



## Валидация методики определения специфической активности интерферона бета человеческого рекомбинантного на примере препарата Инфибета® с использованием различных сочетаний клетка/вирус

Ю.Н. Лебедева<sup>1</sup>, Н.А. Литвинова<sup>2</sup>, Т.Н. Лобанова<sup>1</sup>, Р.Р. Шукуров<sup>2</sup>, Р.А. Хамитов<sup>2</sup>, Л.А. Гайдерова<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup> Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ», ул. Владимирская, д. 14, пос. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, 601125, Российская Федерация

✉ Гайдерова Лидия Александровна; [gaiderova@expmed.ru](mailto:gaiderova@expmed.ru)

### Резюме

В настоящее время при лечении рассеянного склероза доказана эффективность препаратов интерферона бета. Одним из важнейших показателей качества, отражающих эффективность и безопасность лекарственных препаратов интерферона бета, является специфическая противовирусная активность. Для определения активности интерферона бета используют биологический метод, который может давать ошибку конечного результата за счет неопределенностей системы, вносящих свой вклад в общую погрешность. В связи с тем что точность оценки величины специфической активности позволяет гарантировать необходимую терапевтическую дозу препарата, особую актуальность приобретает стандартизация и валидация метода определения данного показателя. **Цель работы:** валидация методики определения специфической активности препаратов интерферона бета человеческого рекомбинантного на примере препарата Инфибета® с использованием различных сочетаний клетка/вирус. **Материалы и методы:** в исследовании использовали клетки WISH, Vero, A-549, MDBK в комбинации с вирусом энцефаломиокардита мышей. Испытания проводили биологическим методом, основанным на способности интерферона подавлять цитопатическое действие вируса в культуре клеток. Учет результатов осуществляли с использованием методов математической статистики и пакета программ GraphPadPrism, Statistica 2/0. **Результаты:** представлены данные сравнительного анализа результатов определения специфической активности препарата Инфибета® (интерферон бета-1b) с использованием различных сочетаний клетка/вирус. Сравнение результатов проводили по характеристикам графика зависимости «доза-эффект». Показано, что все испытанные клеточные линии пригодны для постановки методики определения активности интерферона бета биологическим методом. Однако наилучшие результаты получены с использованием клеток A-549, WISH в сочетании с вирусом энцефаломиокардита мышей. На указанных системах клетка/вирус провели определение валидационных характеристик: специфичность, линейность, прецизионность, робастность. **Выводы:** валидирована методика, позволяющая измерять специфическую активность интерферона бета в диапазоне 4,8–11,2 МЕ/мл с удовлетворительной точностью, что гарантирует получение достоверных результатов анализа. Показана устойчивость методики и ее внутри- и межлабораторная воспроизводимость.

**Ключевые слова:** интерферон бета; специфическая активность; клеточные культуры; вирус; кривая зависимости «доза–эффект»; валидация; критерии приемлемости; оценка валидационных характеристик

**Для цитирования:** Лебедева Ю.Н., Литвинова Н.А., Лобанова Т.Н., Шукуров Р.Р., Хамитов Р.А., Гайдерова Л.А. Валидация методики определения специфической активности интерферона бета человеческого рекомбинантного на примере препарата Инфибета® с использованием различных сочетаний клетка/вирус. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(1):60–79. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-60-79>

## Validation of a test procedure for determination of specific activity of human recombinant interferon beta (Infibeta®) using various cell/virus combinations

Yu.N. Lebedeva<sup>1</sup>, N.A. Litvinova<sup>2</sup>, T.N. Lobanova<sup>1</sup>, R.R. Shukurov<sup>2</sup>, R.A. Khamitov<sup>2</sup>, L.A. Gaiderova<sup>1,✉</sup>

<sup>1</sup> Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

<sup>2</sup> Generium JSC, 14 Vladimirskaia St., Volginsky town, Petushinskiy District, Vladimir Region 601125, Russian Federation

✉ Lidiya A. Gaiderova; [gaiderova@expmed.ru](mailto:gaiderova@expmed.ru)

### Abstract

Interferon beta preparations have demonstrated efficacy in the treatment of multiple sclerosis. One of the most important quality attributes that support efficacy and safety of interferon beta preparations is specific antiviral activity. Interferon beta activity is determined by the biological test method which can lead to an erroneous final result due to the system uncertainties that contribute to the overall uncertainty. Accurate assessment of specific activity plays an important role in adequate determination of the product's therapeutic dose, therefore the test method standardisation and validation are of particular relevance. **The aim of the study** was to validate a test procedure for assessing specific activity of human recombinant interferon beta preparations, using various cell/virus combinations, as illustrated by the example of Infibeta®. **Materials and methods:** WISH, Vero, A-549, and MDBK cells in combination with mouse encephalomyocarditis virus were used in the study. The testing was performed using the biological test method based on the interferon ability to suppress virus-induced cytopathic effects in cell cultures. The results were processed using methods of mathematical statistics and the Graph-PadPrism, Statistical 2/0 software package. **Results:** the paper compares the results of specific activity determination of Infibeta® (interferon beta-1b) using various cell/virus combinations. The dose-response curves were used to compare the test results. It was demonstrated that all the tested cell lines could be used in the biological test procedure for determination of interferon beta specific activity. However, the best results were obtained with A-549, WISH cells in combination with mouse encephalomyocarditis virus. The following validation characteristics were determined in the cell/virus systems: specificity, linearity, precision, and robustness. **Conclusions:** the study validated the test procedure that enables measurement of interferon beta specific activity in the range of 4.8–11.2 IU/mL at a satisfactory accuracy level, which guarantees reliable test results. The study demonstrated robustness, intermediate precision, and reproducibility of the test procedure.

**Key words:** interferon beta; specific activity; cell cultures; virus; dose–response curve; validation; acceptance criteria; assessment of validation parameters

**For citation:** Lebedeva Yu.N., Litvinova N.A., Lobanova T.N., Shukurov R.R., Khamitov R.A., Gaiderova L.A. Validation of a test procedure for determination of specific activity of human recombinant in-

terferon beta (Infibeta®) using various cell/virus combinations. *BIОpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(1):60–79. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-60-79>

## Введение

Одной из сложнейших комплексных и глобальных медико-социальных проблем, существующих как в Российской Федерации, так и во всем мире, считается проблема диагностики и лечения рассеянного склероза (РС). Рассеянный склероз – хроническое заболевание центральной нервной системы (ЦНС), в основе патогенеза которого лежат иммунные механизмы повреждения миелиновой оболочки с последующим присоединением атрофических процессов. Терапия РС имеет большое социально-экономическое значение в связи с большим распространением заболевания среди лиц молодого и трудоспособного возраста, у которых оно вызывает ограничение или потерю трудоспособности вследствие нарастания необратимого поражения ЦНС [1].

Учитывая ведущую роль в РС иммунологических нарушений, основным подходом к селективной иммунокоррекции при рассеянном склерозе является направленное воздействие на избыточную продукцию активирующих цитокинов и стимуляцию выработки *in vivo* провоспалительных цитокинов. К препаратам, основным действием которых является влияние на продукцию цитокинов, относятся препараты интерферона бета (ИФН бета), доказавшие клиническую эффективность в ходе многоцентровых клинических исследований двойным слепым методом [2, 3]. Точный механизм действия интерферонов при РС неизвестен. Считается, что ИФН бета снижает продукцию провоспалительных цитокинов – ФНО- $\alpha$  и интерферона гамма, замедляет пролиферацию Т-клеток, стимулирует выработку противовоспалительных цитокинов IL-10 и трансформирующего фактора роста бета-1, снижает экспрессию молекул гистосовместимости II класса и молекул адгезии, тем самым уменьшая антиген-представление в ЦНС и проницаемость гематоэнцефалического барьера [4].

В клинической практике в качестве первой линии терапии при рассеянном склерозе в Российской Федерации применяют рекомбинантные формы ИФН бета: ИФН бета-1а и ИФН бета-1b [2, 5].

Наиболее известны и используются для лечения РС препараты на основе ИФН бета-1b: референтный препарат Бетаферон® и его отечественный биоаналог Инфибета®. Опыт применения этих препаратов показал значительное снижение числа обострений, более легкое их течение, снижение по данным магнитно-резонансной томографии общей площади очагов воспаления [6]. Кроме того, показано, что при использовании препарата Инфибета® частота и выраженность основных клинических побочных реакций была значимо ниже, чем у других препаратов ИФН бета, применяемых в высоких дозах [7, 8].

Одним из важнейших показателей качества, отражающих эффективность и безопасность лекарственных препаратов ИФН бета, является специфическая активность. Для определения активности ИФН бета используют биологический метод, в основе которого – подавление цитопатического действия вирусов в чувствительных культурах клеток<sup>1</sup>. Использование в процедуре биологических объектов, особо чувствительных к изменению внешних условий, способствует большой вариабельности результатов определения по сравнению с химическими методами. Тем не менее биологические методы должны отвечать соответствующим стандартам точности и надежности, так как объективная информация о величине специфической активности, точность ее оценки позволяет обеспечить дозу препарата, гарантирующую необходимый терапевтический эффект. Таким образом, точное определение специфической активности важно для обеспечения эффективности и безопасности применения препаратов ИФН бета, в связи с чем особую актуальность приобретает стандартизация и валидация метода определения данного показателя.

Цель работы – валидация методики определения специфической активности препаратов ИФН бета человеческого рекомбинантного на примере препарата Инфибета® с использованием различных сочетаний клетка/вирус.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи: выбор красителя для проведения анализа; выбор наиболее подходящей для постановки методики

<sup>1</sup> 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.

системы клетка/вирус на основе сравнительного анализа результатов определения специфической активности ИФН бета; определение валидационных характеристик методики.

