

УДК 62.39.41; 62.39.39

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ШТАММА «ОСПА-ВАКЦИНА» ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ В КЛЕТКАХ VERO НА МАКРОНОСИТЕЛЯХ BIONOC II® В СИСТЕМЕ BELLOSTAGE™-3000

Аманова Ж.Т.,*  Саметова Ж.Ж.,  Булатов Е.А. *ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», Национальный холдинг «QazBioPharm», Жамбылская область, Кордайский район, пгт Гвардейский, 25/1, 080409, Казахстан***Автор для корреспонденции: zh.amanova@biosafety.kz*

АБСТРАКТ

Вирус осповакцины (*Vaccinia virus*) сохраняет практическое значение для разработки и производства противооспепных вакцин, а также широко используется как модельный ортопоксвирус. Целью настоящего исследования была оценка возможности культивирования штамма «Оспа-вакцина» в клетках Vero на макроносителях BioNOC II® с использованием системы BelloStage™-3000, работающей по принципу Tide Motion.

Клетки Vero культивировали во флаконах BelloCell®-500A в среде DMEM с добавлением 2 % фетальной бычьей сыворотки. Через 120 ч культивирования, когда общее количество клеток достигало $1,99 \times 10^9$ на флакон, культуру инфицировали рабочим вирусным инокулятом при расчетной инфекционной нагрузке 0,01 ТЦД₅₀/клетку. Эксперимент проводили в рамках одного биореакторного запуска с использованием трех параллельных флаконов BelloCell®-500A, которые рассматривали как отдельные культуральные единицы внутри одного запуска.

Через 3 ч после посева доля клеток, прикрепившихся к макроносителям, составляла 89 %. За 120 ч общее количество клеток увеличилось с $7,45 \times 10^7$ до $1,99 \times 10^9$ клеток на флакон, что соответствовало 26,7-кратному приросту. После инфицирования титр вируса повышался от 4,60 log₁₀ ТЦД₅₀/мл в рабочем инокуляте до максимального значения 6,00 log₁₀ ТЦД₅₀/мл через 120 ч после инфицирования. Увеличение составило 1,40 log₁₀, или приблизительно 25,1 раза. На протяжении клеточной и постинфекционной фаз значения pH и концентрацию глюкозы в составе питательной среды поддерживали в установленных рабочих диапазонах.

Полученные результаты показывают, что выбранный режим культивирования клеток Vero на макроносителях BioNOC II® обеспечивал формирование клеточного субстрата, поддерживающего репликацию штамма «Оспа-вакцина» в системе BelloStage™-3000.

Поскольку исследование было выполнено в рамках одного биореакторного запуска и не включало параллельную сравнительную платформу, полученные данные характеризуют лабораторную осуществимость процесса в изученных условиях и не позволяют судить о технологическом превосходстве или масштабируемости системы.

Ключевые слова: вирус осповакцины (*Vaccinia virus*), клетки Vero, культивирование, биореактор, макроносители BioNOC II®, Tide Motion.

1. ВВЕДЕНИЕ

Вирус осповакцины (*Vaccinia virus*), относящийся к роду *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae*, занимает особое место в истории вакцинопрофилактики как основа первой живой вакцины, применение которой обеспечило глобальную ликвидацию натуральной оспы [1–3]. В настоящее время вирус осповакцины сохраняет значение для разработки и производства противооспепных вакцин, а также используется как экспериментальная модель при изучении ортопоксвирусов [2–4]. В связи с этим совершенствование подходов к его культивированию в клеточных системах остается актуальной технологической задачей.

Культивирование вирусов в адгезионно-зависимых клеточных культурах традиционно проводят в роллерных флаконах, многоярусных системах и других поверхностно-зависимых форматах. При увеличении масштаба такие процессы требуют расширения доступной площади роста клеток, увеличения числа культуральных единиц и дополнительных операций по их обслуживанию [5]. Поэтому для адгезионных клеточных линий представляет интерес применение систем, позволяющих сосредоточить большую площадь клеточного роста в ограниченном рабочем объеме.

Одним из таких подходов являются биореакторные системы с макроносителями, работающие по принципу Tide Motion. Согласно технической документации производителя, в системе BelloStage™-3000 периодическое перемещение культуральных флаконов обеспечивает чередование контакта клеток с жидкой и газовой фазами. Такой режим предназначен для поддержания переноса питательных веществ и кислорода при относительно низком гидродинамическом воздействии на адгезированные клетки [5,6]. В системе используются одноразовые флаконы BelloCell®-500A, содержащие макроносители BioNOC II® с развитой поверхностью для прикрепления и роста клеток [5,6].

Системы, основанные на сходном принципе, ранее применялись для различных клеточных и вирусных процессов. Lu и соавт. исследовали BelloCell® при культивировании клеток и получении рекомбинантного белка [7]. Платформы CelCradle™, использующие аналогичный Tide Motion подход, применялись для высокоплотного культивирования клеток Vero и получения SARS-CoV-2 [8], вируса гепатита С [9], ряда ветеринарных вирусов [10,11] и вируса денге [12]. Однако прямое количественное сопоставление этих работ ограничено различиями в клеточных линиях, составе сред, плотности посева, режи-

мах культивирования, характеристиках вирусов и способах учета выхода продукта.

