# 2.3.19.17. ТРЕБОВАНИЯ К КЛЕТОЧНЫМ КУЛЬТУРАМ – СУБСТРАТАМ ПРОИЗВОДСТВА БИОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Общая фармакопейная статья устанавливает требования к диплоидным и перевиваемым клеточным линиям, используемым в качестве субстратов для производства вакцин для медицинского применения и биотехнологических лекарственных препаратов для медицинского применения.

Дополнительные аспекты, связанные с лекарственными препаратами, получаемыми с помощью технологии рекомбинантной ДНК, представлены в общей фармакопейной статье *2.3.19.8. Лекарственные средства, получаемые с использованием технологии рекомбинантной ДНК*. Испытания должны быть проведены на различных этапах применения клеточного субстрата (посевные клетки, главный банк клеток (ГБК), рабочий банк клеток (РБК), клетки предельного для производства клеточного возраста *in vitro* или клетки расширенного (послепроизводственного) банка, соответствующие клеткам предельного для производства клеточного возраста *in vitro* или выше него), как указано в таблице номер.-1. Общие положения по использованию клеточных линий и методов испытаний приведены ниже.

Требования к первичным клеткам или клеткам, прошедшим несколько пассажей без создания банка клеток, используемым для производства вакцины для медицинского применения, указывают в частной фармакопейной статье на соответствующую вакцину.

***Диплоидные клеточные линии*** обладают высокой, но ограниченной способностью к размножению *in vitro*.

***Перевиваемые клеточные линии*** способны неограниченно размножаться *in vitro*. Клетки часто имеют различия в кариотипе по сравнению с исходными клетками, они могут быть получены из здоровой или опухолевой ткани; от млекопитающих или насекомых. Существуют теоретические риски, связанные с использованием перевиваемых клеточных линий, особенно, если их туморогенность установлена экспериментально. Риски связаны с потенциальной биологической активностью присутствующей в вакцине остаточной ДНК клетки-хозяина: риск инфекционности, если геном ДНК-содержащего вируса или провируса присутствует в клеточной ДНК (встроенный или внехромосомный), а также риск канцерогенности, если клеточная линия является туморогенной.

Для лекарственных препаратов, произведённых с использованием перевиваемых клеточных линий, независимо от того, являются они туморогенными или нет, необходимо провести оценку риска и возможность его снижения, чтобы оценить пригодность клеточного субстрата, определить приемлемый уровень содержания остаточной ДНК клетки-хозяина и белков клетки-хозяина.

***Система банков клеток.*** Производство лекарственных препаратов с использованием диплоидных или перевиваемых клеточных линий должно быть основано на системе банков клеток, при которой последовательные серии лекарственного препарата производят путём культивирования в клетках, полученных из одного и того же банка клеток. Возраст клеток *in vitro* определяют относительно главного банка клеток (ГБК). Один или несколько контейнеров из ГБК используют для подготовки рабочего банка клеток (РБК). Порядок использования, контроль идентичности и внешнего вида контейнеров должны быть задокументированы.

***Культуральные среды.*** Состав сред, используемых для выделения и последующего культивирования документируют. Используемые вещества человеческого или животного происхождения, не должны содержать посторонних агентов (*ОФС Испытания вирусных вакцин на присутствие посторонних агентов*) и должны соответствовать требованиям общих фармакопейных статей *2.3.1.3. Вирусная безопасность* и *2.3.19.3. Минимизация риска контаминации лекарственных средств инфекционными агентами прионных болезней*.

Альбумин человека, используемый в составе культуральных сред, должен отвечать требованиям соответствующей частной фармакопейной статьи.

Бычья сыворотка, используемая в составе культуральных сред, должна отвечать требованиям соответствующей частной фармакопейной статьи.

Если трипсин, используемый для получения клеточных культур, не получен с использованием технологии рекомбинантной ДНК, подходящими методами подтверждают его стерильность, отсутствие микоплазм и вирусов.

***Посевные клетки***. Пригодность посевных клеток оценивают на основании доступной информации об источнике, истории получения и характеристиках.

*Источник клеток.* Для линии клеток человека документируют следующую информацию о доноре: этническое и географическое происхождение, возраст, пол, состояние здоровья, используемая ткань или органы, результаты анализов на возбудителей инфекционных болезней. Для линии клеток животных документируют следующую информацию: вид, породу, условия разведения, возраст, пол, географическое происхождение, состояние здоровья, используемая ткань или органы, результаты анализов на возбудителей инфекционных болезней.

