

МАСШТАБИРОВАНИЕ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК VERO ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОПРЕПАРАТОВ

Б.А. Сейдахметова , Г.А. Жаппарова , Л.Г. Мараховская ,
 А.А. Терейбай , А.К. Наханов *

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,
 пгт. Гвардейский, Казахстан
 aziz_nk@mail.ru

Аннотация: производство вакцины считается наиболее эффективным способом предотвращения распространения инфекционных заболеваний и борьбы с ними. В настоящее время перевиваемая клеточная линия *Vero* широко используется для производства вакцин. Целью настоящего исследования состояла в том, чтобы изучить оптимальные параметры выращивания культуры клеток *Vero* на клеточных фабриках для осуществления крупномасштабного производства вакцин. Для процессов масштабирования необходимо было определить посевную концентрацию клеток, сроки образования клеточного монослоя, урожай клеток и параметры диспергирования клеток. Результаты исследований показали, что при посевной концентрации клеток составляющей 2.0×10^5 кл/мл монослой образуется на 1-2 сут и является наиболее оптимальной для культивирования большинства вирусов. Многослойные системы для культивирования клеток в промышленных масштабах представляют собой универсальное решение для производства. Удобный и выгодный формат клеточных фабрик позволяет экономить пространство, время и трудозатраты и снижает риск контаминации. В данной работе проведены масштабирование культуры клеток *Vero* на клеточных фабриках, потому что такой метод выращивания клеток является необходимым для создания экономически эффективных рабочих процессов в больших объемах. В проведенном исследовании показано, что посевная концентрация, индекс пролиферации клеток и соотношение диспергирующей смеси для снятия клеток сопоставимы с рутинно используемыми Т-флаконами.

Ключевые слова: культура клеток *Vero*, монослой, клеточная фабрика, вакцина, индекс пролиферации.

№9
 2022

Введение

Исследования в области наук о жизни часто используют культуру клеток млекопитающих в качестве инструмента для открытия лекарств, включая производство вирусных вакцин [1,2].

Производство вакцины считается наиболее эффективным способом предотвращения распространения инфекционных заболеваний и борьбы с ними. Одним из основных источников инфекционных заболеваний являются вирусы. Исследования в области открытия новых вакцин или разработки и улучшения существующих вакцин против вирусных заболеваний в настоящее время являются приоритетными во всем мире. В этой области производство вирусных векторов и вакцин на основе клеточных культур привлекает все большее внимание из-за тенденции отхода от устоявшихся производственных стратегий, таких как производство в куриных эмбрионах или первичных клеточных линиях.

Преимущества производственных процессов на основе клеточных культур включают независимость от поставок куриных эмбрионов, а также минимизацию перекрестного загрязнения или аллергических реакций [3].

Культуры клеток применяют с 1940-х годов и обычно используют для изучения клеточной биологии и молекулярных механизмов. Клетки берут непосредственно из ткани и после соответствующей подготовки переносят в искусственную. Их выращивают в специальной среде, содержащей необходимые питательные вещества, факторы роста и гормоны. Культуры хранятся в специальной посуде, помещенной в строго контролируемый температурный режим, обычно при 37 °C [4-6].

Монослойные клеточные культуры демонстрируют морфологию и биохимическое поведение, необходимое для вирусной инфекции, будучи способные имитировать тонкости микроокружения *in vivo*. В монослойных культурах клетки растут на полистироловых пластинах. Эти модели *in vitro* были использованы для изучения вирусной инфекции. Монослойные клеточные культуры контролируют многие экспериментальные параметры и обладают очевидными преимуществами, такими как более простая, менее трудоемкая и более дешевая, чем эксперименты *in vivo*. Неудобство в том, что однослойные клеточные культуры обычно используют одну клеточную линию, что делает невозможным оценку взаимодействия между различными типами клеток и напоминают организацию и гетерогенность тканей [7, 8].

Клетки выращивают прикрепленными к плоской поверхности, в качестве подложки используются стекло или пластик, растут в виде монослоя. Этот метод культивирования клеток наиболее популярен, потому что он прост и удобен, является бесценным методом, дающий важные знания в качестве моделей различных заболеваний [9,10].

В настоящее время перевиваемая клеточная линия *Vero* считается наиболее используемой клеточной линией для производства вакцин. Имеется множество источников литературы, где можно найти исчерпывающие экспериментальные данные о производстве многих вирусов с использованием клеточной линии *Vero*.

