




Аттестация фармакопейного стандартного образца для оценки специфической активности рекомбинантного интерферона α -2b

Л.А. Гайдерова , Ю.Н. Лебедева, Т.Н. Лобанова, Э.К. Липатова, Р.А. Волкова, О.В. Фадейкина

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

✉ Гайдерова Лидия Александровна; gaiderova@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ. Методика определения специфической активности рекомбинантных интерферонов предусматривает использование стандартного образца в качестве меры сравнения. Доступность международного стандартного образца (МСО), обычно используемого для оценки качества препаратов указанного типа, в настоящее время ограничена, в связи с чем при оценке качества интерферонов целесообразно применять фармакопейные стандартные образцы (ФСО), которые предварительно аттестуют с использованием МСО при их наличии.

ЦЕЛЬ. Аттестация фармакопейного стандартного образца для оценки специфической активности рекомбинантного интерферона α -2b.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Определение специфической активности проводили в реакции подавления интерфероном цитопатического действия вируса на культуре клеток в сравнении с активностью МСО интерферона α -2b (WHO International Standard Interferon alpha 2b (Human, rDNA derived)). В исследовании использовали клетки линий A549 и MDBK в комбинации с вирусами везикулярного стоматита (VSV) и энцефаломиокардита (ЕМС). Исследование проводили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ОФС.1.7.2.0002.15). Учет результатов осуществляли инструментальным и визуальным методами. При расчетах использовали методы математической статистики; учет влияния факторов промежуточной прецизионности проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ. В соответствии с разработанной программой и методикой аттестации проведена аттестация ФСО человеческого рекомбинантного интерферона α -2b (ФСО чРИФН- α -2b), предназначенного для оценки качества соответствующего препарата по показателям «Специфическая активность» (определение противовирусной активности на культуре клеток), «Подлинность» (реакция нейтрализации). Входной контроль кандидата в ФСО по показателям спецификации подтвердил его соответствие требованиям нормативной документации. По результатам испытаний установлено значение специфической активности ФСО: $4,47 \times 10^8$ МЕ/мл, расширенная неопределенность: $8,12 \times 10^7$ МЕ/мл (коэффициент охвата 2, уровень доверия ~95%). Срок годности ФСО чРИФН- α -2b установлен по сроку годности соответствующего препарата при хранении при температуре не выше минус 40 °С. Допускается хранение размороженного ФСО при температуре 2–8 °С в течение 1 мес.

ВЫВОДЫ. Аттестован ФСО для оценки специфической активности рекомбинантного интерферона α -2b. По результатам аттестации ФСО включен в Реестр фармакопейных стандартных образцов Государственной фармакопеи Российской Федерации с реестровым номером ФСО.3.2.00455 и наименованием «Интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный (специфическая активность)». Внедрение аттестованного ФСО

чРИФН- α -2b позволит проводить оценку качества всех отечественных препаратов интерферона указанного типа по показателям «Специфическая активность», «Подлинность» на надлежащем научно-методическом уровне и обеспечит независимость отечественных производителей и органов контроля качества препаратов от импорта МСО.

Ключевые слова: рекомбинантный интерферон α -2b; чРИФН- α -2b; специфическая активность; противовирусная активность; фармакопейный стандартный образец; ФСО; аттестация ФСО; расширенная неопределенность

Для цитирования: Гайдерова Л.А., Лебедева Ю.Н., Лобанова Т.Н., Липатова Э.К., Волкова Р.А., Фадейкина О.В. Аттестация фармакопейного стандартного образца для оценки специфической активности рекомбинантного интерферона α -2b. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(1):21–31. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-21-31>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200103-5).

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

Certification of a pharmacopoeial reference standard for potency testing of recombinant interferon α -2b

Lidia A. Gaiderova✉, Yulia N. Lebedeva, Tatiana N. Lobanova, Elvira K. Lipatova, Rauza A. Volkova, Olga V. Fadeikina

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

✉ Lidia A. Gaiderova; gaiderova@expmed.ru

ABSTRACT

SCIENTIFIC RELEVANCE. Potency testing of recombinant interferons requires a reference standard. The availability of International Standards (ISs) that are commonly used to assess the quality of recombinant interferons is currently limited. Therefore, the quality of interferons should be assessed using pharmacopoeial reference standards (RSs) certified using ISs (if available).

AIM. This study aimed to certify a pharmacopoeial RS for potency testing of recombinant interferon α -2b.

MATERIALS AND METHODS. The potency determination involved comparing the inhibition of the virus-induced cytopathic effect observed in cell culture with the candidate RS and the WHO International Standard for Human rDNA-derived interferon α -2b. The study used A-549 and MDBK cell lines with encephalomyocarditis (EMC) and vesicular stomatitis (VSV) viruses. The authors followed the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (Cell-Culture Bioassays for Interferon Products, OFS.1.7.2.0002.15). The results were recorded using instrumental and visual methods. The calculations used mathematical statistics. To factor in the influence of intermediate precision, the authors applied Student's *t*-test.

RESULTS. The authors developed a certification programme and procedure and certified the pharmacopoeial RS for recombinant human interferon α -2b (rhIFN α -2b) to identify the corresponding medicinal products (by virus neutralisation) and test their potency (by antiviral activity in cell culture). Upon receipt, the candidate RS was verified for compliance with regulatory specifications. According to the test results, the potency of the candidate pharmacopoeial RS was 4.47×10^8 IU/mL, and the expanded uncertainty was 8.12×10^7 IU/mL, with a coverage factor of $k=2$ and a confidence level of 95%. The pharmacopoeial RS for rhIFN α -2b was considered to have the same shelf-life period as the corresponding medicinal products if stored at a temperature not higher than -40°C . When thawed, the pharmacopoeial RS for rhIFN α -2b can be stored at a temperature of $2-8^\circ\text{C}$ for up to 1 month.