Клеточная линия Vero широко применяется как субстрат для репродукции различных вирусов благодаря высокой восприимчивости к вирусной инфекции и хорошо отработанным условиям культивирования [8–13]. Вместе с тем сведения о культивировании штамма «Оспа-вакцина» вируса осповакцины в культуре клеток Vero на макроносителях BioNOC II® в биореакторной системе BelloStage™-3000 (Esco Micro Pte. Ltd., Singapore) в доступной литературе ограничены.

Целью настоящей работы была оценка возможности культивирования штамма «Оспа-вакцина» вируса осповакцины в клетках Vero на макроносителях BioNOC II® в системе BelloStage™-3000, а также характеристика динамики общего количества клеток и инфекционного титра вируса при выбранном режиме процесса.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Вирус

В работе использовали штамм «Оспа-вакцина» вируса осповакцины, полученный из коллекции микроорганизмов ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» (НИИПББ), Республика Казахстан. Штамм зарегистрирован в коллекции под № 115. До начала исследования его поддерживали последовательным пассированием в культуре клеток почки ягненка. В эксперименте использовали материал 5-го пассажа, адаптированный к культуре клеток Vero. Титр исходного вирусного материала до приготовления рабочего инокулята составлял $4,75 \log_{10}$ ТЦД₅₀/мл. Идентичность штамма подтверждали методом ПЦР.

В качестве клеточного субстрата использовали перемещаемую линию Vero, полученную из банка клеточных культур Лаборатории клеточной биотехнологии ТОО НИИПББ, Республика Казахстан. Клеточная линия зарегистрирована во внутреннем банке института под номером CB0/CB884. В экспериментах использовали клетки 138-го пассажа.

Клетки Vero поддерживали в среде DMEM с добавлением 2 % фетальной бычьей сыворотки и глутамина при температуре $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ в атмосфере с 5 % CO₂. Перед использованием клеточную культуру исследовали на отсутствие микоплазм.

2.2. Культивирование клеток Vero и инфицирование вирусом

Клетки Vero культивировали на макроносителях BioNOC II® во флаконах BelloCell®-500A, установленных в системе BelloStage™-3000. В каждом флаконе находилось 5,5 г макроносителей BioNOC II®. Согласно технической документации производителя, рабочий объем BelloCell®-500A составляет 500 мл, а номинальная площадь поверхности макроносителей превышает 15 600 см² [5,6]. Для культивирования использовали среду DMEM с добавлением 2 % фетальной бычьей сыворотки и глутамина.

Перед посевом макроносители смачивали 100 мл питательной среды, которую оставляли во флаконе. Затем внесли 20 мл суспензии Vero, содержащей в общей сложно-

сти $7,45 \times 10^7$ клеток. Концентрация клеток в вносимой суспензии составляла $3,73 \times 10^6$ клеток/мл. Таким образом, значение $7,45 \times 10^7$ характеризовало общее исходное количество клеток на один флакон.

В течение первого часа после посева флаконы осторожно перемешивали каждые 15 мин. В последующие 4 ч перемешивание проводили каждые 30 мин, обеспечивая равномерный контакт клеточной суспензии с макроносителями.

После завершения стадии прикрепления в каждый флакон добавляли 380 мл свежей питательной среды. С учетом 100 мл среды, использованной для предварительного смачивания, и 20 мл клеточной суспензии конечный рабочий объем составлял 500 мл. Герметичные крышки заменяли крышками с мембранным фильтром диаметром пор 0,22 мкм.

Дальнейшее культивирование проводили при скорости подъема 1,0 мм/с и времени удержания в верхнем положении (Т_Н) 10 с. Скорость опускания составляла 1,0 мм/с, а время удержания в нижнем положении (В_Н) — 10 с. В течение клеточной фазы ежедневно контролировали общее количество клеток, pH культуральной среды и концентрацию глюкозы.

Через 120 ч культивирования, когда общее количество клеток Vero достигало $1,99 \times 10^9$ на флакон, 500 мл кондиционированной культуральной среды полностью удаляли. Макроносители промывали 500 мл питательной среды, после чего промывочную жидкость также полностью удаляли. Затем в каждый флакон вносили 500 мл рабочего вирусного инокулята с инфекционным титром $4,60 \log_{10}$ ТЦД₅₀/мл. При указанном количестве клеток расчетная инфекционная нагрузка составляла 0,01 ТЦД₅₀/клетку. Ее рассчитывали как отношение общего количества инфекционных единиц ТЦД₅₀ во внесенном объеме инокулята к общему количеству клеток в момент инфицирования.

После внесения вируса флаконы инкубировали в системе BelloStage™-3000 в течение 1 ч при температуре $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$. На стадии адсорбции скорость подъема составляла 2,0 мм/с, время удержания в верхнем положении (Т_Н) — 20 с, скорость опускания — 2,0 мм/с, а время удержания в нижнем положении (В_Н) — 0 с. После завершения адсорбции систему переводили в режим постинфекционного культивирования со скоростью подъема и опускания 1,0 мм/с и временем удержания в верхнем и нижнем положениях по 10 с.

После инфицирования пробы для оценки динамики вирусного титра отбирали в сроки, представленные на рисунке 4, в течение 0–144 ч после инфицирования. pH культуральной среды и концентрацию глюкозы определяли ежедневно. В постинфекционную фазу pH поддерживали в диапазоне 7,2–7,6, а концентрацию глюкозы — на уровне не ниже 1,0 г/л.

