

УДК 54.062; 615.074

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОГЕННОСТИ ПРЕПАРАТА ИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА-2А

Е.В. Митюшова¹, Н.М. Фаустова^{2*}, О.Н. Пожарицкая³, В.Г. Макаров³,
А.Н. Шиков^{3*}

Резюме. Интерфероны (IFN) – одна из первых групп цитокинов, которые были клонированы и экспрессированы в микроорганизмах. Применение интерферонов в клинической практике может приводить к широкому спектру побочных эффектов, в том числе к возникновению нежелательных последствий для иммунной системы, что и обуславливает необходимость проведения исследований их иммуногенности. Для определения концентрации антител к человеческому рекомбинантному IFN- α -2а в плазме крови лабораторных животных использован и валидирован метод непрямого иммуноферментного анализа. Методика специфична для определения концентрации антител в плазме крови мышей. Линейный диапазон методики составил 3,75–60,00 нг/мл, предел обнаружения 2,19 нг/мл. Точность, междневная и внутривневая прецизионности не превышают 15% на всех уровнях концентраций, что удовлетворяет всем валидационным требованиям.

Ключевые слова: иммуноглобулины, антитела, альфа-интерферон, плазма, ИФА, валидация.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF IMMUNOASSAY FOR IMMUNOGENICITY OF INTERFERON-ALPHA 2A DRUGS

E.V. Mityushova¹, N.M. Faustova², O.N. Pozharitskaya³, V.G. Makarov³, A.N. Shikov^{3*},

Abstract. Interferons were one of the first groups of cytokines to be cloned and produced in bacteria. Interferon-based drugs are widely used for treatment of various infections, inflammatory and autoimmune diseases and malignant tumors. Clinical use of interferons can result in wide range of side effects, including unwanted influence on immune system of patients. Therefore it is important to study immunogenicity of interferones. The method of indirect ELISA was adopted and validated for analysis of antibodies to human recombinant interferon in mice blood plasma. The specificity was confirmed for mice antibodies. The linearity was 3.75–60.00 ng/ml, the detection limit was 2.19 ng/ml. Accuracy, interday and intraday precision did not exceed 15% at all concentration levels, that satisfies all validation requirements.

Keywords: immunoglobulins, antibody, alpha-interferon, blood plasma, ELISA, validation.

1 – ЗАО «Институт экспериментальной фармакологии», 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, Кузьмоловский п., ул. Заводская, д. 3, корп. 245

2 – ЗАО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, Кузьмоловский п., ул. Заводская, д. 3, корп. 245

3 – ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, Кузьмоловский п., ул. Заводская, д. 3, корп. 245

1 – JSC «Institute of Experimental Pharmacology», 3/245, Zavodskaya str., Kuzmolovsky village, Vsevolozhsk district, Leningrad region., 188663, Russia

2 – JSC «SRA «House of Pharmacy», 3/245, Zavodskaya str., Kuzmolovsky village, Vsevolozhsk district, Leningrad region., 188663, Russia

3 – JSC «St.-Petersburg Institute of Pharmacy», 3/245, Zavodskaya str., Kuzmolovsky village, Vsevolozhsk district, Leningrad region, 188663, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: spbpharm@mail.ru, info@doclinika.ru

Тел.: 8 (812) 603 24 32

ВВЕДЕНИЕ

Интерфероны (IFN) – это одна из групп цитокинов, секретируемых белков, играющих важную роль в функционировании иммунной системы организма. Известны несколько подгрупп интерферонов, которые отличаются по свойствам молекулярной структуры, своей функциональной роли и особенностям иммуотропного действия [1].

Основную роль в защите организма от чужеродных агентов играют интерфероны I типа (α и β). Именно эти белки активируют экспрессию генов, отвечающих за механизмы противодействия проникновению вируса в клетку и трансляции вирусных белков, а также запускают апоптоз инфицированных клеток. Кроме того, IFN I типа от-

вечают за регуляцию цитокиновых реакций и индуцируют выработку противовоспалительных факторов. В результате IFN оказывают мощное иммуномодулирующее действие *in vivo*, а также показывают выраженное противовирусное и противовоспалительное действие *in vitro*, препятствуя репродукции инфекционного агента [2].

