

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

5.2.4 Культуры клеток для ветеринарного применения

Настоящая общая фармакопейная статья устанавливает требования к первичным и перевиваемым (диплоидным и гетероплоидным) клеточным культурам животных, птиц, человека и насекомых, применяемым в качестве субстратов для производства и контроля качества вирусных вакцин для ветеринарного применения. Применение культур клеток для производства и контроля иммунобиологических лекарственных ветеринарных препаратов основано на системе создания главного и рабочего банков клеток.

1. Общие положения

Использование в качестве субстрата для производства перевиваемых клеточных линий возможно только при создании системы клеточных банков.

Процесс производства иммунобиологических лекарственных ветеринарных препаратов в клеточных культурах основан на современной технологии, обеспечивающей высокую степень защиты получаемого продукта от контаминирующих агентов. Технологический процесс должен быть валидирован.

Клеточные культуры, используемые в производстве не должны содержать посторонних агентов, должны быть стерильными, жизнеспособными, морфологически однородными, не обладать онкогенностью и туморогенностью.

Хронически зараженные клетки, используемые для производства иммунобиологических лекарственных ветеринарных средств, должны соответствовать требованиям, описанным ниже. Должно быть доказано, что клетки заражены только заявленным агентом.

При производстве иммунобиологических лекарственных ветеринарных препаратов путем культивирования клеточных культур должны использоваться культуральные питательные среды, сыворотки, трипсин и другие реактивы, разрешенные в производстве.

Результаты, полученные при изучении и аттестации главных и рабочих банков клеток, оформляют в виде паспорта, в котором должны быть отражены следующие показатели:

1. Наименование клеточной культуры;
2. Коллекционный шифр (клеточной линии, главного и рабочего банка клеток);
3. История получения (происхождение) клеточной культуры и создания главного и рабочего банка клеток;
4. Запас клеток (количество сохраняемых контейнеров в банках клеток, количество клеток в емкости);
5. Номер пассажа и дата закладки клеток на хранение;
6. Условия криоконсервации, режим хранения и жизнеспособность клеток после размораживания;
7. Цитоморфологическая характеристика (морфология, кариологическая характеристика);
8. Ростовые свойства (способ культивирования, питательная среда, посевная концентрация, метод снятия клеток, кратность посева, температура культивирования, частота пассирования);
9. Стерильность (отсутствие микробных агентов, в том числе микоплазм);
10. Результаты исследований на предмет контаминации вирусами. Отсутствие посторонних вирусов, в том числе эндогенных;
11. Стабильность биологических свойств (количество рекомендованных для производства пассажей);
12. Сфера применения, чувствительность к производственному штамму вируса.

2. Первичные клеточные культуры (ПКК)

Для приготовления первичных клеточных культур материал должен быть получен из стада или от животных, свободных от специфических патогенных микроорганизмов; используются все меры предосторожности от

заражения каким-либо возбудителем (например, защитные барьеры, фильтры на входных воздуховодах, подходящий карантин перед получением животным). Для стад и животных должно быть доказано отсутствие соответствующих специфических патогенных микроорганизмов. Все животные стада, предназначенного для получения первичных клеток, используемых для производства вакцин, подвергаются постоянному наблюдению, включая регулярные серологические испытания, проводимые, по крайней мере, два раза в год, и два дополнительных серологических исследования, выполняемые на 15 % животных из племенного стада между двумя упомянутыми ежегодными исследованиями. Сроки отбора доноров ткани должны исключать возможность сохранения или персистенции вакцинных штаммов вирусов, инокулированных в результате плановых вакцинаций.

3. Диплоидные клеточные культуры

Диплоидные клеточные культуры получают из тканей или органов здорового донора (человека, животного или насекомых), не имеющего в генеалогии онкологических, врожденных аномалий. Диплоидные клеточные культуры получают общепринятыми методами дезинтеграции клеток или методом эксплантатов. После формирования клеточного монослоя культуру периодически пассируют (один-два раза в неделю). В результате пассирования клетки становятся перевиваемыми линиями, сохраняющими диплоидный кариотип со структурой, идентичной донору. Диплоидные клеточные культуры растут в богатых витаминами и минеральными солями питательных средах с содержанием 10-15 % сыворотки крови плодов крупного рогатого скота, свиней, овец и лошадей.

Диплоидные клеточные культуры должны иметь ограниченный срок жизни, стабильный кариотип ($2n$ не менее 75 %), не должны содержать посторонних агентов (бактерий, в том числе, микоплазм, грибов, простейших, специфических цитопатических, гемадсорбирующих и гемагглютинирующих вирусов), должны сохранять стабильность всех биологических свойств в фазе

активного роста (первые две трети срока жизни клеточных культур), должны обладать высоким уровнем вирусрепродуцирующей активности.