CONCLUSIONS. Upon certification for potency testing, the pharmacopoeial RS for rhIFN α -2b has been included in the Register of Reference Standards of the Russian Pharmacopoeia as Recombinant Human Interferon α -2b (Potency) FSO.3.2.00455. The introduction of this pharmacopoeial RS will help to conduct the identification and potency testing of all Russian interferon α -2b products at an appropriate scientific and methodological level. As a result, Russian pharmaceutical manufacturers and quality control agencies will no longer depend on imported ISs.

Keywords: recombinant interferon α -2b; rhIFN α -2b; potency; antiviral activity; pharmacopoeial reference standard; reference standard certification; expanded uncertainty

For citation: Gaiderova L.A., Lebedeva Yu.N., Lobanova T.N., Lipatova E.K., Volkova R.A., Fadeikina O.V. Certification of a pharmacopoeial reference standard for potency testing of recombinant interferon α -2b. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(1):21–31. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-21-31>

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00026-24-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D reporting No. 124022200103-5).

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

Введение

Стандартные образцы (СО) выполняют важную роль в системе производства и обеспечения качества биотехнологических лекарственных препаратов (БТЛП). Они служат мерой сравнения при оценке показателей качества при контроле готовой и промежуточной продукции, а также при стандартизации методов контроля в научно-исследовательских и контролирующих организациях, что позволяет оценивать сопоставимость результатов в различных лабораториях, выпускать качественную продукцию и обеспечивать безопасность и эффективность биологических препаратов при их клиническом применении [1–4].

При производстве и контроле качества БТЛП применяют международные стандартные образцы (МСО) Всемирной организации здравоохранения¹ [5]. Однако МСО имеют высокую стоимость, а кроме того, их производят в ограниченном количестве, что снижает доступность МСО, особенно в условиях санкций в отношении Российской Федерации. В связи с этим для оценки качества при производстве и испытании БТЛП для подтверждения их соответствия требованиям нормативной документации (НД) целесообразно применять вторичные СО, аттестацию которых проводят с использованием МСО, например фармакопейные стандартные образцы (ФСО) [5–7]. В свою очередь, ФСО

также могут быть использованы для аттестации стандартного образца предприятия (СОп).

Аттестация СО – исследование, имеющее целью определение значений метрологических характеристик в соответствии с программой и методикой аттестации, с последующим включением полученных результатов в паспорт СО [6]. В соответствии с требованиями международных² и российских³ стандартов первоочередной этап определения значений аттестуемых характеристик СО – разработка программы и методики аттестации. Аттестуемая характеристика СО БТЛП, как правило, – это показатель специфической активности, титр или концентрация микроорганизмов, содержание активного действующего компонента. Необходимые характеристики СО – однородность, стабильность и срок годности [6].

Ранее авторами данной статьи была проведена разработка отраслевого СО для оценки специфической активности препаратов лейкоцитарного интерферона альфа (ИФН- α) [7]. В настоящее время препараты указанной группы сняты с производства и все больше используются рекомбинантные БТЛП, активным компонентом которых являются цитокины и, в частности, ИФН [8]. В Российской Федерации зарегистрировано 23 отечественных препарата на основе человеческого рекомбинантного интерферона-альфа-2b (чрИФН- α -2b)⁴, которые используются

¹ Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards. Annex 2. WHO Technical Report Series, No. 932. WHO; 2006.

² ISO Guide 35:2017. Reference materials. Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability. Geneva: ISO; 2017.

³ ГОСТ 8.315-2019. Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения.

ГОСТ Р ИСО 17034-2021. Общие требования к компетентности производителей стандартных образцов.

⁴ Государственный реестр лекарственных средств. <https://grls.rosminzdrav.ru>

для лечения различных заболеваний вирусной этиологии.

Специфическая активность (противовирусная активность) — один из важнейших показателей качества препаратов на основе рекомбинантных интерферонов, который отражает их механизм действия и эффективность. Методика определения этого показателя предусматривает использование культур клеток, чувствительных к ИФН, вируса-индикатора и СО в качестве меры сравнения. Важное условие адекватного определения специфической активности — стандартность всех вышеперечисленных компонентов, в том числе использование различными производителями препаратов ИФН стандартного образца, обеспечивающего единство измерений [8].

В связи с введением международных санкций особую актуальность приобретает разработка и аттестация ФСО для оценки активности чРИФН- α -2b, что позволит обеспечить независимость отечественных производителей и органов контроля качества препаратов от импорта МСО и снижение затрат на производство.

Цель работы — аттестация фармакопейного стандартного образца для оценки специфической активности рекомбинантного интерферона α -2b.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- разработка программы и методики аттестации;
- подтверждение соответствия кандидата в ФСО требованиям НД (входной контроль);
- определение значения аттестованной характеристики ФСО и неопределенности аттестованного значения;
- определение срока годности ФСО;
- разработка сопроводительной документации (проект паспорта, макет этикетки первичной и вторичной упаковки, инструкция по применению ФСО).

Материалы и методы

Материалы

Стандартный образец. МСО чРИФН- α -2b (WHO International Standard: Interferon alpha 2b (Human rDNA derived), NIBSC code: 95/656⁵).

Материал кандидата в фармакопейный стандартный образец. Интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный, безметиониновый — субстанция-раствор концентрированный, замороженный (ФС-001808-280422) производства ООО «Фирн М» (Россия). Дата выпуска — 20.06.2022. Срок годности до 06.2024.

