



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 1/00 (2021.02); C12N 5/00 (2021.02)

(21)(22) Заявка: 2018127401, 30.12.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
30.12.2016

Дата регистрации:
17.12.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
30.12.2015 US 62/272,828

(43) Дата публикации заявки: 31.01.2020 Бюл. № 4

(45) Опубликовано: 17.12.2021 Бюл. № 35

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 30.07.2018

(86) Заявка РСТ:
US 2016/069564 (30.12.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2017/117559 (06.07.2017)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ФЕЛПС Мвита (US),
ГУЛД Пол (US),
ФАЙК Ричард (US),
РЕЙНОЛДЗ Мэри (US),
ХАССЕТТ Ричард (US)

(73) Патентообладатель(и):

ЛАЙФ ТЕКНОЛОДЖИЗ КОРПОРЕЙШН
(US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: РАДАЕВ И.Ф. и др.
"Культивирование клеток на микроносителях
в биореакторах" // Вестник ПНИПУ. 2019;
2:22-32; DOI: 10.15593/2224-9400/2019.2.02;
с.23,24. ЯРНЫХ Т.Г. "Суспензии" // НФаУ,
с.5, режим доступа: <https://nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2015/04/Suspenszii.pdf>. WO 02/
36735 A2, 10.05.2002. WO 01/45677 A1, 28.06.2001.
WO 2013/096858 A1, (см. прод.)

(54) СЛОИСТЫЕ ЧАСТИЦЫ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к биотехнологии. Предложены способ получения слоистой среды или сырьевой композиции для клеточной культуры, включающий суспендирование сухого порошка в псевдооживленном слое, введение по меньшей мере одного растворителя с растворенным в нем компонентом или смесью компонентов среды, слой которого подлежит нанесению с помощью распылителя, и сушку полученной слоистой базовой частицы или гранулы (варианты); слоистая среда и сырьевая композиция,

полученные указанным способом, и их применение для культивирования клетки; способ культивирования клетки в жидкости, включающий культивирование клетки в подходящих для клетки условиях в слоистой среде или сырьевой композиции, разведенной в подходящей жидкости или буфере; набор, включающий контейнер со слоистой средой или сырьевой композицией для клеточной культуры, и инструкцию по применению; система для культивирования клеток, содержащая жидкую среду, разведенную из слоистой или сырьевой

композиции для клеточной культуры. Изобретения обеспечивают приготовление сред для клеточной культуры в виде сухого порошка,

термически, фотохимически устойчивых и устойчивых к гамма-облучению. 8 н. и 22 з.п. ф-лы, 21 ил., 6 табл., 4 пр.

(56) (продолжение):

27.06.2013. RU 2234514 C2, 20.08.2004.

RU 2 7 6 2 2 9 2 C 2

RU 2 7 6 2 2 9 2 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12N 1/00 (2021.02); C12N 5/00 (2021.02)(21)(22) Application: **2018127401, 30.12.2016**(24) Effective date for property rights:
30.12.2016Registration date:
17.12.2021

Priority:

(30) Convention priority:
30.12.2015 US 62/272,828(43) Application published: **31.01.2020 Bull. № 4**(45) Date of publication: **17.12.2021 Bull. № 35**(85) Commencement of national phase: **30.07.2018**(86) PCT application:
US 2016/069564 (30.12.2016)(87) PCT publication:
WO 2017/117559 (06.07.2017)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spasskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i
Partnery"**

(72) Inventor(s):

**PHELPS, Mwita (US),
GULDE, Paul (US),
FIKE, Richard (US),
REYNOLDS, Mary (US),
HASSETT, Richard (US)**

(73) Proprietor(s):

LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION (US)(54) **LAYERED PARTICLES OF CELL CULTURE AND THEIR PRODUCTION METHODS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: method for producing a layered medium or a raw material composition for a cell culture is proposed, including suspension of dry powder in a fluidized layer, introduction of at least one solvent with a component or a mixture of medium components dissolved in it, a layer of which is to be applied using a sprayer, and drying of the resulting layered base particle or granule (options); as well as a layered medium and a raw material composition obtained by the specified method, and their use for cell cultivation; a method for cell cultivation in liquid, including cell

cultivation under conditions suitable for the cell in a layered medium or a raw material composition diluted in suitable liquid or buffer; a set including a container with a layered medium or a raw material composition for a cell culture and instructions for use; a system for cell cultivation containing a liquid medium diluted from a layered or raw material composition for a cell culture.

EFFECT: inventions provide preparation of media for a cell culture in the form of dry powder, thermally, photochemically stable and resistant to gamma irradiation.

30 cl, 21 dwg, 6 tbl, 4 ex

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании 119(e) статьи 35 Свода законов США по предварительной заявке на получение патента США № 62/272,828, поданной 30 декабря 2015 г. Полное содержание вышеуказанной заявки включено в

5 настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к сухой среде, сырью, добавкам или концентратам для клеточной культуры, содержащим слоистые частицы, пригодные для культивирования клеток и другим таким применениям. Изобретение относится к

10 процессам приготовления таких слоистых композиций и способам получения композиций клеточной культуры, которые являются термически, фотохимически устойчивыми и/или устойчивыми к гамма-облучению. Изобретение также относится к применению препаратов из таких слоистых частиц для получения белков и полипептидов, и для увеличения, за счет этого, роста клеток и белковых титров.

КРАТКОЕ РАСКРЫТИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение частично направлено на способы получения среды или сырьевой композиции для культивирования клеток, включающие: i) подвергание сухого порошка суспендированию в подвижной колонке газа в аппарате с псевдоожиженным слоем; ii) введение по меньшей мере одного растворителя с помощью распылителя в сухой

20 порошок этапа (i) для образования слоистой базовой частицы; iii) сушку слоистой базовой частицы.

Изобретение также частично направлено на способы получения среды или сырьевой композиции для культивирования клеток, включающие: i) подвергание сухого порошка суспендированию в подвижной колонке газа в аппарате с псевдоожиженным слоем; ii)

25 введение первого растворителя с помощью первого распылителя на сухой порошок этапа (i) для образования базовой гранулы; iii) введение по меньшей мере одного второго растворителя с помощью второго распылителя на базовую гранулу этапа (ii) для образования слоистой базовой гранулы; iv) сушку слоистой базовой гранулы.