Через 72 и 120 ч после инфицирования из каждого флакона отбирали 70 % вирусоносительной культуральной жидкости, что соответствовало 350 мл из рабочего объема 500 мл. Отобранный объем заменяли равным количеством свежей поддерживающей среды. На 144 ч после инфицирования проводили конечный сбор. Для высвобождения вируса, ассоциированного с клетками и макроносителями,

содержимое системы подвергали циклу замораживания–размораживания, после чего собирали весь полученный материал. Поэтому промежуточные титры характеризовали преимущественно инфекционность вируса в культуральной жидкости, тогда как конечный образец включал также высвобожденную клеточно-ассоциированную фракцию. В настоящей работе вирусный титр выражали в ТЦД₅₀/мл. Кумулятивный выход вируса с учетом последовательных частичных сборов не рассчитывали.

2.3. Определение инфекционного титра вируса

Инфекционную активность вирусных образцов определяли методом конечных разведений в культуре клеток Vero, как описано ранее [14]. Готовили десятикратные последовательные разведения вируса и вносили их в 96-луночные планшеты с клетками Vero. Цитопатический эффект учитывали через 7 сут инкубации. Инфекционный титр рассчитывали методом Рида и Менча и выражали в log₁₀ ТЦД₅₀/мл [15].

2.4. Определение общего количества клеток на макроносителях BioNOC II®

В каждую временную точку из каждого флакона BelloCell®-500A асептически отбирали шесть макроносителей BioNOC II®. Носители трижды промывали 1,0 мл раствора PBS/EDTA (0,02 %), после чего клетки высвобождали инкубацией в 1,0 мл раствора трипсин–EDTA (0,05 %/0,02 %) при 37 °C в течение 10 мин. Полученную клеточную суспензию центрифугировали при 180 × g в течение 5 мин, а осадок ресуспендировали в OptiPRO™ SFM. Количество клеток и их жизнеспособность оценивали методом исключения трипанового синего с использованием гемоцитометра или автоматического счетчика TC20 (Bio-Rad Laboratories Pte. Ltd., Singapore). Для расчета общего количества клеток на флакон среднее число клеток, определенное для одного проанализированного носителя, пересчитывали на общее количество макроносителей во флаконе. В тексте статьи термин «общее количество клеток» используется для показателя, выраженного в клетках на флакон, тогда как термин «концентрация клеток» относится только к клеточным суспензиям и выражается в клетках/мл.

2.5. Мониторинг концентрации глюкозы

Концентрацию глюкозы в культуральной среде определяли с использованием системы GlucCell™ (Esco Micro Pte. Ltd., Singapore). В клеточной фазе ее поддерживали на уровне не ниже 1,0 г/л. При снижении концентрации глюкозы ниже 1,0 г/л в период репликации вируса в среду добавляли стерильный раствор D-глюкозы до конечной концентрации 3,0 г/л.

2.6. Мониторинг значения pH

Значение pH культуральной среды измеряли калиброванным pH-метром edge® HI 2030 (Hanna Instruments, Inc., Woonsocket, RI, USA) в соответствии с ранее описанной методикой [12]. При отклонении pH от установленного диапазона его корректировали изменением концентрации CO₂ в инкубационной камере и добавлением стерильного 7,5 % раствора NaHCO₃.

2.7. Экспериментальный дизайн и представление данных

Обработку данных выполняли в GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Исследование включало один биореакторный запуск с тремя отдельными флаконами BelloCell®-500A, которые культивировали параллельно в одинаковых условиях. Каждый флакон рассматривали как отдельную культуральную экспериментальную единицу внутри одного запуска (n = 3). Повторные измерения во времени проводили для тех же культуральных единиц. Поэтому значение n = 3 отражает число параллельных флаконов, а не число независимых биореакторных запусков или независимых биологических экспериментов. Результаты представлены описательно как среднее значение ± SD для трех параллельных флаконов. На графиках, где это было возможно, дополнительно показаны индивидуальные значения. Инференциальные межвременные сравнения с расчетом p-значений не проводили, поскольку независимые биореакторные запуски отсутствовали.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Формирование и пролиферация клеток Vero на макроносителях BioNOC II®

После посева клетки Vero прикреплялись к поверхности макроносителей BioNOC II®. Через 3 ч доля прикрепившихся клеток составляла 89 %. При микроскопическом исследовании клетки распределялись по волнистой структуре носителей (рисунок 1А, Б).

В течение первых суток после посева изменение общего количества клеток было относительно небольшим, после чего показатель последовательно возрастал (рисунок 2). Исходное количество клеток составляло $7,45 \times 10^7$ на флакон. Через 120 ч оно достигало $1,99 \times 10^9$ клеток на флакон, что соответствовало увеличению в 26,7 раза по сравнению с исходным уровнем.

На протяжении клеточной фазы концентрацию глюкозы поддерживали на уровне не ниже 1,0 г/л, а pH — в диапазоне 7,0–7,4.