Культуры клеток:

- клеточная линия карциномы легких человека A549 (ATCC, США, кат. № CCL-185) получена из коллекции ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России; клетки поддерживали в рабочей коллекции ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России;
- перевиваемая клеточная линия почки быка MDBK (NBL-1) получена из коллекции ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России; клетки поддерживали в рабочей коллекции ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Для аттестации ФСО рекомендовано использовать 3–30-й пассаж клеток.

Индикаторные вирусы:

- вирус энцефаломиокардита (ЕМС) получен из коллекции ATCC (ATCC, США, кат. № VR 129B); вирус поддерживали на культуре клеток Vero (коллекция ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России);
- вирус везикулярного стоматита (VSV), штамм «Индиана» (№ 29) получен из Государственной коллекции вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского) Минздрава России; вирус поддерживали на культуре клеток MDBK (коллекция ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России).

Реактивы и материалы. В работе использовали следующие основные реактивы: эмбриональная телячья сыворотка (HyClone, США), раствор трипанового синего 0,4% (Macklin, Китай), краситель нафтол сине-черный (Sigma-Aldrich, США), уксусная кислота ледяная (Sigma-Aldrich, США), формальдегид 37% (Sigma-Aldrich, США), натрия ацетат тригидрат (Fisher Chemical, Великобритания), натрия гидроксид (Fisher Chemical, Великобритания), а также реактивы производства ООО НПП «ПанЭко» (Россия): питательная среда DMEM, жидкая без глутамин, с глюкозой (4,5 г/л); L-глутамин; гентамицин, 10 мг/мл; раствор Версена; трипсин-ЭДТА. В работе использовали материалы производства Corning (США): планшеты культуральные 96-, 24-, 12- и 6-луночные стерильные; стерильные пробирки пластиковые конические вместимостью 15 и 50 мл; стерильные пипетки объемом 1, 2, 10, 25 и 50 мл; чашки Петри культуральные стерильные 100 мм.

Оборудование

Холодильник POZIS XF-400-2 (ПАО «СЭЗ им. Серго Орджоникидзе», Россия); морозильник MDF-U 3386S (Panasonic, Япония); CO₂-инкубатор

⁵ <https://nibsc.org/documents/ifu/95-656.pdf>

МСО-15АС (Sanyo Electric, Япония); шкаф ламинарный БАВп-01-1,2 (ЗАО «Ламинные системы», Россия); микроскоп инвертированный EVOS® XL (Thermo Fisher Scientific, США); термощейкер ST-3L (Elmi, Латвия); центрифуга 5804 R (Eppendorf, Германия); дозатор Biohit Midi Plus (Sartorius, Финляндия); камера Горяева (ООО «МиниМед», Россия).

Методы

При аттестации кандидата в ФСО чРИФН- α -2b по показателю «Специфическая активность» исследовали его противовирусную активность биологическим методом в реакции подавления интерфероном цитопатического действия вируса на культуре клеток в соответствии с ОФС.1.7.2.0002.15⁶. Испытания проводили два аналитика в разные дни с использованием различных комбинаций клеток (MDBK, А549) и вирусов (VSV, EMC), чувствительных к ИФН (табл. 1).

Проведение анализа. Каждый образец чРИФН- α -2b анализировали в 4 повторностях (независимые разведения образца вносились в отдельный планшет). Предварительно образцы кандидата в ФСО и МСО разводили до концентрации 100 МЕ/мл.

Далее использовали 3 варианта проведения испытаний, отличающихся применением различных комбинаций вида клеток и вирусов, порядком внесения испытуемых образцов (кандидата в ФСО и МСО) до и после образования монослоя, способом учета результатов:

- 1) *клетки А549, вирус EMC, инструментальный учет* — готовили серию двукратных разведений чРИФН- α -2b в планшете для предварительных разведений, вносили их в 96-луночный планшет с предварительно сформированным монослоем клеток;
- 2) *клетки MDBK, вирус VSV, визуальный учет* — разведение чРИФН- α -2b проводили непосредственно в планшетах с уже сформировавшимся монослоем клеток;
- 3) *клетки MDBK, вирус VSV, инструментальный учет* — образцы разведенного чРИФН- α -2b вносили в планшеты одновременно с суспензией клеток, при этом клеточный монослой формировался в присутствии интерферона.

В каждом варианте оставляли в планшете два ряда с питательной средой для контроля клеток и вируса.

Планшеты инкубировали при 37 °С в течение 24 ч в атмосфере, содержащей (5,0±0,5)% CO₂.

После инкубирования культур клеток и удаления культуральной среды добавляли в лунки по 100 мкл раствора индикаторного вируса в рабочей дозе 100 ТЦД₅₀/0,1 мл (ТЦД₅₀ — тканевая цитопатическая доза вируса, вызывающая гибель 50% клеток). В лунки, предназначенные для контроля клеток и вируса, вносили по 100 мкл поддерживающей среды.

На контрольном планшете предусматривали 16 лунок для подтверждения дозы вируса, в которые вносили по 100 мкл разведений вируса, соответствующих 100, 10, 1 и 0,1 ТЦД₅₀/0,1 мл. Затем планшет инкубировали при 37 °С в течение 24–48 ч в атмосфере, содержащей (5,0±0,5)% CO₂.

Учет и оценка результатов. Результаты испытания подлежали учету, если выполнялись следующие три условия:

- в лунках с контролем клеток, в лунках, содержащих максимальное количество интерферона, и в лунках с индикаторным вирусом в дозе 0,1 ТЦД₅₀/0,1 мл не наблюдается поражения клеточного монослоя вирусом;
- в лунках с клетками без интерфероновой защиты, подвергшимся действию вируса в заражающей дозе 100 ТЦД₅₀, и в лунках, содержащих минимальное количество интерферона, наблюдается полное поражение клеточного монослоя вирусом;
- доза внесенного вируса составляет 100 ТЦД₅₀ в 0,1 мл.

