

**ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ МЕТОДИК «КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ. ПРОТИВІРУСНА АКТИВНІСТЬ» ДЛЯ ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ ІНТЕРФЕРОНУ АЛЬФА-2b РЕКОМБІНАНТНОГО ЛЮДИНИ**

**Ліпець Н.В., Бессарабов В.І., Кузьміна Г.І., Діхтярьов С.І., Гой А.М.**

Київський національний університет технологій та дизайну, кафедра промислової фармації, м Київ, Україна, e-mail: n.lipets@biofarma.ua

---

У статті описано удосконалену методику кількісного визначення противірусної активності препаратів на основі інтерферону альфа-2b біологічним методом із урахуванням вимог монографії ЄФ 1110 «Interferon alfa-2 concentrated solution» поточної редакції. Порівняльний аналіз результатів кількісного визначення противірусної активності інтерферону альфа-2b у лікарському засобі Лаферобіон, супозиторії за діючою та удосконаленою методиками в одних і тих самих зразках свідчить, що методики є аналогічними. Значення противірусної активності для різних серій препарату за обома методиками відрізняються 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  $\Delta A_{smax}=7,2\%$ . Удосконалену методику адаптовано для аналізу готових лікарських засобів з підбором оптимальних умов для отримання коректних результатів.

---

**Ключові слова:** інтерферон альфа-2b, противірусна активність, біологічний метод, культура клітин.

**COMPARATIVE ANALYSIS OF METHODS «QUANTITATIVE DEFINITION. ANTI-VIRUS ACTIVITY» FOR A RECOMBINANT HUMAN INTERFERONAL PREPARATION**

**Lipets N.V., Bessarabov V.I., Kuzmina G.I., Dikhtiarov S.I., Goy A.M.**

Kyiv National University of Technology and Design, Department of Industrial Pharmacy, Kyiv, Ukraine, e-mail: n.lipets@biofarma.ua

---

The article describes an improved method for quantifying the antiviral activity of drugs based on interferon alfa-2b by biological methods, taking into account the requirements of the monograph EurPh 1110 "Interferon alfa-2 concentrated solution" of the current edition. A comparative analysis of the results of quantification of the antiviral activity of interferon alfa-

**2b in the drug Laferobion suppositories by current and improved methods in the same samples shows that the methods are similar. The values of antiviral activity for different batches of the drug by both methods differ less than the value of the maximum uncertainty of the method for quantification (bilateral rationing for finished drugs - "the value of the established activity should be within 80-125% of the declared activity"), which is  $\Delta A_{smax}=7.2\%$ . The improved method is adapted for the analysis of finished drugs with the selection of optimal conditions to obtain correct results.**

---

**Keywords:** interferon alfa-2b, antiviral activity, biological method, cell culture.

Інтерферони є одними із сучасних засобів терапії та профілактики вірусних захворювань [1, 2]. Існуючі на цей час методики в цілому забезпечують контроль якості групи лікарських препаратів на основі інтерферону альфа-2b. Визначення протівірусної активності препарату здійснюється біологічним методом із використанням культури клітин [3-5]. Однак не дивлячись на багаторічний досвід використання даної методики, не менш важливим завданням є розробка нових та удосконалення існуючих методів визначення протівірусної активності інтерферонів у готових лікарських засобах.

**Мета дослідження:** порівняльний аналіз діючої та удосконаленої методик кількісного визначення протівірусної активності у препаратах на основі інтерферону альфа-2b.

#### **Матеріали і методи дослідження.**

Методика «Кількісне визначення. Протівірусна активність» заснована на біологічному методі з застосуванням культури клітин та порівнянні протівірусної активності препарату з протівірусною активністю міжнародного стандартного зразка активності рекомбінантного інтерферону альфа-2b, атестованого ВООЗ. Як чутливу культуру використовують лінію клітин MDBK (ATCC, CCL 22), яка повинна бути чутлива до вірусу везикулярного стоматиту (VBS), штам Індіана (ATCC, VR-158), або лінія клітин A-549 (ATCC, CCL-185), яка повинна бути чутлива до вірусу енцефаломіокардиту (ATCC, CCL-129B). Дослідження проводять методом імуноферментного аналізу. Результати реєструють за допомогою флуоресцентного спектрофотометра Cytation 5. Статистичну обробку даних проводять методом

визначення еквівалентних доз за допомогою програми Combistats, Excel або аналогічної. Розрахунок концентрації інтерферону методом паралельних ліній проводять за лінійною частиною кривої.