В соответствии с указанными выше первыми аспектами изобретения, сухой порошок

30 может представлять собой порошок базальной среды, порошок полной среды, сырье для клеточной культуры, добавку для клеточной культуры, среду для клеточной культуры или сырьевой концентрат, или смесь аминокислот.

Во втором аспекте первый распылитель может быть выбран из группы, состоящей из: верхнего распылителя, нижнего распылителя и тангенциального распылителя. В

35 качестве альтернативы, первый или второй распылитель может быть выбран из группы, состоящей из: верхнего распылителя, нижнего распылителя и тангенциального распылителя. В предпочтительном варианте реализации второй распылитель может представлять собой нижний распылитель.

В третьем аспекте второй распылитель может распылять множество растворителей на базовую гранулу для образования многослойной базовой гранулы или многослойной базовой частицы, соответственно. В качестве альтернативы, второй распылитель может распылять множество растворителей последовательно, так что имеют место

40 чередующиеся этапы сушки между каждым этапом распыления. Также в качестве альтернативы, второй распылитель может распылять множество растворителей последовательно без каких-либо чередующихся этапов сушки между каждым этапом распыления.

В четвертом аспекте каждый растворитель во множестве растворителей может содержать один компонент; или одинаковые компоненты; или каждый растворитель

может содержать разные компоненты. Например, каждый растворитель может содержать смесь компонентов. Еще в одном аспекте растворитель содержит реакционноспособные виды. В другом аспекте растворитель содержит чувствительные виды.

5 В пятом аспекте компоненты, подлежащие распылению через растворитель, распадаются на реакционноспособные виды и на чувствительные виды.

Еще в одном аспекте реакционноспособные виды и чувствительные виды распыляют отдельно для получения слоистой гранулы. В конкретном аспекте реакционноспособные виды могут быть выбраны из группы, состоящей из одного или более микроэлементов,
10 одной или более реакционноспособных аминокислот, одной или более солей металлов, одной или более растворимых в кислоте реакционноспособных групп, одной или более растворимых в спирте реакционноспособных групп и одной или более групп модификатора pH.

Еще в одном другом аспекте чувствительные виды могут быть выбраны из группы,
15 состоящей из одного или более полиаминов, одного или более витаминов, одного или более факторов роста и одной или более лабильных аминокислот.

В шестом аспекте в способах используют входной газ, приблизительная температура которого может составлять от 20°C до 30°C. Еще в одном аспекте в способах приблизительная температура входного газа, используемого в способе, может составлять
20 25°C.

В седьмом аспекте витамины, которые могут быть чувствительными, выбирают из группы, состоящей из: витамина B₁₂, биотина, холина, фолиевой кислоты, ниацинамида, пиридоксина, рибофлавина, тиамина, аскорбиновой кислоты и парааминобензойной кислоты (ПАБК).

25 В восьмом аспекте этап сушки могут выполнять при приблизительной температуре от 50°C до 60°C.

В девятом аспекте базовая частица или базовая гранула может быть высушена до приблизительного содержания влаги от 0,5% до 10%.

Еще в одном другом дополнительном аспекте растворитель дополнительно содержит
30 по меньшей мере один антиоксидант или по меньшей мере один нейтральный вид, или обоих.

В десятом аспекте слоистая базовая частица или слоистая базовая гранула получена любым из способов, описанных выше.

В одиннадцатом аспекте способы направлены на получение слоистой частицы для
35 питательной среды, слоистой частицы для добавки питательной среды, слоистой частицы для подгруппы питательной среды, включающие получение слоистой частицы среды любым способом, описанным выше, и причем по меньшей мере один слой на базовой частице или базовая гранула содержит реакционноспособные виды и/или по меньшей мере один слой на базовой частице или базовая гранула содержит чувствительные виды.

40 Еще в одном аспекте реакционноспособные виды могут быть выбраны из группы, состоящей из одного или более микроэлементов, одной или более реакционноспособных аминокислот, одной или более солей металлов, одной или более растворимых в кислоте реакционноспособных групп, одной или более растворимых в спирте реакционноспособных групп и одной или более групп модификатора pH. В качестве
45 альтернативы, чувствительные виды могут быть выбраны из группы, состоящей из одного или более полиаминов, одного или более витаминов, одного или более факторов роста и одной или более лабильных аминокислот. В некоторых вариантах реализации сухой порошок может быть выбран из группы, состоящей из витаминов, объемных

неорганических солей и сахаров.

В двенадцатом аспекте способы направлены на культивирование клетки в жидкости, разведенной из слоистой частицы среды, полученной так, как описано выше, способ включает: i) разведение слоистой частицы среды в подходящей жидкости или буфере; 5 причем указанная слоистая частица среды может представлять собой среду, сырье, добавку или концентрат для клеточной культуры; и ii) культивирование клетки может выполняться в разведенной жидкости при условиях, подходящих для роста клетки. Еще в одном аспекте культивирование клетки может быть использовано для продуцирования увеличенного количества полипептида. Еще в одном дополнительном аспекте 10 полипептид может представлять собой рекомбинантный полипептид. В качестве альтернативы, культивирование увеличивает выход продукта, увеличивая рост клеток по сравнению с культурой с жидкой средой, выполненной не из слоистых частиц среды.

В тринадцатом аспекте представлен набор, содержащий: i) первый контейнер, содержащий слоистую частицу или гранулу по любому одному из указанных выше 15 пунктов; причем указанная слоистая частица или гранула может представлять собой среду, сырье, добавку или концентрат для клеточной культуры; и ii) инструкции по применению слоистой частицы или гранулы для клеточной культуры.

В четырнадцатом аспекте представлена система, содержащая: жидкую среду, разведенную из слоистых частиц среды, согласно способам, описанным выше, и клетку. 20 Еще в одном аспекте разведенная жидкая среда может быть использована для культивирования клетки, которая продуцирует рекомбинантный полипептид, вирус, секретируемый белок, или для культивирования клетки в суспензии, или клетки, которая может быть закрепленной.