Визуальный учет активности интерферона.

В планшетах с испытуемыми образцами с помощью инвертированного микроскопа подсчитывали число лунок в каждом разведении для тех растворов кандидата в ФСО и МСО, в которых наблюдалась защита клеточного монослоя от цитопатического действия вируса.

Для каждого планшета рассчитывали титр МСО (Т_{МСО}) и кандидата в ФСО (Т_{кФСО}), используя метод Спирмена–Кербера⁷:

$$T_{\text{кФСО}} = 2^{\log_2 ED_{50\text{кФСО}}}, \quad (1)$$

$$T_{\text{МСО}} = 2^{\log_2 ED_{50\text{МСО}}}, \quad (2)$$

$$\log_2 ED_{50} = D_{\text{max}} + \frac{d}{n} \times \left(p - \frac{n}{2} \right), \quad (3)$$

где Т_{кФСО} — титр кандидата в ФСО; Т_{МСО} — титр МСО; ED₅₀ — 50%-ная эффективная доза противовирусной активности; D_{max} — двоичный логарифм фактора разведения, ниже которого наблюдается защита клеток от цитопатического действия вируса (отсутствие признаков деградации

⁶ ОФС.1.7.2.0002.15 Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. Т.2; 2018.

⁷ Там же.

монослоя) в 100% лунок; d — двоичный логарифм шага разведений ($=1$); n — число лунок, приходящееся на каждое разведение; p — число лунок для разведения, соответствующего D_{\max} , и последующих разведений, в которых наблюдается защита клеток от цитопатического действия вируса (отсутствие признаков дегенерации монослоя).

Для каждого рабочего планшета рассчитывали специфическую активность кандидата в ФСО ($A_{\text{кФСО}}$) по формуле:

$$A_{\text{кФСО}} = A_{\text{МСО}} \times \frac{T_{\text{кФСО}}}{T_{\text{МСО}}}, \quad (4)$$

где $A_{\text{кФСО}}$ — специфическая активность кандидата в ФСО; $A_{\text{МСО}}$ — номинальная специфическая активность МСО; $T_{\text{кФСО}}$ — титр кандидата в ФСО; $T_{\text{МСО}}$ — титр МСО.

Специфическую активность образца рассчитывали как среднее арифметическое по всем повторностям.

Инструментальный учет активности интерферона. При выполнении перечисленных ранее трех условий, допускающих учет результатов, по окончании инкубирования проводили окрашивание клеток (краситель нафтол сине-черный), результаты которого регистрировали путем измерения оптической плотности растворов в лунках с использованием планшетного спектрофотометра.

Специфическую активность испытуемых образцов рассчитывали с помощью модели параллельных линий. Принцип ее основан на том, что обычно в интервале применяемых доз количественный ответ связан линейно с логарифмом дозы. По результатам измерения строили графики «доза — ответ», представляющие собой зависимость значений оптической плотности, соответствующих испытуемым образцам кандидата в ФСО и МСО, от логарифма их разведения. Специфическую активность определяли на основе сравнения линий дозозависимости МСО и кандидата в ФСО. Обработку результатов испытаний и расчет величины специфической активности проводили с помощью программного обеспечения PLA 3.0 (Stegmann Systems, Германия). Значение показателя «Специфическая активность» рассчитывали как среднее арифметическое по всем повторностям.

Статистическая обработка результатов. С использованием программы Microsoft Office Excel рассчитывали показатели описательной статистики: среднее арифметическое значение

($X_{\text{ср}}$), стандартное отклонение (S), относительное стандартное отклонение (RSD).

Значение аттестованной характеристики ФСО чРИФН- α -2b представляли в виде:

$$A_{\text{ФСО}} = A_{\text{ср}} \pm U, \quad (5)$$

где $A_{\text{ФСО}}$ — специфическая активность ФСО чРИФН- α -2b; $A_{\text{ср}}$ — среднее арифметическое ($X_{\text{ср}}$) значение показателя «Специфическая активность»; U — расширенная неопределенность, рассчитанная как $\pm 2S$ (два стандартных отклонения результатов испытаний, полученных в условиях промежуточной прецизионности).

Статистическую значимость (или незначимость) различий двух групп данных для оценки возможности объединения экспериментальных данных, полученных при учете влияния факторов промежуточной прецизионности (клетки MDBK, вирус VSV; клетки A549, вирус EMC; инструментальный/визуальный метод учета; аналитик) проводили с помощью t -критерия Стьюдента при уровне значимости $\alpha=0,5$ и соответствующего числа степеней свободы, рассчитываемого по формуле $df = n_1 + n_2 - 2$ [9].

Результаты и обсуждение

В соответствии с разработанной программой и методикой аттестации провели оценку качества (входной контроль) кандидата в ФСО чРИФН- α -2b, а затем испытания его образцов по показателю «Специфическая активность» для установления значения аттестованной характеристики.

Входной контроль кандидата в ФСО на соответствие требованиям НД⁸ проведен согласно спецификации. Показатель «Специфическая активность» определяли с использованием МСО.

Результаты испытаний подтвердили соответствие материала кандидата в ФСО требованиям НД по проверенным показателям качества: описание (визуальный метод), подлинность (методы — реакция нейтрализации противовирусной активности анти-альфа-интерфероновыми антителами, изоэлектрическое фокусирование, пептидное картирование, обращенно-фазовая ВЭЖХ, электрофорез в полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях), прозрачность (визуальный метод), цветность (визуальный метод), pH (потенциометрический метод), белок (метод Лоури), стерильность (метод прямого посева), специфическая активность (определение противовирусной активности на культуре клеток), удельная активность (расчетный метод),

⁸ НД № ФС-001808-280422, Интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный, безметиониновый — субстанция-раствор концентрированный, производства ООО «Фирн М».