Основная функция интерферона α (IFN- α) – запуск и поддержание активности Т-хелперов, а также активация экспрессии интерферонов II типа (в частности, IFN- γ) и запуск различных сигнальных каскадов иммунной системы. Была отмечена корреляция между экспрессией IFN- α и развитием аутоиммунных заболеваний у человека и экспериментальных животных [3].

Применение интерферонов в клинической практике сопровождается широким спектром

побочных эффектов, в том числе нежелательными последствиями для иммунной системы, что обуславливает необходимость проведения исследований их иммуногенности [4].

Основная задача доклинического изучения иммуногенности лекарственных средств состоит в том, чтобы в эксперименте на животных оценить потенциальный риск фармакологического средства для иммунной системы человека.

Основным методом выявления иммуногенности препарата является контроль иммунного ответа через характеристику экспрессии антител к действующему веществу в крови пациента (либо экспериментального животного). Для препаратов на основе IFN- α -2a иммунный ответ характеризуется содержанием аутоиммунных антител к IFN- α -2a в сыворотке или плазме крови [5]. Дополнительным показателем для анализа иммуногенности препаратов может служить определение изменения концентрации общего содержания иммуноглобулинов G (IgG) в плазме животных.

Известны различные методы определения концентрации антител, такие как радиоиммунный анализ [6], методы иммунодиффузии [7, 8] и метод твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) [9]. Наиболее простым, достаточно чувствительным и доступным способом является метод ИФА. Кроме того, существуют различные способы обработки данных, полученных при проведении ИФА например определение титра антител при анализе ряда разведений исследуемого образца [5] либо определение концентрации антител в образце.

В настоящее время выпускаются ИФА-наборы для определения в плазме или сыворотке лабораторных животных общей концентрации IgG, но для количества антител, специфичных к тому или иному виду интерферонов, таковые отсутствуют. Поэтому возникла необходимость разработки методики количественного определения концентрации антител к IFN- α -2a в плазме крови лабораторных животных. Для этих целей был выбран метод непрямого ИФА с использованием человеческого рекомбинантного IFN- α -2a в качестве субстрата и вторичных моноклональных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, для детектирования антител к человеческому рекомбинантному IFN- α -2a в исследуемых образцах.

Цель данной работы – разработать и валидировать методику определения содержания антител к человеческому рекомбинантному IFN- α -2a в плазме крови подопытных животных с помощью ИФА-анализа для её дальнейшего использования при проведении исследований по сравнительной иммуногенности препаратов интерферона.

Согласно литературным данным, выраженность иммунного ответа зависит от множества факторов: характеристик действующего вещества (структура, посттрансляционные модификации и др.), влияния вспомогательных веществ, способа введения и дозировки, а также генетических особенностей главного комплекса гистосовместимости [10]. Для проведения данной работы были выбраны мыши линии Balb/C, продемонстрировавшие наиболее четко выраженный иммунный ответ при введении IFN- α [11].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выполнения валидационных испытаний использованы следующие образцы свежеприготовленной и замороженной плазмы лабораторных животных: мышей линии Balb/C (возраст 8–12 недель), мышей аутбредных (возраст 8–12 недель), кроликов породы калифорнийская (возраст 2,5–3 мес) и крыс аутбредных (возраст 8–12 недель) (ЗАО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»).

Исследование иммуногенности проводили на половозрелых животных (кроликах калифорнийских и мышах аутбредных) при многократном курсовом введении препаратов по схеме 2 инъекции в неделю в течение 30 дней. Использовали подкожный путь введения, как аналог применяемого в клинике. Исследуемые препараты вводили в терапевтической дозе 6 мкг/кг. Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU по охране животных, используемых в научных целях [12], на полноценной сбалансированной по содержанию питательных веществ диете для лабораторных животных (по ГОСТ Р 50258-92). Эксперименты выполнены согласно методическим руководствам и нормативным документам, правилам надлежащей лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 33044-2014) и одобрены на совещании биоэтической комиссии ЗАО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ». Замороженные образцы плазмы хранили при температуре -20°C до 60 суток [13].