Клетки нервного происхождения, такие как, нейробласты или клеточная линия P12, не используют для производства вакцин, так как они могут быть контаминированы инфекционными агентами прионных заболеваний.

*История получения.* Документируют следующую информацию: метод, используемый для выделения клеточной культуры; методы культивирования; любые другие процедуры, используемые для создания ГБК, в результате которых клетки могут подвергаться воздействию посторонних агентов.

Может быть недоступна полная информация о составе использованных ранее культуральных сред, например, об источнике веществ животного происхождения. При соответствующем обосновании и разрешении уполномоченного органа, для производства лекарственных препаратов допустимо использование банков клеток, уже созданных с использованием таких сред.

*Характеристики.* Должны быть определены:

1) подлинность клеток с использованием таких методов *in vitro*, как изоферментный, иммунохимический, метод амплификации нуклеиновых кислот, метод фингерпринтинга (метод получения уникальных ДНК-профилей);

2) ростовые характеристики клеток и их морфологические свойства с использованием оптической и электронной микроскопии;

3) кариотип (для диплоидных клеточных линий);

4) продолжительность жизни *in vitro* по степени удвоения популяции (для диплоидных клеточных линий).

***Стабильность клеточного субстрата.*** Должна быть установлена подходящая жизнеспособность клеточной линии в предполагаемых условиях хранения. Для конкретного лекарственного препарата должно быть подтверждено постоянство производства требуемого (целевого) продукта при использовании клеток на определенных уровнях пассажа или удвоения популяции в начале и в конце предполагаемого периода использования.

***Инфекционные посторонние агенты***. Выбор испытаний на посторонние инфекционные агенты клеточных линий, используемых в производстве лекарственных препаратов, должен проводиться на основе оценки риска. Пермиссивные клетки выбирают с учетом происхождения клеточного субстрата, а также потенциальных посторонних инфекционных агентов, которые могут быть случайно занесены во время производственных процессов или при использовании сырья животного или растительного происхождения. Одна из таких стратегий выбора представлена в таблице номер-1, но могут быть применены и другие стратегии, например, основанные на более полном перечне испытаний ГБК и РБК. Любая стратегия должна быть обоснована и обеспечивать

уровень безопасности, соответствующий или превышающий таковой для стратегии, указанной в таблице номер-1. Доступны новые чувствительные молекулярные методы с широкими возможностями обнаружения, включая методы массового параллельного секвенирования, метод амплификации нуклеиновых кислот с вырожденными праймерами для целых семейств вирусов или методы случайного прайминга (связанные или не связанные с секвенированием), гибридизацию с олигонуклеотидами и масс-спектрометрию. Эти методы могут быть использованы как альтернативные испытаниям *in vivo* или специфичным методам амплификации нуклеиновых кислот, так и в качестве дополнения или альтернативы культуральным методам испытаний *in vitro* при соответствующем обосновании и разрешении уполномоченным органом. Технологический процесс должен обеспечивать удаление и(или) инактивацию определенных вирусов с учетом данных об источнике клеток, истории их получения, в том числе условий культивирования. Кроме того, должны быть учтены данные о посторонних вирусах, которые достоверно заражают животных, являющихся источником получения клеток, например, вирус *SV* 40 (*Simian virus*) у макак-резус, вирус *Flock house* в клетках насекомых или вирусы, которые могут быть случайно занесены во время производственных процессов или при использовании сырья животного или растительного происхождения.

Для клеточных линий, полученных от насекомых, проводят испытания на специфические вирусы, соответствующие виду насекомого, и на арбовирусы (вирусы, передающиеся членистоногими). Перечень вирусов для испытаний выбирают в соответствии с современным состоянием научных знаний. Для клеточных линий, экспрессирующих эндогенные ретровирусные частицы (например, клетки грызунов), испытания на обратную транскриптазу не проводят, но необходимы испытания на инфекционность, чтобы определить, являются ли эндогенные ретровирусные частицы инфекционными или нет.

Клеточные линии, в которых обнаружено присутствие инфекционных ретровирусов, не применяют для производства вакцин для медицинского применения, если иное не обосновано и не разрешено уполномоченным органом.