Таблица 1. Варианты проведения испытаний кандидата в фармакопейный стандартный образец для оценки специфической активности человеческого рекомбинантного интерферона α -2b
Table 1. Testing arrangement for the candidate pharmacopoeial reference standard for potency testing of human recombinant interferon α -2b

Вариант испытания <i>Test variant</i>	Материал (клетки, вирус) <i>Material (cells, viruses)</i>	Метод учета <i>Recording method</i>	$C_{кл}$, тыс. кл./мл <i>C_{cells}, thousand cells/mL</i>	Время инкубиро- вания клеточной суспензии, ч <i>Incubation time for cell suspensions, h</i>	Доза вносимого вируса, ТЦД ₅₀ /0,1 мл <i>Viral inoculum dose, TCID₅₀/0.1 mL</i>	Индикатор- краситель <i>Indicating dye</i>	Число испытаний <i>Number of tests</i>
1	MDBK, VSV	Инструмен- тальный <i>Instrumental</i>	200	1–1,5	100	Нафтол сине-черный <i>Naphthol blue black</i>	12
2	A549, EMC	Инструмен- тальный <i>Instrumental</i>	250	24	100	Нафтол сине-черный <i>Naphthol blue black</i>	8
3	MDBK, VSV	Визуальный <i>Visual</i>	250	24	100	Без окрашивания <i>No staining</i>	10

Таблица составлена авторами по собственным данным /The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. Варианты испытаний человеческого рекомбинантного интерферона α -2b, чРИФН- α -2b (каждый вариант испытывали по 2 аналитика): 1 – предварительно подготовленная в отдельном планшете серия двукратных разведений чРИФН- α -2b вносится в другой планшет с уже сформированным монослоем клеток; 2 – разведение чРИФН- α -2b непосредственно в планшетах с уже сформировавшимся монослоем клеток; 3 – внесение разведенного чРИФН- α -2b в планшеты одновременно с суспензией клеток, клеточный монослой формируется в присутствии интерферона. Клетки: MDBK – перевиваемая клеточная линия почки быка, A549 – клеточная линия карциномы легких человека; вирусы: VSV – вирус везикулярного стоматита, штамм «Индиана» (№ 29), EMC – вирус энцефаломиокардита (№ VR-129B); $C_{кл}$ – концентрация клеточной суспензии, вносимой в 96-луночный планшет, тыс. клеток на 1 мл (тыс. кл./мл); ТЦД₅₀ – тканевая цитопатическая доза вируса, вызывающая гибель 50% клеток.
Note. Testing arrangement for human recombinant interferon α -2b (rhIFN α -2b), with each test conducted by 2 analysts: 1, serial two-fold dilution of rhIFN α -2b prepared on one plate and inoculated onto another plate with a pre-formed cell monolayer; 2, rhIFN α -2b diluted directly on the plate with a formed cell monolayer; 3, diluted rhIFN α -2b plated simultaneously with the cell suspension forming a monolayer in the presence of rhIFN α -2b. Cells: MDBK, Madin–Darby bovine kidney; A549, adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells. Viruses: VSV, vesicular stomatitis virus, Indiana serotype (National Virus Collection, 29); EMC, encephalomyocarditis virus (ATCC, VR-129B). C, concentration of the cell suspension for inoculation onto 96-cell plates (thousand cells per 1 mL); TCID₅₀, tissue culture infectious dose requires to kill 50% of inoculated cells.

белковые примеси (электрофорез в полиакриламидном геле в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях), родственные примеси (обращенно-фазовая ВЭЖХ).

Испытания кандидата в фармакопейный стандартный образец для оценки показателя «Специфическая активность» и установление значения аттестованной характеристики

Аттестуемой характеристикой является специфическая активность, так как исследуемый кандидат в ФСО чРИФН- α -2b предназначен для оценки специфической (противовирусной) активности препаратов интерферона и выражения ее в международных единицах (МЕ).

Испытания проводили в различных условиях с использованием наиболее часто встречающихся в НД производителей сочетаний клетки/вирус (табл. 1). В испытаниях участвовало 2 аналитика, получено 30 независимых результатов. В таблицах 2 и 3 представлены результаты испытаний и статистической обработки полученных данных.

Проведенный статистический анализ результатов определения специфической активности кандидата в ФСО, полученных

в условиях промежуточной прецизионности (табл. 3), показал, что во всех случаях значения t -критерия Стьюдента, рассчитанные по экспериментальным данным ($t_{эксп}$), меньше критического табличного значения $t_{табл}$ ($df; 0,05$) при уровне значимости 0,05 и соответствующего для каждой сравниваемой групп числа степеней свободы. Это означает, что результаты, полученные разными аналитиками, разными методами с использованием разных культур клеток и вирусов не имеют статистически значимых различий, что позволило объединить все экспериментальные данные и использовать их для расчета значения аттестованной характеристики.

Среднее значение специфической активности ($A_{ФСО}$) исследуемых образцов, стандартное отклонение (S) и относительное стандартное отклонение (RSD) рассчитаны на основе результатов, приведенных в столбце $A_{ср}$ таблицы 2.