### **Результати дослідження.**

Удосконалено методику визначення противірусної активності препарату, що містить активний фармацевтичний інгредієнт інтерферон альфа-2b. 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 пригнічують вихід вірусів з інфікованих клітин. Імуномодулююча активність інтерферону 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 діючої та удосконаленої 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. В даному дослідженні використовувався міжнародний стандарт 2<sup>nd</sup> WHO International Standard (MC3) INTERFERON ALPHA 2b, (Human, rDNA derived), NIBSC Code: 95/566.

В запропонованій методиці у порівнянні з діючою удосконалено спосіб екстрагування діючої речовини, що дозволяє суттєво скоротити витрати високовартісних реактивів (поживного середовища), час екстракції та забезпечити відтворюваність отриманих результатів порівняно до діючої методики.

Візуалізація результатів у запропонованій редакції методики виконується одним з наступних способів: методом забарвлення фіксованих клітин розчином кристалічного фіолетового (аналогічно до діючої редакції) або використовуючи розчин резазурину. Реакція базується на ферментативному перетворенні життєздатними клітинами резазурину у резорурфін, який здатний до флуоресценції. Нежиттєздатні клітини швидко втрачають метаболічну здатність і таким чином не генерують флуоресцентний сигнал.

Результати випробувань 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.

Проведено валідацію методики «Кількісне визначення. Противірусна активність» в новій редакції і показано, що вона придатна для виконання поставлених задач і відповідає критеріям прийнятності. Згідно з розділом 5.3.N.2 «Валідація аналітичних методик і випробувань» ДФУ діючої редакції обов'язковими валідаційними характеристиками для методики кількісного

визначення є правильність, прецизійність, специфічність, лінійність, діапазон застосування [6].

В ході досліджень було проаналізовано приведені вище критерії прийнятності та проведено порівняння валідаційних характеристик діючої та запропонованої методик кількісного визначення противірусної активності інтерферону альфа-2b методом культури клітин. В таблиці 1 приведено критерії прийнятності та валідаційні характеристики діючої та удосконаленої методик кількісного визначення противірусної активності методом культури клітин.

Таблиця 1. Валідаційні характеристики діючої та удосконаленої методики кількісного визначення противірусної активності інтерферону альфа-2b.

Валідаційна характеристика	Критерії прийнятності та результати валідації методики кількісного визначення противірусної активності в препараті	
	Діюча методика	Запропонована методика
1	2	3
Повна невизначеність методики аналізу	Критерій прийнятності: $\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 7,2 \%$	Критерій прийнятності: $\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 7,2 \%$
	3,25 % Відповідає	5,1 % відповідає
Лінійність	Вимоги до залишкового стандартного відхилення ( $S_0$ ) Критерій прийнятності: $S_0 \leq \frac{0,32 \cdot \Delta_{As} (\%) }{t(95\%; n - 2)} \leq 1,216$	Критерій прийнятності: $CV \leq 15\%$
	0,909 Відповідає	
	Вимоги до вільного члена ( $a$ )	Критерій прийнятності: $CV_{max} = 5,8 \%$ відповідає
	Критерій статистичної незначимості Критерій прийнятності: $ a  \leq t(95\%; n - 2) \times S_a \leq 0,76$	
Критерій практичної незначимості Критерій прийнятності: $ a  \leq \frac{0,32 \cdot \Delta_{As}}{1 - (X_{min} / 100)} \leq 2,31$		
	0,16 Відповідає	
	Вимоги до коефіцієнта кореляції $R$ Критерій прийнятності: $r \geq \sqrt{1 - \left( \frac{\Delta_{As}}{t(95\%; n - 2) \cdot SD_y} \right)^2} \geq 0,9995$	

