2.1.11.37. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФИЛГРАСТИМОВ

Общая фармакопейная статья распространяется на биологический метод определения активности лекарственных средств на основе филграстимов (гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), полученного по технологии рекомбинантной ДНК). Метод основан на способности филграстимов в условиях *in vitro* стимулировать пролиферацию клеток линии, чувствительной к Г-КСФ.

Активность филграстимов определяют путём сравнения разведений испытуемого образца с разведениями международного стандартного образца гранулоцитарного колониестимулирующего фактора или другого подходящего стандартного образца филграстима, калиброванного в международных единицах (МЕ).

За международную единицу принимают активность Г-КСФ в определённом количестве международного стандартного образца, устанавливаемую Всемирной организацией здравоохранения. Международный стандартный образец представляет собой лиофилизированный концентрат гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, полученного по технологии рекомбинантной ДНК.

МЕТОД

Проводят испытание с применением подходящей клеточной линии, например, M-NFS-60 (ATCC № CRL-1838) или NFS-60 (CLS № 400301). Клеточную линию инкубируют с различными разведениями испытуемого образца и стандартного образца Г-КСМ, затем проводят количественную оценку клеточной пролиферации с помощью тетразолия соли, или тетразолия бромида, или путем окрашивания подходящим флуоресцентным красителем. Допустимо использование альтернативных методов количественной оценки клеточной пролиферации, таких как измерение внутриклеточного АТФ с помощью биолюминесценции люциферазы,

Условия проведения испытания (концентрация клеток, время инкубации, этапы разведения) соответствующим образом адаптируют с проведением валидации методики.

МЕТОДИКА 1 (С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ M-NFS-60)

Во все лунки 96-луночного микропланшета помещают 50 мкл подходящей культуральной среды. В лунки, предназначенные для контроля клеток, дополнительно прибавляют 50 мкл подходящей культуральной среды. В другие соответствующие лунки дополнительно прибавляют по 50 мкл предварительных разведений испытуемого и стандартного образцов (концентрация 800 МЕ/мл) с серией из десяти последовательных двукратных разведений для построения калибровочного графика (в трёх повторностях).

Готовят суспензию клеток линии M-NFS-60 с концентрацией $7{,}0 \times 10^5$ клеток в миллилитре, в которую добавляют *2-меркаптоэтанол Р* до конечной концентрации 0,1 мМ. В каждую лунку подготовленного микропланшета помещают по 50 мкл приготовленной клеточной суспензии, поддерживая клетки в гомогенном состоянии во время добавления.

Инкубируют микропланшет в инкубаторе с относительной влажностью 95 % при температуре от 36 °C до 38 °C в течение от 44 ч до 48 ч в атмосфере углекислого газа от 5 % до 7 %.

По окончании периода инкубации в каждую лунку прибавляют по 20 мкл стерильного раствора 5 г/л *тетразолия соли Р* и повторно инкубируют в течение четырех часов в тех же условиях. После завершения инкубации измеряют оптическую плотность (*2.1.2.24*) при длине волны 490 нм.

МЕТОДИКА 2 (С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ NFS-60)

Во все лунки 96-луночного микропланшета помещают 50 мкл подходящей культуральной среды. В лунки, предназначенные для контроля клеток, дополнительно прибавляют 50 мкл подходящей культуральной среды. В другие соответствующие лунки дополнительно прибавляют по 50 мкл предварительных разведений испытуемого и стандартного образцов (концентрация 200 МЕ/мл) с серией из десяти последовательных двукратных разведений для построения калибровочного графика (в трёх повторностях).

Готовят суспензию клеток линии NFS-60 с концентрацией $1,5 \times 10^5$ клеток в миллилитре, в которую добавляют *2-меркаптоэтанол Р* до конечной концентрации 0,1 мМ. В каждую лунку подготовленного микропланшета помещают по 100 мкл приготовленной клеточной суспензии, поддерживая клетки в гомогенном состоянии во время добавления.

Инкубируют микропланшет в инкубаторе с относительной влажностью 95 % при температуре от 36 °С до 38 °С в течение от 44 ч до 48 ч в атмосфере углекислого газа от 4,5 % до 5,5 %. По окончании инкубации проводят обработку или окрашивание клеток одним из представленных ниже способов.

Окрашивание клеток резазурином

В каждую лунку прибавляют по 20 мкл раствора 0,15 мг/мл *резазурина Р* в *фосфатном забуференном солевом растворе с pH 7,4 Р* и повторно инкубируют в течение подходящего времени до появления градиентной окраски, например, в течение 4 ч. После завершения инкубации планшеты при подходящих условиях встряхивают в течение 5–10 мин и измеряют уровень флуоресценции на планшетном анализаторе при установленной длине волны возбуждения 530 нм и эмиссии 620 нм.

Обработка клеток тетразолия бромидом

В каждую лунку вносят по 20 мкл стерильного раствора 5 г/л *тетразолия бромида Р*, встряхивают в течение 1–2 мин и повторно инкубируют от 3 ч до 4 ч. После завершения инкубации в каждую лунку прибавляют от 50 мкл до 80 мкл подходящего лизирующего раствора и продолжают инкубировать не менее 17 ч и не более 24 ч.