В пятнадцатом аспекте представлены способы получения среды или сырьевой композиции для культивирования клеток, как описано выше, или набор, как описано 25 выше, или система, как описано выше, причем используются аминокислоты и аминокислоты выбраны из одной или более из двадцати аминокислот, их солей или их производных. Еще в одном аспекте аминокислоты выбраны из одного или более глицина, аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, гистидина, 30 изолейцина, метионина, фенилаланина, пролина, гидроксипролина, серина, треонина, триптофана, валина, тирозина, цистеина и лизина.

В шестнадцатом аспекте представлены слоистые частицы или гранулы, полученные способами, описанными выше, применяемые для культивирования клетки. Еще в одном аспекте клетка может представлять собой клетку млекопитающего. В конкретном 35 аспекте клетка может быть выбрана из группы, состоящей из клеток CHO, ВНК, НЕК, 293 и VERO. В другом аспекте клетка может представлять собой растительную клетку, животную клетку, эукариотическую клетку, клетку водоросли, клетку гриба и бактериальную клетку.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

40 Все публикации, патенты и заявки, на выдачу патента упомянутые в данном описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в такой же степени, как в случае, если бы каждая отдельная публикация, патентная заявка или патент были конкретно и по отдельности включены посредством ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

45 Новые признаки изобретения конкретно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Улучшенное понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения будет обеспечено, ссылаясь на следующее подробное описание, в котором приведены иллюстративные варианты реализации, в которых используются принципы изобретения,

и сопроводительные чертежи, на которых:

Фигура 1: Схематический вид процесса получения составов слоистой гранулы для культуральной среды. Нанесение покрытия нижним распылением выполняли с помощью GPCG 1.1 с 6-дюймовой перегородкой Вурстера, 2-литрового гранулятора/сушилki/ устройства для нанесения покрытия. Нанесение слоя нижним распылением - композиция слоя варьируется для каждой грануляции.

Фигура 1a: Схематическая диаграмма примера однослойных слоистых гранул среды для клеточной культуры с одним ингредиентом - прототип А слоистой гранулы.

Фигура 1b: Схематическая диаграмма примера многослойных слоистых гранул среды для клеточной культуры с одним ингредиентом в каждом слое - прототип В слоистой гранулы.

Фигура 2a: РЭМ-изображения слоистых гранул прототипа А среды для клеточной культуры (один слой, один ингредиент).

Фигура 2b: РЭМ-изображения слоистых гранул прототипа В среды для клеточной культуры (многослойная, один ингредиент).

Фигура 3a: Анализ жизнеспособности слоистой клетки сырья прототипа А.

Фигура 3b: Анализ роста слоистой клетки сырья прототипа А.

Рисунок 4 Пример процесса производства слоистых гранул среды/сырья для клеточной культуры.

Фигура 5a: Схематическая диаграмма состава 1 слоистых гранул среды для клеточной культуры.

Фигура 5b: Схематическая диаграмма состава 2 слоистых гранул среды для клеточной культуры.

Фигура 6a: Состав 1: анализ размера частиц непокрытых, неслоистых гранул (синие полосы) и покрытых (слоистых) гранул (красные полосы).

Фигура 6b: Состав 2: анализ размера частиц непокрытых, неслоистых гранул (синие полосы) и покрытых (слоистых) гранул (красные полосы).

Фигура 7a: Состав 1: кумулятивный анализ размера частиц (сито) перед и после нанесения покрытия нижним распылением: анализ ситовой фракции гранулированного базового порошка перед этапом нанесения слоя. Анализ размера частиц непокрытых, неслоистых гранул (синие квадраты) и покрытых, слоистых гранул (красные ромбы).

Фигура 7b: Состав 2: кумулятивный анализ размера частиц (сито) перед и после нанесения покрытия нижним распылением: анализ ситовой фракции гранулированного базового порошка перед этапом нанесения слоя.

Фигура 8a: Состав 1: РЭМ-изображения покрытых (слоистых) гранул состава 1 (F1) при увеличении левой панели: Вид сверху 100х; правая панель: Поперечное сечение 1500х.

Фигура 8b: Состав 2: РЭМ-изображения покрытых (слоистых) гранул состава 2 (F2) при увеличении левой панели: Вид сверху 100х; правая панель: Поперечное сечение 1500х.

Фигура 9a: Составы 1, 2, 3: Анализ размера частиц гранулированных базовых порошков. Кумулятивный анализ ситовой фракции. Ситовый анализ грануляции базового порошка выполняли с 3-5 граммами гранулированного материала с помощью 3-дюймовых сит.

Фигура 9b: Составы 1, 2, 3: Анализ размера частиц гранулированных базовых порошков. Ситовый анализ грануляции базового порошка выполняли с 3-5 граммами гранулированного материала с помощью 3-дюймовых сит.

Фиг. 10a: Составы 1, 2, 3: Анализ размера молотых частиц гранулированных базовых

порошков. Кумулятивный анализ ситовой фракции для базового порошка, который был размолот после грануляции.

Фиг. 10b: Составы 1, 2, 3: Гистограмма анализа размера молотых частиц гранулированных базовых порошков. Ситовый анализ грануляции базового порошка (размолот после грануляции) выполняли с 95-105 граммами материала с помощью 8-дюймовых сит.

Фигура 11: Распад питательных веществ в слоистых грануляциях, индуцированный облучением. Как видно из фигур, стратегии нанесения слоя, при применении к гамма-облученной среде в сухом виде (диапазон дозы от 20 кГр до 70 кГр), улучшила устойчивость чувствительных и/или реакционноспособных компонентов по сравнению с таковой у необлученной (0 кГр) контрольной среды.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к способам получения композиции среды в виде сухого порошка, содержащей слоистые базовые частицы или слоистые базовые гранулы. Среда в виде сухого порошка, при упоминании в настоящем описании, может относиться к среде в виде сухого порошка (базальной среде или полной среде), сухой концентрированной среде для клеточной культуры, сырью или добавкам в виде сухого порошка, концентрированному сырью или добавкам в виде сухого порошка, сухим порошкам буфера, которые могут быть использованы в комбинации, или частично, или отдельно (когда он может быть полной средой) для культивирования клетки. В целом, культивирование относится к культивированию клетки *in vitro*. Способ производства для получения частиц или гранул слоистой среды или сырья будет описан далее в настоящем документе.