Таким образом, значение аттестованной характеристики ФСО чРИФН- α -2b ($A_{ФСО}$), установленное относительно МСО, составило $4,470 \times 10^8$ МЕ/мл, стандартное отклонение (S) – $4,059 \times 10^7$ МЕ/мл, RSD – 9,08%; расширенная неопределенность аттестованного значения

Таблица 2. Результаты определения специфической активности кандидата в фармакопейный стандартный образец человеческого рекомбинантного интерферона α-2b

Table 2. Results of potency testing of the candidate pharmacopoeial reference standard for human recombinant interferon α-2b

№ п/п Item No.	Фактор промежуточной прецизионности (клетки, вирус, метод учета, аналитик) Intermediate precision factor (cell line, virus, result recording method, analyst)	Число образцов, n Number of samples, n	A _{ср} , МЕ/мл Average potency, IU/mL	S, МЕ/мл S, IU/mL	RSD, %
1	MDBK, VSV Инструментальный учет Аналитик 1 MDBK, VSV Instrumental method Analyst 1	n ₁ =6	4,659×10 ⁸	3,637×10 ⁷	7,8
2	MDBK, VSV Инструментальный учет Аналитик 2 MDBK, VSV Instrumental method Analyst 2	n ₂ =6	4,559×10 ⁸	2,279×10 ⁷	5,0
3	A549, EMC Инструментальный учет Аналитик 1 A549, EMC Instrumental method Analyst 1	n ₁ =3	4,644×10 ⁸	4,2×10 ⁷	9,1
4	A549, EMC Инструментальный учет Аналитик 2 A549, EMC Instrumental method Analyst 2	n ₂ =5	4,068×10 ⁸	3,659×10 ⁷	9,0
5	MDBK, VSV Визуальный учет Аналитик 1 MDBK, VSV Visual method Analyst 1	n ₁ =5	4,332×10 ⁸	3,485×10 ⁷	8,04
6	MDBK, VSV Визуальный учет Аналитик 2 MDBK, VSV Visual method Analyst 2	n ₂ =5	4,574×10 ⁸	5,400×10 ⁷	11,8

Таблица составлена авторами по собственным данным /The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. n₁ – число образцов, исследуемых аналитиком 1; n₂ – число образцов, исследуемых аналитиком 2; A_{ср} – среднее арифметическое значение показателя «Специфическая активность»; S – стандартное отклонение значений показателя; RSD – относительное стандартное отклонение; клетки: MDBK – перевиваемая клеточная линия почки быка, A549 – клеточная линия карциномы легких человека; вирусы: VSV – вирус везикулярного стоматита, штамм «Индиана» (№ 29), EMC – вирус энцефаломиокардита (№ VR 129B).

Note. n₁, number of samples tested by analyst 1; n₂, number of samples tested by analyst 2; S, standard deviation; RSD, relative standard deviation. Cells: MDBK, Madin–Darby bovine kidney; A549, human lung adenocarcinoma cells. Viruses: VSV, vesicular stomatitis virus, Indiana serotype (National Virus Collection, 29); EMC, encephalomyocarditis virus (ATCC, VR-129B).

для коэффициента охвата k=2 и уровня доверия ~95% (U=2S) – 8,118×10⁷ МЕ/мл.

Полученные авторами результаты исследования на двух системах клетки/вирус (A549/EMC и MDBK/VSV) полностью подтверждаются данными исследований зарубежных авторов на значительно большем количестве сочетаний клетки/вирус [4], что позволяет использовать аттестованный нами ФСО на любых клетках, чувствительных к рИФН-α-2b.

Оценка стабильности и установление срока годности фармакопейного стандартного образца

Для оценки стабильности размороженного ФСО крИФН-α-2b провели испытания 10 образцов по показателю «Специфическая активность» после их хранения при температуре 2–8 °С в течение 1 мес. Рассчитанные по экспериментальным данным среднее значение активности A_{ср}=4,614×10⁸ МЕ/мл и значения статистических показателей, характеризующих ее неопределенность (S=6,686×10⁷ МЕ/мл,

Таблица 3. Результаты статистического анализа результатов испытаний с t -критерием Стьюдента
Table 3. Statistical analysis of test results using Student's t -test