Клеточная линия *Vero* была первой перевиваемой клеточной линией одобренной ВОЗ для производства вирусных вакцин для использования человеком в соответствии с определенными нормативными рекомендациями. Клетки *Vero* считаются не канцерогенными при определенном количестве пассажей и безопасны для использования в качестве субстрата для вакцин [11].

1962 г. данная клеточная линия была выделена из почки африканской зеленой мартышки. Культура представляет собой непрерывную клеточную линию, поэтому ее можно пассировать неограниченное количество раз, что позволяет проводить всестороннюю характеристику клеток и создавать банки клеток, это является ценным преимуществом по сравнению с первичными клеточными линиями с ограниченной способностью к пассажам. Клетки *Vero* растут адгезивно, у них недостаточно экспрессии интерферона и могут быть адаптированы для роста в бессывороточных условиях. Они широко используются во многих областях исследований, особенно в вирусологии, бактериологии, паразитологии и токсикологии [12-14].

Клеточная линия *Vero* является адгезивной клеточной культурой. Кинетика роста таких клеточных культур зависит от многих составляющих, в том числе от состава питательной среды, температуры, заряда, адгезивных свойств полимера и плотности посева клеток. Традиционно в последние десятилетия для культивирования *Vero* используют культуральные флаконы, чашки Петри и многолуночные культуральные планшеты. К недостаткам такого метода культивирования можно отнести ограниченную площадь поверхности культивирования, что ведёт к быстрому заселению её клетками и снижению их пролиферативной активности вследствие контактного торможения, и истощение питательной среды.

Приведённые причины обуславливают необходимость периодического рассеивания клеток с использованием новой культуральной посуды. Таким образом, наращивание монослойной клеточной культуры традиционным способом *in vitro* – длительная, дорогостоящая многоступенчатая манипуляция. Выходом из этой проблемы является культивирование на клеточных фабриках Nunc Cell Factory [15].

В НИИПББ для производства вакцин широко используется стационарный метод выращивания клеток на культуральных матрасах, который является достаточно сложным и трудоемким, кроме этого требуется большой расход времени и используемых в работе растворов. Поэтому, масштабирование культуры клеток *Vero* на клеточных фабриках является необходимым для создания экономически эффективных рабочих процессов в больших объемах.

Целью работы является изучение оптимальных параметров выращивания культуры клеток *Vero* на клеточных фабриках для осуществления крупномасштабного производства вакцин.

Материалы и методы

Культивирование клеток *Vero* проводили в системе клеточной фабрики (Thermo Scientific™ Nunc™ Cell Factory™). В исследовании определения посевной концентрации перевиваемой культуры клеток *Vero* были использованы питательная среда DMEM с 10% фетальной сывороткой КРС. Для этого клеточную фабрику с монослойными клетками снимали диспергирующей смесью в соответствующей концентрации, ресуспендировали небольшим количеством ростовой среды. Затем в клеточные фабрики добавляли суспензию клеток в различных концентрациях (0.5×10^5 , 1.0×10^5 , 1.5×10^5 , 2.0×10^5 , 2.5×10^5 и 3.0×10^5 кл/мл). После этого клеточные фабрики инкубировали при $t_{ре} + 37^\circ C$. Фиксировали срок образования клеточного монослоя и подсчитывали индекс пролиферации (ИП). Индекс пролиферации определяли по формуле:

$$ИП = X_{n+1} / X_n \quad (1)$$

где X_n – это общее исходное число посеянных для каждой группы клеток,

X_{n+1} – это общее число выращенных для каждой группы клеток.

Для определения оптимального соотношения диспергирующей смеси, необходимого для снятия клеточного монослоя с поверхности клеточной фабрики использовали растворы 0,25% трипсина и 0,02% ЭДТА. Для этого монослойную культуру клеток обрабатывали данной смесью в различных соотношениях. Использовали соотношение диспергирующей смеси 1:1, 1:3, 1:5, 1:7, 1:9. По количеству мертвых клеток после снятия и образованию клеточного монослоя через 24 часа после посева судили об оптимальности соотношения диспергирующей смеси.

Для подбора оптимального объема питательной среды в клеточные фабрики добавляли питательную среду в объеме 150 мл, 160 мл, 170 мл, 180 мл, 190 мл и 200 мл на один слой фабрики.

