

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Биологические методы испытания

ОФС.1.7.2.0002.15

препаратов интерферона

с использованием культур клеток

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья определяет основные требования к биологическим методам испытаний препаратов интерферона с использованием клеточных культур и распространяется на субстанции и лекарственные формы интерферона человеческого всех типов природного и генно-инженерного происхождения.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Биологические методы с использованием клеточных культур применяют для определения следующих показателей качества препаратов интерферона:

1. Специфическая активность
2. Подлинность

Методы определения специфической активности и подлинности основаны на способности интерферона подавлять цитопатическое действие индикаторного вируса в культуре клеток в сравнении со стандартным образцом интерферона (СО). Испытания проводят с использованием соответствующих линий клеток, чувствительных к определенному типу интерферона и к индикаторному вирусу.

Наиболее часто используют следующие комбинации клетка/вирус:

- линия клеток карциномы легкого человека А-549, линия клеток почки африканской зеленой мартышки *Vero*, линия клеток карциномы гор-

тани человека Нер-2с, линия клеток фибробластов мыши L-929/ вирус энцефаломиокардита мышей (EMCV);

- клетки бычьих почек Madin-Darby MDBK, линия клеток почки африканской зеленой мартышки *Vero*, линия лимфоидных клеток человека Л-41, линия клеток карциномы легкого человека А-549, линия клеток фибробластов мыши L-929, линия клеток амниона человека WISH/ вирус везикулярного стоматита (VSV);

- клетки фибробластов человека/ вирус леса Семлики (SFV), вирус Синдбис (*virus Sindbis*) или иные.

Выбор комбинации «клеточная культура/вирус» основывается на том, какая из них обеспечивает наиболее чувствительный ответ для определяемого типа интерферона.

В качестве СО может быть использован международный стандартный образец активности интерферона соответствующего типа или стандартный образец, откалиброванный в Международных единицах (МЕ) по соответствующему международному стандарту.

Испытания проводят в асептических условиях.

Подготовка к испытаниям

Клетки. Требования к клеточным линиям (общие условия культивирования и пересева клеток, пассаж, на котором клетки проявляют оптимальную эффективность при проведении испытания, допустимый предел жизнеспособности клеток при пересевах и при взятии клеточной суспензии в испытание, процент сформированного монослоя) указывают в нормативной документации.

Испытуемые образцы препарата. Пробоподготовку испытуемых образцов проводят в соответствии с указаниями, приведенными в нормативной документации. Для некоторых лекарственных форм препаратов интерферона (суппозитории, мази, гели и т.д.) при пробоподготовке необходимо экстрагирование активного вещества (интерферона) в раствор, с соблюдением сле-

дующих условий: используемые реагенты не должны оказывать токсического действия на культуру клеток в разведениях, необходимых для исследования; использование реагентов для экстрагирования должно быть обоснованным.

Индикаторный вирус. Суспензию индикаторного вируса готовят в соответствии с указаниями в нормативной документации на лекарственное средство, содержащее интерферон. Титр вируса должен быть не менее 10^5 ТЦД/мл.

Реагенты и питательные среды.

К составу питательных сред, предназначенных для культур клеток животных и человека, предъявляют определенные требования. Для приготовления питательных сред обычно используются солевые растворы Эрла и Хенкса. Возможно использование стандартных коммерческих сред для ведения культур клеток: Игла MEM, MEM, DMEM (двойная модификация среды Игла), среды 199, среды RPMI и др. Для стимуляции роста, прикрепления и деления клеток обычно добавляют 5 – 10 % инактивированной сыворотки коров/крупного рогатого скота. В среду для разведений интерферона добавляют 2 – 5 % сыворотки. Для обеспечения бактериологической стерильности в питательные среды вводят антибиотики: пенициллин (натриевая соль), стрептомицин (хлоркальциевый комплекс) из расчета 100—200 ЕД каждого на 1 мл среды, микостатин (нистатин) из расчета 20—25 ЕД на 1 мл или гентамицин (конечная концентрация 10 мкг/мл). Содержание L-глутамина в питательной среде должно быть около 292 мг/л.

В качестве поддерживающей среды обычно используют питательную среду без сыворотки с добавлением антибиотиков и L-глутамина.

Постоянство рН среды является одним из главных условий культивирования. Другим важным условием культивирования является осмотическое давление. Диапазоны рН и осмоляльности, при которых происходит размножение клеток, узки и варьируют в зависимости от типа клеток.

Оценить количество жизнеспособных клеток возможно при помощи

красителей: метиленового синего, кристаллического фиолетового, тиазолинового синего (МТТ), Аламара голубого и других.

Раздел 1. Специфическая активность

Противовирусную активность интерферона определяют путем сравнения защитного действия испытуемого препарата (ИП) с аналогичным действием стандартного образца активности интерферона (СО).

Проведение испытания

Определение специфической активности препаратов интерферона проводят на монослое культур клеток, полученном при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в атмосфере с $(5,0 \pm 0,5) \% \text{CO}_2$ в лунках 96-луночных плоскодонных культуральных планшетов.