Таблица номер-1 – Стратегия выбора испытаний клеточных линий

| Испытание | Посевные клетки | Главный банк клеток | Рабочий банк клеток | Клетки предельного для производства клеточного возраста *in vitro* или клетки расширенного (послепроизводственного) банка, соответствующие клеткам предельного для производства клеточного возраста *in vitro* или выше него |
|---|---|---|---|---|
| Подлинность и чистота | | | | |
| Морфология | + | + | + | + |
| Идентификация | + | + | + | + |
| Кариотип (диплоидные клеточные линии) | + | + | +[1)] | +[1)] |
| Продолжительность жизни *in vitro* диплоидные клеточные линии) | – | + | + | – |
| Посторонние агенты | | | | |
| Бактериальная и грибковая контаминация | – | + | + | – |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Микобактерии | – | +[2)] | +[2)] | – |
| Микоплазмы | – | + | + | – |
| Спироплазмы[3)] | – | + | + | – |
| Электронная микроскопия | – | +[4)] | – | +[4)] |
| Культуральные методы (испытание жизнеспособных клеток или полученного из них клеточного лизата) | – | + | + | + |
| Испытания на новорожденных мышах и на куриных эмбрионах | – | – | +[5)] | +[5)] |
| Оценка наличия конкретных вирусов методами амплификации нуклеиновых кислот | – | +[6)] | +[6)] | +[6)] |
| Испытания с использованием молекулярных методов | +[7)] | +[7)] | +[7)] | +[7)] |
| Ретровирусы | – | +[4)] | – | +[4)] |
| Туморогенность | | | | |
| Туморогенность | +[8, 9)] | – | – | +[8)] |

Примечания.

1) Диплоидный характер устанавливают для каждого РБК, но с использованием клеток предельного для производства клеточного возраста *in vitro* или выше него.

2) Если используют клетки, чувствительные к *Mycobacterium tuberculosis* или другим видам *Mycobacteriaceae.*

3) Если используют клетки насекомых или сырье растительного происхождения.

4) Испытание проводят для ГБК, но с использованием клеток предельного для производства клеточного возраста *in vitro* или выше него.

5) Испытание проводят для каждого РБК, но с использованием клеток предельного для производства клеточного возраста *in vitro* или выше него.

6) Специальные испытания на возможную контаминацию (например, вирусами), выбранные в соответствии с оценкой риска, основанной на происхождении клеток и потенциальных посторонних инфекционных агентах, случайно попавших в производственные процессы или в результате использования сырья животного или растительного происхождения. Этапы испытания выбирают на основе оценки риска.

7) Методы могут быть использованы как альтернативные испытаниям *in vivo* или специфичным методам амплификации нуклеиновых кислот, а так же в качестве дополнения или альтернативы культуральным методам испытаний *in vitro* при соответствующем обосновании и разрешении уполномоченным органом. Этапы испытания выбирают на основе оценки риска.

8) Клеточные линии *MRC*-5, *WI*-38 и *FRhL*-2 признаны нетуморогенными и не требуют проведения испытания. Испытания не проводят для линий клеток с подтвержденной туморогенностью, например *CHO* и *BHK*-21.

9) Испытание проводят для посевных клеток, но с использованием клеток предельного для производства клеточного возраста *in vitro* или выше него.

***Туморогенность.*** Туморогенность определяют как способность клеточной линии индуцировать рост опухоли после введения интактных жизнеспособных клеток животным с иммунодефицитом или иммуносупрессией (обычно грызунам). Испытания на туморогенность проводят с использованием клеток в конце производства или предельного для производства клеточного возраста *in vitro* или на пассаже выше него

Диплоидные клеточные линии *MRC*-5, *WI*-38 и *FRhL*-2 признаны нетуморогенными и не требуют проведения испытания. Испытания не проводят для линий клеток с подтвержденной туморогенностью, например *CHO*.

Если ранее не охарактеризованная клеточная линия является туморогенной, необходимо провести исследование онкогенности с использованием очищенной ДНК из клеточной линии и(или) лизата клеток, чтобы установить отсутствие онкогенных компонентов. Результаты используют в рамках анализа рисков, проводимого для обоснования возможности использования клеточной линии для производства вакцин для медицинского применения. Кроме того, необходимо определение 50 % туморогенной дозы ($TPD_{50}$) клеток и их способность к метастазированию.