Объектом исследования являлся препарат Пега-сис[®], раствор для подкожного введения, 180 мкг/0,5мл [пэгинтерферон альфа-2a (40 кДа), «Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд», Швейцария, серия B1354, срок годности 11.2016].

Определение концентрации антител, специфичных к человеческому рекомбинантному IFN- α , методом ИФА проводилось с использованием человеческого рекомбинантного IFN- α -2a (GenScript, США), козьих антител к иммуноглобулинам мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma Aldrich, США) и мышинных антител к человеческому IFN- α -2a для составления стандартных образцов (Antibodies Online, США).

Анализ проводили согласно протоколу Indirect ELISA Protocol (Abcam) [9] с оптимизацией условий про-

цедуры для достижения наилучшего результата. Концентрацию IgG, специфичных к IFN- α , в образцах определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) на планшетном спектрофотометре xMark (BioRad, США).

В протоколе непрямого ИФА [9] для ряда параметров отсутствует строгая регламентация: времени и условий инкубаций с субстратом в иммобилизующем буферном растворе и с буферным раствором для блокировки неспецифического связывания (допустимы варианты инкубаций в течение 1–2 ч при комнатной температуре либо при температуре +4 °C overnight), время и условий инкубаций с тестируемыми образцами и вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (при температуре +4 °C overnight, при комнатной температуре в течение 1–4 ч, при температуре +37 °C в течение 40–60 мин), а также продолжительности инкубации с тетраметилбензидином (от 5 до 30 мин). Таким образом, условия испытания методики с определенным набором реактивов должны быть определены экспериментально.

Человеческий рекомбинантный IFN- α -2a в концентрации 20 мкг/мл иммобилизовали на полистироловых планшетах, затем проводили инкубацию с блокирующим буферным раствором для предотвращения неспецифического связывания.

Схема анализа предусматривает разведение исследуемых образцов плазмы в случае необходимости. Подготовленные образцы вносились в лунки планшета с иммобилизованным интерфероном в соответствии с заранее составленной схемой.

Планшет заклеивали пленкой и инкубировали при температуре 37 °C в течение 60 мин в термостатируемом шейкере ST-3L (Elmi, Латвия). По окончании инкубации содержимое лунок удаляли и тщательно промывали лунки фосфатно-солевым буферным раствором. После промывки во все лунки вносили раствор вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, заклеивали пленкой и инкубировали при температуре 37 °C в течение 60 мин. По окончании инкубации защитную пленку снимали, удаляли содержимое лунок и тщательно промывали лунки фосфатно-солевым буферным раствором. Затем во все лунки вносили раствор тетраметилбензидина, заклеивали планшет пленкой и инкубировали при температуре 37 °C в течение 5 мин в термостатируемом шейкере. После окончания инкубации останавливали реакцию с помощью стоп-реагента (2M серной кислоты).

Оптическую плотность растворов в лунках измеряли на планшетном спектрофотометре в двухволновом режиме: при длине волны 450 нм (основной фильтр) и 640 нм (референсная длина волны) через 2–3 мин после остановки реакции. Для построения калибровочного графика и расчетов концентрации антител, специфичных к человеческому рекомбинантному

IFN- α , в образцах использовали приведенную оптическую плотность $D=D_{450}-D_{640}$, о.е.

Для приготовления модельных смесей и разведений образцов плазмы крови использовали рабочий буферный раствор: 1% раствор бычьего сывороточного альбумина (BSA) в фосфатно-солевом буфере (pH=7,4).