Количество клеток, вносимых в каждую лунку планшета, должно быть достаточным для дальнейшего экспоненциального роста клеточной культуры и образования полноценного монослоя при вышеуказанных условиях культивирования в течение 24-48 ч.

Готовят серию разведений испытуемого препарата в среде для разведений интерферона с содержанием 2 – 5 % сыворотки (на 4 разведения выше и ниже предполагаемого титра активности). Параллельно готовят такие же разведения СО в среде для разведения интерферона. Рабочие разведения ИП и СО должны быть указаны в нормативной документации.

Из лунок планшетов с клеточным монослоем удаляют ростовую среду и вносят приготовленные разведения ИП и соответствующего СО, используя на каждое разведение не менее 4-х лунок с культурой клеток.

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

Для контроля дозы индикаторного вируса оставляют 16 лунок с культурой клеток, а для контроля состояния монослоя клеток – 4 лунки. В эти 20 лунок вносят поддерживающую среду.

96-луночные планшеты с культурой клеток, разведениями ИП и СО инкубируют в течение 24-48 ч при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в атмосфере с $(5,0\pm 0,5)\%$ CO_2 . Затем в каждую лунку с ИП и соответствующим СО вносят вирусную суспензию, содержащую рассчитанную заранее дозу индикаторного вируса – 100 ТЦД_{50} . В лунки контроля клеток вносят такой же объем поддерживающей среды.

Определение дозы вируса-индикатора

Определение дозы индикаторного вируса начинают с установления его активности.

Для определения активности вируса-индикатора готовят десятикратные разведения вируса в поддерживающей среде (от 10^{-1} до 10^{-8}). Из лунок 96-луночного планшета с клеточным монослоем удаляют ростовую среду. После этого в лунки планшета, используемые для определения дозы вируса, поддерживающую среду в объеме, равном объему испытуемого образца. Затем вносят приготовленные разведения индикаторного вируса (не менее, чем по 4 лунки на каждое разведение) в объеме, равном объему внесенной до этого поддерживающей среды. 96-луночный планшет с разведениями вируса инкубируют в течение 24-48 ч при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в атмосфере с $(5,0\pm 0,5)\%$ CO_2 . За титр (активность) вируса принимают величину, обратную разведению вируса, при котором клеточный монослой в 50 % лунок оказался полностью пораженным цитопатическим действием. Титр вируса выражают в тканевых цитопатических дозах – $\text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$.

Активность вируса вычисляют методом Спирмена-Кербера по формуле:

$$\lg ED_{50} = D_{\max} + \frac{d}{n} \cdot \left(p - \frac{n}{2} \right),$$

где: $\lg ED_{50}$ – десятичный логарифм титра вируса;

D_{\max} – десятичный логарифм разведения, ниже которого произошла 100 % гибель клеток (+);

d – десятичный логарифм интервала между разведениями ($=1,0$);
 n – число лунок, приходящееся на каждое разведение вируса ($=4$);
 p – число лунок, давших гибель (+) в разведении, ниже которого произошла 100 % гибель клеток, и последующих разведениях.

После установления активности вируса производят подсчёт дозы для последующего внесения в лунки с испытуемым препаратом (100 ТЦД_{50}).

Одновременно с внесением вируса-индикатора осуществляют контроль взятой дозы вируса на 16-ти лунках с культурой клеток (по 4 лунки на каждое разведение вируса).

Вносят вирус, начиная с разведения, соответствующего 100 ТЦД_{50} , и до разведения, соответствующего $0,1 \text{ ТЦД}_{50}$ с коэффициентом разведения равным 10.

Лунки с культурой клеток для оценки состояния монослоя клеток остаются интактными.

После внесения индикаторного вируса в дозе 100 ТЦД_{50} 96-луночный планшет инкубируют в течение 24-48 ч при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в атмосфере с $(5,0 \pm 0,5) \% \text{CO}_2$ до появления первых признаков цитопатических изменений в клеточном монослое с индикаторным вирусом в дозе 1 ТЦД_{50} . Монослой в лунках с $0,1 \text{ ТЦД}_{50}$ индикаторного вируса должен соответствовать состоянию клеток в контрольных лунках.

Учёт активности интерферона осуществляют через 24-48 ч при выполнении следующих условий:

- доза внесённого вируса соответствует 100 ТЦД_{50} ;
- в лунках с клетками и минимальными концентрациями ИП и СО, зараженными индикаторным вирусом, наблюдается практически полный цитопатический эффект (80 – 100 %);
- в лунках с контролем клеток отсутствуют признаки дегенерации.

Учёт активности интерферона осуществляют визуально или инструментально.

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

Титр интерферона вычисляют методом Спирмена-Кербера по формуле:

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

где: D_{\max} – двоичный логарифм разведения, ниже которого произошла 100 % защита (–);

d – двоичный логарифм интервала между разведениями (=1,0);

n – число лунок на каждую дозу (=4);

p – число лунок, давших защиту (–) в разведении, ниже которого произошла 100 % защита, и последующих разведениях.

