытуемого препарата (ИП) и МСО на 4 разведения выше и ниже предполагаемого титра активности. За титр принимали величину, обратную разведению.

Возможно внесение ИП и МСО в лунки планшета до внесения культуры клеток. В этом случае клеточный монослой будет формироваться с внесенным интерфероном.

Далее планшеты с культурой клеток и внесенными в них разведениями ИП и МСО инкубировали в течение 24–48 ч при температуре (37 ± 1) °C в атмосфере с (5,0 ± 0,5)% CO₂. Затем в каждую лунку с ИП и соответствующим МСО вносили вирусную супензию, содержащую рассчитанную заранее дозу индикаторного вируса 100 ТЦД₅₀/0,1 мл.

Для контроля дозы индикаторного вируса оставляли 16 лунок с культурой клеток, а для контроля состояния монослоя клеток — 4 лунки. В эти 20 лунок вносили поддерживающую среду.

После внесения индикаторного вируса 96-луночный планшет инкубировали в течение 24–48 ч в стандартных условиях. Инкубацию прекращали при появлении цитопатического действия в монослое клеток с индикаторным вирусом в дозе 1 ТЦД₅₀/0,1 мл.

Результаты испытания подлежали учету, если выполнялись следующие условия:

- отсутствует дегенерация клеточного монослоя в лунках с контролем клеток и в лунках индикаторного вируса с 0,1 ТЦД₅₀/0,1 мл;
- доза внесенного вируса составляет 100 ТЦД₅₀/0,1 мл.

Учет активности интерферона осуществляли визуально или инструментально.

Визуальный учет активности интерферона производили микроскопически при 100-кратном увеличении через 24–48 ч после внесения индикаторного вируса. За титр интерферона принимали величину, обратную разведению препарата, при котором клеточная культура в 50% лунок полностью защищена от цитопатического действия вируса.

Титр интерферона вычисляли методом Спирмена—Кербера по формуле (1):

$$\log_2 ED_{50} = D_{\max} + \frac{d}{n} \left(p - \frac{n}{2} \right)^2, \quad (1)$$

где D_{\max} — двоичный логарифм разведения, ниже значения которого произошла 100% защита;

- d — двоичный логарифм интервала между разведениями (равен 1,0);
- n — число лунок на каждую дозу (равно 4);
- p — число лунок, в которых была обеспечена защита в разведении, ниже значения которого произошла 100% защита, и последующих разведений.

Противовирусную активность интерферона (A_x) в исследуемом образце в МЕ вычисляли по формуле (2):

$$A_x = \frac{A_{\text{MCO}}}{a_{\text{MCO}}} a_x, \quad (2)$$

где A_{MCO} — противовирусная активность МСО интерферона в МЕ; a_x — титр ИП; a_{MCO} — титр МСО.

Возможен также инструментальный способ учета результатов с использованием селективного окрашивания живых клеток, защищенных интерфероном от действия вируса, элюирования красителя, фотометрирования оптической плотности элюата и последующей компьютерной обработки результатов.

Результаты исследования снижения цитопатического эффекта в основном соответствовали сигмоидальному графику «доза–ответ», когда функция представлена графически — концентрация интерферона (логарифм обратной величины разведения интерферона) к поглощению красителя. Строили график функции концентрации интерферона (логарифм обратной величины разведения) к поглощению красителя для стандартных и исследуемых образцов. Используя линейный участок графика, рассчитывали концентрацию интерферона в образце путем сравнения реакций для растворов стандартного и исследуемого образцов, применяя обычные статистические методы параллельного анализа⁶.

Статистическую обработку проводили общепринятыми методами, применимыми для нормального распределения результатов [11].

Результаты и обсуждение

Важнейшим условием эффективности определения специфической противовирусной активности ИФН является выбор наиболее чувствительной к действию интерферона комбинации клеточной культуры и индикаторного вируса [6, 7]. Для проведения сравнительного изучения чувствительности нескольких клеточных линий к действию интерферона и индикаторного вируса в работе использовали следующие комбинации клеточная культура/вирус: MDBK/VSV, Vero/VSV, Нер2/VSV, Vero/EMC, Нер-2/EMC. Вирус-индикатор вносили в дозе 100 ТЦД₅₀/0,1 мл. В качестве образца интерферона использовали МСО ИФН альфа-2b. Определяли количество интерферона, при котором клеточная культура в 50% лунок полностью защищена от цитопатического действия вируса в лабораторных единицах (ЛЕ), где лабораторная единица — это величина, обратная разведению интерферона.