4. Гетероплоидные клеточные культуры

Гетероплоидные клеточные культуры могут быть получены при: серийном субкультивировании первично-трипсинизированных клеток опухолей человека или животных; трансформации нормальных клеток с ограниченным сроком жизни онкогенным вирусом; серийном субкультивировании первично-трипсинизированных нормальных культур с выделением доминантной популяции спонтанно трансформированных клеток (например, Vero, ВНК-21, MDCK); слиянии миеломных клеток с В-лимфоцитами, продуцирующими антитела (гибридомы), гибридизации соматических клеток.

Основными преимуществами ГКК являются: возможность получения полной характеристики клеточной линии, нетребовательность к составу питательной среды, возможность адаптации к росту в бессывороточной среде, получение больших объемов в суспензии, на микроносителях (субстрат-зависимые клетки) и в биореакторах.

Гетероплоидные клеточные культуры должны иметь неограниченный срок жизни, типичную морфологию для данной линии и иммунологические маркеры, характерные для донора клеток, кариотип, определяющий видовую принадлежность, обладать онкогенной и туморогенной безопасностью, высокой перmissивностью к адаптированным вирусам, сохранять стабильность всех биологических свойств в течение срока, рекомендуемого для производства иммунобиологического лекарственного ветеринарного препарата, не содержать биологических контаминантов, ограничивающих возможность их использования.

5. Криоконсервация

Среда для криоконсервации обычно состоит из базовой питательной среды, криопротектора и источника белка и подбирается в зависимости от вида культуры. В качестве криопротектора широко применяются глицерин или

диметилсульфоксид (ДМСО), которые быстро проникают в клетки и прочно связывают в ней воду. Возможно также использование других криопротекторов.

Клеточные культуры могут храниться при температуре минус 196 °С в течение 10 и более лет.

После размораживания следует исследовать жизнеспособность клеток, определяя их количество путем подсчета живых и погибших клеток после окрашивания. Для определения физиологического состояния клеток «сохранные/поврежденные» широко применяется тест витального окрашивания 0,5% водным раствором трипанового синего с подсчетом клеток в гемоцитометрах.

6. Методы испытания клеточных культур

Испытания, описанные ниже, выполняются (как приведено в Таблице 1 и 2) на культуре главного банка клеток и рабочего банка клеток или на производственных клеточных культурах.

Таблица 1 – Методы испытания перевиваемых клеточных культур

	Главный банк клеток	Рабочий банк клеток	Производственные клеточные культуры (на предельном пассажном уровне)
Морфология	+	-	-
Видовая идентификация	+	-	-
Кариотип	+	-	-
Бактерии и грибы	+	+	+
Микоплазмы	+	+	+
Вирусы	+	+	+
Туморогенность	+	-	-
Ретровирусы	+	-	-

Таблица 2 – Методы испытания первичных клеточных культур

	Главный банк клеток	Рабочий банк клеток	Производственные клеточные культуры (на предельном пассажном уровне)
Морфология	+	-	-
Видовая идентификация	+	-	-
Бактерии и грибы	+	+	+

Микоплазмы	+	+	+
Вирусы	+	+	+

Морфология

Для морфологического изучения клеточные культуры выращивают на предметных или покровных стеклах в течение 48-72 ч, фиксируют 96 % этиловым спиртом или жидкостью Карнуа в течение 10-15 мин при температуре от 20 до 22 °С, окрашивают гематоксилин-эозином или азур-эозином и просматривают в световом микроскопе. В нормативном документе по качеству могут быть указаны иные условия приготовления препаратов. Определяют тип роста клеток (эпителиоподобный или фибробластоподобный), четкость клеточных границ, гомогенность цитоплазмы, наличие эозинофильных включений, характерные особенности ядра, ядрышек и др. органелл, отсутствие дегенеративных и цитопатических изменений клеточного монослоя.

Необходимо также описывать оптимальные условия и способ культивирования: стационарный, роллерный, суспензионный или псевдосуспензионный, на микроносителях (декстрановых, покрытых коллагеном или желатином, целлюлозных или полистироловых). Должны быть представлены: посевная доза, метод снятия клеток, кратность посева, частота пассирования.

Определение видовой аутентичности

Видовая аутентичность предполагает подтверждение соответствия культивируемых клеток паспортным данным культуры по истории происхождения (видовая принадлежность донора исходной ткани) и контроль кросс-контаминации. С этой целью разработаны и применяются методы электрофоретической подвижности изоферментов, кариологического анализа хромосом, молекулярно-генетические методы (ПЦР) и иммунологические методы.