С целью получения более полной корреляции фенотипа клеточной линии с туморогенным, могут быть проведены дополнительные испытания *in vitro*, например, способность к росту в мягких агаровых гелях, способность индуцировать инвазивный рост клеток в мышцах и (или) способность индуцировать трансформацию клеток линии 3*T*3 (эмбриональных фибробластов мыши).

***Остаточная ДНК клетки-хозяина***. Для каждого конкретного лекарственного препарата, произведенного с использованием перевиваемой клеточной линии, проверяют остаточное содержание ДНК клетки-хозяина и устанавливают допустимый верхний предел, основанный на оценке риска, с учетом:

– происхождения (человеческого или нет) и туморогенности (в том числе степени туморогенности) клеточной линии;

– наличия в производственном процессе стадий инактивации потенциальной биологической активности (онкогенности, инфекционности) остаточной ДНК клетки-хозяина (например, обработка химическими реагентами, такими как, бета-пропиолактон, ДНКаза);

– возможности производственного процесса обеспечивать снижение количества и размера остаточной ДНК клетки-хозяина;

– предполагаемого использования лекарственного препарата (например, путь введения);

– метода, используемого для определения содержания остаточной ДНК клетки-хозяина.

Процесс очистки парентеральных вакцин способен снизить содержание остаточной ДНК клетки-хозяина в лекарственном препарате до уровня менее 10 нг на дозу, пределы приемлемости должны быть обоснованы и разрешены уполномоченным органом.

При соответствующем обосновании по результатам валидационных исследований (например, исследований по внесению заданных количеств примеси с соответствующим распределением фрагментов ДНК по размерам) и последующего подтверждения воспроизводимости процесса производства в отношении снижения содержания остаточной ДНК клетки-хозяина до установленного уровня, испытание лекарственного препарата на содержание остаточной ДНК клетки-хозяина может быть исключено при разрешении уполномоченного органа.

***Хромосомная характеристика***. Необходимо подтвердить, что диплоидные клеточные линии являются диплоидными. Для диплоидных клеточных линий необходима более полная характеристика с методами анализа кариотипа, если не было подтверждено полное удаление интактных клеток на стадиях обработки биомассы вируса. Исследуют образцы с четырех пассажей, равномерно распределенных в течение жизни клеточной культуры *in vitro*. Исследуют не менее 200 клеток в метафазе; устанавливают точное количество хромосом и частоту гиперплоидии, гипоплоидии, полиплоидии, разрывов и структурных аномалий.

Клеточные линии *MRC*-5, *WI*-38 и *FRhL*-2 признаны диплоидными и хорошо охарактеризованы; если они не модифицированы генетически, дальнейшие испытания для них не проводят.

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

*МОРФОЛОГИЯ*

Морфология клеток должна быть адекватно описана и задокументирована.

*ИДЕНТИФИКАЦИЯ*

Для установления подлинности клеток используют метод фингерпринтинга, а также методы для установления следующих характеристик:

– биохимических (изоферментный анализ);

– иммунологических (определение антигенов гистосовместимости, иммунохимические анализы *in vitro*);

– цитогенетических (определение цитогенетических маркеров);

– генетических (методы амплификации нуклеиновых кислот).

*КОНТАМИНИРУЮЩИЕ КЛЕТКИ*

Испытание методом фингерпринтинга, проводимое для идентификации, также позволяет подтвердить отсутствие контаминирующих клеток.

*КОНТАМИНАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМАМИ*

ГБК и каждый РБК должны соответствовать требованиям испытания на стерильность (*2.1.6.1.*). Испытания проводят с использованием 10 мл культуральной жидкости для каждой питательной среды. Испытанию подлежит 1 % ёмкостей от общего числа в банке, но не менее двух ёмкостей.

*МИКОБАКТЕРИИ*

ГБК и каждый РБК клеточной линии, чувствительной к *Mycobacterium tuberculosis* или другим видам *Mycobacteriaceae*, должны соответствовать требованиям испытания на микобактерии (*2.1.6.14.*). Допустимо использование методов амплификации нуклеиновых кислот (*2.1.6.17.*) в качестве альтернативных культуральному методу при соответствующем обосновании сопоставимости получаемых результатов.

*МИКОПЛАЗМЫ*

ГБК и каждый РБК должны соответствовать требованиям испытания на микоплазмы (*2.1.6.25.*). Для проведения испытания используют одну или несколько ёмкостей.