Результаты изучения чувствительности исследуемых клеточных линий и индикаторного вируса к действию интерферона альфа представлены на рисунке 1.

⁵ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0002.15 Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁶ Там же.

Как показано на рисунке 1, наиболее чувствительными к интерферону альфа оказались следующие комбинации клеточной культуры и вируса:

- клетки MDBK/вирус VSV;
- клетки Hep-2/вирус EMC.

Полученные результаты подтверждают имеющиеся в литературе данные [6–10] и согласуются с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации.

Как известно, активность ИФН зависит от времени его инкубации с клеточной культурой [2, 4, 6, 7]. В работе было изучено влияние времени инкубирования интерферона с культурой клеток на величину проявляемой противовирусной активности (рис. 2). Использовали перевиваемую культуру клеток (MDBK) почек крупного рогатого скота. Концентрация клеток, вносимая в микропланшет, составляла $2,0 \times 10^4$ клеток/0,1 мл. В качестве испытуемого образца использовали МСО ИФН альфа-2b, в качестве индикаторного вируса — вирус везикулярного стоматита (VSV), штамм Индиана.

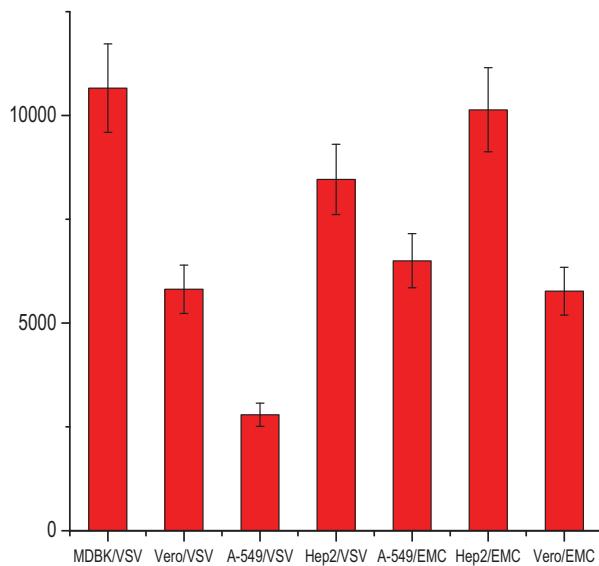


Рис. 1. Чувствительность исследуемых клеточных линий и индикаторного вируса к действию интерферона альфа типа ($n = 10$). Vero — перевиваемая культура клеток почек африканской зеленой мартышки; MDBK — перевиваемая культура клеток почек крупного рогатого скота; Hep-2 — перевиваемая линия клеток эпидермоидной карциномы горлани человека; A-549 — перевиваемая линия клеток карциномы легкого человека; VSV — вирус везикулярного стоматита, штамм Индиана, в дозе 100 ТЦД₅₀/0,1 мл; EMC — вирус энцефаломиокардита мышей (TC адаптированного). Вертикальные отрезки (рис. 1–3) — доверительный интервал для среднего значения при нормальном распределении. Ось абсцисс — наименование клеточной линии; ось ординат — противовирусная активность, ЛЕ.

Fig. 1. The sensitivity of the studied cell lines and indicator virus to interferon alpha ($n = 10$). Vero—a continuous cell culture derived from African green monkey kidney; MDBK—a continuous cell culture derived from bovine kidney; Hep-2—a continuous cell line of human laryngeal epidermoid carcinoma cells; A-549—a continuous cell line from human lung carcinoma; VSV—vesicular stomatitis Indiana virus at a dose of 100 TCD₅₀/0.1 mL; EMC—murine encephalomyocarditis (tissue culture adapted). X-axis—cell line; Y-axis—antiviral activity (LSU).

В микропланшеты вносили двукратные разведения МСО ИФН альфа-2b в питательной среде в объеме 0,1 мл и 0,1 мл вирусной суспензии в дозе 100 ТЦД₅₀. Разведения МСО ИФН альфа-2b вносили в лунки планшета как до внесения культуры клеток, так и в сформированный в течение 24 ч монослой клеток. Определяли количество интерферона, при котором клеточная культура в 50% лунок полностью защищена от цитотоксического действия вируса. Учет проводили сразу после добавления вируса, через 2 и 24 ч от начала опыта.