Составы среды, сырья или добавки для клеточной культуры могут содержать химические вещества, которые становятся неустойчивыми с течением времени (т.е. распадаются, окисляются и т.д.) или неустойчивы ввиду нежелательных взаимодействий между чувствительными и реакционноспособными компонентами в самом составе. Например, глюкоза может вступать в реакцию с некоторыми аминокислотами или с полиамидами с образованием нежелательных продуктов реакции Майларда, которые выпадают в осадок при растворении в растворе, и такие реакции могут быть дополнительно усилены в присутствии одного или более из следующего: высокоэнергетические или ионизирующие излучения, тепловое повреждение, свет, химические вещества, воздействующие на окружающую среду, длительное хранение, механическое колебание и т.д. Таким образом, среда для клеточной культуры должна храниться или транспортироваться при пониженных температурах, что увеличивает затраты на товары и может быть обременительным. Для преодоления таких проблем необходим способ защиты компонентов среды для клеточной культуры, которые в противном случае вступят в нежелательное взаимодействие, и это может быть достигнуто посредством сегрегации или группировки ингредиентов клеточной культуры, например, реакционноспособные компоненты могут быть пространственно отделены от чувствительных компонентов путем их нанесения отдельными слоями, а в некоторых вариантах реализации путем смешивания слоя чувствительного компонента и/или реакционноспособных компонентов с гасителями свободных радикалов или реакционноспособных видов; гашения таких компонентов, как антиоксиданты, и/или с нейтральными компонентами (см., например, Таблицу в Примере 3 ниже). Таким образом, желательным решением вышеуказанной проблемы было бы создание среды для клеточной культуры или сырья (базального или полного) для добавления в систему клеточной культуры так, чтобы чувствительные компоненты в составе и/или

реакционноспособные компоненты состава были пространственно разделены друг от друга за счет нанесения слоями. Необязательно, инертные компоненты и/или гасители, такие как антиоксиданты, могут быть смешаны с чувствительными компонентами, и/или реакционноспособные компоненты, или инертные компоненты и/или гасители, такие как антиоксиданты, могут быть нанесены слоями между реакционноспособным и чувствительным слоем. Нанесение такой слоистой порошкообразной среды для клеточной культуры может продлить устойчивость продукта и/или повысить устойчивость к, например, тепловому облучению, излучению или фотохимическим облучениям.

Приготовление слоистой гранулы многокомпонентной среды для клеточной культуры, сырья или добавки может быть затруднительным, поскольку полная среда, например, содержит от 80 до 100 компонентов, каждый из которых необходим в точных количествах для поддержания роста жизнеспособной клетки и поддержания надежных белковых титров.

Для приготовления слоистой гранулы может быть использован распылитель, например, нижний распылитель, для распыления растворителя на негранулированный базовый порошок или гранулированный, или агломерированный базовый порошок. Слойми могут быть нанесены частицы в широком диапазоне размера. Примеры гранулированных порошков включают, но без ограничения, полученные грануляцией распылением/влажной грануляцией, распылительной сушкой с псевдооживленным слоем (см. Srivastava и др.; Международный журнал по фармацевтическим наукам и исследованию препаратов 2010; 2(4): 236-246; полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки). Таким образом, на грануле может быть образован первый слой. Растворитель может содержать одно или более химических веществ/компонентов, или микросуспензию из одного или более химических веществ/компонентов. В некоторых вариантах реализации на грануле могут быть созданы разные химические слои контролируемой толщины. В конкретном варианте реализации связующие не используются в растворителе или на какой-либо стадии для образования или для нанесения слоя на гранулу. Иными словами, состав среды для клеточной культуры, сырья или концентрата, не должен быть изменен добавлением связующих или дополнительных компонентов для образования гранулы. На гранулу может быть нанесен слой с помощью компонентов, уже присутствующих в составе. Вместо этого, компоненты состава сегрегируются или группируются, как описано ниже.

Сегрегация химических веществ/компонентов и нанесение слоев: Химические вещества/компоненты в слоистой грануле могут быть сегрегированы или сгруппированы в соответствии с, например, их химической реактивностью/свойствами; их подверженностью тепловым повреждениям или повреждениям излучением, или фотохимическим повреждениям, или в соответствии с их растворимостью в растворителе, и т.д.

Например, ядро гранулы (также называемой базовой гранулой) может содержать один или более чувствительных компонентов (иногда называемых внутренним ядром/слоем). В других случаях базовая гранула может содержать смесь чувствительных и антиоксидантных компонентов. Еще в одних других случаях базовая гранула может содержать смесь чувствительных компонентов, антиоксидантных и/или нейтральных компонентов. Например, в конкретном варианте реализации ядро гранулы может содержать наиболее чувствительный компонент или смесь наиболее чувствительных компонентов, и смесь одного или более нейтральных (инертных) компонентов и/или одного или более антиоксидантных компонентов. В других случаях на саму базовую

гранулу может быть нанесен слой, так что чувствительные компоненты и/или нейтральные химические вещества, и/или антиоксидантные компоненты могут быть нанесены слоями друг за другом, друг на друге. Например, наиболее чувствительный компонент может образовывать центральное ядро базовой гранулы, после которого находится следующий чувствительный компонент в следующем слое, и так далее, смешанный с или после которого следуют нейтральный/инертный(е) компонент(ы), и/или антиоксидантный слой в качестве наружного слоя базовой гранулы. В качестве альтернативы, нейтральный компонент может находиться на ядре, после которого следует чувствительные компоненты, или наоборот. Нанесение чувствительного/нейтрального/антиоксидантного слоя гранулы может происходить в любом порядке, в соответствии с ингредиентами среды для клеточной культуры, сырья или концентрата, и как определено специалистом в данной области техники, исходя из свойств компонентов среды для клеточной культуры или сырья.