Концентрацию и жизнеспособность клеток подсчитывали с помощью автоматического счетчика клеток Countess FLII путем окрашивания 0,4% раствором трипанового синего [15].

Результаты

Флаконы культуральные T-25, T-75, T-150 (Т-флаконы) и т.д. являются наиболее часто используемыми пластиковыми расходными материалами для размножения клеток на ранней стадии, обычно при выращивании клеток, начиная с криопробирки (рис. 1, слева). Т-флаконы различаются по размеру, начиная с площади культивирования 12,5 – 300 см², и изготовлены из одноразового полистирола, обработанного плазмой, или пластика для

тканевых культур. Несмотря на свою экономичность, эти флаконы трудоемки и становятся нерентабельными при увеличении массы клеток за пределы лабораторного масштаба, в основном из-за их большой занимаемой площади.

Роллерные бутылки – цилиндрические сосуды для выращивания клеток в динамической системе (рис. 1, в центре). Их обычно помещают в роллерный аппарат, которая медленно вращается (от 5 до 240 оборотов в час). Поверхность, доступная для размножения клеток, составляет от 500 до 1700 см² при общем объеме от 1 до 1,5 л, что подходит для культуральных объемов 0,1 – 0,3 л. Как и стационарные флаконы, роллеры также трудоемки. Для наработки большого количества клеток с использованием роллерных бутылок, еще одним ограничением является, отсутствие контроля O₂ и CO₂ как в газовой, так и в жидкой фазах культуры.

Клеточные фабрики или многослойные флаконы – это состоящие из сложенных друг на друга плоских поверхностей (рис. 1, справа). При использовании этих систем доступная поверхность для культивирования увеличивается в разы за счет многослойного блока, достигающего общей площади, которая зависит от количества слоев, но обычно достигает до 2,5 м².

Как видно из вышесказанного наиболее оптимальной системой для масштабирования является клеточная фабрика, которая по сравнению с роллерными сосудами имеет в 5 раз и с Т-флаконами в 27 раз больше площадь культивирования.



(а) пластиковый матрас



(б) сосуды



(в) клеточная фабрика

Рисунок 1 – Виды культуральных сосудов

Начальным этапом процесса масштабирования было определение посевной концентрации клеток. Клеточную суспензию *Vero* добавляли в клеточные фабрики в следующих концентрациях: 1.0x10⁵, 1.5x10⁵, 2.0x10⁵, 2.5x10⁵ и 3.0x10⁵ кл/мл. При этом учитывали свойства клеток, срок образования и характеристику монослоя. Результаты исследований показали, что при посевной концентрации клеток составляющей 2.0x10⁵ кл/мл монослой образуется на 1-2 сут и является наиболее оптимальной для культивирования большинства вирусов (таблица 1).

№9
2022

Таблица 1 – Посевная концентрация клеток *Vero* на клеточных фабриках

Концентрация клеток	Срок образования монослоя клеток, сут	Характеристика клеточного монослоя
1.0 x 10 ⁵	3-4	Монослой содержит бесклеточные очаги
1.5 x 10 ⁵	3	Монослой равномерный
2.0 x 10 ⁵	1-2	Монослой равномерный
2.5 x 10 ⁵	1-2	Монослой равномерный, часто встречаются плавающие клетки и округлые клетки на поверхности монослоя
3.0 x 10 ⁵	1	Полислой с большим количеством плавающих клеток и округлыми клетками на поверхности слоя клеток

Для определения оптимального соотношения диспергирующей смеси, необходимого для снятия клеточного монослоя с подложки культуральной посуды использовали смесь 0.25% трипсина фирмы «Sigma» и 0.02% версена. Диспергирующую смесь брали в соотношениях 1:1, 1:3, 1:5, 1:7, 1:9. С этой целью монослойную культуру клеток обрабатывали диспергирующей смесью трипсина и версена в различных соотношениях. По образованию клеточного монослоя через 24 часа после посева и по количеству мертвых клеток после снятия, судили об оптимальности соотношения диспергирующей смеси. Результаты опыта представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Сравнительная характеристика открепления клеточной культуры *Vero* различными соотношениями диспергирующей смеси

Диспергирующая смесь	Время экспозиции, мин	Количество мертвых клеток, %	Характеристика клеточного монослоя
1 : 1	5	1	Монослой
1 : 3	7	3	Монослой с окнами
1 : 5	7	2,5	Редкий монослой
1 : 7	10	3,3	Редкий монослой
1 : 9	10	4,7	Монослой с окнами

Как видно из таблицы 2 для культуры клеток *Vero* применима диспергирующая смесь в соотношении 1:1. Так как культура снимается со стекла в течение 5 минут и при этом количество мертвых клеток невысокая. На первые сутки культивирования ровный монослой по сравнению с другими соотношениями диспергирующей смеси.