После завершения инкубации планшеты встряхивают и измеряют оптическую плотность (*2.1.2.24*) при длине волны 550 нм и корректирующей длине волны 690 нм. Находят разность значений оптической плотности, полученных при длине волны 550 нм и 690 нм. В дальнейших расчётах используют скорректированные значения.

Обработка клеток тетразолия солью

В каждую лунку прибавляют по 20 мкл стерильного раствора 5 г/л *тетразолия соли Р* и повторно инкубируют в течение 4 ч в тех же условиях. После завершения инкубации измеряют оптическую плотность (*2.1.2.24*) при длине волны 490 нм.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассчитывают активность испытуемого образца подходящим статистическим методом, например, методом параллельных прямых (*2.3.12.0*).

Рассчитанная активность должна быть не менее 80 % и не более 125 % от заявленной активности, доверительный интервал (P=0,95) рассчитанной активности должен быть не менее 74 % и не более 136 % от заявленной активности.

Результаты испытания считают достоверными, если:

– статистический анализ подтверждает отсутствие отклонений от линейности и параллельности кривой зависимости «доза – ответ» для испытуемого образца в сравнении со стандартным образцом ($P=0,95$);

– коэффициент детерминации, определяемый для кривой зависимости ответа от дозы стандартного образца и испытуемого образца (R^2), должен быть не менее 0,95;

-–коэффициенты вариации значений оптической плотности или единиц флуоресценции (*RSD,* %) для повторностей каждого разведения стандартного образца и испытуемого образца должны быть не более 25 %.

СЛЕДУЮЩИЙ РАЗДЕЛ ПРИВОДИТСЯ ДЛЯ ИНФОРМАЦИИ

Подготовка клеточной культуры может осуществляться следующим образом.

Инактивирование сыворотки крови крупного рогатого скота. Сыворотку крови крупного рогатого скота выдерживают в водяной бане при температуре 56 °С в течение от 30 мин до 40 мин.

Культуральная среда базовая

Среда RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) без глутамина	435 мл
Раствор антибиотиков (содержит 5000 единиц пенициллина и 5 мг стрептомицина в 1 мл)	5,0 мл
200 мМ раствор *глутамина Р*	5,0 мл
1 М раствор 2-[4-(2-Гидроксиэтил)пиперазин-1-ил]этансульфоновой кислоты (HEPES)	5,0 мл
Инактивированная сыворотка крови крупного рогатого скота	50 мл

Процедура размораживания и культивирования клеток. Криопробирку извлекают из криохранилища, быстро помещают в водяную баню при температуре от 35 °С до 39 °С и частично размораживают суспензию (в криопробирке должен остаться небольшой кусочек льда). Переносят суспензию в стерильную центрифужную пробирку вместимостью 50 мл, содержащую от 20 мл до 30 мл культуральной среды базовой, предварительно нагретой до температуры от 15 °С до 25 °С, и центрифугируют при 1000 g в течение 5 мин при температуре от 15 °С до 25 °С. Сливают супернатант и ресуспендируют в предварительно нагретой до температуры 37 °С культуральной среде базовой в объеме от 5 мл до 7 мл. Производят подсчёт клеток и определяют их жизнеспособность. Жизнеспособность клеток после восстановления должна быть не менее 70 %.

Клетки переносят в культуральный флакон (площадь поверхности 25 см^2), содержащий от 5 мл до 7 мл культуральной среды базовой, предварительно нагретой до температуры 37 °С, и от 1 нг/мл до 2 нг/мл ростового фактора (например, интерлейкин-3). Культивируют в CO_2-инкубаторе в течение не менее 48 ч и не более 72 ч в стандартных условиях. Ежедневно производят визуальную оценку роста и морфологии клеток с помощью инвертированного микроскопа. Пересевают клетки при достижении концентрации от $0,5 \times 10^6$ клеток в миллилитре до $1,5 \times 10^6$ клеток в миллилитре. До испытания необходимо проведение не менее трёх пассажей клеток (пассаж после размораживания клеток считается нулевым). Допустимый диапазон количества пассажей (пересевов) должен быть подтверждён экспериментальными данными или определён согласно указаниям паспорта (сертификата) на клеточную культуру.

Подготовка клеточной суспензии линий M-NFS-60 и NFS-60 к испытанию. Переносят суспензию из культурального флакона в центрифужную пробирку вместимостью 50 мл и центрифугируют при 1000 g в течение 5 мин при температуре от 15 °С до 25 °С. Супернатант удаляют, клетки ресуспендируют в предварительно нагретой до температуры 37 °С культуральной среде базовой в объеме от15 мл до 20 мл, и повторяют процедуру центрифугирования не менее двух раз для удаления остатков ростового фактора. Производят подсчёт клеток и оценку жизнеспособности, которая должна быть не менее 90 %. Для испытания готовят суспензию с подходящей концентрацией клеток.