Статистическая обработка результатов выполнена с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007. Графики построены на основании средних арифметических значений (\bar{X}) и соответствующих им стандартных отклонений (SD). В таблицах приведены средние арифметические значения (\bar{X}), соответствующие им стандартные отклонения (SD), относительное стандартное отклонение (RSD).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Интерфероны – одна из первых групп цитокинов, которые были клонированы и экспрессированы в микроорганизмах. Именно эта группа наиболее изучена как с точки зрения молекулярной структуры, так и с точки зрения клинического применения. Препараты на основе интерферонов (и в частности, IFN- α) используются в терапии инфекционно-воспалительных, аутоиммунных и онкологических заболеваний, к примеру хронических вирусных гепатитов и злокачественных опухолей [4, 14, 15]. Аминокислотные последовательности человеческих рекомбинантных интерферонов совпадают с последовательностями их эндогенных аналогов, однако они могут различаться по степени гликозилирования, посттрансляционному процессингу и вариациям третичной структуры. Известно, что пэгилирование (присоединение полиэтиленгликоля) не влияет на функциональные свойства препарата, однако увеличивает период полураспада интерферона в сравнении с его оригинальной формулой [3]. Все эти факторы могут оказывать влияние на иммуногенность препаратов на основе рекомбинантных интерферонов, а также на их эффективность [7].

Возможность применения данной методики была экспериментально проверена нами на примере препарата Пегасис®. По результатам предварительных экспериментов процедура анализа была адаптирована и оптимизирована для конкретного объекта: IgG мыши, специфичных к человеческому рекомбинантному IFN- α .

Для получения достоверных данных при анализе методика должна быть валидирована [13, 16, 17]. Валидация аналитической методики – это экспериментальное доказательство того, что методика пригодна для решения предполагаемой задачи.

В качестве параметров валидации согласно рекомендациям [13, 16, 17] были выбраны: специфичность, линейность, точность и прецизионность.

Специфичность (реже селективность) – способность однозначно оценивать анализируемое вещество

во в присутствии других компонентов, которые могут находиться в образце (примеси, вспомогательные вещества). Специфичность методики ИФА определяется специфичностью используемых в работе антител, которая подтверждается паспортом реактива.

В работе были использованы два вида антител: моноклональные антитела мыши к IFN- α (Antibodies Online, США), специфичные к IFN- α -2a и IFN- α -2b, и антитела к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США).

Для подтверждения специфичности использованных антител был выполнен анализ образцов плазмы животных, полученных от разных видов лабораторных животных: мышей, крыс и кроликов (таблица 1).

Таблица 1.

Результаты анализа плазмы крови животных различных видов ($\bar{X} \pm SD$)

Вид животных (n=4)	D, о.е.
Крыса аутбредная (интактная)	0,169 \pm 0,008
Кролик (интактный)	0,031 \pm 0,008
Кролик (после введения IFN- α)	0,054 \pm 0,010
Мышь линии Balb/C (интактная) (разведение 1:1000*)	0,289 \pm 0,005
Мышь линии Balb/C (после введения IFN- α)	1,312 \pm 0,007
Мышь аутбредная (интактная, разведение 1:1000*)	0,355 \pm 0,006
Мышь аутбредная (после введения IFN- α , разведение 1:1000*)	1,042 \pm 0,008

Примечание: * Интенсивность сигнала при анализе неразведенной плазмы мышей выходила за пределы диапазона линейности, поэтому в дальнейшем использовались образцы плазмы крови мышей, разведенные в фосфатно-солевом буферном растворе.

Традиционно для оценки специфичности анализу подвергают пробу, не содержащую анализируемые вещества (бланк или плацебо), пробу с добавкой стандартного образца аналита и испытуемую пробу препарата. По результатам анализа ожидают отсутствие аналитического сигнала для пробы плацебо и наличие сходных аналитических сигналов для проб со стандартом и с испытуемым объектом.

На основании данных, представленных в таблице 1, необходимо отметить, что интенсивность сигнала для образцов плазмы других видов животных значительно ниже, чем для образцов плазмы мышей. Проведение иммунизации у кроликов, приводившей к появлению специфических антител к IFN- α , не приводило к значительному усилению сигнала, что подтверждает отсутствие кросс-реактивности к IgG кролика. Разработанная методика специфична для определения концентрации антител в плазме крови мышей, однако имеет частичную кросс-реактивность к антителам к IFN- α -2a, вырабатываемым в организме крыс, что может быть обусловлено близким родством данных видов животных.