При определении ростовых (пролиферативных) свойств клеток *Vero* на клеточных фабриках было установлено, что индекс пролиферации клеток соответствует культуральным характеристикам данных клеток и ИП составляет 2,51. Эти данные согласуются с данными при культивировании этих клеток с использованием Т-флаконов, где ИП составлял 2,6 и паспортным данным клеточной линии [2, 5].

Поскольку размер сосуда и объем среды могут оказывать значительное влияние на газообмен и доставку кислорода к прикрепленным клеткам, необходимо тщательно оптимизировать высоту среды. Высота среды должна быть достаточно низкой, чтобы кислород мог свободно перемещаться из свободного пространства к клеткам, но достаточно высокой, чтобы имелось достаточное количество питательных веществ для поддержания роста клеток. Обычно для большинства плоскостонных сосудов для культивирования клеток рекомендуется использование 0,2–0,4 мл питательной среды на см² площади роста. Каждый слой клеточной фабрики имеет 632 см² и производителем рекомендовано добавление 150-200 мл на каждый слой. Изучение сроков образования монослоя и количества клеток при разном уровне питательной среды показало статистически не значимого влияния данного параметра на рост клеток *Vero*.

Несмотря на то, что система клеточных фабрик полезное устройство для масштабирования, существуют опасения относительно качества клеток и связанной с этим трудоемкости. Например, может быть неоднородная доступность и распределение питательных веществ и газов между разными слоями клеточной фабрики. Кроме того, простые операции, такие как посев клеток, смена среды и отделение/сбор клеток, становятся сложными из-за размера и веса клеточных фабрик. В этом отношении автоматизация системы значительно улучшила бы эти повседневные операции.

Обсуждение

Оптимизация условий клеточного культивирования – обязательный этап для эффективного производства продукции приемлемого качества. За последнее десятилетие изменилось масштабирование процессов культивирования клеток млекопитающих, а вместе с ним и проблемы, связанные с этим. Основная проблема масштабирования связана с теми клетками, которые зависят от прикрепления, обычно называемыми адгезивными клетками. Это наиболее распространенная форма животных клеток, которая широко используется во всех областях (например, в регенеративной медицине, клеточной терапии, для производства биологических препаратов и т. д.). Таким образом, для эффективной системы размножения клеток *in vitro* существует острая необходимость в улучшенных биопроцессах, которые обеспечивают более благоприятное соотношение поверхности к объему, более жесткий контроль над критическими параметрами роста, более оптимизированную диссоциацию от поверхности роста и более эффективный конечный сбор клеток [16].

Традиционный процесс масштабирования состоит из увеличения начальной аликвоты клеток, начиная с небольшого сосуда, а затем постепенно увеличивая количество сосудов каждый раз, когда клетки достигают слияния. Этот процесс может занять 3–4 недели и требует частых и множественных ручных операций для создания достаточного количества клеток для перехода к следующему этапу. Тао и др. предложил альтернативную систему, позволяющую ускорить время и сократить количество этапов в процессе масштабирования за счет создания банков клеток высокой плотности [17].

Многослойные системы для культивирования клеток в промышленных масштабах представляют собой универсальное решение для производства. Удобный и выгодный формат клеточных фабрик позволяет экономить пространство, время и трудозатраты и снижает риск контаминации. Цель состоит в том, чтобы увеличить доступную поверхность за счет включения многослойного блока, достигающего общей площади, которая зависит от количества слоев, но обычно достигает до 2,5 м² [18].

