



УДК 615.32

## АНАЛІЗ МЕТОДИК «КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ. ПРОТИВІРУСНА АКТИВНІСТЬ» ДЛЯ ПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ ІНТЕРФЕРОНУ АЛЬФА-2b

Студ. Н.В. Ліпєць гр. МгЗФХ-18

Наукові керівники: проф. С.І. Дегтярьов та доц. Г.І. Кузьміна  
Київський національний університет технології та дизайну

**Мета та завдання.** Інтерферони є одними із сучасних засобів терапії та профілактики вірусних захворювань. За походженням виділяють наступні групи препаратів на основі інтерферонів: лейкоцитарні (I покоління) та рекомбінантні (II покоління) [1,2].

На сьогодні, існуючі методики в цілому забезпечують контроль якості групи препаратів на основі інтерферону альфа-2b. Визначення противірусної активності препарату здійснюється біологічним методом із використанням культури клітин. Однак не дивлячись на багаторічний досвід використання даної методики, не менш важливим завданням є розробка нових та удосконалення існуючих методів визначення противірусної активності інтерферонів у готових лікарських засобах [3].

**Об'єкт та предмет дослідження.** Діюча методика кількісного визначення противірусної активності препаратів на основі інтерферону альфа-2b. Предметом дослідження є удосконалення біологічного методу визначення противірусної активності *in vitro*.

**Методи та засоби дослідження** Для вирішення поставлених завдань використано загальну методологію системного підходу, статистичний аналіз результатів досліджень, експериментальні дослідження, аналітичний метод збору та обробки інформації.

**Наукова новизна та практичне значення отриманих результатів.** Запропоновано удосконалити методику кількісного визначення противірусної активності препаратів на основі інтерферону альфа-2b біологічним методом із урахуванням вимог монографій ЄФ 1110 «Interferon alfa-2 concentrated solution» та ДФУ «Інтерферону альфа-2 розчин концентрований» [4,5], адаптовано методику для аналізу готових лікарських засобів із підбором оптимальних умов для отримання коректних результатів.

**Результати.** Методика базується на системі «вірус-клітина», оскільки відомо, що інтерферон альфа-2b при взаємодії з відповідними рецепторами на поверхні клітини ініціює комплекс послідовних внутрішньоклітинних реакцій, пов'язаних з індукцією ряду ферментів і реалізацією клітинних функцій. Ці процеси перешкоджають реплікації вірусів всередині клітини, уповільнюють проліферацію клітин пухлини і сприяють імуномодулюючій дії інтерферону. Діючи на систему регуляції синтезу нуклеїнових кислот, інтерферони активують ферменти та інгібітори, за допомогою яких пригнічують практично всі стадії реплікації вірусів, включаючи проникнення, транскрипцію, трансляцію, тобто синтез вірусоспецифічних білків; а також вихід вірусів з інфікованих клітин. Імуномодулююча активність пов'язана зі стимуляцією фагоцитарної активності макрофагів, а також підвищенням специфічної цитотоксичності лімфоцитів до клітин-мішеней. Противірусну дію інтерферону пов'язано також з розвитком імунної реакції Th1-клітинного типу, яка необхідна для реалізації ефективного противірусного імунітету.

Виконання методики «Кількісне визначення. Противірусна активність» здійснюють методом культури клітин шляхом порівняння противірусної активності препарату з противірусною активністю міжнародного стандартного зразка активності рекомбінантного інтерферону альфа-2b, атестованого ВООЗ. Вудосконаленій методиці детально описані етапи приготування розчинів, поживних середовищ, ведення культури клітин та її підготовка до використання. Також підібрано умови, що впливають на ефективність екстракції інтерферону із супозиторіїв (підвищено температуру екстракції, змінено екстрагент, збільшено інтенсивність центрифугування), що дозволяє суттєво зменшити витрати на високовартісні реактиви (поживне середовище), скоротити час екстракції та забезпечити відтворюваність отриманих результатів порівняно до діючої методики. Візуалізація результатів методики виконується одним з наступних способів: методом забарвлення фіксованих клітин розчином кристалічного фіолетового (аналогічно до діючої редакції) або використовуючи розчин резаурину. Реакція базується на ферментативному перетворенні життєздатними клітинами резаурину у резоруфін, який здатний



до флуоресценції. Нежиттєздатні клітини швидко втрачають метаболічну здатність і таким чином не генерують флуоресцентний сигнал. Результати реєструють за допомогою планшетного флуоресцентного спектрофотометра в режимі Ex 560 нм, Em 590 нм (за умови використання розчину резазурину, як фарбника) або при довжині хвилі 590 нм (за умови використання розчину кристалічного фіолетового, як фарбника). Статистичну обробку отриманих даних проводять методом визначення еквівалентних доз за допомогою програм Combistats, Excel або аналогічних. Розрахунок концентрації інтерферону методом паралельних ліній проводять по лінійній частині кривої. Статистичні критерії лінійності, паралельності і нахилу прямої для випробуваного розчину щодо розчину порівняння повинні перебувати в довірчому інтервалі не нижче 95% ( $P \geq 0,95$ ). Довірчий інтервал ( $P = 0,95$ ) повинен бути не менше 64% і не більше 156% заявленої активності. Значення встановленої активності має бути в межах 80-125% заявленої активності.

Згідно з розділом ДФУ 5.3.N.2 «Валідація аналітичних методик і випробувань» обов'язковими валідаційними характеристиками для методик кількісного визначення є правильність, прецизійність, специфічність, лінійність, діапазон застосування. В ході дослідів було проаналізовано приведені критерії прийнятності та порівняння валідаційних характеристик діючої та запропонованої методик. Методику кількісного визначення противірусної активності для препарату у запропонованій редакції було провалідовано і показано, що вона придатна для виконання поставлених задач і відповідає критеріям прийнятності. Для підтвердження аналогічності двох методик було проведено аналіз трьох серій препарату.

**Висновки:** Значення противірусної активності для різних серій препарату відрізняється менше, ніж на значення максимальної невизначеності методики для кількісного визначення (двобічне нормування для готових лікарських засобів – «значення встановленої активності має бути в межах 80-125 % заявленої активності»), яке становить  $\Delta A_{s_{max}} = 7.2 \%$ . Порівняльний аналіз результатів кількісного визначення противірусної активності за обома методиками в одних і тих самих зразках свідчить, що методики є аналогічними. Серед різних методів оцінки життєздатності клітин альтернативний метод є одноступеневим, чутливим, безпечним та нетоксичним для клітин, а також економічним.

**Ключові слова.** Інтерферон альфа-2b, противірусна активність, біологічний метод.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Лазаренко Л.М., Співак М.Я., Михайленко О.М., Сухих Г.Т. Папіломовірусна інфекція та система інтерферону: монографія. Київ: Фітосоціоцентр, 2005. 288с.
2. Прожерина Ю. М. Противовирусные и иммуномодулирующие препараты. *Ремедиум*. 2016. №6. С. 21-26.
3. Обзор методических подходов к оценке качества лекарственных средств на основе рекомбинантных интерферонов / О.Б.Устинникова, Л.А.Гайдерова, М.Л. Байкова и др. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017. №3. С 152-157.
4. Державна Фармакопея України: у 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»: 2-е вид. Харків, 2015. Т. I. 1128 с.
5. Interferonalfa-2 concentrated solution: European Pharmacopoeia 9.0.: веб-сайт. URL: <http://online6.edqm.ua/ep900> (дата звернення: 12.10.2018).