Для проверки специфичности детектирования окрашенного продукта ферментной реакции были записаны УФ-спектры испытуемого раствора и раствора стандартного образца в диапазоне длин волн 350–640 нм. В качестве плацебо использовали буфер для разведения стандартных образцов, не содержащий мышиных IgG, специфичных к IFN- α , пробы с добавками аналита – лунки с внесением мышиных IgG, специфичных к IFN- α в двух концентрациях. Типичный УФ-спектр растворов представлен на рисунке 1.

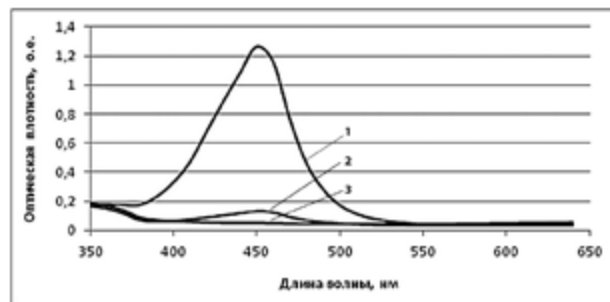


Рисунок 1. Типичный УФ-спектр продуктов реакции стандартного раствора IgG к IFN- α : 1 – с концентрацией 100 нг/мл; 2 – стандартного раствора IgG к IFN- α с концентрацией 3,7 нг/мл; 3 – стандартного раствора с концентрацией IgG к IFN- α 0 нг/мл

Для детектируемой области характерно наличие четкого максимума при 450 \pm 2 нм. Аналогичные спектры имеют продукты реакции всех исследуемых образцов.

Линейность – способность показать, что аналитические сигналы пропорциональны концентрации анализируемого вещества в образце в пределах диапазона применения методики. Линейность проверяют непосредственно на активной субстанции или на модельных смесях. На основании полученных данных методом наименьших квадратов проводят расчет уравнения регрессии и дополнительных статистических показателей. Линейность методики была проверена и подтверждена в диапазоне концентраций 3,75–60,00 нг/мл.

При расчете и построении калибровочной кривой была использована методика Logit-log, которая также часто применяется для обработки результатов ИФА [18]. Зависимость этого параметра от концентрации IgG, специфичных к альфа-интерферону, описывается линейной функцией. По результатам серии экспериментов, выполненных в разные дни, получены значения коэффициента корреляции от 0,992 до 0,999. На рисунке 2 приведен пример линейной зависимости значений logit (D/D₀) от логарифма концентрации IgG, специфичных к IFN- α .

Предел обнаружения (ПО) (или чувствительность) – наименьшее количество анализируемого ве-

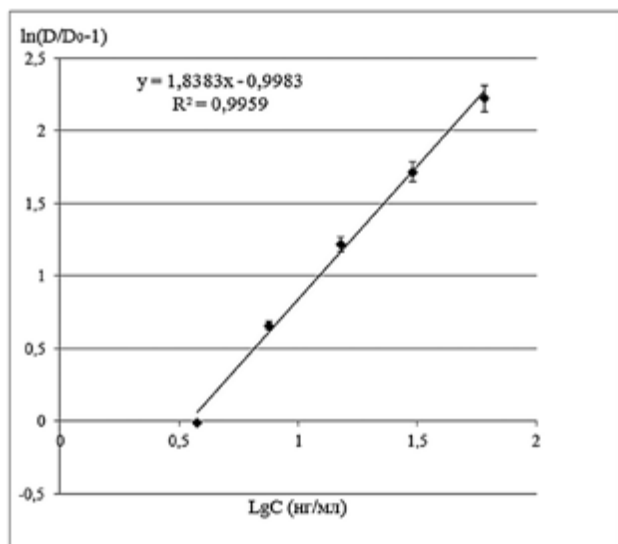


Рисунок 2. Типичный график зависимости аналитического сигнала от концентрации IgG, специфичных к IFN-α, в координатах Logit-log

щества, которое может быть обнаружено, но не оценено точно количественно. ПО разработанной методики составил 2,19 нг/мл.