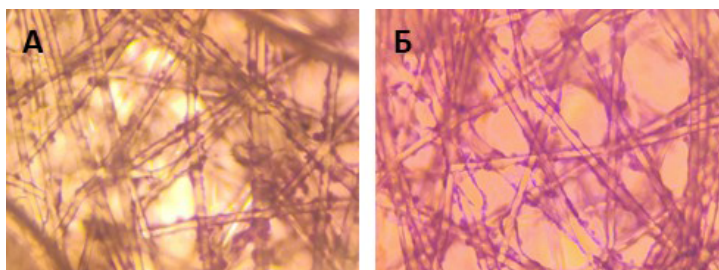


Рисунок 1. Микроскопическая оценка адгезии и колонизации поверхности макроносителей клетками Vero на ранних этапах культивирования. (А) Адгезия клеток Vero к макроносителям через 1 ч после инокуляции. (Б) Адгезия клеток Vero к макроносителям через 3 ч после инокуляции.

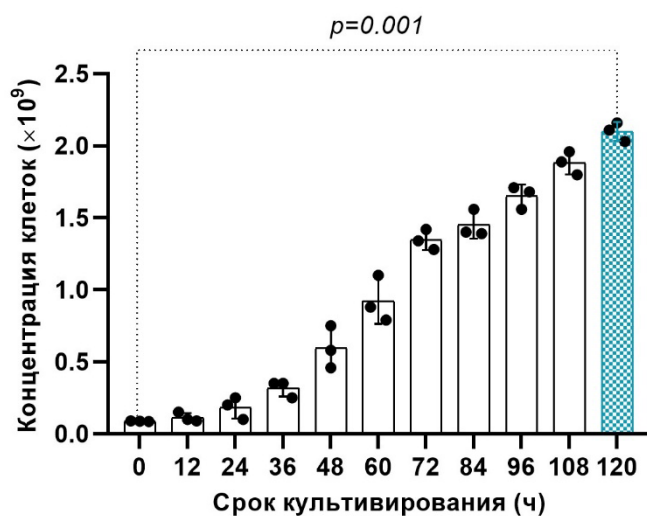


Рисунок 2. Динамика общего количества клеток Vero на макроносителях BioNOC II® во флаконах BelloCell®-500A в системе BelloStage™-3000 в течение 120 ч клеточного культивирования.

Столбцы показывают среднее значение $\pm$ SD. Отдельные точки соответствуют трем параллельным флаконам одного биореакторного запуска ($n = 3$). Инференциальные р-значения не приводятся, поскольку независимые биореакторные запуски не выполнялись.

3.2. Репликация вируса осповакцины в клетках Vero на макроносителях BioNOC II®

Инфицирование проводили после 120 ч культивирования клеток, когда их общее количество достигало $1,99 \times 10^9$ на флакон. Расчетная инфекционная нагрузка составляла 0,01 ТЦД₅₀/клетку. Морфология клеток Vero на макроносителях BioNOC II® через 48 и 144 ч после инфицирования представлена на рисунке 3.

После инфицирования общее количество клеток Vero постепенно снижалось с $1,99 \times 10^9$ до приблизительно $1,43 \times 10^9$ клеток на флакон к концу периода наблюдения. Одновременно отмечалось накопление инфекционного вируса в культуральной жидкости. Титр рабочего инокулята составлял 4,60 log₁₀ ТЦД₅₀/мл. Через 72 ч после инфицирования титр культуральной жидкости достигал 4,75 log₁₀ ТЦД₅₀/мл. Максимальное значение 6,00 log₁₀ ТЦД₅₀/мл регистрировали через 120 ч после инфицирования. На 144 ч после инфицирования титр конечного материала, полученного после замораживания–размораживания, составлял 5,41 log₁₀ ТЦД₅₀/мл. Полная динамика показателей представлена на рисунке 4.

(*) — момент инфицирования клеток Vero вирусом

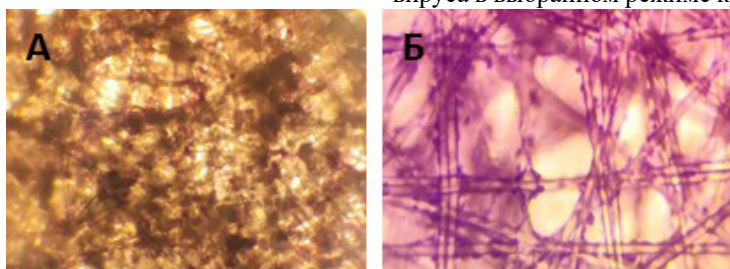


Рисунок 3. Морфология клеток Vero на макроносителях BioNOC II® после инфицирования штаммом «Оспа-вакцина». (А) 48 ч после инфицирования (2 сут). (Б) 144 ч после инфицирования (6 сут).

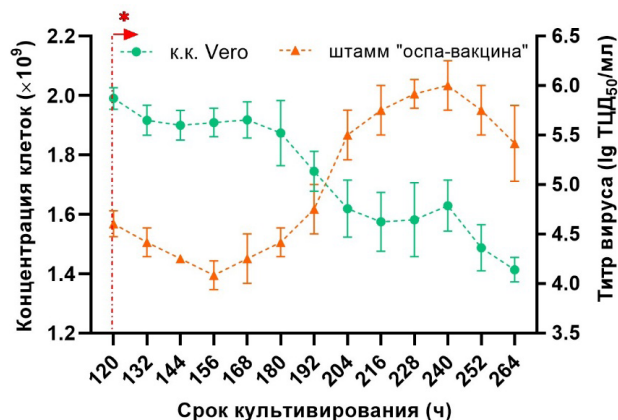


Рисунок 4. Динамика общего количества клеток Vero и инфекционного титра штамма «Оспа-вакцина». По оси X показано общее время культивирования. Точка 120 ч соответствует моменту инфицирования, то есть 0 ч после инфицирования. Точка 240 ч общего времени соответствует 120 ч после инфицирования. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SD для трех параллельных флаконов одного биореакторного запуска ($n = 3$).