Затем на базовые гранулы с чувствительным компонентом (внутреннее ядро или слой) могут быть нанесены реакционноспособные химические вещества. В некоторых примерах реакционноспособные химические вещества могут быть смешаны вместе и нанесены в виде одного слоя на базовую гранулу. Данное разделение может обеспечить в некотором роде пространственное разделение между чувствительными и реакционноспособными химическими веществами внутри одной или той же гранулы. В других случаях реакционноспособные химические вещества могут быть нанесены друг за другом, один слой на другой, причем наименее реакционноспособное химическое вещество находится в контакте с (чувствительной) базовой гранулой, а наиболее реакционноспособное химическое вещество находится на расстоянии в пространстве от базовой гранулы (наружным слоем). В качестве альтернативы, промежуточный нейтральный/инертный химический слой может отделять внутренний чувствительный слой от наружного реакционноспособного слоя/слоев гранулы.

В предпочтительном варианте реализации может быть получена агломерированная среда для клеточной культуры AGT способом гранулирования с псевдооживленным слоем. К полученной базовой частице может быть применена дополнительная технология нанесения покрытия с псевдооживленным слоем, например, с помощью способа нанесения слоя нижним распылением, такого как способ Вурстера. В составе клеточной культуры AGT способ нижнего распыления может обеспечить возможность добавления химических групп в конкретном порядке для образования контролируемых слоев вокруг сыпучих компонентов гранулирования (т.е. называемый активным нанесением слоев) для разделения/сегрегации реакционноспособных химических компонентов в готовом продукте AGT. В некоторых аспектах частица с покрытием может быть модифицирована для медленного высвобождения компонентов, а в других аспектах активная AGT с нанесенным слоем может обеспечивать защиту компонентов состава, которые неустойчивы к гамма-облучению, ухудшению состояния окружающей среды, ухудшению ввиду влаги и так далее. Реакционноспособные химические компоненты могут быть смешаны с антиоксидантами для обеспечения эффекта защиты. Один или более активных слоев могут быть распылены на частицу AGT для полной комплектации состава. Каждый слой может содержать или может не содержать один или более антиоксидантов для дополнительной устойчивости. Данный способ обладает потенциалом обеспечить полную среду AGT заключительной стерилизации (т.е. в формате единого целого в сухом виде) без необходимости во второстепенных условиях обработки (например, распылительной сушке, микроинкапсуляции). Испытание устойчивости может быть выполнено по прошествии 1 недели, 3 недель или более, с

хранением среды со слоистыми частицами @ 37С, КТ, 4°С, °С и т.д. Аналитическое испытание с облучением и/или ухудшением состояния окружающей среды, вариацией температуры, или недель устойчивости было выполнено путем оценки сохранения чувствительных компонентов, таких как витамины, этаноламин и т.д. с помощью

5 рутинных оценок.

Примеры чувствительных или менее устойчивых химических веществ/компонентов включают, но без ограничения, витамины, полиамины, факторы роста, гормоны и т.д. Примеры реакционноспособных химических веществ/компонентов включают, но без ограничения, микропримеси металлов или соли, некоторые реакционноспособные

10 аминокислоты, некоторые сахара (например, глюкоза, которая может образовывать аддукты с другими компонентами, в том числе, некоторые аминокислоты, полиамины), ионы металлов и т.д. Примеры нейтральных химических веществ/компонентов включают, но без ограничения, нейтральные аминокислоты, нейтральные сахара и т.д.

Определения

15 Термин «порошок» или «сухой порошок», используемый в настоящем документе, относится к порошкам среды или порошковым композициям среды для клеточной культуры, которые присутствуют в сухой форме, которые в общем могут быть сыпучими. Термин «порошок» включает агломерированные порошки. Термин «базовый порошок» или «сухой базовый порошок», или «сухой порошок», может использоваться

20 взаимозаменяемым образом, и, как используется в настоящем документе, относится к исходной композиции сухого порошка перед тем, как на нее может быть нанесен слой. Термин «базовый порошок» или «сухой базовый порошок», или «сухой порошок», может быть гранулирован любыми средствами, например, в сушилке с псевдооживленным слоем для получения «базовой гранулы» или «агломерированной

25 гранулы», на которую затем может быть нанесен слой путем последующего «нанесения слоя» с помощью растворителей. Однако это не означает, что слоистая частица (или гранула) должна начинаться с базовой гранулы. Слоистая частица может начинаться с простой негранулированной порошкообразной, на которую может быть нанесен слой, также с помощью технологий распыления. Из соображений удобства,

30 гранулированная или агломерированная исходная частица перед нанесением слоя может называться «базовой гранулой». Следовательно, сухой порошок, негранулированная исходная частица иногда может называться «базовой частицей» перед нанесением слоя. Это может не означать то, что любой исходный материал может быть полностью свободен от сухого порошка или агломерированных гранул. Исходный

35 материал иногда может содержать смесь сухого порошка и агломерированных гранул перед нанесением слоя с помощью растворителя. Сухой или агломерированный порошок (по мере необходимости) может представлять собой порошок базальной среды, порошок полной среды, сырье для клеточной культуры, добавку для клеточной культуры, среду для клеточной культуры или сырьевой концентрат, или смесь аминокислот.

40 Термин «композиции среды для клеточных культур» или «порошкообразная композиция среды», или «порошки среды», или «составы сухого порошка», или «составы среды», могут использоваться взаимозаменяемым образом и в широком смысле включают, *например*, среду, добавку среды, подгруппу среды или буфер, в соответствии с изобретением, и могут не ограничиваться базальной средой, полной средой, сырьем

45 среды, добавками среды, наполнителями среды, концентрированной средой, концентрированными добавками и сырьем, аминокислотами или группами аминокислот, короткими пептидами, витаминами, буферами, солями, микрокомпонентами и т.д. Эти термины в целом относятся к компонентам, добавляемыми во время культивирования

клетки, и специалисту в данной области техники явным образом будет ясно, когда и каким образом используются эти термины.