## Материалы и методы

Для проведения исследований были использованы следующие основные материалы:

- Инфибета®, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения, 9,6 млн МЕ (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия);
- Бетаферон®, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения, 9,6 млн МЕ (Байер Фарма АГ, Германия);
- международный стандартный образец ИФН бета Working standard interferon beta ser17 mutein, human rDNA derived (NIBSC code: 00/574) (МСО);
- стандартный образец, аттестованный относительно международного стандартного образца (СО);
- среда минимальная с L-глутамином и NEAA (MEM) (Invitrogen-GIBCO, США, кат. № 32561029);
- натрия бикарбонат (Sigma-Aldrich, кат. № S8875);
- пенициллин-стрептомицин, 100-кратный лиофилизированный (ООО НПП «ПанЭко», Россия, кат. № А065);
- трипсин-ЭДТА (10×) (Lonza, Швейцария, кат. № BE17-160E);
- эмбриональная бычья сыворотка (HyClone®, США, кат. № SV 30160);
- диметилсульфоксид (ДМСО) (Sigma-Aldrich, кат. № 472301);
- 0,4% раствор трипанового синего (Sigma-Aldrich, кат. № T8154);
- кристаллический фиолетовый (Merck, Германия, кат. № 1.15940.0025);
- набор для оценки пролиферации клеток ХТТ (реактив ХТТ), включающий раствор соли тетразолия ХТТ и реагент для активации (PanReac, AppliChem, кат. № А8088, или Roche, Merck, Sigma-Aldrich, кат. № 11465015001, или АТСС, кат. № 30-1011К);
- клеточные линии, чувствительные к интерферону: линия клеток амниона человека WISH (АТСС® CCL-25™); линия клеток карциномы протока легкого А-549 (АТСС® CCL-185™); линия клеток почки африканской зеленой мар-тышки Vero (АТСС® CCL-81™); линия клеток почки крупного рогатого скота MDBK (коллекция ФБНУ ГНЦ ВБ «Вектор», АТСС® CCL 22™;

ЕССАСС 90050801; РККК; колл. шифр № 110);

- индикаторный вирус энцефаломиокардита мышей (вирус EMCV) (АТСС® VR-1762™);
- планшеты 96-луночные (Corning, США, кат. № 3599).

Определение специфической активности проводили биологическим методом, который основан на способности ИФН бета-1b подавлять цитопатическое действие индикаторного вируса на культуре клеток, чувствительных к интерферону, в сравнении со стандартным образцом<sup>2</sup>.

### Получение рабочей суспензии клеток

Клеточные линии культивировали в ростовой среде MEM с добавлением 10% инактивированной эмбриональной бычьей сыворотки, 1–1,5 г/л натрия бикарбоната для поддержания рН в стандартных условиях: температура 37±1 °С, содержание углекислого газа в атмосфере инкубатора 5,0±0,5%. Пересев клеток осуществляли 3 раза в неделю до посевной плотности не более 0,2 млн клеток/мл и жизнеспособности не менее 85%. Перед анализом активности ИФН бета культуральные флаконы с клетками просматривали под микроскопом и отбирали культуры в логарифмической фазе роста с активно делящимися жизнеспособными клетками, сформировавшими монослой на внутренней поверхности флакона.

Из флакона удаляли ростовую среду и добавляли 1,0–2,0 мл 0,25% раствора Трипсин-ЭДТА, равномерно распределяли его по поверхности клеток покачиванием и выдерживали в течение 5–10 мин, контролируя отслоение клеток под микроскопом, затем вносили 6–8 мл ростовой среды, переносили содержимое в центрифужную пробирку и отмывали от остатков трипсина центрифугированием при 125 g в течение 5 мин. Клетки ресуспендировали в 10 мл ростовой среды и определяли количество жизнеспособных.

### Определение титра вируса

За титр вируса принимали величину, обратную разведению, в котором поражение клеточного монослоя в лунках составляет 50%. Титр вируса определяли для каждой серии исследуемого вируса, его величина составляла не менее 10<sup>5</sup> ТЦД<sub>50</sub> (тканевая цитопатическая доза, вызывающая гибель 50% клеток).

Для определения титра вируса клетки в состоянии монослоя с конфлюэнтностью 80–90% инфицировали разведениями вирусной суспензии

<sup>2</sup> 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.

от  $10^{-2}$  до  $10^{-10}$  в поддерживающей среде (среда MEM с добавлением 2% инактивированной эмбриональной бычьей сыворотки и 1,0–1,5 г/л натрия бикарбоната). С помощью окрашивания солями тетразолия определяли наибольшее разведение вируса, соответствующее ТЦД<sub>50</sub>. Проводили спектрофотометрию окрашенных клеток в лунках планшета при длине волны 450–500 нм с референсом 650–690 нм относительно воздуха. По результатам измерений строили кривую титрования, отражающую зависимость количества живых клеток (ось ординат) от десятичного логарифма фактора разведения вируса (ось абсцисс). Определяли значение десятичного логарифма разведения, соответствующего 50% выживанию клеток в лунках, с использованием статистической программы GraphPadPrism. Для определения цитопатического действия вируса на клетку использовали дозу вируса 100 ТЦД<sub>50</sub>. За титр (активность) вирусной суспензии принимали величину, обратную десятичному логарифму разведения ( $\lg EC_{50}$ ).

#### **Проведение анализа специфической активности интерферона бета**

Испытание для каждого образца проводили в трех независимых повторностях, используя индивидуальный планшет. Готовили последовательные двукратные разведения образцов испытуемых препаратов ИФН бета и стандартного образца в поддерживающей среде начиная с 150 МЕ/мл и вносили в 96-луночный планшет со сформированным клеточным монослоем, используя по 4 лунки на каждое разведение. После 24 ч инкубации в лунки планшета, содержащие двукратные разведения стандартного и испытуемого образцов, вносили по 50 мкл вирусной суспензии в дозе 100 ТЦД<sub>50</sub>. Одновременно с внесением вирусной суспензии осуществляли контроль дозы вируса – вносили по 50 мкл 10-кратных разведений вирусной суспензии начиная с разведения 100 ТЦД<sub>50</sub> до разведения 0,1 ТЦД<sub>50</sub> с 10-кратным шагом.

Планшеты инкубировали в стандартных условиях в течение  $48 \pm 3$  ч, до появления признаков цитопатических изменений в клеточном монослое с индикаторным вирусом в дозе 1 ТЦД<sub>50</sub>. Клеточный монослой в лунках с вирусом в дозе 0,1 ТЦД<sub>50</sub> должен соответствовать состоянию клеток в контрольных лунках (контроль под микроскопом). Окрашивание проводили кристаллическим фиолетовым или реактивом ХТТ.

#### **Учет и оценка результатов**

Планшеты помещали в планшетный спектрофотометр и определяли оптическую плотность

содержимого каждой лунки при длине волны 450–500 нм с референсом 650–690 нм относительно воздуха. Расчет специфической активности проводили с использованием пакета статистических программ GraphPadPrism. Результаты получали после введения в программу значений оптической плотности для каждой лунки и построения четырехпараметрической дозозависимой кривой. С этой целью в программе выбирали тип анализа *XY tables*, при котором каждая точка определяется двумя координатами (XY). Для каждой точки вводили значения четырех повторов (по числу лунок). В появившейся таблице для значений X вводили активность препарата в МЕ/мл. Для значений Y вводили оптические плотности содержимого лунок. Оценку результатов проводили с помощью нелинейного регрессионного анализа с построением сигмоидальных дозозависимых кривых и использованием четырехпараметрической статистической модели.

При расчете активности ИФН бета-1b по сигмоидальным кривым разведений испытуемого и стандартного образцов должны соблюдаться следующие условия: полученные величины оптических плотностей разведений испытуемого и стандартного образцов должны находиться в диапазоне между значениями оптических плотностей контрольных лунок.

При расчетах результатов использовали методы математической статистики и пакет программ GraphPadPrism, Statistica 2/0.

Коэффициент детерминации ( $R^2$ ) – характеризует степень зависимости между регрессионной моделью и исходными данными.  $R^2$  вычисляли по формуле (1):

$$R^2 = \frac{[\sum(X - \bar{X})(Y - \bar{Y})]^2}{\sum(X - \bar{X})^2 \sum(Y - \bar{Y})^2}, \quad (1)$$

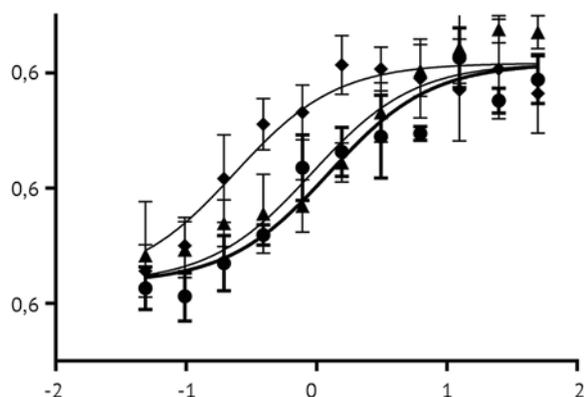
где  $X$  и  $Y$  – индивидуальные значения независимой и зависимой переменных соответственно, а  $\bar{X}$  и  $\bar{Y}$  – средние значения тех же переменных.

## **Результаты и обсуждение**

### **Выбор красителя для проведения анализа**

Обычно при инструментальном учете результатов определения специфической активности ИФН бета для окраски жизнеспособных клеток, не подвергшихся цитопатическому действию вируса, используют различные красители: кристаллический фиолетовый, МТТ, ХТТ и др. [9–11].

На первом этапе исследований испытывали комбинацию А-549/EMCV. При этом для окраши-



| Parameter | 15 min | 10 min | 5 min  |
|-----------|--------|--------|--------|
| $R^2$     | 0,8628 | 0,8449 | 0,7771 |
| $EC_{50}$ | 1,244  | 0,9195 | 0,2355 |

**Рис. 1.** Кривые зависимости «доза–эффект» при определении активности препарата Инфибета® в системе A-549/EMCV при окрашивании кристаллическим фиолетовым и разных режимах инкубации. ● 5, ▲ 10, ◆ 15 мин (min). Ось Y – оптическая плотность ( $OD_{570}$ ). Ось X – десятичный логарифм концентрации образца Инфибета®, [МЕ/мл].  $EC_{50}$  – полумаксимальная эффективная концентрация;  $R^2$  – коэффициент детерминации.