Заключение

Растущее число клеточных приложений требует большого количества клеток. Использование однослойных Т-флаконов, которые подходят для мелкомасштабного расширения, становится громоздким, трудоемким и занимает много времени, когда требуется большое количество клеток. Чтобы удовлетворить эту потребность, наиболее оптимальным является использование клеточных фабрик для культивирования клеток, облегчающих масштабирование клеток из однослойных Т-флаконов. Конструкция этих клеточных фабрик также обеспечивает удобный доступ для добавления реагентов и клеток непосредственно в сосуд, а также эффективное извлечение клеток и реагентов и снижает риск загрязнения в процессе. В проведенном исследовании показано, что посевная концентрация, индекс пролиферации клеток и соотношение диспергирующей смеси для снятия клеток сопоставимы с рутинно используемыми Т-флаконами. Однако по таким параметрам как трудоёмкость, количество сосудов на единицу площади и урожай клеток клеточные фабрики превосходят в несколько раз Т-флаконы и роллерные сосуды. При этом увеличивается производительность за счет увеличения площади поверхности на 30% при стандартной занимаемой площади системы.

Финансирование. Работа выполнена в рамках проекта: «Разработка субъединичной вакцины против коронавирусной инфекции COVID-19 на основе фрагмента рекомбинантного S белка вируса» по НТП «Разработка вакцины против коронавирусной инфекции COVID-19» на 2020-2022 годы.

Благодарности. Авторы выражают благодарность руководству и сотрудникам НИИПББ МЗ РК за оказанную помощь в проведении данных исследований.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

- 1 Hu W.S. Overview of cell culture processes // J.Cell Culture Bioprocess Engineering (Boca Raton: CRC Press). – 2020. – P.1–35.
- 2 Ryan J.A. Introduction to Animal Cell Culture. [Электронный ресурс]. - URL: <https://www.corning.com/catalog/cls/documents/application-notes/CLS-AN-042.pdf> (accessed August 20, 2020).
- 3 Aubrit F., Perugi F., Léon A., Guéhenneux F., Champion-Arnaud P., Lahmar M., Schwamborn K. Cell substrates for the production of viral vaccines // J.Vaccine 33. – 2015. – P. 5905–5912.
- 4 Goodman T.T., Ng C.P., Pun S.H. 3-D tissue culture systems for the evaluation and optimization of nanoparticle-based drug carriers // J.Bioconjug. Chem. – 2008. – P. 1951–1959.
- 5 Do Amaral J.B., Rezende-Teixeira P., Freitas V.M., Machado-Santelli G.M. MCF-7 cells as a three-dimensional model for the study of human breast cancer // J.Tissue Eng. Part C Methods – 2011. – P. 1097-1107.
- 6 Antoni D., Burckel H., Josset E., Noel G. Three-dimensional cell culture: A breakthrough in vivo // J. Mol. Sci. – 2015. – P. 5517-5527.
- 7 Gordon S. Non-animal models of epithelial barriers (skin, intestine and lung) in research, industrial applications and regulatory toxicology //ALTEX. – 2015. – P. 327-378.
- 8 Imle A., Kumberger P., Schnellbacher N.D., Fehr J., Carrillo-Bustamante P., Ales J., Schmidt P., Ritter C., Godinez W.J., Müller B. Experimental and computational analyses reveal that environmental restrictions shape HIV-1 spread in 3D cultures. Nat. Commun. – 2019. – P. 1-18.
- 9 Lv D., Hu Z., Lu L., Lu H., Xu X. Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery (Review) //Oncol. Lett. – 2017. – P. 6999-7010.
- 10 Vantangoli M.M., Madnick S.J., Huse S.M., Weston P., Boekelheide K. MCF-7 human breast cancer cells form differentiated microtissues in scaffold-free hydrogels // PLoS ONE. – 2015. – 10 p.
- 11 Barrett P.N., Mundt W., Kistner O., Howard M.K. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines //Expert Rev. Vaccines – 2009. – P. 1201-1219.
- 12 Emeny J.M., Morgan M.J. Regulation of the interferon system: evidence that vero cells have a genetic defect in interferon production //J. Gen. Virol. – 1979. – P. 247-252.
- 13 Merten O.W., Wu R., Couvé E., Crainic R. Evaluation of the serum-free medium MDSS2 for the production of poliovirus on Vero cells in bioreactors // Cytotechnology. – 1997. – P. 35-44.
- 14 Ammerman N.C., Beier-Sexton M., Azad A.F. Growth and maintenance of vero cell lines. //Curr. Protoc. Microbiol. – 2008. – 11 p.
- 15 Волкова И.М. Трёхмерные матрицы природного и синтетического происхождения для клеточной биотехнологии / И.М. Волкова, Д.Г. Коровина // Биотехнология. – 2015. – № 2. – С. 8-26.
- 16 Bellani CF, Ajeian J, Duffy L, Miotto M, Groenewegen L and Connon CJ (2020) Scale-Up Technologies for the Manufacture of Adherent Cells. Front. Nutr. 7:575146. doi: 10.3389/fnut.2020.575146.
- 17 Tao Y, Shih J, Sinacore M, Ryll T, Yusuf-Makagiansar H. Development and implementation of a perfusion-based high cell density cell banking process. Biotechnol Progress. (2011) 27:824–9. doi: 10.1002/btpr.599
- 18 Rafiq QA, Coopman K, Hewitt CJ. Scale-up of human mesenchymal stem cell culture: current technologies and future challenges. Curr Opin Chem Eng. (2013) 2:8–16. doi: 10.1016/j.coche.2013.01.005