Термин «компонент» или «ингредиент» среды относится к любому соединению, независимо от химического или биологического происхождения, которое может быть использовано при культивировании клетки, для поддержания или промотирования роста и пролиферации клеток. Термины «компонент», «нутриент», «ингредиент», «виды» могут использоваться взаимозаменяемым образом и подразумевается, что все они относятся к таким соединениям. Типичные ингредиенты, которые используются в среде для клеточной культуры, включают аминокислоты, соли, ионы металлов, микроэлементы, полиамины, сахара, углеводы, липиды, нуклеиновые кислоты, гормоны, витамины, жирные кислоты, буферные соли, белки и тому подобное. Другие ингредиенты, которые промотируют или поддерживают культивирование клеток *ex vivo*, могут быть выбраны специалистом в данной области техники, исходя из конкретной потребности.

Распыление: В некоторых вариантах реализации «компонент» для нанесения слоя может быть распылен на базовую частицу или базовую гранулу. В некоторых вариантах реализации единый «компонент» может быть распылен на базовую частицу или базовую гранулу. В других вариантах реализации распыляют множество «компонентов». Когда распыляют множество «компонентов», они могут быть сгруппированы вместе, например, в соответствии с их реакционной способностью, их растворимостью, их свойствами (например, аминокислота по сравнению с сахаром), и распыляют вместе в виде смеси. В качестве альтернативы, компоненты могут быть последовательно распылены друг за другом.

Термин «растворитель» относится к любой жидкости, такой как вода, любому гидранту, любому буферу или органической жидкости, такой как этанол, и т.д., в которой может раствориться один или более «компонентов», слой которого подлежит нанесению. Нанесение слоя может выполняться посредством «распыления» жидкости с растворенным «компонентом» или «смесью компонентов». Растворитель может растворять один или более «подобных» компонентов; например, этанол может растворять липиды, жирные кислоты, холестерин и т.д., или растворитель может растворять один или более «отличающихся» компонентов, таких как «реакционноспособные компоненты» и «антиоксиданты» вместе, вероятно ввиду того, что антиоксиданты или другие такие молекулы/компоненты помогают стабилизировать или замедлить этапы разложения реакционноспособных видов или групп. Растворитель может быть распылен последовательным образом или одновременно весь. При последовательном распылении каждый распыляемый растворитель может иметь одинаковую композицию или может иметь разные композиции. В некоторых случаях множество растворителей может быть распылено на одну и ту же базовую частицу или гранулу для образования многослойной базовой частицы или гранулы. В некоторых случаях многослойная базовая частица или гранула пространственно отделяет активные или реакционноспособные виды (или ингредиенты) от чувствительных видов. В одном варианте реализации скорость введения растворителя может быть между приблизительно 1 г/мин до приблизительно 30 г/мин. В другом варианте реализации скорость введения растворителя может составлять приблизительно 5 г/мин.

Термин «распылитель» относится к оборудованию, которое распыляет жидкость, содержащую один или более компонентов, на базовую частицу или базовую гранулу. Распылитель может быть выбран из группы, состоящей из: верхнего распылителя, нижнего распылителя и тангенциального распылителя. Один распылитель может быть

использован для получения гранулированной частицы (например, агломерированной частицы), тогда как второй распылитель, в одном варианте реализации нижний распылитель, может быть использован для нанесения растворителей и компонентов слоями по желанию и как описано выше.

5 «Реакционноспособные виды» относятся к тем компонентам, которые легко вступают в реакцию с другими компонентами в среде или сырье, тем самым продуцируя нежелательные продукты, такие как аддукты, поперечно сшитые продукты, осадки и т.д. Реакционноспособные виды могут самопроизвольно реагировать или могут быть активированы для вступления в реакцию ввиду воздействия более высокими
10 температурами, облучения, присутствия других химических веществ или реакционноспособных видов и т.д. Примеры реакционноспособных видов включают, но без ограничения, ионы металлов, сахара, которые образуют аддукты, компоненты микропримесей металлов, реакционноспособные аминокислоты и т.д.

«Чувствительные виды» относятся к тем компонентам, которые легко разрушаются
15 ввиду их нежелательной реакции с более реакционноспособными видами или группами из среды или сырья. Чувствительные (или лабильные) виды могут самопроизвольно реагировать или могут быть активированы для вступления в реакцию с другими компонентами, особенно реакционноспособными видами, ввиду воздействия на них более высокими температурами, облучения, присутствия других химических веществ
20 или реакционноспособных видов и т.д. Примеры чувствительных видов включают, но без ограничения, витамины, некоторые аминокислоты, полиамины, такие как этаноламин, и т.д., биологические компоненты, такие как факторы роста, и т.д., которые разрушаются с течением времени, или при более высокой температуре, или при воздействии облучением, или ввиду комбинации одного или более из этих факторов.

25 Фразы «среда для клеточной культуры», «культуральная среда» и «состав среды» (во множественном числе «среды» в каждом случае) относятся к питательному раствору, который поддерживает культивирование и/или рост клеток; эти фразы могут использоваться взаимозаменяемым образом.

Термин «комбинирование» относится к смешиванию или подмешиванию ингредиентов
30 в состав среды для клеточной культуры. Комбинирование может выполняться в жидкости или порошке, или с одним или более порошками и одной или более жидкостями. В другом примере два или более порошкообразных компонента могут быть подмешаны и затем агломерированы для получения сложной смеси, такой как среда, добавка среды, подгруппы среды или буферы.