**Fig. 1.** Dose–response curves for determination of Infibeta® activity in the A-549/EMCV system after staining with crystal violet and using different incubation modes. ● 5, ▲ 10, ◆ 15 minutes (min). Y-axis–optical density ( $OD_{570}$ ). X-axis–decimal logarithm of Infibeta® sample concentration, [IU/mL].  $EC_{50}$ –half maximal effective concentration;  $R^2$ –coefficient of determination.

вания был использован кристаллический фиолетовый и испытаны разные режимы инкубации с красителем от 5 до 15 мин. Результаты представлены на рисунке 1.

Значение коэффициента детерминации ( $R^2$ ), рассчитанное по полученным экспериментальным данным при всех режимах инкубации, не удовлетворяет критериям приемлемости для биологических методов ( $R^2 \leq 85$ ). Кроме того, относительная разница между оптической плотностью лунок с живыми (наибольшая концентрация ИФН бета) и мертвыми (наименьшая концентрация ИФН бета) клетками не превышает 0,5 о.е., что также неприемлемо. При таких значениях критериев метод не позволяет получать точные и воспроизводимые результаты и нуждается в доработке.

Для снижения гетерогенности результатов и уменьшения разброса между 4 повторами кристаллический фиолетовый заменили на краситель ХТТ. Использование этого красителя основано на восстановлении формазана в присутствии акцептора электронов (активатора) и при участии митохондрий живых клеток до окрашенного комплекса оранжевого цвета. Основное преимущество его применения в вирусологическом тесте – возможность проводить процедуру с монослоем живых клеток, когда не требуются дополнительные этапы промывки, фиксации и просушки монослоя клеток, приводящие к его частичному отслоению и смыву клеток, что, в конечном итоге, приводит к искажению результатов анализа.

Испытание красителя ХТТ проводили на системе A-549/EMCV. Были получены результаты,

удовлетворяющие критериям приемлемости, а именно: результаты подчиняются 4-параметрической сигмоидальной зависимости (рис. 2), позволяющей произвести корректные расчеты параметров; значение  $R^2$  – не менее 0,85.

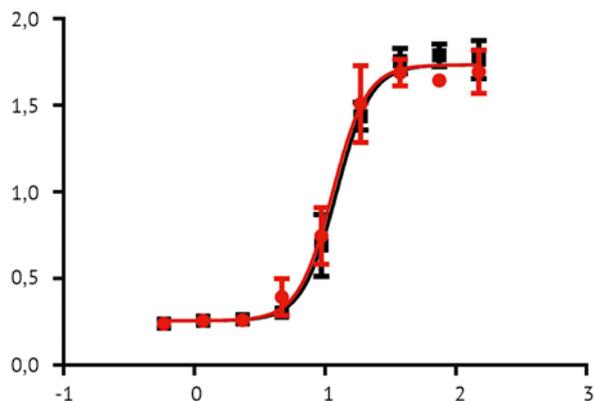
Последующие исследования проводили с применением красителя ХТТ.

#### **Сравнительное определение специфической активности препаратов Инфибета® и Бетаферон®**

Предварительную оценку результатов определения специфической активности препарата Инфибета® проводили по сравнению с референтным препаратом Бетаферон®. В испытаниях использовали три серии препарата Инфибета® и три серии препарата Бетаферон® на четырех клеточных линиях в сочетании с вирусом EMC. Полученные результаты (табл. 1, рис. 3) позволяют сделать вывод о сопоставимости лекарственных препаратов Инфибета® и Бетаферон® по показателю «Специфическая активность». Значения специфической активности в процентах получены путем вычисления отношения полумаксимальной эффективной концентрации ( $EC_{50}$ ) стандартного образца к полумаксимальной эффективной концентрации ( $EC_{50}$ ) испытуемого образца, умноженному на 100%.

#### **Сравнительный анализ результатов определения специфической активности интерферона бета с использованием различных систем клетка/вирус**

На втором этапе исследований, задачей которого был выбор для определения



| Parameter | RS     | Infibeta® |
|-----------|--------|-----------|
| $R^2$     | 0,9744 | 0,9874    |
| $EC_{50}$ | 11,40  | 12,23     |

**Рис. 2.** Кривая зависимости «доза–эффект» при определении активности препарата Инфибета® в системе A-549/EMCV с использованием реактива ХТТ. ● – стандартный образец (RS); ■ – испытуемый образец Инфибета® (Infibeta®). Ось Y – разница между значениями оптической плотности, измеренной при длинах волн 475 и 660 нм ( $OD_{475-660}$ ). Ось X – десятичный логарифм разведения стандартного и испытуемого образцов, [МЕ/мл].  $EC_{50}$  – полумаксимальная эффективная концентрация;  $R^2$  – коэффициент детерминации.

**Fig. 2.** Dose–response curve for determination of Infibeta® activity in the A-549/EMCV system using the XTT reagent. ● – reference standard (RS); ■ – Infibeta® test sample. Y-axis–difference between the optical density values measured at 475 nm and 660 nm ( $OD_{475-660}$ ). X-axis–decimal logarithm of the reference standard and test sample dilution, [IU/mL].  $EC_{50}$ –half maximal effective concentration;  $R^2$ –coefficient of determination.

специфической активности оптимальной биологической системы клетка/вирус, провели испытания с использованием клеточных линий WISH, A-549, Vero и MDBK в комбинации с вирусом EMCV. Сравнение результатов (табл. 2, рис. 4) проводили по характеристикам графика зависимости «доза–эффект» (наличие линейного участка, коэффициент детерминации, значение 50% эффективной дозы  $EC_{50}$ ).

Оптимальной для математического расчета параметров является такая кривая зависимости «доза–эффект», в которой 4 точки располагаются на верхнем плато (клетки живые), 4 точки – на перегибе (начали умирать, но еще проявляется защитное действие ИФН бета) и 4 точки – на нижнем плато (клетки мертвые, вирус полностью поразил клетки монослоя). Имеет значение и наклон кривой: наиболее приемлем наклон около 45 градусов, чем больше градус и круче кривая – тем больше вели-

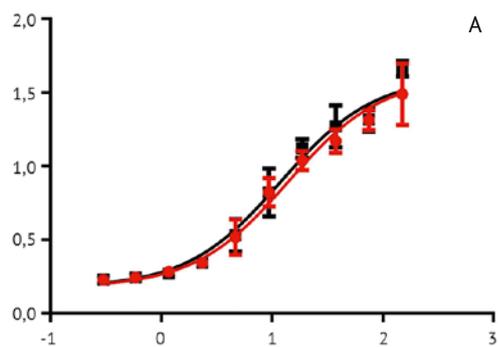
чина ошибки. Расположение точек на слишком пологой кривой также может привести к значительной погрешности при расчетах. Следует подобрать такую систему клетка/вирус, которая будет отвечать указанным требованиям.

Как видно из представленных данных, во всех изученных вариантах кривая «доза–эффект» имеет сигмоидную форму с выраженным линейным участком; в большинстве случаев соблюдается и второе условие (4 точки на перегибе, 4 точки на плато). Таким образом, из приведенных результатов можно сделать вывод о пригодности клеточных линий WISH, Vero, A-549, MDBK в комбинации с вирусом энцефаломиокардита мышей для постановки методики определения активности ИФН бета биологическим методом. Однако следует иметь в виду и некоторые особенности каждой из испытанных систем.

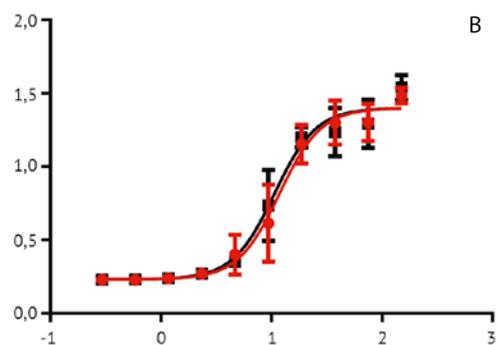
При использовании клеток линии Vero (рис. 5) кривая вышеуказанной зависимости часто имеет

**Таблица 1.** Результаты сравнения специфической активности препаратов Инфибета® и Бетаферон® на различных линиях клеток  
**Table 1.** Results of comparison of Infibeta® and Betaferon® specific activities in different cell lines

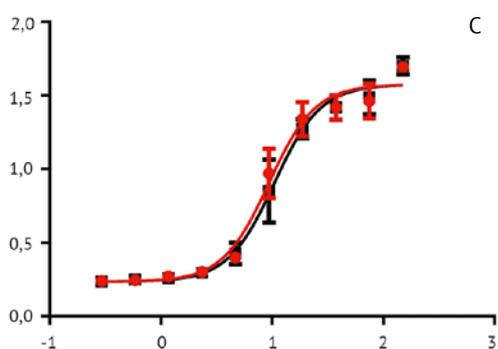
| Линия клеток<br><i>Cell line</i> | Отношение активности препарата Инфибета® к активности препарата Бетаферон®, %<br><i>Ratio of Infibeta® and Betaferon® specific activities, %</i> |
|----------------------------------|--|
| WISH                             | 88,0   |
| MDBK                             | 95,6   |
| A-549                            | 94,3   |
| Vero                             | 100,2  |



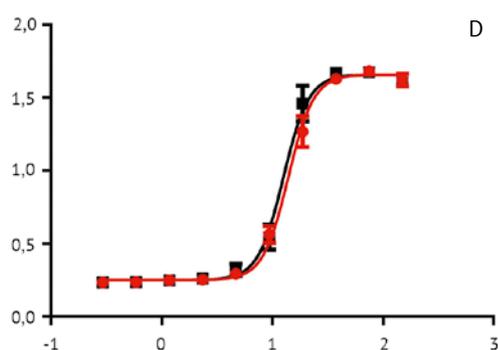
| Parameter | Betaferon® | Infibeta® |
|-----------|------------|-----------|
| $R^2$     | 0,9621     | 0,9616    |
| $EC_{50}$ | 13,97      | 11,96     |



| Parameter | Betaferon® | Infibeta® |
|-----------|------------|-----------|
| $R^2$     | 0,9488     | 0,9482    |
| $EC_{50}$ | 11,79      | 10,64     |



| Parameter | Betaferon® | Infibeta® |
|-----------|------------|-----------|
| $R^2$     | 0,9714     | 0,9730    |
| $EC_{50}$ | 9,346      | 10,47     |



| Parameter | Betaferon® | Infibeta® |
|-----------|------------|-----------|
| $R^2$     | 0,9945     | 0,9925    |
| $EC_{50}$ | 13,92      | 12,59     |