Метод учета результатов, клетки, вирус, аналитик <i>Result recording method, cell line, virus, analyst</i>	Наименование фактора промежуточной прецизионности <i>Intermediate precision factor</i>	Число испытаний <i>Number of tests</i>	Число степеней свободы, <i>df</i> <i>Number of degrees of freedom, df</i>	Значение <i>t</i> -критерия Стьюдента, рассчитанное по экспериментальным данным, $t_{\text{эксп}}$ <i>Student's t-test value for experimental data, t_{exp}</i>	Критическое значение <i>t</i> -критерия Стьюдента, $t_{\text{табл}}(df;0,05)$ <i>Critical value of Student's t-test, t_{crit} (df;0,05)</i>	Достигнутый уровень значимости, <i>p</i> <i>Achieved level of significance, p-value</i>	Вывод о статистической значимости/незначимости различий <i>Conclusion on statistical significance/insignificance of differences</i>
Сравнение результатов, полученных разными аналитиками <i>Comparison of results obtained by different analysts</i>							
Инструментальный учет, MDBK, VSV <i>Instrumental method, MDBK, VSV</i>	Аналитик 1 <i>Analyst 1</i>	$n_{\text{аналитик1}}=6$ $n_{\text{analyst1}}=6$	10	0,5718	$t_{\text{табл}}(df = 10;0,05)=2,2281$ $t_{\text{crit}}(df = 10;0,05)=2,2281$	0,5801	Не значимо <i>Insignificant</i>
	Аналитик 2 <i>Analyst 2</i>	$n_{\text{аналитик2}}=6$ $n_{\text{analyst2}}=6$					
Инструментальный учет, A549, EMC <i>Instrumental method, A549, EMC</i>	Аналитик 1 <i>Analyst 1</i>	$n_{\text{аналитик1}}=3$ $n_{\text{analyst1}}=3$	6	1,9612	$t_{\text{табл}}(df = 6;0,05)=2,447$ $t_{\text{crit}}(df = 6;0,05)=2,447$	0,0868	Не значимо <i>Insignificant</i>
	Аналитик 2 <i>Analyst 2</i>	$n_{\text{аналитик2}}=5$ $n_{\text{analyst2}}=5$					
Визуальный учет, MDBK, VSV <i>Visual method, MDBK, VSV</i>	Аналитик 1 <i>Analyst 1</i>	$n_{\text{аналитик1}}=5$ $n_{\text{analyst1}}=5$	8	0,8440	$t_{\text{табл}}(df = 8;0,05)=2,306$ $t_{\text{crit}}(df = 8;0,05)=2,306$	0,4232	Не значимо <i>Insignificant</i>
	Аналитик 2 <i>Analyst 2</i>	$n_{\text{аналитик2}}=5$ $n_{\text{analyst2}}=5$					
Сравнение результатов, полученных инструментальным методом с использованием культуры клеток MDBK/вирус VSV и культуры клеток A549/вирус EMC <i>Comparison of results recorded instrumentally using MDBK/VSV and A549/EMC combinations</i>							
Инструментальный учет, Аналитик 1, 2 <i>Instrumental method, Analyst 1, 2</i>	MDBK, VSV <i>MDBK, VSV</i>	$n_{\text{аналитик1,2}}=12$ $n_{\text{analyst1,2}}=12$	18	1,7567	$t_{\text{табл}}(df = 18;0,05)=2,101$ $t_{\text{crit}}(df = 18;0,05)=2,101$	0,0702	Не значимо <i>Insignificant</i>
	A549, EMC <i>A549, EMC</i>	$n_{\text{аналитик1,2}}=8$ $n_{\text{analyst1,2}}=8$					
Сравнение результатов, полученных инструментальным и визуальным методом <i>Comparison of results recorded by instrumental and visual methods</i>							
Аналитик 1, 2, MDBK, VSV A549, EMC <i>Analyst 1, 2 MDBK, VSV A549, EMC</i>	Инструментальный учет <i>Instrumental method</i>	$N_{\text{инстр}}=20$ $N_{\text{instrumental}}=20$	28	1,1589	$t_{\text{табл}}(df = 28;0,05)=2,048$ $t_{\text{crit}}(df = 28;0,05)=2,048$	0,8695	Не значимо <i>Insignificant</i>
	Визуальный учет <i>Visual method</i>	$N_{\text{визуальный}}=10$ $N_{\text{visual}}=10$					

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. Клетки: MDBK — перевиваемая клеточная линия почки быка, A549 — клеточная линия карциномы легких человека; вирусы: VSV — вирус везикулярного стоматита, штамм «Индиана» (№ 29), EMC — вирус энцефаломиокардита (№ VR 129B).
Note. Cells: MDBK, Madin–Darby bovine kidney; A549, human lung adenocarcinoma cells. Viruses: VSV, vesicular stomatitis virus, Indiana serotype (National Virus Collection, 29); EMC, encephalomyocarditis virus (ATCC, VR-129B).

$RSD=14,49\%$), входят в интервал значений аттестованной характеристики (от 3,67 до 6,27 МЕ/мл) и подтверждают стабильность размороженного СО. Срок годности ФСО чРИФН- α -2b установлен по сроку годности соответствующего препарата при хранении при температуре не выше минус 40 °С.

Выводы

1. Аттестован фармакопейный стандартный образец для оценки специфической активности человеческого рекомбинантного интерферона α -2b. Значение аттестованной характеристики фармакопейного стандартного образца активности человеческого рекомбинантного интерферона α -2b, установленное относительно международного стандартного образца, составило $4,47 \times 10^8$ МЕ/мл, расширенная неопределенность: $8,12 \times 10^7$ МЕ/мл (коэффициент охвата 2; уровень доверия ~95%).
2. Подтверждена стабильность размороженного фармакопейного стандартного образца по показателю «Специфическая активность» после хранения в течение 1 мес. при температуре 2–8 °С.
3. Установлен срок годности аттестованного фармакопейного стандартного образца активности человеческого рекомбинантного интерферона α -2b при хранении при температуре не выше минус 40 °С.
4. Разработана и утверждена в установленном порядке сопроводительная документация (паспорт, макет этикетки первичной и вторичной упаковки, инструкция по применению ФСО).
5. Стандартный образец включен в Реестр фармакопейных стандартных образцов Государственной фармакопеи Российской Федерации с реестровым номером ФСО.3.2.00455⁹ и наименованием «Интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный (специфическая активность)».