Результаты исследования показали, что активность интерферона при минимальной экспозиции, т. е. сразу после внесения интерферона в культуру клеток, в 3 раза ниже, чем при времени экспозиции 24 ч. Полученные результаты подтверждают, что увеличение продолжительности контакта интерферона с клетками увеличивает их резистентность к последующему заражению вирусом. Оптимальная резистентность клеток к вирусу достигается при инкубировании интерферона на культуре клеток в течение 24 ч.

Антисорбционное действие белков эмбриональной телячьей сыворотки на содержащийся в препаратах интерферон хорошо известно. Данный факт необходимо учитывать при разведении интерферона, предусматривая наличие в среде для разведения определенного количества сыворотки⁷.

Было проведено сравнительное изучение зависимости уровня противовирусной активности интерферона от количества эмбриональной телячьей сыворотки в среде титрования.

Испытания проводили на сформированном монослое культуры клеток MDBK с концентрацией $2,0 \times 10^4$ клеток в лунке, в качестве индикаторного вируса использовали вирус везикулярного стоматита, штамм Индиана, в дозе 100 ТЦД₅₀/0,1 мл. Результаты исследования представлены на рисунке 3.

В ходе исследования установлено, что активность интерферона при разведении его в среде, не содержащей сыворотку, в два раза ниже, чем в присутствии сыворотки. При этом увеличение содержания сыворотки в питательной среде до 10% не влияет на результаты определения активности интерферона.

Таким образом, оптимальной концентрацией эмбриональной телячьей сыворотки в питательной среде, используемой для разведений препаратов интерферона, можно считать 2–5%.

При сравнительном анализе способов учета результатов испытания использовали перевиваемую культуру клеток MDBK. Концентрация клеток, вносимых в микропланшет, составляла $2,8 \times 10^4$ клеток/0,1 мл. Использовали вирус VSV в дозе 100 ТЦД₅₀/0,1 мл. В качестве испытуемого образца использовали интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный, субстанция-раствор в концентрации 3×10^6 ЕД/мл и МСО ИФН альфа-2b в концентрации 550 ЕД/мл.

Учет результатов проводили визуально, затем инструментально. Визуальный учет проводили общепринятым микроскопическим методом⁸. Для инструментального способа учета в качестве красителя использовали 0,5% спиртовой раствор кристаллического фиолетового. Краситель в количестве 50 мкл вносили в лунки культурального планшета, затем при комнатной температуре выдерживали 10 мин, удаляли и промывали лунки очищенной водой до полного исчезновения красителя в смывной воде, просушивали, вносили в качестве элюата 70% раствор этилового спирта

⁷ Ершов ФИ, Киселев ОИ. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). М.: ГЭОТАР-Медиа; 2005.

⁸ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0002.15 Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

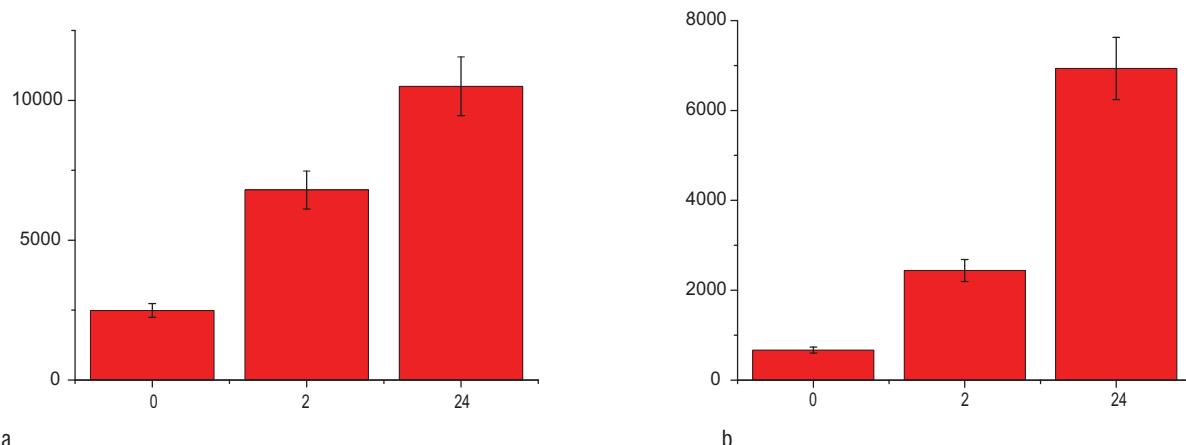


Рис. 2. Влияние времени инкубирования клеточной культуры в присутствии интерферона альфа на результаты определения противовирусной активности ($n = 7$): а — противовирусная активность ИФН-альфа при внесении в сформированный монослой культур клеток; б — противовирусная активность ИФН-альфа при внесении в суспензию культур клеток. Ось абсцисс — время инкубирования, ч; ось ординат — противовирусная активность, ЛЕ.