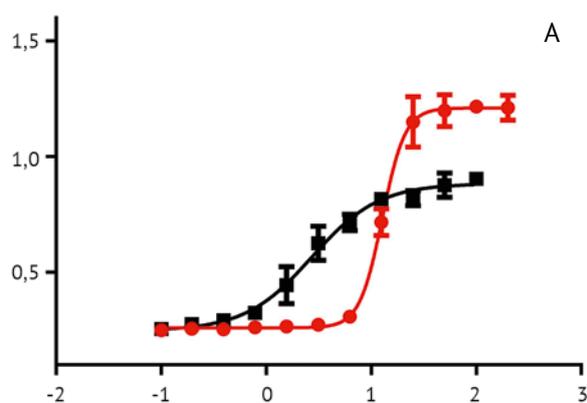
**Рис. 3.** Кривые «доза–эффект» при сравнительном определении противовирусной активности препаратов Инфибета® и Бетаферон® на различных культурах клеток (А – MDBK, В – WISH, С – А-549, D – Vero) в комбинации с вирусом EMCV. ● – стандартный образец Бетаферон® (Betaferon®); ■ – испытуемый образец Инфибета® (Infibeta®). Ось Y – разность значений оптической плотности, измеренной при длинах волн 475 и 660 нм ( $OD_{475-660}$ ). Ось X – десятичный логарифм разведения стандартного и испытуемого образцов, [МЕ/мл].  $EC_{50}$  – полумаксимальная эффективная концентрация.  $R^2$  – коэффициент детерминации.

**Fig. 3.** Dose–response curves for comparison of Infibeta® and Betaferon® antiviral activities in different cell cultures (A–MDBK, B–WISH, C–A-549, D–Vero) combined with EMCV. ●– Betaferon® reference standard; ■– Infibeta® test sample. Y-axis–difference between the optical density values measured at 475 nm and 660 nm ( $OD_{475-660}$ ). X-axis–decimal logarithm of the reference standard and test sample dilution, [IU/mL].  $EC_{50}$ –half maximal effective concentration;  $R^2$ –coefficient of determination.

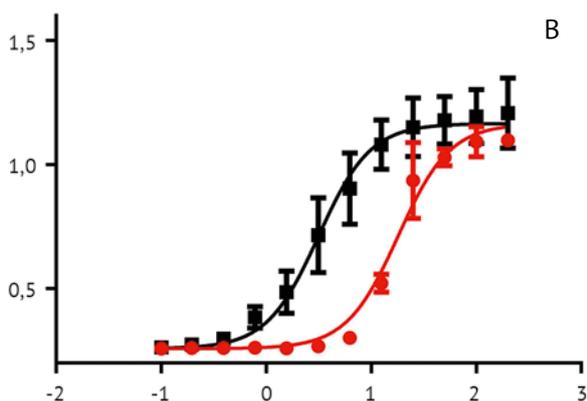
**Таблица 2.** Определение специфической активности препарата Инфибета® на различных культурах клеток с вирусом EMCV  
**Table 2.** Determination of Infibeta® specific activity in different cell cultures with the EMCV virus

| Наименование образца<br><i>Sample</i> | Значение специфической активности при использовании клеточной линии<br><i>Specific activity in the cell line</i> |       |       |      |       |       |       |       | Среднее, %<br><i>Mean, %</i> |
|---------------------------------------|--|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|------------------------------|
|                                       | MDBK   |       | WISH  |      | A-549 |       | Vero  |       |                              |
| Инфибета® 1<br><i>Infibeta® 1</i>     | 121,6  | 100,0 | 102,8 | 94,5 | 102,9 | 105,8 | 102,4 | 100,2 | 104,6                        |
| Инфибета® 2<br><i>Infibeta® 2</i>     | 87,7   | 89,3  | 91,7  | 88,7 | 93,8  | 91,2  | 94,8  | 90,1  | 90,4                         |

*Примечание.* Указан % от номинального значения активности стандартного образца.  
*Note.* The table gives the percentage of the assigned activity of the reference standard.



| Parameter | WISH   | Vero   |
|-----------|--------|--------|
| $R^2$     | 0,9914 | 0,9729 |
| $EC_{50}$ | 12,75  | 2,713  |



| Parameter | A-549  | MDBK   |
|-----------|--------|--------|
| $R^2$     | 0,9706 | 0,9429 |
| $EC_{50}$ | 18,02  | 3,146  |

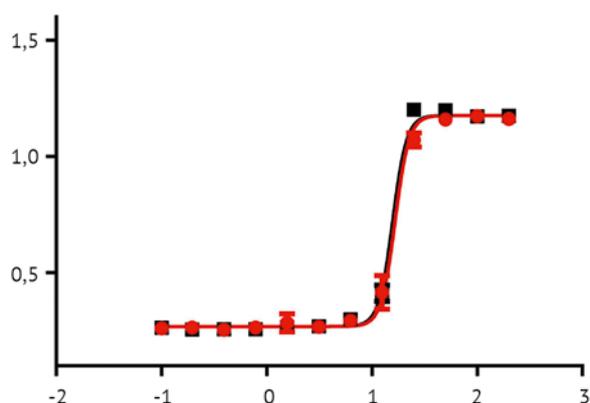
**Рис. 4.** Кривые зависимости «доза–эффект» при определении специфической активности препарата Инфибета® на различных культурах клеток в комбинации с вирусом EMCV. А: ● WISH, ■ Vero; В: ● A-549, ■ MDBK. Ось Y – разница значений оптической плотности, измеренной при длинах волн 475 и 660 нм ( $OD_{475-660}$ ). Ось X – десятичный логарифм разведения стандартного и испытуемого образцов, [МЕ/мл].  $EC_{50}$  – полумаксимальная эффективная концентрация.  $R^2$  – коэффициент детерминации.

**Fig. 4.** Dose–response curves for determination of Infibeta® specific activity in different cell cultures combined with EMCV. A: ● WISH, ■ Vero; B: ● A-549, ■ MDBK. Y-axis–difference between the optical density values measured at 475 nm and 660 nm ( $OD_{475-660}$ ). X-axis–decimal logarithm of the reference standard and test sample dilution, [IU/mL].  $EC_{50}$ –half maximal effective concentration;  $R^2$ –coefficient of determination.

очень крутой наклон, ярко выраженное верхнее и нижнее плато, в результате при расчете  $EC_{50}$  может возникнуть погрешность.

При использовании клеточной линии MDBK (рис. 6) кривая зависимости, наоборот, имеет слишком пологую форму, верхнее и нижнее плато выражены неявно, что может привести к увеличению погрешности при расчете. Следует отметить также, что именно при проведении исследований на клеточных культурах MDBK и Vero наблюдался наибольший разброс данных.

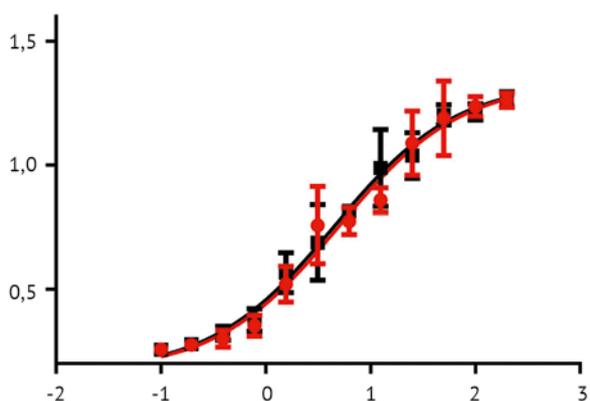
При работе с клетками WISH следует иметь в виду, что по указанной в паспорте информации эта линия клеток неоднородна по составу и при неблагоприятных условиях может перерождаться в фибробластоподобные клетки. В силу этого обстоятельства манипуляции с данной клеточной линией требуют особого внимания: следует не допускать достижения высоких концентраций клеток в монослое и своевременно их пересевать. Однако при правильном использовании эта культура позволяет получать очень



| Parameter | RS     | Infibeta® |
|-----------|--------|-----------|
| $R^2$     | 0,9943 | 0,9956    |
| $EC_{50}$ | 16,62  | 15,76     |

**Рис. 5.** Вид сигмоидной кривой при определении специфической активности препарата Инфибета® на культуре клеток Vero в комбинации с вирусом EMCV. ● стандартный образец (RS); ■ испытуемый образец Инфибета® (Infibeta®). Ось Y – разница значений оптической плотности, измеренной при длинах волн 475 и 660 нм ( $OD_{475-660}$ ). Ось X – десятичный логарифм разведения стандартного и испытуемого образцов, [МЕ/мл].  $EC_{50}$  – полумаксимальная эффективная концентрация.  $R^2$  – коэффициент детерминации.

**Fig. 5.** Sigmoid curve for determination of Infibeta® specific activity in Vero cell culture combined with EMCV. ● reference standard (RS); ■ Infibeta® test sample. Y-axis—difference between the optical density values measured at 475 nm and 660 nm ( $OD_{475-660}$ ). X-axis—decimal logarithm of the reference standard and test sample dilution, [IU/mL].  $EC_{50}$ —half maximal effective concentration;  $R^2$ —coefficient of determination.



| Parameter | RS     | Infibeta® |
|-----------|--------|-----------|
| $R^2$     | 0,9485 | 0,9623    |
| $EC_{50}$ | 4,936  | 4,446     |

**Рис. 6.** Вид сигмоидной кривой при определении специфической активности препарата Инфибета® на культуре клеток MDBK в комбинации с вирусом EMCV. ● стандартный образец (RS); ■ испытуемый образец Инфибета® (Infibeta®). Ось Y – разница значений оптической плотности, измеренной при длинах волн 475 и 660 нм ( $OD_{475-660}$ ). Ось X – десятичный логарифм разведения стандартного и испытуемого образца, [МЕ/мл].  $EC_{50}$  – полумаксимальная эффективная концентрация.  $R^2$  – коэффициент детерминации.

