

КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

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

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Клеточная линия (КЛ) — культура, возникающая в результате последовательного пассирования клеток первичной культуры.

Посевной пул клеток (ППК) — клеточная линия на определенном уровне пассажа, полученная из одного вида ткани донора и сохраняемая в контейнерах в равных частях однородного состава при температуре не выше минус 196 °С. Один или несколько контейнеров используются для создания главного банка клеток.

Главный банк клеток (ГБК) — запас охарактеризованных, паспортизированных клеток, полученных из одного посевного пула клеток, сохраняемых в контейнерах в равных частях однородного состава на определенном уровне пассажа при температуре не выше минус 196 °С. Предназначен для последующего создания рабочего банка клеток.

Рабочий банк клеток (РБК) — запас клеток однородного состава, полученных из ГБК на определенном уровне пассажа, сохраняемых в контейнерах в равных частях при температуре не выше минус 70 °С при хранении не более 1 года. Используются для получения производственной клеточной культуры.

Производственная клеточная культура — клетки, полученные из РБК и используемые для производства ИЛП. Для каждой производственной клеточной культуры определен пассажный интервал культивирования, при котором гарантированно сохраняется стабильность биологических свойств

клеточного субстрата, включая иммунобиологические характеристики целевого продукта.

Первичные клеточные культуры (ПКК) - культуры, источником которых являются органы, ткани или клетки, непосредственно извлеченные из организма (исключая культуры, источником которых являются опухоли, возникшие у животных после инъекции культивируемых клеток). Первичная культура может считаться таковой, пока она не подверглась, хотя бы однократному пассированию.

Диплоидные клеточные культуры (штаммы) (ДКК) — морфологически однородная популяция клеток человеческого или животного происхождения с ограниченным сроком жизни, в которой не менее 75% клеток имеют диплоидный кариотип, полностью соответствующий нормальному диплоидному кариотипу клеток организма, послужившего источником клеток.

Гетероплоидные клеточные культуры (ГКК) — однородная популяция клеток человеческого или животного происхождения с неограниченным сроком жизни, сохраняющая стабильность биологических характеристик в течение установленного срока, в которой диплоидным числом хромосом обладают менее 75% клеток.

Посторонние агенты — бактерии (в том числе, микобактерии, риккетсии, микоплазмы), грибы, вирусы, прионы (в том числе вызывающие трансмиссивные губчатые энцефалопатии крупного рогатого скота) и др., которые случайно попали в ИЛП в ходе производственного процесса.

Удвоение популяции — удвоение количества клеток при митотическом делении.

Онкогенность — свойство биологических агентов (вирусов, нуклеиновых кислот, клеточного субстрата, химических веществ, субклеточных элементов и др.) индуцировать превращения клеток в опухолевые (при этом опухоль состоит из клеток хозяина).

Туморогенность – способность клеточного субстрата образовывать опухоли при введении чувствительным животным (опухоль состоит из

инокулированных клеток).

Пассаж — перенос клеток из одного культурального сосуда в другой для размножения и накопления необходимого количества клеточной массы.

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Использование в качестве субстрата для производства перевиваемых клеточных линий (ДКК и ГКК) возможно только при создании системы клеточных банков.

Процесс производства ИЛП 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 ИЛП, получаемые из тканей животных и птиц, не должны содержать посторонних агентов, должны быть стерильными, жизнеспособными, морфологически однородными, не обладать онкогенностью и туморогенностью.

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

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

1. Наименование клеточной культуры;
2. Коллекционный шифр (клеточной линии, ГБК, РБК);
3. История получения (происхождение) клеточной культуры и создания ГБК и РБК;
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 стада 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 (ДКК)

ДКК получают из тканей или органов здорового донора (человека, животного или насекомых), не имеющего в генеалогии онкологических, врожденных аномалий. ДКК 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. ДКК растут в богатых витаминами и минеральными солями питательных средах с содержанием 10-15 % сыворотки крови плодов крупного рогатого скота, свиней, овец и лошадей.

ДКК 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 (ГКК)

ГКК 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.

ГКК должны иметь неограниченный срок жизни, типичную морфологию для данной линии, зимограмму и иммунологические маркеры, характерные для донора клеток, кариотип, определяющий видовую принадлежность, обладать онкогенностью и туморогенностью, высокой перmissивностью к адаптированным вирусам, сохранять стабильность всех биологических свойств в течение срока, рекомендуемого для производства ИЛП, 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) на культуре главного банка клеток и рабочего банка клеток или на производственных клеточных культурах.

Таблица 1 – Типы клеток, на которых проводится испытание

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

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 нормативной документации 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.

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.

Испытание клеточных культур на стерильность проводят в соответствии с ОФС «Стерильность».

Выявление микоплазм проводят микробиологическим и

цитохимическими методами («Испытание на присутствие микоплазм»). При отсутствии методов культивирования отдельных видов микоплазм используют методы окраски ДНК или, как сигнальный метод, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с последующим микробиологическим выделением (присутствие живых 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 ОФС «Определение вирусной контаминации в вирусных вакцинах для ветеринарного применения».

Испытание сыворотки и трипсина на стерильность и присутствие микоплазм проводят с помощью методов, изложенных в ОФС «Стерильность» и «Испытание на присутствие микоплазм».

В качестве дополнительных методов для выявления вирусов (парвовируса свиней 1 типа, цирковирусов свиней 1 и 2 типов, аденовирусов, вирусов, вызывающих гастроэнтериты, вирусов энцефалита свиней и др.) возможно использование иммуноферментного анализа (ИФА) и ПЦР в соответствии с инструкциями по применению после валидации методик.

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.

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.