References

- 1 Hu W.S. Overview of cell culture processes // J.Cell Culture Bioprocess Engineering (Boca Raton: CRC Press). – 2020. – P.1–35.
- 2 Ryan J.A. Introduction to Animal Cell Culture. [Электронный ресурс]. - URL: <https://www.corning.com/catalog/cls/documents/application-notes/CLS-AN-042.pdf> (accessed August 20, 2020).

- 3 Aubrit F., Perugi F., Léon A., Guéhenneux F., Champion-Arnaud P., Lahmar M., Schwamborn K. Cell substrates for the production of viral vaccines // *J.Vaccine* 33. – 2015. – P. 5905–5912.
- 4 Goodman T.T., Ng C.P., Pun S.H. 3-D tissue culture systems for the evaluation and optimization of nanoparticle-based drug carriers // *J.Bioconjug. Chem.* – 2008. – P. 1951–1959.
- 5 Do Amaral J.B., Rezende-Teixeira P., Freitas V.M., Machado-Santelli G.M. MCF-7 cells as a three-dimensional model for the study of human breast cancer // *J.Tissue Eng. Part C Methods* – 2011. – P. 1097-1107.
- 6 Antoni D., Burckel H., Josset E., Noel G. Three-dimensional cell culture: A breakthrough in vivo // *J. Mol. Sci.* – 2015. – P. 5517-5527.
- 7 Gordon S. Non-animal models of epithelial barriers (skin, intestine and lung) in research, industrial applications and regulatory toxicology // *ALTEX*. – 2015. – P. 327-378.
- 8 Imle A., Kumberger P., Schnellbacher N.D., Fehr J., Carrillo-Bustamante P., Ales J., Schmidt P., Ritter C., Godinez W.J., Müller B. Experimental and computational analyses reveal that environmental restrictions shape HIV-1 spread in 3D cultures. *Nat. Commun.* – 2019. – P. 1-18.
- 9 Lv D., Hu Z., Lu L., Lu H., Xu X. Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery (Review) // *Oncol. Lett.* – 2017. – P. 6999-7010.
- 10 Vantangoli M.M., Madnick S.J., Huse S.M., Weston P., Boekelheide K. MCF-7 human breast cancer cells form differentiated microtissues in scaffold-free hydrogels // *PLoS ONE*. – 2015. – 10 p.
- 11 Barrett P.N., Mundt W., Kistner O., Howard M.K. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines // *Expert Rev. Vaccines* – 2009. – P. 1201-1219.
- 12 Emeny J.M., Morgan M.J. Regulation of the interferon system: evidence that vero cells have a genetic defect in interferon production // *J. Gen. Virol.* – 1979. – P. 247-252.
- 13 Merten O.W., Wu R., Couvé E., Crainic R. Evaluation of the serum-free medium MDSS2 for the production of poliovirus on Vero cells in bioreactors // *Cytotechnology*. – 1997. – P. 35-44.
- 14 Ammerman N.C., Beier-Sexton M., Azad A.F. Growth and maintenance of vero cell lines. // *Curr. Protoc. Microbiol.* – 2008. – 11 p.
- 15 Volkova I.M. Tryohmernye matriksy prirodnogo i sinteticheskogo proiskhozhde-niya dlya kletочноj biotekhnologii / I.M. Volkova, D.G. Korovina // *Biotekhnologiya*. – 2015. – № 2. – P. 8-26.
- 16 Bellani CF, Ajeian J, Duffy L, Miotto M, Groenewegen L and Cannon CJ (2020) Scale-Up Technologies for the Manufacture of Adherent Cells. *Front. Nutr.* 7:575146. doi: 10.3389/fnut.2020.575146.
- 17 Tao Y, Shih J, Sinacore M, Ryll T, Yusuf-Makagiansar H. Development and implementation of a perfusion-based high cell density cell banking process. *Biotechnol Progress.* (2011) 27:824–9. doi: 10.1002/btpr.599
- 18 Rafiq QA, Coopman K, Hewitt CJ. Scale-up of human mesenchymal stem cell culture: current technologies and future challenges. *Curr Opin Chem Eng.* (2013) 2:8–16. doi: 10.1016/j.coche.2013.01.005

