

2.3.19.18. ТРЕБОВАНИЯ К КЛЕТОЧНЫМ КУЛЬТУРАМ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ВАКЦИН ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Общая фармакопейная статья устанавливает основные требования к клеточным линиям, используемым в качестве субстрата для производства и контроля качества вирусных вакцин для ветеринарного применения. Культуры клеток, используемые для производства ветеринарных вакцин должны соответствовать всем требованиям, указанным в настоящей фармакопейной статье. Культуры клеток используемые для контроля качества ветеринарных вирусных вакцин должны соответствовать всем или основным указанным требованиям.

ЛИНИИ КЛЕТОК

СИСТЕМА БАНКА КЛЕТОК

Производство ветеринарных вирусных вакцин с использованием диплоидных и перевиваемых линий клеток основано на системе банка клеток: главного банка клеток (ГБК) и рабочего банка клеток (РБК) при которой последовательные серии лекарственного препарата производят путем культивирования в клетках, полученных из одного и того же банка клеток. Одну или несколько емкостей из ГБК используют для подготовки рабочего банка клеток (РБК). Порядок использования, контроль идентичности и внешнего вида емкостей должны быть задокументированы. Возраст клеток *in vitro* определяют относительно главного банка клеток (ГБК).

Документы на ГБК и РБК должны содержать следующую информацию:

1. Наименование клеточной культуры;
 2. Идентификационный код главного банка клеток;
 3. Источник происхождения (вид, линия животных, географическое происхождение, используемая ткань или орган);
 4. История получения линии клеток (метод, используемый для выделения первичных клеток; метод культивирования и любые другие продуценты, используемые для создания главного банка клеток; число проведенных пассажей до создания главного банка клеток; условия хранения);
 5. Номер пассажа и дата закладки клеток на хранение;
 6. Запас клеток (количество сохраняемых емкостей банка клеток, количество клеток в миллилитре или емкости);
 7. Условия криоконсервации (среда для криоконсервации), режим хранения (при температуре минус 70 °C и ниже), жизнеспособность клеток после размораживания;
 8. Цитоморфологическая характеристика (морфология клеток до и после окрашивания);
 9. Кариологическая характеристика
 10. Ростовые свойства (способ культивирования, питательная среда и все ее компоненты, посевная концентрация клеток при пассировании, метод снятия клеток при выращивании на поверхности твердой фазы, кратность посева, температура культивирования, частота пассирования);
 11. Уровень предельного пассажа (количество рекомендованных пассажей);
 12. Стабильность биологических свойств (должна быть подтверждена соответствующая жизнеспособность культуры клеток в предполагаемых условиях хранения);
 13. Отсутствие посторонних агентов (бактерии, грибы, микоплазмы, посторонние вирусы);
 14. Туморогенность (применимо для перевиваемых культур клеток);
 15. Сфера применения, чувствительность к штаммам вирусов;
- При использовании в производстве постоянно зараженных культур клеток должно

быть доказано, что клетки заражены только заявленным агентом, что должно быть отражено в соответствующем документе на культуру клеток. Инфицированные клетки, используемые для производства, должны соответствовать требованиям данной общей фармакопейной статьи.

ПЕРВИЧНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ

Культуры клеток, полученные из тканей здоровых животных и выращиваемые *in vitro* до начала субкультивирования.

Для приготовления первичных клеточных культур материал должен быть получен из стада птиц категории СПФ или от животных, свободных от специфических патогенных микроорганизмов; из хозяйств благополучных по инфекционным заболеваниям. Для этого должны использоваться 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.

ДИПЛОИДНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ

Клеточные линии, полученные путем субкультивирования первичных культур клеток, имеют диплоидный набор хромосом, структурно идентичный хромосомам того вида, от которого получена культура.

Диплоидные клеточные культуры получают из тканей или органов здоровых животных – доноров (*человека, животного или насекомых*), не имеющего в генеалогии онкологических, врожденных аномалий, общепринятыми методами дезинтеграции клеток или методом эксплантатов. После формирования клеточного монослоя культуру периодически пассируют (один-два раза в неделю).

Диплоидные клеточные культуры имеют 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.

ПЕРЕВИВАЕМЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ

Обладают стабильными культурально-морфологическими свойствами с сохранением чувствительности ко многим вирусам. Могут быть получены при серийном субкультивировании первично-трипсинизированных нормальных культур с выделением доминантной популяции спонтанно трансформированных клеток, серийном субкультивировании первично-трипсинизированных клеток опухолей человека или животных; трансформации нормальных клеток с ограниченным сроком жизни онкогенным вирусом; слиянии миеломных клеток с В-лимфоцитами, продуцирующими антитела (гибридомы), гибридизации соматических клеток.

Гетерогенность от 1 до 3 хромосом к нормальному кариотипу является одним из показателей перехода диплоидной культуры клеток в перевиваемую.

Перевиваемые клеточные культуры имеют неограниченный срок жизни, типичную морфологию для данной линии и иммунологические маркеры, характерные для донора

клеток, кариотип, определяющий видовую принадлежность, Данные культуры клеток должны 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.