*СПИРОПЛАЗМЫ*

Испытания на спироплазмы необходимо проводить для клеточных линий насекомых, а также в случае использования сырья растительного происхождения. Если применимо проводят испытания ГБК и каждого РБК валидированным методом, одобренным и разрешенным уполномоченным органом. Допустимо использование методов амплификации нуклеиновых кислот (*2.1.6.17.*) при соответствующем обосновании и разрешении уполномоченного органа. Для проведения испытания используют одну или несколько ёмкостей.

*ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ*

РБК исследуют методом электронной микроскопии на наличие посторонних агентов. Клетки культивируют при температуре, используемой при производстве лекарственного препарата, и исследуют клетки на пассаже, обычно используемом для производства, или предельного для производства клеточного возраста *in vitro* (или на пассаже выше него). Клеточные линии насекомых культивируют также при значениях температуры выше и ниже тех, которые используют для производства, а также подвергают другим видам обработки, например, воздействию химических веществ

(стрессоров). Для клеточных линий насекомых используемые значения температуры и методы обработки, а также количество клеток, подлежащих исследованию, должны быть обоснованы и разрешены уполномоченным органом.

*ИСПЫТАНИЕ НА ПОСТОРОННИЕ АГЕНТЫ В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ*

Для проведения испытания клеточных линий млекопитающих жизнеспособные клетки (не менее $10^7$ клеток) культивируют совместно с подходящей монослойной культурой клеток или эквивалентный клеточный лизат в культуральной жидкости помещают на монослой подходящей клеточной линии. Могут быть использованы:

– диплоидные клетки человека;

– перевиваемые клетки почки обезьяны;

– для испытания клеточной линии, полученной не от человека или обезьяны, клетки той же клеточной линии из отдельной партии.

Для проведения испытания клеточных линий насекомых клеточный лизат в культуральной жидкости помещают на монослойную культуру клеток других клеточных линий, в том числе клеток человека, обезьяны, а также и не менее одной клеточной линии, отличной от используемой в производстве, чувствительной к вирусам насекомых и позволяющей выявить арбовирусы человека (например, *ВНК*-21).

Полученную совместно культивируемую клеточную культуру (для жизнеспособных клеток) или клеточную культуру, на монослой которой был помещен клеточный лизат, наблюдают не менее двух недель и исследуют на наличие вирусов по цитопатическому эффекту. Если клеточная линия способна поддерживать рост цитомегаловируса человека или обезьяны, диплоидные клетки человека наблюдают в течение четырех недель. Для выявления цитомегаловируса человека или обезьяны допустимо использование метода амплификации нуклеиновых кислот (*2.1.6.17.*) вместо четырехнедельного культивирования диплоидных клеток человека. При необходимости для сохранения клеток в жизнеспособном состоянии в течение дополнительных двух недель используют свежую культуральную среду или через две недели производят субкультивирование. В конце периода наблюдения проводят испытания культуральной жидкости на гемагглютинирующие вирусы или жизнеспособных клеток на гемадсорбирующие вирусы с использованием эритроцитов морской свинки.

Эритроциты морской свинки хранят при температуре от 2 ºС до 8 ºС не более семи суток. Половину культур подвергают испытанию после инкубации при температуре от 2 ºС до 8 ºС в течение 30 мин, а другую половину после инкубации при температуре от 20 ºС до 25 ºС в течение 30 мин. Испытание на гемагглютинирующие вирусы не применяют для выявления для арбовирусов.

Испытание считается недействительным, если жизнеспособными остаются менее 80 % клеток. Клеточная культура выдерживает испытание, если не обнаружено никаких признаков постороннего агента.

*РЕТРОВИРУСЫ*

Если неизвестно, продуцирует ли клеточная линия ретровирусные частицы, наличие ретровирусов устанавливают с помощью:

1) анализа обратной транскриптазы с усилением (*2.1.6.17.*), проводимого для банков клеток с использованием культуральной жидкости клеток на пассаже, обычно используемом для производства, или предельного для производства клеточного возраста in vitro (или на пассаже выше него);

2) просвечивающей (трансмиссионной) электронной микроскопии.

Если одно или оба испытания дают положительный результат, проводят испытания на инфекционность на пермессивных клеточных линиях человека с использованием анализа обратной транскриптазы с усилением (*2.1.6.17.*) в культуральной жидкости.