**Fig. 6.** Sigmoid curve for determination of Infibeta® specific activity in MDBK cell culture combined with EMCV. ● reference standard (RS); ■ Infibeta® test sample. Y-axis—difference between the optical density values measured at 475 nm and 660 nm ( $OD_{475-660}$ ). X-axis—decimal logarithm of the reference standard and test sample dilution, [IU/mL].  $EC_{50}$ —half maximal effective concentration;  $R^2$ —coefficient of determination.

четкие и воспроизводимые данные, наклон кривой зависимости величины оптической плотности от концентрации интерферона обеспечивает правильный расчет  $EC_{50}$ .

Итак, сравнительное изучение особенностей определения специфической активности препарата Инфибета® в различных культурах клеток показало, что все испытанные комбинации клетка/вирус пригодны для определения указанного показателя. Однако с учетом особенностей изученных вариантов можно заключить, что наилучшие результаты получены с использованием клеток A-549, WISH в сочетании с вирусом EMCV.

#### **Определение валидационных характеристик методики**

Согласно современным требованиям регуляторных документов локального и международного законодательства, в том числе Государственной фармакопеи Российской Федерации<sup>3</sup> и Международного совета по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH)<sup>4</sup>, для подтверждения пригодности и адекватности метода для целевого применения обязательным этапом при фармацевтической разработке продукта является валидация.

При определении специфической активности *in vitro* оценивают следующие характеристики: специфичность, точность, линейность, прецизионность, устойчивость (робастность). В валидационных испытаниях использовали следующие пары клетка/вирус: WISH/EMCV, A-549/EMCV, Vero/EMCV.

#### **Специфичность**

Для определения специфичности методики проведено сравнительное определение специфической активности препарата Инфибета® и белка другого класса (unknown protein, UP) с использованием двух клеточных линий (рис. 7). Количественный результат получен только для препарата ИФН бета, что подтверждает специфичность методики.

#### **Точность**

Правильность (точность) аналитического метода – степень, с которой сходятся результаты испытаний и истинные значения. В целях установления правильности и диапазона примене-

ния биологического метода испытуемые образцы для валидации могут быть получены путем серии разведений МСО с целью оценки линейности зависимости между известной и установленной относительной активностью.

Измеряли  $EC_{50}$  в смещенных диапазонах концентраций  $X$  (60, 80, 100, 125, 140, 200%) в трех независимых исследованиях для каждого тестируемого диапазона. Активность ( $A$ , %) в каждом эксперименте вычисляли по формуле (2):

$$A = EC_{50}(100\%) / EC_{50}(X\%) \times 100\% , \quad (2)$$

где  $EC_{50}$  – полумаксимальная эффективная концентрация.

Точность определения активности ( $R$ , %) вычисляли по формуле (3):

$$R = A_{X \text{ полученное}} / A_{X \text{ теоретическое}} \times 100\% , \quad (3)$$

где  $A_{X \text{ полученное}}$  – активность препарата, полученная экспериментально,  $A_{X \text{ теоретическое}}$  – активность препарата теоретическая.

Установлены следующие критерии приемлемости: значение  $R$  для испытуемого раствора 100% должно составлять 85–115%, для испытуемых растворов 80 и 125% – 80–125% (табл. 3).

Полученные значения  $R$  удовлетворяют установленным критериям приемлемости, что подтверждает заданную точность методики.

#### **Сходимость**

Для определения сходимости проводили 6 параллельных анализов одним аналитиком в одних и тех же условиях. Предварительно оценивали однородность выборки с использованием дисперсионного анализа (табл. 4).

Так как рассчитанные параметры (табл. 4) подтверждают однородность полученных результатов, все значения выборки можно использовать для вычисления относительного стандартного отклонения. Рассчитанное по экспериментальным результатам значение  $RSD = 7,48\%$  удовлетворяет критерию приемлемости (не более 15%). Методика дает удовлетворительную сходимость результатов.

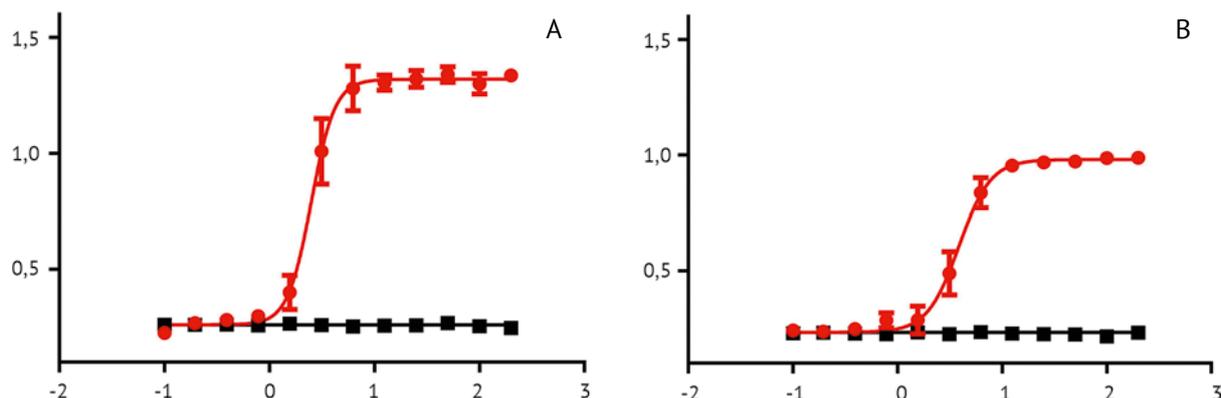
В исследовании использованы клетки одного пассажа и вирусный материал одной серии (табл. 5).

#### **Воспроизводимость**

Для оценки внутрилабораторной прецизионности (воспроизводимости) методики проведено определение специфической активности

<sup>3</sup> Общая фармакопейная статья 1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

<sup>4</sup> ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Guidance for Industry; 2005.



**Рис. 7.** Результаты определения специфичности методики на двух культурах клеток: А-549 (А) и WISH (В). ● – испытуемый образец Инфибета®; ■ – неизвестный белок. Ось Y – разница значений оптической плотности, измеренной при длинах волн 475 и 660 нм ( $OD_{475-660}$ ). Ось X – десятичный логарифм концентрации образца, [МЕ/мл].

**Fig. 7.** Assessment of the test procedure specificity in two cell cultures: A-549 (A) and WISH (B). ● – Infibeta® test sample; ■ – unknown protein (UP). Y-axis – difference between the optical density values measured at 475 nm and 660 nm ( $OD_{475-660}$ ). X-axis – decimal logarithm of the test sample concentration, [IU/mL].

в испытуемом образце (100%) двумя аналитиками (по 3 независимых исследования каждым) с использованием трех серий Инфибета® в одинаковых условиях (на одной суспензии клеток А-549 и на одной серии вирусного материала) (табл. 6).

Значение *RSD* для серии измерений каждого аналитика не превышает 15%. Значимые отличия между средними значениями специфической активности, полученными двумя аналитиками, не выявлены (при уровне значимости  $P = 0,95$ ).

Полученные результаты удовлетворяют критерию приемлемости, что подтверждает установленный уровень внутрилабораторной прецизионности методики.

Проведена также оценка межлабораторной прецизионности по результатам, полученным в двух независимых лабораториях разными аналитиками на разном оборудовании и в разные дни (табл. 7, рис. 8, 9). С этой целью одни и те же серии препарата Инфибета® были проанализированы в трех повторностях с использованием СО, аттестованного относительно МСО, в каждой из лабораторий. На основании полученных результатов рассчитаны величины стандартного отклонения и относительного стандартного отклонения.

Согласно методическим рекомендациям по проведению межлабораторных сличительных испытаний<sup>5</sup> расчет проводили по Z-индексу по следующей формуле (4):

$$Z = (x - X) / \sigma, \quad (4)$$

где  $x$  – результат лаборатории;  $X$  – среднее значение между результатами, полученными в разных лабораториях;  $\sigma$  – стандартное отклонение, рассчитанное по результатам оценки воспроизводимости методики.

При  $|Z| \leq 2$  результат признается положительным по критерию 3, при  $2 < |Z| < 3$  – сомнительным, при  $|Z| \geq 3$  – отрицательным.

Полученный результат (табл. 8) удовлетворяет критериям приемлемости.

#### Линейность

Линейность методики устанавливается по наличию линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики.

Тест на линейность проводили в выбранном интервале 60–140% (от 4,8 до 11,2 млн МЕ/мл). Экспериментальные данные обрабатывали методом наименьших квадратов с использованием линейной модели. Результаты приведены на рисунке 10.

Линейная зависимость наблюдается в диапазоне 60–140% от номинальной активности (8 млн МЕ/мл). В полученном уравнении линейной зависимости  $y = kx + b$  значение коэффициента  $k$  должно быть равно  $1,0 \pm 0,2$ , а значение коэффициента детерминации  $R^2$  должно быть не менее 0,95.

<sup>5</sup> ГОСТ Р 50779.60-2017 Статистические методы при проверке квалификации посредством межлабораторных испытаний.