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

ПЕРВИЧНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ

Испытания первичных клеточных культур проводят по показателям: «Морфология», «Бактерии и грибы», «Микоплазмы», «Посторонние вирусы», «Эндогенные ретровирусы млекопитающих/птиц». (Методы испытания на отсутствие посторонних агентов приведены в ОФС «Оценка рисков и подтверждение отсутствия посторонних агентов в вакцинах для ветеринарного применения»).

Дополнительные требования к первичным клеткам, используемым для производства вакцины для ветеринарного применения, указывают в частной фармакопейной статье на соответствующую вакцину.

ДИПЛОИДНЫЕ И ПЕРЕВИВАЕМЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ

Испытания, описанные ниже, выполняются на культуре главного банка клеток и рабочего банка клеток или на посевных клеточных культурах на предельном пассажном уровне (в соответствии с 2.3.19.18.-1).

Таблица 2.3.19.18.-1 – Стратегия выбора испытаний диплоидных и перевиваемых клеточных линий

Показатели	Главный банк клеток	Рабочий банк клеток	Посевные клеточные культуры (на предельном пассажном уровне)
Морфология	+	+	+
Кариотип	+	+	+
Видовая идентификация	+	—	+
Бактерии и грибы*	+	+	+
Микоплазмы*	+	+	+
Посторонние* вирусы	+	+	+
Эндогенные* ретровирусы млекопитающих/птиц	+	-	+
Туморогенность	+	-	+
Продолжительность жизни <i>in vitro</i> (для диплоидных линий клеток)	+	+	-

*Методы испытания изложены в ОФС: 2.1.6.1., 2.1.6.25 и в ОФС «Оценка рисков и подтверждение отсутствия посторонних агентов в вакцинах для ветеринарного применения»

МОРФОЛОГИЯ

Для морфологического изучения клеточные культуры выращивают на предметных

или покровных стеклах в течение 48-72 ч, фиксируют *этанолом (96 % об/об)* 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 скорость и тип роста клеточной культуры (эпителиоподобный или фибробластоподобный), внешний вид монослоя клеток, до и после гистологического окрашивания, четкость клеточных границ, гомогенность цитоплазмы, наличие эозинофильных включений, характерные особенности ядра, ядрышек и др. органелл, отсутствие дегенеративных и цитопатических изменений клеточного монослоя.

КАРИОТИП

Исследование хромосом, проводится не менее чем на пятидесяти клетках в миотическую стадию, взятых из главного и/или рабочего банков клеток на уровне пассажа, который используется в производстве. Любой хромосомный маркер, присутствующий в клетках главного банка, должен быть обнаружен в клетках рабочего банка соответствующего пассажа, модальное число хромосом не должно превышать более чем на 15 % число хромосом в клетках главного банка. Кариотипы должны быть идентичными. Если модальное число хромосом превышает указанный уровень, если хромосомные маркеры не будут найдены в клетках рабочего банка или на предельном пассажном уровне, используемом в производстве, или кариотип будет отличаться, такая линия клеток не должна использоваться в производстве.

Для новых или ранее не охарактеризованных субстратов диплоидных клеток должно быть представлено подтверждение диплоидного кариотипа.

ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Видовая идентификация предполагает подтверждение соответствия культивируемых клеток паспортным данным культуры по истории происхождения (видовая принадлежность донора исходной ткани) одной из валидированных методик. Могут быть применены методы электрофоретической подвижности изоферментов, кариологического анализа хромосом, молекулярно-генетические методы (ПЦР).

Должно быть доказано, что главный банк клеток и клетки на предельном уровне пассажа, используемом для производства, получены от указанного вида животного.

ТУМОРОГЕННОСТЬ

Туморогенность определяют, как способность клеточной линии индуцировать рост опухоли у чувствительных животных в месте введения после введения.

Должен быть оценен риск опухоленности линии клеток для целевых видов, для которых предназначена вакцина, и, в случае необходимости, проведены испытания.

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ IN VITRO (ДЛЯ ДИПЛОИДНЫХ ЛИНИЙ КЛЕТОК)

Испытания проводят на предельном и выше пассажном уровне. При использовании суспензии культур клеток увеличение числа клеток, эквивалентное приблизительно трем удвоениям популяции, считается одним пассажем. Определяют предельное количество пассажей, при проведении которых культура клеток остается подобной главному банку клеток в отношении всех биологических характеристик и чистоты. С помощью валидации и дальнейшими испытаниями подтверждают, что использование таких клеток не оказывает негативного влияния на производимые с их использованием в качестве субстрата вакцины.

КОНТАМИНАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Каждая серия ГБК, РБК и ПКК должна соответствовать требованиям испытания на

стерильность (2.1.6.1)

МИКОПЛАЗМЫ

Каждая серия ГБК, РБК и ПКК должна соответствовать требованиям испытания на микоплазмы (2.1.6.25).