Литература/References

1. Волкова РА, Фадейкина ОВ, Устинникова ОБ, Саканян ЕИ, Меркулов ВА, Мовсесянц АА и др. Современные проблемы стандартных образцов лекарственных средств в Российской Федерации. *Фармация*. 2020;69(2):5–11. Volkova RA, Fadeikina OV, Ustinnikova OB, Sakanyan EI, Merkulov VA, Movsesyants AA, et al. Current problems with the standard samples of medicines in the Russian Federation. *Pharmacy*. 2020;69(2):5–11 (In Russ.). <https://doi.org/10.29296/25419218-2020-02-01>
2. Гегечкори ВИ, Шатилина АА, Шульга НА, Петухова ЯД, Смирнов ВВ, Раменская ГВ. Биологические стандартные образцы: актуальные вопросы разработки и порядка аттестации. *Эталоны. Стандартные образцы*. 2023;19(3):21–9. Gegchkori VI, Shatilina AA, Shulga NA, Petukhova YaD, Smirnov VV, Ramenskaya GV. Biological reference materials: topical issues of development and certification procedure. *Measurement Standards. Reference Materials*. 2023;19(3):21–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-3-21-29>
3. Олефир ЮВ, Волкова РА, Фадейкина ОВ, Саканян ЕИ, Меркулов ВА, Мовсесянц АА, Бондарев ВП. Проблемы стандартных образцов биологических лекарственных средств. В кн.: *Сборник тезисов докладов III международной научной конференции «Стандартные образцы в измерениях и технологиях»*. Екатеринбург; 2018. С. 148–50. Olefir YuV, Volkova RA, Fadeikina OV, Sakanyan EI, Merkulov VA, Movsesyants AA, Bondarev VP. Problems of biological reference standards. In: *Collection of abstracts of the III International Scientific Conference "Reference materials in measurements and technologies"*. Ekaterinburg; 2018. P. 148–50 (In Russ.). EDN: [YSMLQL](https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-3-21-29)
4. Meager A, Gaines Das R, Zoon K, Mire-Sluis A. Establishment of new and replacement World Health Organization International Biological Standards for human interferon alpha 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)
5. Петров АЮ, Сысуюев ЕБ, Новикова НА. Некоторые особенности применения стандартных образцов в фармации. *Роль технического регулирования и стандартизации в эпоху цифровой экономики. Сборник статей II Международной научно-практической конференции молодых ученых*. Екатеринбург: Ажур; 2020. С. 21–32. Petrov AYU, Sysuev EB, Novikova NA. Some features of application standard samples in pharmacy. *The role of technical regulation and standardization in the era of the digital economy. Collection of articles of the II International Scientific and Practical Conference of Young Scientists*. Ekaterinburg: Azhur; 2020. P. 21–32 (In Russ.). EDN: [JGBEAC](https://doi.org/10.1007/s11094-017-1680-6)
6. Фадейкина ОВ, Волкова РА. Разработка порядка аттестации стандартных образцов биологических лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал*. 2017;51(8):44–50. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2017-51-8-44-50> Fadeikina OV, Volkova RA. Elaboration of certification procedures for reference standards of biological drugs. *Pharm Chem J*. 2017;51(8):716–21. <https://doi.org/10.1007/s11094-017-1680-6>
7. Гайдерова ЛА, Никитина ТН, Фадейкина ОВ, Байкова МЛ, Устинникова ОБ, Климов ВИ, Шведов ДВ. Аттестация отраслевого стандартного образца активности лейкоцитарного интерферона альфа типа. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2014;(2):31–6. Gayderova LA, Nikitina TN, Fadeikina OV, Baikova ML, Ustinnikova OB, Klimov VI, Shvedov DV. Evaluation of branch reference standard of leukocyte interferon alpha activity. *Biopreparation (Biopharmaceuticals)*. 2014;(2):31–6 (In Russ.). EDN: [SJRCDF](https://doi.org/10.1007/s11094-017-1680-6)

⁹ <https://www.regmed.ru/produkt-n-service/fso/fso-registry/fso-of-biological-origin/>

8. Алпатова НА, Гайдерова ЛА, Яковлев АК, Мотузова ЕВ, Лысикова СЛ, Солдатов АА, Авдеева ЖИ. Особенности определения специфической активности биотехнологических лекарственных средств. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017;17(1):13–26.
Alpatova NA, Gayderova LA, Yakovlev AK, Motuzova EV, Lysikova SL, Soldatov AA, Avdeeva GI. Assessment of biotechnological products specific activity. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;17(1):13–26 (In Russ.).
EDN: [YHSSGL](#)
9. Glantz SA. *Primer of biostatistics*. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 2012.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Л.А. Гайдерова** – обсуждение результатов, редактирование текста рукописи и утверждение окончательной версии рукописи для публикации; **Ю.Н. Лебедева** – разработка дизайна и проведение экспериментальных исследований, систематизация, статистическая обработка, оформление и интерпретация результатов; **Т.Н. Лобанова** – анализ результатов, написание, редактирование и переработка текста рукописи; **Э.К. Липатова** – проведение экспериментальных исследований, оформление и систематизация результатов; **Р.А. Волкова** – разработка дизайна исследования, обсуждение программы аттестации и анализ результатов; **О.В. Фадеекина** – обсуждение и статистический анализ результатов; разработка сопроводительных документов (паспортов, этикеток).

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **L.A. Gaiderova** discussed the results, edited the manuscript, and approved the final version for publication. **Yu.N. Lebedeva** designed the study; conducted experiments; carried out statistical processing of the results; registered, systematised, and interpreted the results. **T.N. Lobanova** analysed the results, drafted and edited the manuscript. **E.K. Lipatova** conducted experiments, formatted and systematised the results. **R.A. Volkova** designed the study, discussed the certification programme, and analysed the results. **O.V. Fadeikina** carried out statistical analysis of the results, designed the accompanying documentation for the reference standard (certificates, labels).

Об авторах / Authors

Гайдерова Лидия Александровна, канд. мед. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6176-5934>
gaiderova@expmed.ru

Лебедева Юлия Николаевна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8933-6966>
lebedevaun@expmed.ru

Лобанова Татьяна Николаевна, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8972-4851>
Tlobanova@expmed.ru

Липатова Эльвира Константиновна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1471-8737>
lipatova@expmed.ru

Волкова Рауза Асхатовна, д-р биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>
volkova@expmed.ru

Фадеекина Ольга Васильевна, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>
fadeikina@expmed.ru

Lidia A. Gaiderova, Cand. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6176-5934>
gaiderova@expmed.ru

Yulia N. Lebedeva
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8933-6966>
lebedevaun@expmed.ru

Tatiana N. Lobanova, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8972-4851>
Tlobanova@expmed.ru

Elvira K. Lipatova
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1471-8737>
lipatova@expmed.ru

Rauza A. Volkova, Dr. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>
volkova@expmed.ru

Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>
fadeikina@expmed.ru

Поступила 07.11.2023

После доработки 20.02.2024

Принята к публикации 29.02.2024

Received 7 November 2023

Revised 20 February 2024

Accepted 29 February 2024