**Таблица 3.** Значения параметров, характеризующих точность валидируемой методики  
**Table 3.** Values characterising the accuracy of the validated test procedure

| Значение специфической активности<br><i>Specific activity, %</i>            | Теоретическое значение X<br><i>Theoretical value X</i> |        |       |        |        |        |
|---|--|--------|-------|--------|--------|--------|
|   | 60   | 80     | 100   | 125    | 140    | 200    |
| Экспериментальное значение X, %<br><i>Experimental value X, %</i>           | 60,4   | 67,2   | 105,7 | 131    | 147,8  | 207,7  |
|   | 57,3   | 92,9   | 105,5 | 108,4  | 130,4  | 188,2  |
|   | 59,4   | 79,8   | 115,9 | 111,4  | 145,4  | -      |
|   | 51,8   | 73,7   | 108,5 | 114,9  | 135,2  |        |
|   | 60,4   | 80,5   | 91,9  | 130,1  | 142,5  |        |
|   | 61,3   | 80,2   | 109,3 | 131,3  | -      |        |
|   | 50,7   | 85,5   | 93,5  | 143,7  |        |        |
|   | -  | 88,2   | 115,4 | 131,5  |        |        |
|   |  | -      | 110,6 | 122,0  |        |        |
|   |  |        | 108,4 | 122,5  |        |        |
| 100,2   | 124,8  |        |       |        |        |        |
| $\bar{X}$ , %   | 57,3   | 81,00  | 105,9 | 124,69 | 140,26 |        |
| <i>SD</i>   | 4,35   | 8,10   | 7,87  | 10,35  | 7,26   | 13,79  |
| <i>RSD</i>  | 7,58   | 10,01  | 7,43  | 8,30   | 5,18   | 6,97   |
| Точность экспериментальная R, %<br><i>Experimental accuracy value R, %</i>  | 100,66   | 84     | 105,7 | 104,8  | 105,57 | 103,85 |
|   | 95,5   | 116,13 | 105,5 | 86,72  | 93,14  | 94,1   |
|   | 99   | 99,75  | 115,9 | 89,12  | 103,86 | -      |
|   | 86,33  | 92,13  | 108,5 | 91,92  | 96,57  |        |
|   | 100,67   | 100,63 | 91,9  | 104,08 | 101,79 |        |
|   | 102,17   | 100,25 | 109,3 | 105,04 | -      |        |
|   | 84,5   | 106,88 | 93,5  | 114,96 |        |        |
|   | -  | 110,25 | 115,4 | 105,2  |        |        |
|   |  | -      | 110,6 | 97,6   |        |        |
|   |  |        | 108,4 | 98     |        |        |
| 100,2   | 99,84  |        |       |        |        |        |
| Среднее значение R, %<br><i>Mean R, %</i>                                   | 95,55  | 101,25 | 105,9 | 99,75  | 100,19 |        |
| Среднее значение R, % для всех измерений<br><i>Mean R for all values, %</i> | 100,27   |        |       |        |        |        |

Примечание. *SD* – стандартное отклонение, *RSD* – относительное стандартное отклонение. «-» – не определяли.  
 Note. *SD*—standard deviation, *RSD*—relative standard deviation. – not determined.

Таблица 4. Значения параметров, характеризующих однородность выборки

Table 4. Values characterising the sample homogeneity

| Характеристики выборки<br>Sample characteristics   |  |
|--|--|
| $R = X_{\max} - X_{\min} = 115,9 - 91,9 = 24,0$  |  |
| $ x1 - x2  =  115,9 - 109,3  = 6,6$  | $ x5 - x6  =  105,1 - 91,9  = 13,2$  |
| $CR_{\text{найденное1}} =  x1 - x2  / R = 6,6 / 24,0 = 0,275$<br>$CR_{\text{determination1}} =  x1 - x2  / R = 6,6 / 24,0 = 0,275$ | $CR_{\text{найденное2}} =  x5 - x6  / R = 13,2 / 24,0 = 0,55$<br>$CR_{\text{determination2}} =  x5 - x6  / R = 13,2 / 24,0 = 0,55$ |
| $CR_{\text{крит}}(P=0,95) = 0,56$<br>$CR_{\text{critical}}(P=0,95) = 0,56$   |  |
| $CR_{\text{найденное1}} < CR_{\text{крит}}(P=0,95)$<br>$CR_{\text{determination1}} < CR_{\text{critical}}(P=0,95)$                 | $CR_{\text{найденное2}} < CR_{\text{крит}}(P=0,95)$<br>$CR_{\text{determination2}} < CR_{\text{critical}}(P=0,95)$                 |

Примечание. X – значение параметра, R – размах, CR – критический диапазон для уровня вероятности 95%.

Note. X–value of the parameter, R–range, CR–critical range for the 95% probability level.

Таблица 5. Значения параметров, характеризующих сходимость валидируемой методики

Table 5. Values characterising the repeatability of the validated test procedure

| Значение специфической активности, %<br>(6 повторов)<br>Specific activity, % (6 replicates) |       |       |       |       |      | Среднее значение<br>специфической активности, %<br>Mean specific activity, % | Коэффициент<br>вариации (CV), %<br>Coefficient of<br>variation (CV), % | Стандартное<br>отклонение (SD)<br>Standard deviation<br>(SD) |
|---|-------|-------|-------|-------|------|--|--|--|
| 115,9   | 109,3 | 108,5 | 105,7 | 105,1 | 91,9 | 106,1  | 7,48   | 7,94   |

Как видно из представленных данных, наблюдается линейная зависимость экспериментальных значений специфической активности от расчетных значений. Значение  $R^2 = 0,9963$ . Уравнение полученной линейной функции имеет следующий вид:  $y = 0,9877x + 1,8037$ .

Полученные данные удовлетворяют критериям приемлемости, линейность методики подтверждена в диапазоне 60–140%.

#### Робастность

Робастность методики оценивали путем сравнения результатов испытаний при использовании вирусного материала разных серий. Оценку проводили по вариабельности значений  $EC_{50}$  для одной серии препарата Инфибета® и двух серий вирусного материала, вариабельность оценивали по RSD (табл. 9).

Как видно из представленных результатов, величина RSD для двух серий вирусной суспензии составляет не более 25%. Результаты соответствуют критериям приемлемости, робастность методики подтверждена.

#### Выводы

Сравнительное изучение особенностей определения специфической активности препарата Инфибета® в различных культурах клеток показало, что все испытанные комбинации клетка/вирус пригодны для определения указанного показателя. С учетом особенностей изученных вариантов для валидации методики использовали следующие пары клетка/вирус: WISH/EMCV, A-549/EMCV, Vero/EMCV.

В результате проведения испытаний определены валидационные характеристики методики: специфичность, прецизионность, линейность, робастность.

Показано, что методика позволяет измерять специфическую активность ИФН бета в диапазоне от 4,8 до 11,2 млн МЕ/мл с точностью, удовлетворяющей критериям приемлемости, что гарантирует получение достоверных результатов анализа. Подтверждена устойчивость, а также внутри- и межлабораторная воспроизводимость методики.

**Таблица 6.** Значения параметров, характеризующих внутрилабораторную прецизионность валидируемой методики  
**Table 6.** Values characterising the intermediate precision of the validated test procedure

| Наименование образца<br><i>Sample</i> | Аналитик<br><i>Operator</i>     | Клеточная линия A-549<br><i>Cell line A-549</i>  |  |                                |       |      |  |        | По двум аналитикам<br><i>Two operators</i>                                       |       |        |
|---------------------------------------|---------------------------------|--|--|--------------------------------|-------|------|--|--------|--|-------|--------|
|                                       |                                 | EC <sub>50</sub> CO<br><i>EC<sub>50</sub> RS</i> | EC <sub>50</sub> Инфибета®<br><i>EC<sub>50</sub> Infibeta®</i> | № планшета<br><i>Plate No.</i> | A, %  | SD   | среднее значение специфической активности, %<br><i>mean specific activity, %</i> | RSD, % | среднее значение специфической активности, %<br><i>mean specific activity, %</i> | SD    | RSD, % |
| Инфибета®1<br><i>Infibeta®1</i>       | Аналитик 1<br><i>Operator 1</i> | 11,91  | 11,3   | 1                              | 105,4 | 3,6  | 109,6  | 3,3    | 107,15   | 14,04 | 13,10  |
|                                       |                                 | 11,79  | 13,21  | 2                              | 112,0 |      |  |        |  |       |        |
|                                       |                                 | 12,25  | 13,63  | 3                              | 111,3 |      |  |        |  |       |        |
|                                       | Аналитик 2<br><i>Operator 2</i> | 12,13  | 9,825  | 4                              | 81,0  | 21,5 | 104,7  | 20,5   |  |       |        |
|                                       |                                 | 16,29  | 20,02  | 5                              | 122,9 |      |  |        |  |       |        |
|                                       |                                 | 12,69  | 14   | 6                              | 110,3 |      |  |        |  |       |        |
| Инфибета®2<br><i>Infibeta® 2</i>      | Аналитик 1<br><i>Operator 1</i> | 10,45  | 11,52  | 7                              | 110,2 | 5,3  | 113,3  | 4,7    | 106,92   | 8,79  | 8,22   |
|                                       |                                 | 10,79  | 11,89  | 8                              | 110,2 |      |  |        |  |       |        |
|                                       |                                 | 10,53  | 12,57  | 9                              | 119,4 |      |  |        |  |       |        |
|                                       | Аналитик 2<br><i>Operator 2</i> | 12,22  | 12,98  | 10                             | 106,2 | 6,7  | 100,6  | 6,6    |  |       |        |
|                                       |                                 | 11,11  | 11,36  | 11                             | 102,3 |      |  |        |  |       |        |
|                                       |                                 | 8,699  | 8,111  | 12                             | 93,2  |      |  |        |  |       |        |
| Инфибета®3<br><i>Infibeta® 3</i>      | Аналитик 1<br><i>Operator 1</i> | 12,08  | 12,73  | 13                             | 105,4 | 13,6 | 105,6  | 12,8   | 108,08   | 11,34 | 10,50  |
|                                       |                                 | 6,635  | 7,919  | 14                             | 119,4 |      |  |        |  |       |        |
|                                       |                                 | 10,45  | 9,636  | 15                             | 92,2  |      |  |        |  |       |        |
|                                       | Аналитик 2<br><i>Operator 2</i> | 10,57  | 12,93  | 16                             | 122,3 | 10,9 | 110,5  | 9,9    |  |       |        |
|                                       |                                 | 8,814  | 9,562  | 17                             | 108,5 |      |  |        |  |       |        |
|                                       |                                 | 11,13  | 11,21  | 18                             | 100,7 |      |  |        |  |       |        |

Примечание. EC<sub>50</sub> – полумаксимальная эффективная концентрация, SD – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, A – активность испытуемых образцов, CO – стандартный образец.