Продовження табл. 1

1	2		3
	0,9999 Відповідає		
Правильність	Критерій статистичної невизначеності Критерій прийнятності: $\delta \leq \Delta_z / \sqrt{n} \leq 2,8$	Критерій практичної невизначеності Критерій прийнятності: $\delta \leq 0,32 \cdot \Delta_{As} \leq 2,3$	Критерій прийнятності: 80-120 % від номінальної активності.
	0,9 Відповідає		87,35-106,53 % відповідає
Прецизійність	Критерій прийнятності: $\Delta_z \leq \Delta_{As} \leq 7,2\%$		Критерій прийнятності: $CV \leq 20\%$
	5,6 Відповідає		$CV_{max} = 5,59\%$ відповідає
Специфічність	Критерій прийнятності: $100 \cdot \frac{A_{placebo}}{A_{sample}} \leq 0,32 \cdot \max \Delta_{As} = 2,3$		Критерій прийнятності: $ЦПД(\%) = \frac{ A_{placebo} - A_{K+} }{ A_{K-} - A_{K+} } \cdot 100\% \leq 0,32 \cdot \max \Delta_{As} = 2,3$
	0,57 Відповідає		$ЦПД_{max} = 2,29\%$ відповідає
			Критерій прийнятності: $КТ(\%) = \frac{A_{placebo(-)}}{A_{K-}} \cdot 100\% = (80 - 120)\%$ $КТ = (93,2 - 101,3)\%$ відповідає
Діапазон застосування методики	Критерій прийнятності: Від 80 % до 125 % від номінальної противірусної активності інтерферону альфа-2b.		Критерій прийнятності: Від 80 % до 125 % від номінальної противірусної активності інтерферону альфа-2b.
	Від 1,56 % до 200 % від номінальної противірусної активності інтерферону альфа-2b. Відповідає		Від 6,56 % до 210 % від номінальної противірусної активності інтерферону альфа-2b. Відповідає

Як видно з представлених даних, обидві методики відповідають критеріям прийнятності за обов'язковими валідаційними характеристиками згідно з ДФУ, тому є валідними. Для підтвердження аналогічності двох методик було проведено аналіз трьох серій препарату «Лаферобіон, супозиторії по 1 г у контурній чарунковій упаковці №10». Результати аналізу серій за показниками методів контролю якості за діючою та запропонованою методиками наведено у таблиці 2.

Таблиця 2. Порівняння показників контролю якості.

Лаферобіон супозиторії по 150 000 МО	Кількісне визначення. Противірусна активність, МО/г	
	Діюча методика	Запропонована методика
Серія 1	121 491	125 845
Серія 2	123 619	121 059
Серія 3	120 176	124 654

### Висновки.

1. Порівняльний аналіз результатів кількісного визначення противірусної активності препарату Лаферобіон, супозиторії по 150 000 МО за діючою та удосконаленою методиками в одних і тих самих зразках показав, що методики є аналогічними. Значення противірусної активності для різних серій препарату відрізняються 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  $\Delta A_{S_{max}}=7,2\%$ .

2. Удосконалену методику кількісного визначення противірусної активності препаратів на основі інтерферону альфа-2b біологічним методом із урахуванням вимог монографії ЄФ 1110 «Interferon alfa-2 concentrated solution» адаптовано для аналізу готових лікарських засобів із підбором оптимальних умов для отримання коректних результатів.

### Список літератури.

1. Папіломовірусна інфекція та система інтерферону / Лазаренко Л. М., Співак М. Я., Михайленко О. М., Сухих Г. Т. 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 / Устинникова О.Б. и др. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017. № 3. С. 152-157.
4. Особенности определения специфической активности биотехнологических лекарственных средств / Алпатова Н.А. и др. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017. № 17. С. 13-26.
5. Interferon alfa-2 concentrated solution/ *European Pharmacopea 9.0*. URL: <http://online6.edqm.ua/ep900>
6. Державна Фармакопея України. 2-е вид. X. : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2015. Т. 1. 1128 с.