35 Термин «размер частицы» относится к размеру (который может представлять собой распределение) слоистых частиц, определенному посредством «ситового» измерения. В варианте реализации приблизительный размер слоистой частицы или базовой гранулы может составлять от 0,05 мм до 7 мм. В предпочтительном варианте реализации размер слоистой частицы или базовой гранулы может составлять от приблизительно 0,05 мм
40 до приблизительно 0,5 мм, от приблизительно 0,05 мм до приблизительно 1 мм, от приблизительно 0,05 мм до приблизительно 2 мм, от приблизительно 0,05 мм до приблизительно 3 мм, от приблизительно 0,05 мм до приблизительно 4 мм, от приблизительно 0,05 мм до приблизительно 5 мм, от приблизительно 0,05 мм до приблизительно 6 мм, от приблизительно 0,05 мм до приблизительно 0,1 мм, от
45 приблизительно 0,05 мм до приблизительно 0,2 мм, от приблизительно 0,05 мм до приблизительно 0,3 мм, от приблизительно 0,05 мм до приблизительно 0,4 мм, от приблизительно 0,1 мм до приблизительно 1 мм, от приблизительно 0,1 мм до приблизительно 2 мм, от приблизительно 0,1 мм до приблизительно 3 мм, от

приблизительно 0,1 мм до приблизительно 4 мм, от приблизительно 0,1 мм до приблизительно 5 мм, от приблизительно 0,1 мм до приблизительно 6 мм, от приблизительно 0,5 мм до приблизительно 1 мм, от приблизительно 0,5 мм до приблизительно 2 мм, от приблизительно 0,5 мм до приблизительно 3 мм, от приблизительно 0,5 мм до приблизительно 4 мм, от приблизительно 0,5 мм до приблизительно 5 мм, от приблизительно 0,5 мм до приблизительно 6 мм, от приблизительно 0,5 мм до приблизительно 7 мм, от приблизительно 1 мм до приблизительно 2 мм, от приблизительно 1 мм до приблизительно 3 мм, от приблизительно 1 мм до приблизительно 4 мм, от приблизительно 1 мм до приблизительно 5 мм, от приблизительно 1 мм до приблизительно 6 мм, от приблизительно 1 мм до приблизительно 7 мм. Еще в одном другом варианте реализации размер слоистой частицы или гранулы может быть больше, чем приблизительно 0,5 мм, размер больше, чем приблизительно 0,4 мм, больше, чем приблизительно 0,3 мм, больше, чем приблизительно 0,2 мм, больше, чем приблизительно 0,6 мм, больше, чем приблизительно 0,7 мм, больше, чем приблизительно 0,8 мм, больше, чем приблизительно 0,9 мм, больше, чем приблизительно 1 мм.

ПРИМЕРЫ

Несмотря на то, что в настоящем документе были показаны и описаны предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что такие варианты реализации представлены лишь в качестве примера. Специалисту в данной области техники теперь будут ясны многочисленные вариации, изменения и замены без выхода за рамки изобретения. Следует понимать, что различные альтернативы вариантов реализации изобретения, описанных в настоящем документе, могут быть реализованы при реализации изобретения на практике. Предполагается, что представленная далее формула изобретения определяет объем изобретения, и что она охватывает способы и структуры, находящиеся в пределах объема данной формулы изобретения и ее эквивалентов.

Пример 1: Пример процесса получения слоистой гранулы среды для клеточной культуры - прототипы А и В (с помощью нижнего распылителя)

Составы гранулы были разработаны и получены способами нанесения слоев с помощью комбинации верхнего распылителя для гранулирования и нижнего распылителя (например, Вурстера) для нанесения покрытия. В одном примере нанесение покрытия нижним распылением выполняли с помощью GPCG 1.1 с 6-дюймовой перегородкой Вурстера, 2-литрового гранулятора/сушилки/устройства для нанесения покрытия. Для нанесения слоя нижним распылением композиция слоя может варьироваться для каждого гранулирования. Например, для прототипов А и В - (см. Фигуры 1a, 1b; 2a, 2b; 3a, 3b). Гранулированная базовая среда для прототипов А и В с использованием SKU PL003021, партия 1024MER1601. Базовую среду получали гранулированием с верхним распылением.

Прототип А наносили слоем следующим образом: Раствор #1 (витамин В-12), SKU PL003023, партия 1101MER1601.

Применение распыляемого раствора #1 (использование ~95 мл на партию 200X конц.) Прототип В наносили слоем следующим образом: С помощью раствора #2 (раствор соли NaCl,) SKU PL003024, партия 1101MER1602. С помощью раствора #3 (раствор тиамина HCl) SKU PL003029, партия 1109MER1601. Применение распыляемого раствора #2 (использование ~38 мл на партию 500X конц.) с последующим распыляемым раствором #3 (использование ~38 мл на партию 500X конц.). Завершение с окончательным применением распыляемого раствора #2 (использование ~38 мл на

партию 500X конц.). РЭМ-изображения прототипов А и В показаны на Фигурах 2а и 2b. РЭМ высушенного слоистого продукта показывает Прототип А (нижнее распыление) с более гладкой поверхностью по сравнению с гранулированным базовым порошком (верхнее распыление). При РЭМ Прототипа В покрытая поверхность является грубой по сравнению с гранулированным базовым порошком (верхнее распыление) возможно ввиду того, что наружным слоем является слой соли (NaCl).

Пример 2: Сравнение жизнеспособности и роста клеток при оценке повторно растворенной слоистой сырьевой среды

Сравнение жизнеспособности и роста клеток при оценке повторно растворенной слоистой сырьевой среды (испытание= испытан Прототип А) относительно регулярной сырьевой среды с положительным контролем (см. Фигуры 3а и 3b). Для данной оценки линию клеток DG44-IgG культивировали в CD- СНО (среда) # 12490 с эффективным сырьем В (добавкой) #A2530 (положительный контроль); тогда как при испытании повторно растворяли слоистую сырьевую среду (Прототип А); а отрицательный контроль=среда, снабженная глюкозой.

Все клетки были разделены на последующие пассажы следующим образом: 3 последующих пассажа для 3 дней; затем клетки из каждого последующего пассажа разделяли на 3×10^5 жизнеспособных клеток/мл. На 4^М последующем пассаже по прошествии 3 дней отбирали суточное количество клеток. Все испытуемые и контрольные сырьевые среды растворяли в жидкости, а затем стерильно фильтровали. Как видно из Фигур 3а и 3b, Прототип А продемонстрировал высокий % жизнеспособности по сравнению с клеточной культурой с добавленной неслоистой сырьевой средой положительного контроля. Касательно роста клеток, Прототип А продемонстрировал количества жизнеспособных клеток, составляющие $\sim 6.6 \times 10^6$ клеток /мл (рост), то есть лишь немного меньшие количества, чем клеточная культура с добавленным сырьем положительного контроля ($\sim 7.5 \times 10^6$). Для сравнения, анализ клеточной культуры без добавки может быть маркирован как сырье глюкозы (отрицательный контроль).