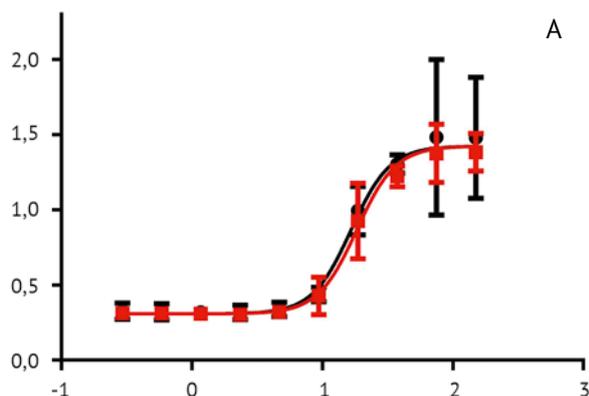
Note. EC<sub>50</sub> –half maximal effective concentration, SD–standard deviation, RSD–relative standard deviation, A–activity, RS–reference standard.

**Таблица 7.** Значения параметров, характеризующих межлабораторную прецизионность валидируемой методики  
**Table 7.** Values characterising the reproducibility of the validated test procedure

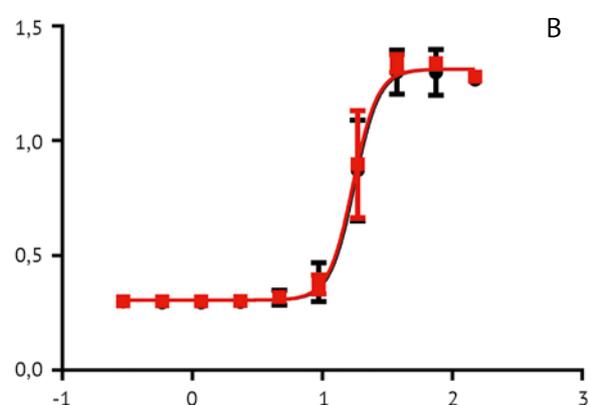
| Наименование образца<br><i>Sample</i>   | Значение специфической активности в индивидуальных планшетах, %<br><i>Specific activity in individual plates, %</i> | SD, % | Среднее значение специфической активности, %<br><i>Mean specific activity, %</i> | RSD, % |
|---|---|-------|--|--------|
| Инфибета®, измерение в АО «ГЕНЕРИУМ»<br><i>Infibeta® analysed by Generium</i>                       | 105,6   | 3,99  | 102,1  | 3,91   |
|   | 103,0   |       |  |        |
|   | 97,7  |       |  |        |
| Инфибета®, измерение в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России<br><i>Infibeta® analysed by FSBI "SCEEMP"</i> | 110,5   | 6,6   | 104,9  | 6,3    |
|   | 97,6  |       |  |        |
|   | 106,6   |       |  |        |

Примечание. SD – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение.

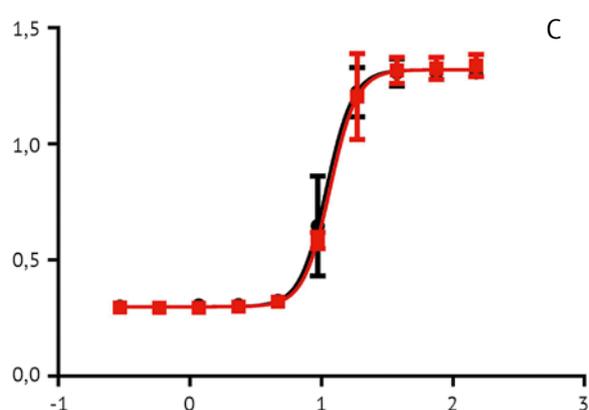
Note. SD–standard deviation, RSD–relative standard deviation.



| Parameter | RS     | Infibeta® |
|-----------|--------|-----------|
| $R^2$     | 0,8642 | 0,9461    |
| $EC_{50}$ | 16,60  | 18,34     |



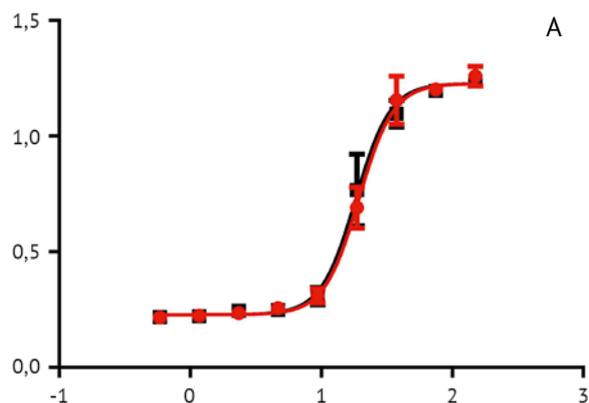
| Parameter | RS     | Infibeta® |
|-----------|--------|-----------|
| $R^2$     | 0,9687 | 0,9759    |
| $EC_{50}$ | 17,66  | 17,23     |



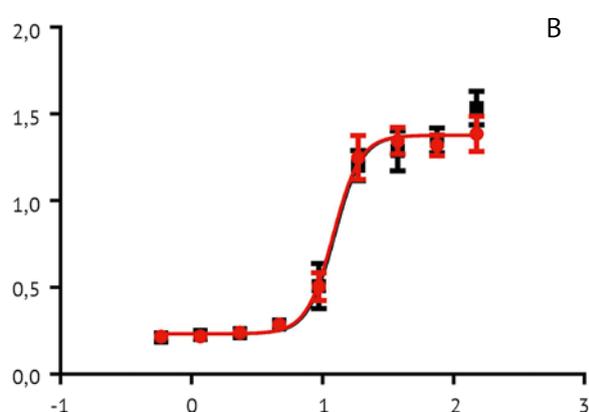
| Parameter | RS     | Infibeta® |
|-----------|--------|-----------|
| $R^2$     | 0,9776 | 0,9849    |
| $EC_{50}$ | 10,95  | 11,67     |

**Рис. 8.** Результаты испытаний, полученные в лаборатории ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, для расчета межлабораторной прецизионности валидируемой методики (А, В, С). Противовирусная активность интерферона бета биологическим методом определена в системе WISH/EMCV. ● стандартный образец (RS); ■ испытуемый образец Инфибета® (Infibeta®). Ось Y – разница значений оптической плотности, измеренной при длинах волн 475 и 660 нм ( $OD_{475-660}$ ). Ось X – десятичный логарифм разведения стандартного и испытуемого образцов, [МЕ/мл].  $EC_{50}$  – полумаксимальная эффективная концентрация;  $R^2$  – коэффициент детерминации.

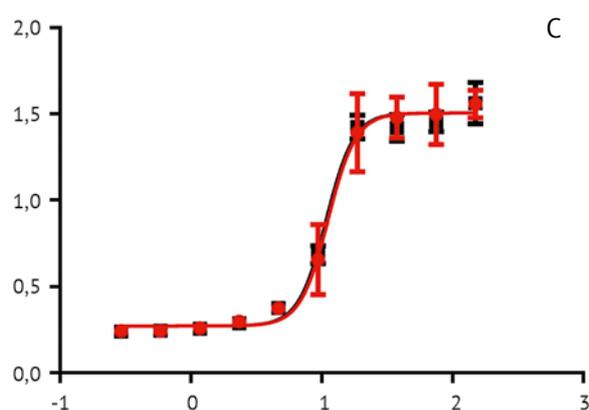
**Fig. 8.** Test results obtained by the FSBI "SCEEMP" for calculation of reproducibility of the validated test procedure (A, B, C). The antiviral activity of interferon beta was determined by the biological test method in the WISH/EMCV system. ● reference standard (RS); ■ Infibeta® test sample. Y-axis – difference between the optical density values measured at 475 nm and 660 nm ( $OD_{475-660}$ ). X-axis – decimal logarithm of the reference standard and test sample dilution, [IU/mL].  $EC_{50}$  – half maximal effective concentration;  $R^2$  – coefficient of determination.



| Parameter | RS     | Infibeta® |
|-----------|--------|-----------|
| $R^2$     | 0,9890 | 0,9840    |
| $EC_{50}$ | 19,36  | 18,32     |



| Parameter | RS     | Infibeta® |
|-----------|--------|-----------|
| $R^2$     | 0,9840 | 0,9719    |
| $EC_{50}$ | 12,11  | 12,39     |



| Parameter | RS     | Infibeta® |
|-----------|--------|-----------|
| $R^2$     | 0,9643 | 0,9860    |
| $EC_{50}$ | 11,20  | 10,87     |

**Рис. 9.** Результаты испытаний, полученные в лаборатории АО «ГЕНЕРИУМ», для расчета межлабораторной прецизионности валидируемой методики (А, В, С). Противовирусная активность интерферона бета биологическим методом определена в системе WISH/EMCV. ● стандартный образец (RS); ■ испытуемый образец Инфибета® (Infibeta®). Ось Y – разница значений оптической плотности, измеренной при длинах волн 475 и 660 нм ( $OD_{475-660}$ ). Ось X – десятичный логарифм разведения стандартного и испытуемого образцов, [МЕ/мл].  $EC_{50}$  – полумаксимальная эффективная концентрация;  $R^2$  – коэффициент детерминации.

**Fig. 9.** Test results obtained by Generium for calculation of reproducibility of the validated test procedure (A, B, C). The antiviral activity of interferon beta was determined by the biological test method in the WISH/EMCV system. ● reference standard (RS); ■ Infibeta® test sample. Y-axis—difference between the optical density values measured at 475 nm and 660 nm ( $OD_{475-660}$ ). X-axis—decimal logarithm of the reference standard and test sample dilution, [IU/mL].  $EC_{50}$ —half maximal effective concentration;  $R^2$ —coefficient of determination.