Иммунологические методы идентификации клеток включают реакцию гемагглютинации, метод смешанной агглютинации, реакцию гемадсорбции,

иммунофлуоресценции (РИФ), определение антигенов гистосовместимости. Существует также ряд методов, основанных на применении специфического связывания антител с клеточной поверхностью: иммунный лизис (используют антитела к нежелательным клеткам, например, фибробластам в популяции эпителиальных клеток), направленная доставка цитотоксина, сортировка клеток с активацией флуоресценции или на магнитных гранулах с иммобилизованными антителами.

Туморогенность

Должен быть оценен риск линии клеток для вида, для которого предназначена вакцина, и, в случае необходимости, проведены испытания.

Ретровирусы

Испытание клеточных культур на контаминацию ретровирусами проводят методом полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Если при выполнении ПЦР будет обнаружено присутствие ретровирусов, то должно быть выполнено испытание на их инфекционность.

Культуры клеток, в которых обнаружено присутствие инфекционных (вирулентных) ретровирусов не допускаются к дальнейшему производству вакцин.

Испытание клеточных культур на присутствие посторонних агентов

Испытание клеточных культур на посторонние вирусы. Посторонние вирусы должны отсутствовать. Для испытаний используются чувствительные методики, включая описанные ниже.

Клетки должны быть приготовлены и культивироваться с использованием питательных сред и добавок в условиях, применяемых при производстве вакцин. Получают достаточное для проведения описанных ниже испытаний количество клеток в соответствующих контейнерах.

В течение всего времени инкубации образцы монослоя регулярно проверяют на наличие цитопатических эффектов, а в конце периода наблюдения - на наличие цитопатических эффектов, гемадсорбирующих и

гемагглютинирующих вирусов и специфических вирусов с помощью иммунофлюоресценции и других подходящих методик, описанных ниже.

Обнаружение цитопатических вирусов. Два образца монослоя, площадью, по крайней мере, 6 см² каждый, окрашивают соответствующим цитологическим красителем. Вся область каждого окрашенного образца монослоя исследуется на наличие любых тельцов включения, большого количества гигантских клеток или любых других повреждений клеток, которые могут быть вызваны посторонними агентами.

Обнаружение гемадсорбирующих вирусов. Образцы монослоя промывают несколько раз буферным раствором и достаточным объемом суспензии соответствующих эритроцитов, для равномерного покрытия поверхности монослоя. Через определенные периоды инкубации клетки исследуют на наличие гемадсорбции.

Обнаружение гемагглютинирующих вирусов. Образцы суспензии клеток объединяют с достаточным объемом суспензии соответствующих эритроцитов. Через определенные периоды инкубации клетки исследуют на наличие гемагглютинации.

Обнаружение специфических вирусов. Проводятся испытания на отсутствие определенных видоспецифических инфекционных возбудителей, характерных для вида, от которого получены клетки, и для вида, для которого предназначена вакцина. Получают достаточное для проведения испытаний на специфические агенты количество клеток. В каждом испытании дополнительно используется подходящий положительный контроль. Клетки подвергаются соответствующим испытаниям, например, с использованием антител, конъюгированных с флуоресцеином или подобными реактивами.

Культуры клеток из тканей мелких жвачных животных аттестуют на отсутствие вирусов и провирусов медленных инфекций (Висна-Маеди, аденоматоз легких овец, артрит-энцефалит коз) методом ПЦР.

Испытание клеточных культур на стерильность проводят в соответствии с *общей фармакопейной статьей «Стерильность»*.

Испытание клеточных культур на контаминацию микоплазмами проводят в соответствии с *общей фармакопейной статьей «Испытание на присутствие микоплазм»*.

Сыворотка крови крупного рогатого скота и трипсин, применяемые при культивировании клеточных культур, должны быть проверены на присутствие вирусов, бактерий (включая микоплазмы) и грибов. Испытание проводят в соответствии с *общей фармакопейной статьей «Определение вирусной контаминации в вирусных вакцинах для ветеринарного применения»*.

Испытание сыворотки и трипсина на стерильность и присутствие микоплазм проводят с помощью методов, изложенных в *общей фармакопейной статье «Стерильность»* и *общей фармакопейной статье «Испытание на присутствие микоплазм»*.

Для инактивации потенциальных вирусов - контаминантов возможно использование γ -облучения если используется облучение, его дозы должны быть достаточно низкими и не изменять биологических свойств облучаемых материалов.