Если известно, что клеточная линия продуцирует ретровирусные частицы, то наличие ретровирусов устанавливают с помощью:

– просвечивающей (трансмиссионной) электронной микроскопии;

– испытаний на инфекционность, проводимых на подходящих клеточных линиях человека и дополнительных клеточных линиях (например, клетках *Mus dunni* или клетках *SC*-1 для оценки клеток *CHO*) с использованием анализа обратной транскриптазы с усилением (*2.1.6.17.*) в культуральной жидкости. В случае наличия в клетках обратной транскриптазы культуральную жидкость исследуют методом бляшкообразования или методом флуоресцентного фокуса.

Чувствительность метода анализа обратной транскриптазы с усилением очень высока, поэтому интерпретация положительных результатов неоднозначна; в этом случае применимость клеточной линии для производства биологического лекарственного препарата должна быть оценена с учетом всех доступных данных.

*ИСПЫТАНИЕ НА НОВОРОЖДЕННЫХ МЫШАХ*

Испытание проводят, если оценка риска показывает, что оно обеспечивает снижение риска с учетом результатов всех других испытаний, проведенных для данной клеточной линии.

В испытании используют новорожденных мышей в возрасте не старше 24 часов из двух пометов, состоящих не менее чем из 10 животных.

Суспензию, содержащую $10^7$ жизнеспособных клеток, или эквивалентный клеточный лизат в культуральной жидкости вводят каждому животному внутрибрюшинно не менее 0,1 мл и в мозг 0,01 мл.

Наблюдают за новорожденными мышами в течение не менее четырех недель. Заболевших животных и имеющих отклонения в состоянии здоровья исследуют для установления причины.

Клеточная линия выдерживает испытание, если отсутствуют данные о наличии посторонних агентов. Испытание считают недействительным, если менее 80 % новорожденных мышей в каждой группе остаются здоровыми и доживают до конца периода наблюдения.

*ИСПЫТАНИЕ НА КУРИНЫХ ЭМБРИОНАХ*

Испытание проводят, если оценка риска показывает, что оно обеспечивает снижение риска с учетом результатов всех других испытаний, проведенных для данной клеточной линии.

В испытании используют куриные эмбрионы яиц, полученных от стад кур категории СПФ (*2.3.19.4.*).

Суспензию, содержащую $10^6$ жизнеспособных клеток или эквивалентный клеточный лизат в культуральной жидкости вводят

– в аллантоисную полость 10 куриных эмбрионов в возрастном периоде от 9 суток от 11 суток.

– в желточный мешок 10 куриных эмбрионов в возрастном периоде от 5 суток от 7 суток.

Инкубируют не менее пяти суток. Определяют в аллантоисной жидкости наличие гемагглютининов с использованием эритроцитов млекопитающих и птиц. Проводят испытание при температуре от 2 ºС до 8 ºС и при температуре от 20 ºС до 25 ºС, оценивая результат через 30–60 мин.

Клеточная линия выдерживает испытание, если отсутствуют данные о наличии посторонних агентов. Испытание считают недействительным, если менее 80 % куриных эмбрионов остаются здоровыми и доживают до конца периода наблюдения.

*ИСПЫТАНИЯ НА ОПРЕДЕЛЕННЫЕ ВИРУСЫ*

Перечень вирусов, на наличие которых необходимо проводить испытания клеточной линии, определяют на основе оценки риска вирусной контаминации в соответствии с принципами, указанными в общей фармакопейной статье *2.3.1.3. Вирусная*

*безопасность*. Должны быть учтены источник получения клеточной линии, потенциальные источники вирусной контаминации (например, сырье животного или растительного происхождения) и другие возможные источники вирусной контаминации.

Испытания методами амплификации нуклеиновых кислот (*2.1.6.17)* проводят как с предварительной амплификацией в клетках, так и без нее. Для обнаружения видоспецифичных вирусов в клеточных линиях грызунов используют методы амплификации нуклеиновых кислот (*2.1.6.17*) или испытания на мышах, крысах или хомяках по обнаружению выработки специфичных антител.