Таблица 8. Расчет показателя Z-индекса

Table 8. Calculation of the Z-index

| Образец<br>Sample   | Специфическая активность, %<br>(измерение в ФГБУ «НЦЭСМП»<br>Минздрава России)<br>Specific activity, %<br>(analysed by<br>FSBI "SCEEMP") | Специфическая актив-<br>ность, % (измерение<br>в АО «ГЕНЕРИУМ»)<br>Specific activity, %<br>(analysed by<br>Generium) | Среднее значение<br>специфической<br>активности, %<br>Mean specific<br>activity, % | $\sigma$ , % | Расчетное<br>значение<br>Z-индекса<br>Z-index |
|---|--|--|--|--------------|---|
| СО при измере-<br>нии относительно<br>МСО<br>RS measured<br>relative to the IRS | 104,9  | 102,1  | 103,5  | 13,1         | 0,2   |

Примечание. СО – стандартный образец, МСО – международный стандартный образец.

Note. RS—reference standard, IRS – international reference standard.

Таблица 9. Значения параметров, характеризующих робастность валидируемой методики

Table 9. Values characterising the robustness of the validated test procedure

| Образец<br>Sample     | Экспериментальное значение специфической активности, %<br>Experimental value of specific activity, % |   |
|-----------------------|--|---|
|                       | вирусный материал серии 0819<br>viral material batch 0819  | вирусный материал серии 0619<br>viral material batch 0619 |
| 1                     | 116,7  | 98,6  |
| 2                     | 106,2  | 104,8   |
| 3                     | 88,8   | 111,6   |
| 4                     | 107,9  | 114,6   |
| Среднее, %<br>Mean, % | 104,9  | 107,4   |
| SD                    | 11,68  | 7,16  |
| RSD, %                | 11,13  | 7,00  |
| Среднее, %<br>Mean, % | 106,15   |   |
| SD                    | 9,07   |   |
| RSD, %                | 8,54   |   |

Примечание. SD – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение.

Note. SD—standard deviation, RSD—relative standard deviation.

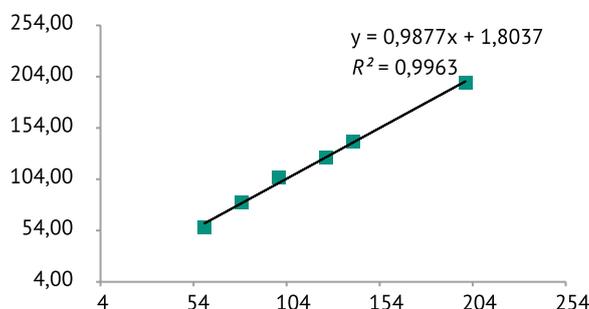


Рис. 10. Определение линейности валидируемой методики. График зависимости измеренной от ожидаемой величины активности протестированных растворов в диапазоне 60–140% с применением линейного тренда. Ось Y – ожидаемое значение специфической активности, %. Ось X – измеренное значение специфической активности, %.

Fig. 10. Determination of the linearity of the validated test procedure. The plot of the measured and the expected activities of the test solutions in the range of 60–140% using a linear trend. Y-axis—expected value of specific activity, %. X-axis—measured specific activity, %.

## Литература/References

1. Ульянова ОВ, Куташев ВА, Дутова ТИ. Рассеянный склероз — актуальная неврологическая проблема XXI века. *Молодой ученый*. 2016;15(119):558–67. [Ulyanova OV, Kutashev VA, Dutova TI. Multiple sclerosis is an actual neurological problem of the XXI century. *Molodoy uchenyy = The Young Scientist*. 2016,15(119):558–67 (In Russ.)]
2. Мирошникова ВВ, Саранов АА, Аракелян АС, Рыбак ВА. Современная терапия рассеянного склероза. *Лекарственный вестник*. 2013;7(49):20–34. [Miroshnikova VV, Saranov AA, Arakelyan AS, Rybak VA. Modern therapy of multiple sclerosis. *Lekarstvennyj vestnik = Pharmaceutical Bulletin*. 2013;7(49):20–34 (In Russ.)]
3. Jakimovski D, Kolb C, Ramanathan M, Zivadinov R, Weinstock-Guttman B. Interferon- $\beta$  for multiple sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(11):a032003. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032003>
4. Kieseier BC. The mechanism of action of interferon- $\beta$  in relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs*. 2011;25(6):491–502. <https://doi.org/10.2165/11591110-000000000-00000>
5. Kremenchtzky M, Morrow S, Rush C. The safety and efficacy of IFN-beta products for the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin Drug Saf*. 2007;6(3):279–88. <https://doi.org/10.1517/14740338.6.3.279>
6. Борец ОГ, Говорухина НФ, Зверев КВ, Бойко АН. Сравнительный анализ результатов применения в повседневной клинической практике для лечения рассеянного склероза препаратов  $\beta$ -интерферон-1а 30 мкг для внутримышечного введения и  $\beta$ -интерферон-1а 44 мкг для подкожных инъекций. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. Спецвыпуски. 2016;116(2–2):63–7. [Borets OG, Govorukhina NF, Zverev KV, Boiko AN. A comparison analysis of the use of intravenous  $\beta$ -interferon-1a 30 mcg and subcutaneous  $\beta$ -interferon-1a 44 mcg in routine clinical practice of treatment in patients with multiple sclerosis. *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii imeni S.S. Korsakova = S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2016;116:2(2):63–7 (In Russ.)]
7. Попова ЕВ, Бойко АН, Васильев АВ, Давыдовская МВ, Завалишин ИА, Котов СВ и др. Результаты сравнительного клинического исследования российского биоаналога — интерферона-1b (инфибета). *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2012;112(5):56–61. [Popova EV, Boiko AN, Vasil'ev AV, Davydovskaia MV, Zavalishin IA, Kotov SV, et al. Results of a comparative clinical trial of the Russian — interferon-1b bioanalogue (infibeta). *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii imeni S.S. Korsakova = S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2012;112(5):56–61 (In Russ.)]
8. Хабиров ФА, Хайбуллин ТИ, Гранатов ЕВ, Шакирзянова СР, Бабичева НН, Кочергина ОС и др. Результаты открытого сравнительного ретроспективного исследования особенностей рассеянного склероза на фоне терапии препаратом инфибета и другими биоаналогами интерферонов бета и глатирамера ацетатом. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2018;118(3):18–26. [Khabirov FA, Khaibullin TI, Granatov EV, Shakirzianova SR, Babicheva NN, Kochergina OS, et al. The results of an open comparative retrospective trial of the course of multiple sclerosis during treatment with infibeta and other interferon-beta bioanalogues and glatiramer acetate. *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii imeni S.S. Korsakova = S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2018;118(3):18–26 (In Russ.)] <https://doi.org/10.17116/jnevro20181183118-26>
9. Stoddart MJ. Cell viability assays: introduction. *Methods Mol Biol*. 2011;740:1–6. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_1)
10. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic Colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. *Methods Mol Biol*. 2017;1601:1–17. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_1)
11. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem*. 2018;120(3):159–67. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>

**Вклад авторов.** Ю.Н. Лебедева — проведение экспериментальных исследований по оценке межлабораторной воспроизводимости, оформление и интерпретация результатов; Н.А. Литвинова — проведение экспериментальных исследований, статистическая обработка и систематизация результатов, написание сопроводительного текста к экспериментальным данным; Т.Н. Лобанова — анализ и интерпретация результатов, написание и оформление текста рукописи, редактирование и переработка рукописи; Р.Р. Шукуров — обсуждение и анализ полученных результатов; Р.А. Хамитов — разработка дизайна исследования и окончательное утверждение версии рукописи для публикации; Л.А. Гайдерова — обобщение результатов и редактирование рукописи.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава Рос-

**Authors' contributions.** Yu.N. Lebedeva—conducting experiments to assess the test procedure's reproducibility, interpretation of the results, preparation of the graphic material; N.A. Litvinova—conducting experimental research, statistical processing and systematisation of the results, preparation of legends for the graphic material; T.N. Lobanova—analysis and interpretation of the results, writing, revision, and editing of the paper; R.R. Shukurov—discussion and analysis of the results; R.A. Khamitov—elaboration of the study design and final approval of the paper for publication; L.A. Gaiderova—analysis of the results and editing of the paper.

**Acknowledgements.** The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

сии № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

**Конфликт интересов.** Р.А. Хамитов является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

**Conflict of interest.** R.A. Khamitov is a member of the Editorial Board of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

---

## Об авторах / Authors

**Лебедева Юлия Николаевна.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8933-6966>

[LebedevaUN@expmed.ru](mailto:LebedevaUN@expmed.ru)

**Литвинова Наталия Алексеевна,** канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9729-3281>

[litvinova@ibcgenerium.ru](mailto:litvinova@ibcgenerium.ru)

**Лобанова Татьяна Николаевна,** канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8972-4851>

[Tlobanova@expmed.ru](mailto:Tlobanova@expmed.ru)

**Шукуров Рахим Рахманкулович,** канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6532-7835>

[Shukurov@ibcgenerium.ru](mailto:Shukurov@ibcgenerium.ru)

**Хамитов Равиль Авгатович,** д-р. мед. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1314-894X>

[Khamitov@ibcgenerium.ru](mailto:Khamitov@ibcgenerium.ru)

**Гайдерова Лидия Александровна,** канд. мед. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6176-5934>

[Gaiderova@expmed.ru](mailto:Gaiderova@expmed.ru)

**Yulia N. Lebedeva.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8933-6966>

[LebedevaUN@expmed.ru](mailto:LebedevaUN@expmed.ru)

**Nataliya A. Litvinova,** Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9729-3281>

[litvinova@ibcgenerium.ru](mailto:litvinova@ibcgenerium.ru)

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

[Tlobanova@expmed.ru](mailto:Tlobanova@expmed.ru)

**Rakhim R. Shukurov,** Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6532-7835>

[Shukurov@ibcgenerium.ru](mailto:Shukurov@ibcgenerium.ru)

**Ravil A. Khamitov,** Dr. Sci. (Med.), Professor. OR-

CID: <https://orcid.org/0000-0002-1314-894X>

[Khamitov@ibcgenerium.ru](mailto:Khamitov@ibcgenerium.ru)

**Lidiya A. Gaiderova,** Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6176-5934>

[Gaiderova@expmed.ru](mailto:Gaiderova@expmed.ru)

Поступила 16.03.2021

После доработки 16.11.2021

Принята к публикации 11.03.2022

Received 16 March 2021

Revised 16 November 2021

Accepted 11 March 2022