осповакцины. Промежуточные значения титра относятся к культуральной жидкости. Конечный образец на 144 ч после инфицирования получали после замораживания–размораживания всей системы.

Увеличение инфекционного титра от 4,60 до 6,00 log₁₀ ТЦД₅₀/мл составило 1,40 log₁₀, что соответствует приблизительно 25,1-кратному повышению концентрации инфекционного вируса. Этот показатель характеризует изменение титра на единицу объема и не отражает кумулятивный выход вируса на флакон, единицу площади макроносителей или клетку.

Максимальный титр был зарегистрирован через 120 ч после инфицирования. К 144 ч после инфицирования его значение снижалось до 5,41 log₁₀ ТЦД₅₀/мл.

Снижение вирусного титра после достижения максимума происходило на фоне уменьшения общего количества клеток. Однако имеющиеся данные не позволяют установить причинную связь между этими изменениями или определить клеточный механизм снижения вирусной продуктивности.

На протяжении постинфекционной фазы концентрацию глюкозы поддерживали на уровне не ниже 1,0 г/л, а pH — в диапазоне 7,2–7,6.

В совокупности полученные данные характеризуют динамику роста клеток Vero и накопления инфекционного вируса в выбранном режиме культивирования на BioNOC

II® в системе BelloStage™-3000.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе охарактеризовано культивирование клеток Vero на макроносителях BioNOC II® с последующей репликацией штамма «Оспа-вакцина» в системе BelloStage™-3000. В выбранных условиях через 3 ч после посева доля прикрепившихся клеток составляла 89 %, а к 120 ч общее количество клеток увеличивалось до $1,99 \times 10^9$ на флакон. После инфицирования максимальный титр вируса достигал $6,00 \log_{10}$ ТЦД₅₀/мл через 120 ч. Эти результаты показывают, что сформированный на макроносителях клеточный субстрат поддерживал репликацию вируса в течение исследованного постинфекционного периода.

Достигнутое в настоящей работе общее количество клеток $1,99 \times 10^9$ на флакон сопоставимо по порядку величины с результатами, опубликованными для клеток Vero в CelCradle™ и родственных системах. Offersgaard и соавт. сообщали о $2,2\text{--}2,5 \times 10^9$ клеток на культуральный модуль [8], Rhazi и соавт. — о значении до $3,04 \times 10^9$ [10], а Guo и соавт. — до $2,46 \times 10^9$ клеток [12]. Эти значения дают ориентир для интерпретации полученного клеточного выхода, однако не позволяют сделать прямой вывод о сравнительной эффективности платформ, поскольку исследования различались по составу сред, плотности посева, режимам культивирования и методам учета клеток.

После инфицирования титр вируса возрастал от $4,60 \log_{10}$ ТЦД₅₀/мл в рабочем инокуляте до $6,00 \log_{10}$ ТЦД₅₀/мл через 120 ч после инфицирования. Разница составила $1,40 \log_{10}$, что соответствует приблизительно 25,1-кратному увеличению концентрации инфекционного вируса. Такой расчет отражает изменение титра в единице объема. Он не эквивалентен общему выходу вируса из флакона, поскольку в ходе процесса проводили частичные сборы на 72 и 120 ч с последующей заменой среды, а клеточно-ассоциированный вирус дополнительно высвобождали только при конечном сборе на 144 ч.

После достижения максимума титр снижался и к 144 ч после инфицирования составлял $5,41 \log_{10}$ ТЦД₅₀/мл. Одновременно уменьшалось общее количество клеток. Вместе с тем в ходе постинфекционной фазы изменялись не только состояние клеточной культуры, но и объем вирусосодержащей жидкости вследствие частичных сборов и замены среды. Поэтому по имеющимся данным нельзя однозначно связывать снижение титра с истощением продукционного потенциала клеток. Для такой интерпретации необходимы параллельные данные о жизнеспособности клеток, внутриклеточной и внеклеточной вирусных фракциях и полном балансе вируса на каждой временной точке.

Ранее платформы Tide Motion и packed-bed системы применялись для получения различных вирусов, включая SARS-CoV-2, вирус гепатита С, вирус денге и ряд вирусов ветеринарного назначения [8–12, 17–20]. В доступных публикациях сведения именно о сочетании штамма «Оспа-вакцина», клеток Vero, макроносителей BioNOC II® и системы BelloStage™-3000 ограничены. Поэтому полученные результаты дополняют данные о возможностях применения макроносителей и Tide Motion подхода

для культивирования ортопоксвирусов, не предполагая прямого доказательства превосходства данной платформы над другими способами культивирования.

При интерпретации результатов необходимо учитывать экспериментальный дизайн. Исследование было выполнено в рамках одного биореакторного запуска с тремя параллельными флаконами BelloCell® 500A. Такой дизайн позволяет оценить вариабельность между культуральными единицами одного запуска, но не характеризует межсерийную воспроизводимость процесса. Для ее оценки необходимы независимые биореакторные запуски, выполненные в разные серии экспериментов.