БИОПРЕПАРАТТАР ӨНДІРІСІНДЕ VERO ЖАСУША ӨСІНДІСІН КӨБЕЙТУ

Б.А.Сейдахметова , Г.А. Жаппарова , Л.Г. Мараховская ,
А.А.Теребай , А.К.Наханов *

Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты,
Гвардейский қтп., Қазақстан

Аннотация: вакцина өндірісі жұқпалы аурулардың таралуының алдын алу және бақылаудың ең тиімді әдісі болып саналады. Қазіргі таңда вакцина өндірісінде *Vero* шексіз жасуша линиясы кеңінен қолданылады.

Бұл зерттеудің мақсаты кең ауқымды вакциналарды өндіру үшін жасуша фабрикаларында *Vero* жасуша өсіндісін өсірудің оңтайлы параметрлерін зерттеу болды. Масштаптау

процесі үшін жасушалардың егу концентрациясы анықталды. Зерттеу нәтижелері бойынша $2,0 \times 10^5$ жасуша/мл егу концентрациясында моноқабат 1-2 күнде түзілетінін және көптеген вирустарды өсіру үшін ең оңтайлы екенін көрсетті. Өнеркәсіптік масштабтарда көп қатарлы жүйеде жасушаны өсіру өндірістері бір жолғы шешім болып табылады. Жасуша фабрикасы ыңғайлы және үнемді пішімі уақытты және жұмыс күшін үнемдейді және ластану қаупін азайтады.

Бұл жұмыстың барысында жасуша фабрикасында *Vero* жасушасын көбейту жұмысы жүргізілді, өйткені жасуша өсірудің бұл әдісі үлкен көлемде және экономикалық тиімді жұмыс болып табылады. Зерттеу барысында егу концентрациясы, жасуша пролиферациясының индексі және жасушаны түсіруге арналған дисперстік қоспаның қатынасы күнделікті қолданылатын Т-құтылармен салыстырылатыны көрсетілді.

Түйін сөздер: *vero* жасуша өсіндісі, монослой, жасуша фабрикасы, вакцина, индекс пролиферациясы, DMEM қоректік орта.

SCALING OF VERO CELL CULTURE FOR THE PRODUCTION OF BIOLOGICAL PRODUCTS

B.A. Seidakhmetova , G.A. Zhapparova , L.G. Marakhovskaya ,
 A.A. Terebay , A.K. Nakhanov  *

Scientific Research Institute of Biological Safety Problems,
 Gvardeysky, Kazakhstan

Abstract: vaccine production is considered the most effective way to prevent and control the spread of infectious diseases. The transplantable *Vero* cell line is now widely used for vaccine production.

The aim of this study was to investigate the optimal parameters for growing *Vero* cell cultures in cell factories for large-scale vaccine production. For the scaling process, the seed concentration of cells was determined. The results of the studies showed that at a cell inoculum concentration of 2.0×10^5 cells/ml, a monolayer is formed in 1-2 days and is the most optimal for cultivating most viruses. Multilayer cell culture systems for industrial scales provide a one-stop production solution. The convenient and cost-effective format of cell factories saves space, time and labor and reduces the risk of contamination.

In this paper, *Vero* cell culture is scaled up in cell factories because this cell culture method is necessary to create cost-effective workflows in large volumes. The study showed that the inoculum concentration, the cell proliferation index, and the ratio of the dispersing mixture for cell removal are comparable to routinely used T-vials.

Keywords: *vero* cell culture, cell factory, vaccine, proliferation index, DMEM culture medium.