Fig. 2. The effect of the incubation period of the cell culture with interferon alpha on the results of antiviral activity determination ($n = 7$): a—IFN-alpha antiviral activity upon inoculation into the cell culture monolayer; b—IFN-alpha antiviral activity upon inoculation into the cell culture suspension. X-axis—incubation period, h; Y-axis—antiviral activity, LSU.

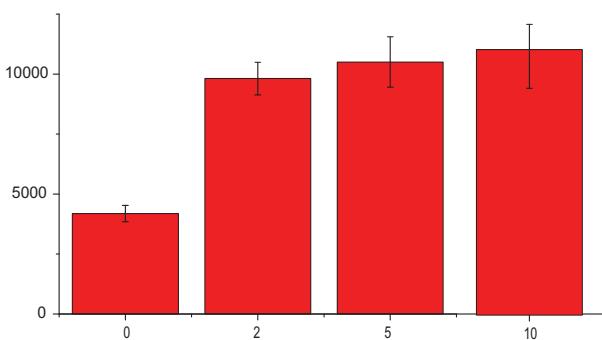


Рис. 3. Влияние состава среды титрования на противовирусную активность интерферона ($n = 7$). Ось абсцисс — концентрация сыворотки в среде, %; ось ординат — противовирусная активность, ЛЕ.

Fig. 3. The effect of the titration medium composition on the antiviral activity of interferon ($n = 7$). X-axis—serum concentration in the medium, %; Y-axis—antiviral activity, LSU.

в количестве 0,1 мл, перемешивали на шейкере в течение 30 мин. Проводили измерение оптической плотности содержимого лунок на фотометрическом микропланшетном анализаторе при длине волн 595 нм. На основании этих данных строили графики зависимости оптической плотности от двоичного логарифма разведений, используя компьютерную программу OringinPro 9.1. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Как показано в таблице 1, значения величин противовирусной активности, полученные при визуальном и инструментальном способах учета результатов, не имеют достоверных различий, но визуальный (микроскопический) способ учета является гораздо более субъективным, требует участия специалиста, имеющего большой опыт работы с микроскопическими методами исследования. Таким образом, более предпочтительным является инструментальный способ учета как более объективный, современный и в конечном счете менее трудоемкий.

Таблица 1. Сравнительная оценка результатов определения противовирусной активности интерферона альфа при визуальном и инструментальном способах учета первичных данных
Table 1. The results of antiviral activity determination using the visual and instrumental methods of primary data reporting

№ п/п No.	Способ учета Reporting method	
	визуальный, МЕ/мл visual, IU/mL	инструментальный*, МЕ/мл instrumental*, IU/mL
1	$5,4 \times 10^8$	$4,9 \times 10^8$
2	$5,4 \times 10^8$	$5,7 \times 10^8$
3	$4,9 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$
4	$5,4 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$
5	$4,9 \times 10^8$	$4,5 \times 10^8$
6	$4,9 \times 10^8$	$4,5 \times 10^8$
7	$4,9 \times 10^8$	$5,0 \times 10^8$
8	$4,2 \times 10^8$	$5,7 \times 10^8$
9	$4,3 \times 10^8$	$5,0 \times 10^8$
10	$4,7 \times 10^8$	$4,6 \times 10^8$

*С помощью программы OringinPro 9.1.

*Using the OringinPro 9.1 software.

Выводы

1. Сравнительное изучение нескольких клеточных линий к действию ИФН и индикаторного вируса выявило, что наиболее чувствительными являются следующие комбинации клеточной культуры/вируса: клетки MDBK/вирус VSV и клетки Нер-2/вирус EMC.

2. Оптимальное время инкубирования интерферона с клеточной культурой — 24 ч. Оптимальная концентрация эмбриональной телячьей сыворотки в питательной среде, используемой для разведений препаратов интерферона, — 2–5%.