К другим ограничениям относятся отсутствие параллельной контрольной платформы, неполный временной ряд данных о жизнеспособности клеток и отсутствие раздельного количественного учета внутриклеточной и внеклеточной вирусных фракций. В настоящей работе также не рассчитывали кумулятивный выход вируса, выход на клетку или единицу площади макроносителей и не оценивали генетическую стабильность штамма, чистоту, стабильность вирусного материала и параметры масштабирования. Поэтому следующий этап исследования должен включать независимые биореакторные запуски, прямое сравнение с валидированным способом культивирования и полный материальный баланс вируса с заранее определенными показателями клеточной и вирусной продуктивности.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В лабораторных условиях показана возможность культивирования штамма «Оспа-вакцина» вируса осповакцины в клетках Vero на макроносителях BioNOC II® с использованием системы BelloStage™-3000. При выбранном режиме общее количество клеток увеличивалось с $7,45 \times 10^7$ до $1,99 \times 10^9$ клеток на флакон за 120 ч культивирования.

После инфицирования максимальный титр вируса составлял $6,00 \log_{10}$ ТЦД₅₀/мл и регистрировался через 120 ч после инфицирования. По сравнению с титром рабочего инокулята $4,60 \log_{10}$ ТЦД₅₀/мл увеличение составило $1,40 \log_{10}$, или приблизительно 25,1 раза. Полученные данные подтверждают репликацию штамма «Оспа-вакцина» в исследованной системе при выбранных условиях.

Результаты настоящей работы следует рассматривать как лабораторную характеристику процесса, полученную в одном биореакторном запуске без параллельной сравнительной платформы. Для оценки воспроизводимости, сравнительной эффективности и возможности дальнейшего масштабирования необходимы независимые биореакторные эксперименты, количественная оценка жизнеспособности клеток и полный учет вирусного выхода.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам Лаборатории клеточной биотехнологии ТОО НИИПББ за предоставление клеточной линии Vero и сотрудникам Лаборатории коллекции микроорганизмов ТОО НИИПББ за предоставление штамма «Оспа-вакцина» вируса осповакцины, использованного в настоящем исследовании.