*ИСПЫТАНИЯ НА ВИРУСЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ С ШИРОКИМИ ВОЗМОЖНОСТЯМИ ОБНАРУЖЕНИЯ*

При соответствующем обосновании на основе оценки риска и разрешении уполномоченным органом молекулярные методы с широкими возможностями обнаружения, например, высокопроизводительное секвенирование, могут быть использованы как альтернативные испытаниям *in vivo* или специфичным методам амплификации нуклеиновых кислот, так и в качестве дополнения или альтернативы культуральным методам испытаний *in vitro*

Выбор этапов применения клеточного субстрата, на которых проводят испытания (например, ГБК, РБК и др.), как для методов амплификации нуклеиновых кислот (*2.1.6.17*), так и для и молекулярных методов с широкими возможностями обнаружения должен быть основан на оценке риска и зависит от этапов производственного процесса, на которых может произойти контаминация вирусами.

При получении положительных результатов в испытаниях методами амплификации нуклеиновых кислот (*2.1.6.17*) и молекулярными методами с широкими возможностями обнаружения должно быть установлено, связано ли обнаружение нуклеиновых кислот с контаминацией клеточной линии посторонними инфекционными агентами и(или) представляют ли они риск для здоровья человека.

*ИСПЫТАНИЕ НА ТУМОРОГЕННОСТЬ IN VIVO*

Определение туморогенности перевиваемой клеточной линии проводят в сравнении с подходящей клеточной линией в качестве положительного контроля (например, клетки *HeLa* или *Hep*2).

В испытании используют животных, признанные подходящими:

1) бестимусные мыши (генотип *Nu*/*Nu*)

2) новорождённые мыши, крысы или хомяки, которым вводили антитимоцитарную сыворотку или глобулин;

3) тимэктомированные и облученные мыши, с восстановленной иммунной системой ($T^-$, $B^+$) костным мозгом здоровых мышей.

Животных распределяют на две группы, состоящие из 10 особей (опытная группа и контрольная группа).

Каждому животному опытной группы вводят внутримышечно или подкожно по 0,2 мл суспензии, содержащей $10^7$ клеток испытуемой клеточной линии. Каждому животному контрольной группы вводят внутримышечно или подкожно по 0,2 мл суспензии, содержащей $10^7$ клеток положительного контроля.

Новорождённым животным вводят по 0,1 мл антитимоцитарной сыворотки или глобулина сразу после рождения и на 2 сутки, 7 сутки и 14 сутки после рождения. Активность сыворотки или глобулина должна быть достаточной для подавления иммунной системы животных, до такой степени, чтобы последующее введение $10^7$ клеток клеточной линии положительного контроля индуцировало опухоли и метастазы.

Тяжело поражённых животных с очевидными прогрессирующими опухолями подвергают эвтаназии до окончания испытания.

За животными наблюдают и через равные промежутки времени пальпируют на предмет образования узловых уплотнений в местах инъекций. Любые образовавшиеся

узлы измеряют в двух перпендикулярных направлениях, измерения регулярно повторяют, чтобы определить, есть ли прогрессивный рост узлов. Животных, у которых эти узлы начинают регрессировать в течение периода наблюдения, подвергают эвтаназии до того, как узловые уплотнения перестанут пальпироваться, и подвергают гистологическому исследованию.

За животными с прогрессивно растущими узлами наблюдают в течение от одной до двух недель. Среди животных, у кого не образовались узловые уплотнения, половину наблюдают в течение трех недель, а вторую половину – в течение 12 недель, прежде чем подвергнуть эвтаназии и провести гистологическое исследование.

В конце периода наблюдения всех животных подвергают эвтаназии. Проводят вскрытие каждого животного и исследуют на наличие макроскопических и микроскопических признаков пролиферации инокулированных клеток в месте инъекции и в других органах, таких как лимфатические узлы, лёгкие, мозг, селезёнка, почки и печень. Все опухолеподобные образования и место инъекции исследуют гистологически. Кроме того, так как некоторые клеточные линии могут давать метастазы без признаков местного роста опухоли, любые обнаруживаемые регионарные лимфатические узлы и легкие всех животных также исследуют гистологически.

Испытание считают недействительным, если менее чем у 9 из 10 животных контрольной группы обнаруживают прогрессивно растущие опухоли.

Для новой туморогенной клеточной линии устанавливают уровень туморогенности. С этой целью клетки в подходящем диапазоне концентраций (например, в количестве $10^5$ клеток, $10^6$ клеток, $10^7$ клеток) вводят различным группам из 10 животных. Количество животных с постепенно растущими узлами в каждой группе учитывают для расчёта $TPD_{50}$.