Точность характеризует близость результатов испытаний, полученных с помощью данной методики, к истинному значению. Показателем точности метода является систематическая погрешность (δ), выражаемая как разность между ожидаемым значением (истинным) и результатом измерений. Оценка точности выполнена по результатам анализа модельных смесей аналита на четырех уровнях концентрации: нижнем пределе количественного определения (НПКО) и верхнем пределе количественного определения (ВПКО) (3,75 и 60,00 нг/мл соответственно), середине (50%) линейного диапазона [30,00 нг/мл, средний контроль качества (КК)] и для концентрации, не превышающей 3-кратное значение предела количественного определения (ПКО) [7,50 нг/мл, низкий контроль качества (КК)] (таблица 2). Точность оценивали по принципу «внесено – найдено» как относительную систематическую погрешность (δ) в процентах от внесенного количества.

Относительные погрешности (δ) при оценке точности в общем случае должны быть не более 15%, для предела количественного определения – не более 20% [16, 17]. Полученные результаты (0,81–14,40%) для всего диапазона концентраций соответствуют этому требованию (таблица 2).

В соответствие с рекомендациями по валидации методов контроля химических и физико-химических показателей качества медицинских иммунопрепаратов [16, 17] оценка правильности проведена также на основании графика зависимости измеренного количества от ожидаемого количества анализируемого соединения. При отсутствии систематической ошиб-

ки график должен представлять собой прямую, проходящую через начало координат и имеющую наклон 1. Для данных, представленных в таблице 2, полученное уравнение регрессии $y=1,0034x$ ($r=0,996$) (x – внесенное количество IgG к IFN-α, нг/мл; y – экспериментально полученные значения количества IgG к IFN-α в плазме, нг/мл) свидетельствует об отсутствии систематической ошибки [16, 17].

Таблица 2.

Данные по проверке точности методики определения концентрации IgG к IFN-α

Внесено IgG к α-интерферону, нг/мл	Найдено ¹ , нг/мл	Погрешность абсолютная, нг/мл	Погрешность относительная, %	Средняя относительная погрешность, %
60 (ВПКО)	65,19	+5,19	+8,7	5,4
	56,95	-3,05	-5,1	
	59,83	-0,17	-0,28	
	55,31	-4,68	-7,8	
	63,20	+4,30	+7,0	
30 (Средний КК)	29,17	-0,83	-2,77	4,2
	32,41	+2,41	+8,03	
	28,98	-1,02	-3,40	
	31,09	+1,09	+3,63	
	29,11	-0,89	-2,97	
7,5 (Низкий КК)	8,47	0,97	+12,93	10,8
	7,12	-0,38	-5,07	
	8,54	1,04	+13,87	
	8,13	0,63	+8,40	
	8,54	1,04	+13,87	
3,75 (НПКО)	4,24	+0,49	+13,1	8,5
	3,21	-0,54	-14,4	
	3,72	-0,03	-0,81	
	3,85	+0,10	+2,60	
	4,19	+0,44	+11,73	

Примечание: 1 – результаты фактических анализов (в 5-кратной повторности);
2 – соответствующая каждому определению фактическая «Погрешность абсолютная, нг/мл», что и свидетельствует об отклонениях фактических концентраций от рассчитанных.

Прецизионность аналитической методики выражает степень близости (или степень разброса) результатов для серии измерений, выполненных по данной методике на различных пробах одного и того же однородного образца. Прецизионность определяли на двух уровнях: в течение одного рабочего дня (внутридневная) и в течение нескольких (не менее 2) рабочих дней (междневная) [13, 16, 17]. Прецизионность зависит только от случайных факторов и не связана с истинным значением определяемой величины. Мерой внутридневной и междневной прецизионностей является величина коэффициента вариации (CV, %), полученная при усреднении результатов измерений [16].

Оценка прецизионности была выполнена по результатам анализа модельных смесей с добавлением известных количеств IgG к IFN-α на четырех уровнях

концентраций в необходимом количестве повторностей (не менее пяти). Экспериментальные данные, полученные при оценке прецизионности, представлены в таблице 3.

Таблица 3.