ВКЛАД АВТОРОВ

Вклад авторов: Z.A.: разработка концепции, обработка данных, формальный анализ, проведение исследования, методология, визуализация, написание первоначального варианта статьи. Z.S.: разработка концепции, методология, визуализация, проведение исследования, формальный анализ. E.B.: научное руководство, привлечение финансирования, проверка результатов. Все авторы ознакомились с окончательной версией рукописи и одобрили её.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при поддержке Министерства здравоохранения Республики Казахстан в рамках научно-технической программы НТП BR28712529 «Разработка средств специфической профилактики и диагностики оспы обезьян».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ahmed S.F., Sohail M.S., Quadeer A.A., McKay M.R. Vaccinia-Virus-Based Vaccines Are Expected to Elicit Highly Cross-Reactive Immunity to the 2022 Monkeypox Virus // *Viruses*. – 2022. – № 14(9). – Article 1960. <https://doi.org/10.3390/v14091960>
2. Berry M.T., Khan S.R., Schlub T.E., Notaras A., Kunasekaran M., Grulich A.E., MacIntyre C.R., Davenport M.P., Khoury D.S. Predicting vaccine effectiveness for mpox // *Nature Communications*. – 2024. – № 15(1). – Article 3856. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-48180-w>
3. Shafaati M., Forghani S., Shahsavand Davoudi A., Samiee R., Mohammadi K., Akbarpour S., Seifi A., Salehi M., Zare M. Current advances and challenges in mpox vaccine development: a global landscape // *Therapeutic Advances in Vaccines and Immunotherapy*. – 2025. – № 13. – Article 25151355251314339. <https://doi.org/10.1177/25151355251314339>
4. Williamson A.L. Approaches to Next-Generation Capripoxvirus and Monkeypox Virus Vaccines // *Viruses*. – 2025. – № 17(2). – Article 186. <https://doi.org/10.3390/v17020186>
5. Esco Aster Pte. Ltd. BelloStage™-3000 and BelloCell® Cell Culture Systems: Technical Brochure. – Singapore: Esco Aster, 2024.
6. Vaccixcell Co., Ltd. BelloCell® and CelCradle™ Technical Documentation. – Taiwan: Vaccixcell Co., Ltd., 2025.
7. Lu J.T., Chung Y.C., Chan Z.R., et al. A Novel Oscillating Bioreactor BelloCell: Implications for Insect Cell Culture and Recombinant Protein Production // *Biotechnology Letters*. – 2005. – № 27. – P. 1059–1065. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-8450-3>
8. Offersgaard A., Duarte Hernandez C.R., Pihl A.F., Costa R., Venkatesan N.P., Lin X., Van Pham L., Feng S., Fahne U., Scheel T.K.H., Ramirez S., Reichl U., Bukh J., Genzel Y., Gottwein J.M. SARS-CoV-2 Production in a Scalable High Cell Density Bioreactor // *Vaccines*. – 2021. – № 9(7). – Article 706. <https://doi.org/10.3390/vaccines9070706>
9. Offersgaard A., Duarte Hernandez C.R., Pihl A.F., Venkatesan N.P., Krarup H., Lin X., Reichl U., Bukh J., Genzel Y., Gottwein J.M. High-Titer Hepatitis C Virus Production in a Scalable Single-Use High Cell Density Bioreactor // *Vaccines*. – 2022. – № 10(2). – Article 249. <https://doi.org/10.3390/vaccines10020249>
10. Rhazi H., Safini N., Mikou K., Alhyane M., Tadlaoui K.O., Lin X., Venkatesan N.P., Elharrak M. Production of small ruminant morbillivirus, Rift Valley fever virus and lumpy skin disease virus in CelCradle™-500A bioreactors // *BMC Veterinary Research*. – 2021. – № 17(1). – Article 93. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02801-4>
11. Choi H.Y., Choi J.C., Kang Y.L., Ahn S.H., Lee S.W., Park S.Y., Song C.S., Choi I.S., Lee J.B. Production of a chimeric porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-2 vaccine using a lab-scale packed-bed bioreactor CelCradle // *BMC Veterinary Research*. – 2023. – № 19(1). – Article 105. <https://doi.org/10.1186/s12917-023-03659-4>
12. Guo H., Ding X., Hua D., Liu M., Yang M., Gong Y., Ye N., Chen X., He J., Zhang Y., et al. Enhancing Dengue Virus Production and Immunogenicity with CelCradle™ Bioreactor: A Comparative Study with Traditional Cell Culture Methods // *Vaccines*. – 2024. – № 12(6). – Article 563. <https://doi.org/10.3390/vaccines12060563>
13. Kiesslich S., Kamen A.A. Vero cell upstream bioprocess development for the production of viral vectors and vaccines // *Biotechnology Advances*. – 2020. – № 44. – Article 107608. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107608>
14. Amanova Z., Sametova Z., Chervyakova O., Turyskeldy S., Kurmasheva A., Abitayev R., Ussembay A., Kondibayeva Z., Toktyrova D., Mazbayeva D., Bulatov Y. BelloStage™-3000 Bioreactor Versus Conventional Cultivation of Recombinant Capripoxvirus Expressing Brucella Antigens in Vero Cells: A Step Towards the Development of a New Human Brucellosis Vaccine // *Cells*. – 2025. – № 14(20). – Article 1631. <https://doi.org/10.3390/cells14201631>
15. Amanova Z., Sametova Z., Turyskeldy S., Kurmasheva A., Abitayev R., Ussembay A., Kondibaeva Z., Toktyrova D., Mazbayeva D., Nurabayev S., Kerimbayev A., Bulatov Y. Efficient Serum-Free Rabies Virus Propagation Using BSR and Vero Cell Lines: A Comparative Evaluation of BioNOC II® Macrocarriers in the BelloStage™-3000 Bioreactor Versus Conventional Microcarriers // *Biology*. – 2025. – № 14(10). – Article 1455. <https://doi.org/10.3390/biology14101455>
16. Mazhed Z.K., Vasilenko V.E., Siniugina A.A., Kaa K.V., Motov A.S., Pokidova K.O., Ivin Y.Y., Piniaeva A.N., Khapchaev Y.K., Chernov K.A., Ishmukhametov A.A. Intensification of Vero cell adherence to microcarrier particles during cultivation in a wave bioreactor // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2025. – № 13. – Article 1542060. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2025.1542060>
17. Fang Z., Lyu J., Li J., Li C., Zhang Y., Guo Y., Wang Y., Zhang Y., Chen K. Application of bioreactor technology for cell culture-based viral vaccine production: Present status and future prospects // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2022. – № 10. – Article 921755. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.921755>
18. Ton C., Stabile V., Carey E., Maraikar A., Whitmer

T., Marrone S., Afanador N.L., Zabrodin I., Manomohan G., Whiteman M., Hofmann C. Development and scale-up of rVSV-SARS-CoV-2 vaccine process using single use bioreactor // *Biotechnology Reports*. – 2023. – № 37. – Article e00782. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2023.e00782>

19. Tapia F., Jordan I., Genzel Y., Reichl U. Efficient and stable production of Modified Vaccinia Ankara virus in two-stage semi-continuous and in continuous stirred tank

cultivation systems // *PLoS ONE*. – 2017. – № 12(8). – Article e0182553. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182553>

20. Gränicher G., Tapia F., Behrendt I., Jordan I., Genzel Y., Reichl U. Production of Modified Vaccinia Ankara Virus by Intensified Cell Cultures: A Comparison of Platform Technologies for Viral Vector Production // *Biotechnology Journal*. – 2021. – № 16(1). – Article e2000024. <https://doi.org/10.1002/biot.202000024>

LABORATORY-SCALE CULTIVATION OF THE OSPA-VAKTSINA VACCINIA VIRUS STRAIN IN VERO CELLS ON BIONOC II® MACROCARRIERS USING THE BELLOSTAGE™-3000 SYSTEM**Zh.T. Amanova* , Zh. Zh. Sametova, Ye. A. Bulatov***Research Institute for Biological Safety Problems LLP, National Holding “QazBioPharm”, Gvardeyskiy, Korday District, Zhambyl Region, 25/1, 080409, Kazakhstan***Corresponding author: zh.amanova@biosafety.kz***ABSTRACT**

Vaccinia virus remains relevant as a viral substrate for smallpox vaccines and as an orthopoxvirus model. This study evaluated, at laboratory scale, the feasibility of cultivating the “Ospa-vaktsina” vaccinia virus strain in Vero cells grown on BioNOC II® macrocarriers using the BelloStage™-3000 Tide Motion system. The study was not designed as a comparative assessment of BelloStage™-3000 performance against another cultivation platform.