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

$$A_x = \frac{A_{CO}}{a_{CO}} \cdot a_x,$$

где: A_{CO} – противовирусная активность СО интерферона в МЕ;

a_x – титр ИП;

a_{CO} – титр СО.

Инструментальный учет активности интерферона предполагает селективное окрашивание живых клеток, защищенных интерфероном от действия вируса, элюирование красителя, фотометрирование оптической плотности элюата и статистическую обработку результатов с помощью метода параллельных линий.

Как правило, результаты исследования снижения цитопатического эффекта соответствуют сигмоидальному графику доза-ответ: зависимость значений оптической плотности элюата ИП и СО от логарифма их разведения.

При расчете активности интерферона по сигмоидальным кривым ИП и СО должны быть соблюдены следующие условия:

- Измеренные оптические плотности для ИП и СО должны находиться в одном диапазоне оптических единиц, ограниченном значениями оптической плотности, измеренными в лунках контроля клеток и вируса;
- Полученные данные должны отвечать требованиям к параллельности, линейности и величине угла наклона кривых доза-ответ для СО и ИП, указанным в нормативной документации.

Используя линейный участок графика, рассчитывают титр ИП и СО, а затем рассчитывают активность интерферона по формуле:

$$A_x = \frac{A_{co}}{a_{co}} \cdot a_x,$$

где: A_{co} – противовирусная активность СО интерферона в МЕ;

a_x – титр ИП, то есть разведение ИП, в котором наблюдается 50 %-е поражение клеточного монослоя индикаторным вирусом;

a_{co} – титр СО, то есть разведение СО, в котором наблюдается 50 %-е поражение клеточного монослоя индикаторным вирусом.

Описание инструментального метода приводят в нормативной документации.

Раздел 2. Подлинность

Подлинность препаратов интерферона определяют путем нейтрализации противовирусной активности ИП моно- или поликлональными антителами против соответствующего типа интерферона, предусмотренными в нормативной документации на препарат. Реакцию нейтрализации противови-

русной активности ИП проводят в культуре клеток, чувствительных к данному типу интерферона, в присутствии индикаторного вируса.

Проведение испытания

Определение подлинности препаратов интерферона проводят на моно-слое культур клеток.

Количество клеток, вносимых в каждую лунку 96-луночных культуральных планшетов, должно быть достаточным для дальнейшего экспоненциального роста клеточной культуры и образования полноценного монослоя в условиях культивирования при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в атмосфере с $(5,0\pm 0,5)\%$ CO_2 в течение 24-48 ч.

Готовят рабочие дозы ИП и СО. Для этого их разводят средой для разведения интерферона с содержанием 2 – 5 % сыворотки до одной десятой титра противовирусной активности (раздел «Специфическая активность»).

Нейтрализующие антитела разводят средой для разведения до концентраций, указанных в нормативной документации.

Для приготовления нейтрализованной смеси подготовленные разведения антител объединяют в равных объемах с рабочими дозами ИП и СО. Полученную смесь инкубируют при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в атмосфере с $(5,0\pm 0,5)\%$ CO_2 в течение 1 ч.

Из лунок 96-луночного планшета с монослоем культуры клеток удаляют ростовую среду, вносят в лунки планшета нейтрализованную смесь, не менее чем по 4 лунки на каждое разведение антител.

Нейтрализованную смесь допустимо вносить в лунки 96-луночного планшета как до внесения культуры клеток, так и после него.

Для оценки качества монослоя клеток в процессе постановки реакции нейтрализации (контроль) оставляют не менее 4 лунок, в которые не вносят нейтрализованную смесь. В этих лунках заменяют ростовую среду на поддерживающую.

Для контроля защитного действия интерферона также оставляют по 4

лунки на рабочие разведения СО и ИП без нейтрализующих антител.

Проверяют дозу вируса-индикатора как описано в разделе 1 «Специфическая активность».

Индикаторный вирус в дозе 100 ТЦД₅₀ вносят во все лунки 96-луночного планшета, кроме 4 лунок, предназначенных для контроля моно-слоя клеток.

После внесения индикаторного вируса в лунки с культурой клеток планшеты инкубируют при температуре $(37\pm 1) ^\circ\text{C}$ в атмосфере с $(5,0\pm 0,5) \%$ СО₂ до появления первых признаков цитопатических изменений в клетках с индикаторным вирусом в дозе 1 ТЦД₅₀ (обычно в течение 24-48 ч). Моно-слой в лунках с 0,1 ТЦД₅₀ индикаторного вируса должен соответствовать состоянию клеток в контрольных лунках.

Учет и интерпретация результатов

Учёт результатов осуществляют при выполнении следующих условий:

- доза внесённого вируса соответствует 100 ТЦД₅₀;
- отсутствуют признаки дегенерации в контроле клеток и в лунках с рабочими разведениями СО и ИП без нейтрализующих антител.

Нейтрализация активности испытуемого образца анти-интерфероновыми антителами в сравнении с СО в аналогичном разведении свидетельствует о том, что в испытуемом образце содержится интерферон соответствующего типа.

Подробное описание проведения реакции нейтрализации приводят в нормативной документации.