Данные по оценке прецизионности методики

Концентрация IgG к α -интерферону в калибровочном растворе, нг/мл	Внутридневная прецизионность, RSD, %	Междневная прецизионность, RSD, %	Требования [4, 5], не более %
Модельная смесь в рабочем буферном растворе			
60 (ВПКО)	0,65 – 2,15	1,20	15
30 (Средний КК)	0,98 – 2,40	1,30	15
7,5 (Низкий КК)	0,78 – 2,56	1,60	15
3,75 (НПКО)	1,67 – 3,23	2,30	20
Модельная смесь с плазмой интактных мышей			
4,2 (НПКО)	2,40 – 10,80	16,70	20
30 (Средний КК)	1,10 – 2,20	7,00	15
60 (ВПКО)	0,72 – 6,40	6,80	15

Прецизионность должна составлять не более 15%, для НПКО – не более 20%. Полученные значения на четырех уровнях концентраций удовлетворяют этим требованиям.

При проведении пилотного эксперимента в плазме крови интактных животных (мышей линии Balb/C) было обнаружено присутствие IgG, специфичных к IFN- α . Для минимизации фонового сигнала плазма крови мышей разводилась в фосфатно-солевом буферном растворе. Результаты эксперимента по подбору оптимального разведения приведены в таблице 4.

Таблица 4.

Подбор разведений плазмы крови ($\bar{X} \pm SD$)

Разведение	Оптическая плотность растворов $D_{ст} = D_{450} - D_{650}$
1:200	0,541 \pm 0,012
1:500	0,296 \pm 0,007
1:1000	0,244 \pm 0,016
1:2000	0,167 \pm 0,027*

Примечание: * Данное значение оптической плотности соответствует НПКО, поэтому использование больших разведений плазмы крови нецелесообразно.

В дальнейшем для создания модельных смесей использовали разведение плазмы крови интактных животных 1:2000. При анализе образцов плазмы крови от экспериментальных животных после иммунизации разведение подбирали таким образом, чтобы оптическая плотность реакционной смеси находилась в пределах 0,3–0,5 о.е.

Наличие гемолиза в образцах плазмы крови вносит погрешность в определение различных био-

химических параметров [8, 9, 19]. Поэтому в ходе эксперимента было оценено влияние гемолиза на концентрацию антител с помощью данной методики (таблица 5).

Таблица 5.

Содержания IgG, специфичных к IFN- α , в плазме крови интактных мышей Balb/c с гемолизом и без гемолиза ($\bar{X} \pm SD$)

Пол и № животного	Концентрация IgG к IFN- α , мкг/мл	
	плазма крови без гемолиза	плазма крови с гемолизом
Самцы	1	17,4 \pm 1,1
	2	21,6 \pm 1,3
	3	17,1 \pm 1,0
Самки	4	31,8 \pm 1,9
	5	29,6 \pm 1,8
	6	34,3 \pm 2,1

На основании результатов, представленных в таблице 5, можно сделать заключение, что при анализе гемолизированной плазмы разработанная методика показывает значительное завышение концентрации антител к IFN- α . Вероятность возникновения подобных ошибок при анализе гемолизированных проб также подтверждается литературными данными [9].

Таким образом, по всем критериям валидации получены результаты, свидетельствующие о специфичности, линейности, точности, прецизионности и достаточно высокой чувствительности методики определения концентрации IgG к IFN- α методом ИФА.

На данном этапе исследования методика количественного определения IgG к IFN- α в плазме мышей валидирована в соответствии с современными требованиями, удовлетворяет им по всем показателям и может быть использована при проведении исследований по иммуногенности различных препаратов IFN- α .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы разработана и валидирована методика определения содержания IgG (антител) к IFN- α в плазме крови подопытных животных (мышей) с помощью ИФА-анализа.