Vero cells were cultivated in BelloCell®-500A vessels in Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 2% fetal bovine serum. After 120 h of cell cultivation, when the total cell number reached 1.99×10^9 cells per vessel, cultures were infected with a working virus inoculum at a calculated infectious input of 0.01 TCID₅₀ per cell. The infectious input was calculated as the total TCID₅₀ delivered in the 500-mL inoculum divided by the total cell number at infection. One bioreactor run included three parallel BelloCell®-500A vessels ($n = 3$ culture units within a single run).

Cell attachment to the macrocarriers was 89% at 3 h after seeding. The total cell number increased from 7.45×10^7 cells at seeding to 1.99×10^9 cells per vessel at 120 h, corresponding to a 26.7-fold increase. Following infection, the virus titer increased from 4.60 log₁₀ TCID₅₀/mL in the working inoculum to a maximum of 6.00 log₁₀ TCID₅₀/mL at 120 h post-infection, a 1.40-log₁₀ (approximately 25.1-fold) increase. Culture medium parameters were maintained within predefined operating ranges for the cell-growth and post-infection phases.

Under the conditions tested, the Vero/BioNOC II® culture supported replication of the “Ospa-vaktsina” strain in BelloStage™-3000. Because the study comprised a single bioreactor run and did not include a parallel comparator platform, the findings demonstrate laboratory-scale feasibility but do not establish technological superiority, process scalability, or suitability for vaccine manufacturing.

Keywords: Vaccinia virus, Vero cells, cultivation, bioreactor, BioNOC II® macrocarriers, Tide Motion.

BELLOSTAGE™-3000 ЖҮЙЕСІНДЕ BIONOC II® МАКРОТАСЫМАЛДАҒЫШТАРЫНДА VERO ЖАСУШАЛАРЫНДА ОСПОВАКЦИНА ВИРУСЫНЫҢ «ОСПА-ВАКЦИНА» ШТАМЫН ӨСІРУ**Аманова Ж.Т. *, Саметова Ж.Ж. , Булатов Е.А.***«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты» ЖШС, «QazBioPharm» ұлттық холдингі, Жамбыл облысы, Қордай ауданы, Гвардейский кенті, 25/1, 080409, Қазақстан***Хат-хабарларға жауапты автор: zh.amanova@biosafety.kz***ТҮЙІН**

Осповакцина вирусы (Vaccinia virus) шешекке қарсы вакциналарды өндірудің негізі ретінде тәжірибелік маңыздылығын сақтаған, бұл оның өсіру әдістерін жетілдіру қажеттілігін көрсетеді. Зерттеу мақсаты – Tide Motion принципі бойынша жұмыс атқаратын BelloStage™-3000 биореактор жүйесінде BioNOC II® макротасымалдағыштарда Vero жасуша өсіндісінде осповакцина вирусының «Оспа-вакцина» штамын өсіру мүмкіндігін бағалау.

Vero жасушасын өсіру BelloCell®-500A құтыларында 2 % ірі қара малдың ұрықтық қан сарысуы қосылған DMEM қоректік ортасында жүргізілді. Бір құтыдағы жасушалардың жалпы саны 120 сағатта $1,99 \times 10^9$ дейін өскенде, жасуша өсіндісін осповакцина вирусымен 0,01 ТЦД₅₀/жасуша дозада зарарланды. Зерттеуді бір биореактор жүйесінде жеке культуралды бірліктер ретінде үш BelloCell®-500A құтыларын қолдану арқылы жүргізілді.

Егуден кейін 3 сағ өткен соң макротасымалдағыштарға жасушалардың жабысу деңгейі 89 %-ға жеткені анықталды. Бір құтыдағы жалпы жасуша саны 120 сағаттық өсіру барысында $7,45 \times 10^7$ -нан $1,99 \times 10^9$ -ға дейін өсті, бұл 26,7 есе артуға сәйкес келді. Жұқтырғаннан кейін вирус титрі жұмыс инокулятындағы 4,60 log₁₀ ТЦД₅₀/мл-ден 120 сағ өткенде 6,00 log₁₀ ТЦД₅₀/мл ең жоғары мәніне дейін артты. Айырмашылық 1,40 log₁₀ немесе шамамен 25,1 есе болды. Өсірудің барлық кезеңінде қоректік ортадағы глюкоза концентрациясы мен pH көрсеткіші белгіленген жұмыс диапазонында сақталды.

Алынған нәтижелер BioNOC II® макротасымалдағыштарда Vero жасушаларын өсіру үшін таңдалған әдіс BelloStage™-3000 жүйесінде «Оспа-вакцина» штамның көбеюін сүйемелдейтін жасуша субстратының түзілуін қамтамасыз етті. Зерттеу бір биореакторлық цикл аясында жүргізіліп, параллель салыстырмалы платформаны қамтымағандықтан, алынған деректер зерттелген жағдайлардағы процестің зертханалық жүзеге асу мүмкіндігін сипаттайды және жүйенің технологиялық артықшылығы немесе масштабталу қабілеті туралы қорытынды жасауға мүмкіндік бермейді.

Түйінді сөздер: осповакцина, Vero жасушалары, өсіру, биореактор, BioNOC II® макротасымалдағыштары, Tide Motion.