3. Значения величин противовирусной активности, полученные при визуальном и инструментальном (микроскопическом) способах учета результатов, не имеют достоверных различий. Однако более предпочтительным является инструментальный способ как более объективный, современный точный и менее трудоемкий.

Вклад авторов. **М.Л. Байкова** — концепция и дизайн исследования, экспериментальная работа; **И.М. Щербаченко** — идея, интерпретация данных, написание текста; **Л.А. Гайдерова** — обобщение экспериментальных данных, доработка текста; **О.Б. Устинникова** — написание и доработка текста; **А.А. Мовсесянц** — окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. **Marina L. Baykova**—research concept and design, experimental work; **Irina M. Shcherbachenko**—idea, interpretation of research results, writing the text; **Lidia A. Gayderova**—integration of experimental data, revising the text; **Olga B. Ustinnikova**—writing, revising the text; **Artashes A. Movsesyan**—final approval of the version to be published.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-0003-20-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-0003-20-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. AAAA-A18-118021590049-0).

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

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература/References

- Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE. Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem*. 1987;56:727–77. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.003455>
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:227–64. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.227>
- Biron CA. Interferons alpha and beta as immune regulators — a new look. *Immunity*. 2001;14(6):661–4. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(01\)00154-6](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(01)00154-6)
- Quesada JR, Guterman JU, Hersh EM. Treatment of hairy cell leukemia with alpha interferons. *Cancer*. 1986;57(8 Suppl):1678–80. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19860415\)57:8<1678::aid-cncr2820571308>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19860415)57:8<1678::aid-cncr2820571308>3.0.co;2-6)
- Baron S, Tyring SK, Fleischmann WR Jr, Coppenhaver DH, Niesel DW, Klimpel GR, et al. The interferons. Mechanisms of action and clinical applications. *JAMA*. 1991;266(10):1375–83. <https://doi.org/10.1001/jama.266.10.1375>
- Larocque L, Bliu A, Xu Ranran, Diress A, Wang J, Lin R, et al. Bioactivity determination of native and variant forms of therapeutic interferons. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:174615. <https://doi.org/10.1155/2011/174615>
- Meager A, Gaines Das R, Zoon K, Mire-Sluis A. Establishment of new and replacement World Health Organization International Biological Standards for human interferon alfa and omega. *J Immunol Methods*. 2001;257(1–2):17–33. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(01\)00460-4](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(01)00460-4)
- Авдеева ЖИ, Алпатова НА, Солдатов АА, Бондарев ВП, Бунятыан НД, Меркулов ВА и др. Особенности доклинических исследований биотехнологических лекарственных препаратов. *Иммунология*. 2015;36(5):306–12. [Avdeeva ZhI, Alpatova NA, Soldatov AA, Bondarev VP, Bunyatyany ND, Merkulov VA, et al. Features of preclinical studies of biotechnological medicines. *Immunologiya = Immunology*. 2015;36(5):306–12 (In Russ.)]
- Meager A. Assays for antiviral activity. *Methods Mol Biol*. 2004;249:121–34. <https://doi.org/10.1385/1-59259-667-3:121>
- Алпатова НА, Авдеева ЖИ, Солдатов АА, Бондарев ВП, Медуницын НВ. Принципы оценки специфической активности биотехнологических лекарственных препаратов. *Цитокины и воспаление*. 2015;14(3):10–8. [Alpatova NA, Avdeeva ZhI, Soldatov AA, Bondarev VP, Medunitsyn NV. Principles of assessment of biotechnological medicines specific activity. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*. 2015;14(3):10–8 (In Russ.)]
- Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М.: Практика; 1998. [Glanz S. *Biomedical statistics*. Moscow: Praktika; 1998 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Байкова Марина Леонидовна. *Marina L. Baykova*. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9889-4038>

Щербаченко Ирина Михайловна, канд. биол. наук. *Irina M. Shcherbachenko*, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9378-3312>

Гайдерова Лидия Александровна, канд. мед. наук. *Lidia A. Gayderova*, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6176-5934>

Устинникова Ольга Борисовна, канд. биол. наук. *Olga B. Ustinnikova*, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5432-1887>

Мовсесянц Арташес Авакович, д-р мед. наук, проф. *Artashes A. Movsesyan*, Dr Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>

Поступила 05.09.2019

После доработки 31.10.2019

Принята к публикации 14.02.2020

Received 5 September 2019

Revised 31 October 2019

Accepted 14 February 2020