Экспериментально подтверждена пригодность данной методики для определения концентрации IgG к IFN- α в плазме крови лабораторных животных (мышей). Линейность методики составила, 3,75–60,00 нг/мл IgG к IFN- α , предел обнаружения (чувствительность) – 2,19 нг/мл. Показатели точности, междневная и внутривневная прецизионность не превышают 15% на всех уровнях концентраций (для НПКО – 20%) и удовлетворяют требованиям нормативных документов, что позволяет в дальнейшем использовать разработанную методику для проведения исследований по иммуногенности различных препаратов IFN- α . Образцы плазмы крови с гемолизом непригодны для анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. S.A. Stifter, C.G. Feng. Interfering with immunity: detrimental role of type I IFNs during infection // *Journal of Immunology*. 2015. V. 194. P. 2455–2465.
2. L. Grine, L. Dejager, C. Libert, R.E. Vandebroucke. An inflammatory triangle in psoriasis: TNF, type I IFNs and IL-17 // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2015. V. 26. P. 25–33.
3. Ю.А. Вавиленкова. Современные представления о системе интерферона // *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. 2012. Т. 11(2). С. 74–82.
4. И.Г. Никитин. Пегилированные интерфероны-альфа: новые возможности лечения хронического гепатита С // *Фарматека*. 2002. Т. 9. С. 4.
5. I. Garcia, P.A. Prats, M. Cervantes et al. Factors that influence the immunogenicity of human recombinant interferon alpha-2b in mice // *Biotechnologia Applicada*. 2002. V. 19. P. 15–18.
6. R.S. Yalow, S.A. Berson. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man // *Journal of Clinical Investigation*. 1960. V.39. P. 1157–1175.
7. М. Тертон, Д.Р. Бангхем, К.А. Колкотт. Новые методы иммуноанализа. – М.: Мир, 1991. 280 с.
8. Иммунологические методы / Под ред. Г.Фримеля. – М.: Медицина, 1987. 472 с.
9. ELISA Instruction Manual (Cloud Clone Corp). URL: [http://www.cloud-clone.us/manual/ELISA-Kit-for-Immunoglobulin-G-\(IgG\)-E90544Mu.pdf](http://www.cloud-clone.us/manual/ELISA-Kit-for-Immunoglobulin-G-(IgG)-E90544Mu.pdf) (дата обращения 24.11.2015).
10. М.В. Шестакова, О.К. Викулова. Биосимиляры: презумпция «виновности» // *Сахарный диабет*. 2011. № 4. С. 91–99.
11. P. Tagliaferri, P. Tassone, S. Blotta et al. Antitumor therapeutic strategies based on the targeting of epidermal growth factor-induced survival pathways // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2005. V. 54. P. 1–10.
12. Directive 2010/63/EU of 22/09/2010 Guide for the care and use of laboratory animals 8th edition. National Academy of Sciences. Washington, D.C. 2010.
13. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств. – М.: Министерство здравоохранения и социального развития РФ, 2007. 49 с.
14. M. Deutsch, S.J. Hadziyannis. Old and emerging therapies in chronic hepatitis C: an update // *Journal of Viral Hepatitis*. 2008. V. 15. P. 2–11.
15. G.V. Papatheodoridis, S. Manolakopoulos, A.J. Archimandritis. Current treatment indications and strategies in chronic hepatitis B virus infection // *World Journal of Gastroenterology*. 2008. V. 14. P. 6902–6910.
16. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2001.
17. Валидация методов контроля химических и физико-химических показателей качества МИБП: порядок проведения и представления результатов. Методические указания. МУ 3.3.2.1886-04. 2004.
18. Н.В. Свежова, Д.Б. Шаркова, В.А. Громов и др. Методы математической обработки данных в иммуноферментном анализе // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2008. № 1. С. 3–9
19. А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилова. Теория и практика иммуноферментного анализа. – М.: Высшая школа, 1991. 288 с.

CRYSTE Laboratory & Biomedical Technology

ВЫСОКОТЕХНОЛОГИЧНОЕ ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ



Универсальная центрифуга PURISPIN 17R

- разделение жидких систем с высокой скоростью до 17000 об/мин
- сохраняет термочувствительные пробы
- поддерживает основные стандарты работы с микрообъемами: реакции с нуклеиновыми кислотами, ПЦР, субклеточное разделение и т.д.

286 000 руб.



Универсальная центрифуга большой вместимости VARISPIN 15R

- скорость вращения до 15000 об/мин
- поддерживает работу с роторами разного типа

501 000 руб.



Универсальная центрифуга VARISPIN 4 с угловым ротором или ротором крестовиной

171 000 руб.

Центрифуги CRYSTE с расширенным набором технических возможностей и системой охлаждения от -10°C до +40 °C с набором роторов под пробирки различного объема