Пример 3: Пример процесса производства слоистых гранул среды/сырья для клеточной культуры

Составы гранулы были разработаны и получены способами нанесения слоев, используя комбинацию верхнего распылителя для гранулирования и нижнего распылителя (Вурстера) для нанесения покрытия. См. Фигуры 4, 5а и 5b.

Базовый порошок содержит аминокислоты, d-глюкозу, соляные буферы и отобранные витамины (SKU 12681).

Порошок смешивали, например, с помощью смесителя (4qt), гранулировали с помощью растворителя (например, воды), используя процесс верхнего распыления (см. Таблицу 1) и с оборудованием, включающим, но без ограничения, например, Niro MP-1, перильстатический насос, Quadro Comil U5; затем измельчали, например, с помощью Fitzmill L1A. Здесь базовый порошок гранулировали перед нанесением слоев, однако гранулирование базового порошка может не являться обязательным этапом. При гранулировании можно использовать верхнее распыление, нижнее распыление или тангенциальное распыление. Нанесение слоев, как правило, может выполняться с помощью нанесения слоев нижним распылением, а композиция слоя может варьироваться для каждого гранулирования. См. Таблицу 1 ниже для параметров гранулирования верхним распылением, и см. Фигуры 4-11.

Таблица 1: Примеры параметры гранулирования верхним распылением

Состав	Размер партии (г)	Исходные параметры гранулирования	Параметры гранулирования по прошествии 7 мин	Параметры гранулирования по прошествии 20 мин	Параметры гранулирования по прошествии 30 мин
1	1312	Температура слоя: 44°C Поток газа: 20 куб. метров в час T _{дна} выходе: 5°C LOD слоя: 0,7 вес. %	Температура слоя: 30°C Поток газа: 75 куб. метров в час T _{дна} выходе: 13,5°C LOD слоя: 2,2 вес. %	Температура слоя: 34,5°C Поток газа: 60 куб. метров в час T _{дна} выходе: 14,7°C LOD слоя: 2,2 вес. %	Температура слоя: 39°C Поток газа: 60 куб. метров в час T _{дна} выходе: 10°C LOD слоя: 1,7 вес. %
2	1437	Температура слоя: 44°C Поток газа: 20 куб. метров в час T _{дна} выходе: 3°C LOD слоя: 0,7 вес. %	Температура слоя: 31°C Поток газа: 75 куб. метров в час T _{дна} выходе: 13,5°C LOD слоя: 2,8 вес. %	Температура слоя: 34°C Поток газа: 60 куб. метров в час T _{дна} выходе: 11°C LOD слоя: 2,3 вес. %	Температура слоя: 36°C Поток газа: 60 куб. метров в час T _{дна} выходе: 6°C LOD слоя: 1,9 вес. %

Гранулированные базовые порошки подвергали анализу размера частиц и РЭМ-анализу (см. Фигуры 6а и b; 7а и b; и 8а и b). Примерами параметров процесса, которые могут быть использованы для получения гранулы, являются следующие; см. Таблицу 2:

Таблица 2: Параметры процесса			Значение	Единица
Скорость потока псевдооживленного воздуха			45	Куб. фут/мин
Температура на входе (процесса)			50	°C
Точка конденсации на входе			<5	°C
Скорость распыления жидкости			5 +/- 0,5	г/мин
Давление воздуха при распылении			1,1	бар
Температура слоя			35 +/- 2	°C
Точка конденсации на выпуске			<10	°C
Параметр продукта			Значение	Единица
Целевая температура продукта			< 40	°C
% окончательной влажности			<2,5	%

В Таблице 2 (выше) нанесение покрытия нижним распылением выполняли с помощью Niro MP-1 с 6-дюймовым резервуаром, форсункой Schlick 970 и 1,2 мм наконечником для жидкости (диапазон 0,5-4,0 мм). Форсунку фиксировали на 4 см над основанием с воздушным промежутком колонны, составляющим 20 мм (диапазон). Покрытие наносили 7 раз для состава 1 и 8 раз для состава 2. Все запуски нанесения покрытия проводили на протяжении по меньшей мере 20 минут для обеспечения равномерного покрытия. Между каждым нанесением покрытия линии промывали 5 мл воды. В конце запуска имел место 10-минутный этап сушки при выключенной форсунке и температурой на входе, установленной на 40°C.

Покрытие наносили 7 раз для состава 1 и 8 раз для состава 2. Схематическая диаграмма для каждого слоя, распыленного для составов 1 и 2, показана на Фигурах 5а и 5b, а описание также представлено ниже в Таблице 3.

Таблица 3: Описание составов 1 и 2: Содержание базовых гранул и покрытия, которые распыляли.

Описания приведены в отношении каталога Thermo Fisher (каталога смесей) CD OptiCHO AGT SKU# A11222-05.

	Состав 1		Состав 2	
	Описание	Общий вес. %	Описание	Общий вес. %
База	•Удаление cys, цистеина (cys2), met •Удаление алифатических аминокислот3	82%	•Удаление cys, met •Добавление NaCl после гранулирования	94%
Распыляемый раствор 1	•Распыляемый раствор витамина с глутатионом, cys, met •19% cys, 34% met (вес твердых веществ) •11% вес/об твердых продуктов в воде	0,7%	•Распыляемый раствор витамина с глутатионом, cys, met •26% cys, 39% met (вес твердых веществ) •11% вес/об твердых веществ в воде	0,7%

5	Распыляемый раствор 2	•Нейтральный распыляемый раствор с сульфатом декстрана, cys, met •3,1% cys, 5,7% met (вес твердых веществ) •8,8% вес/об твердых веществ в воде	0,6%	•Спиртовой раствор •0,11% вес/об твердых веществ в 60% EtOH/вода	0,01%
	Распыляемый раствор 3	•Спиртовой распыляемый раствор с cys, met •12% cys, 22% met (вес твердых веществ) •0,16% вес/об твердых веществ в 60% EtOH/вода	0,01%	•Нейтральный распыляемый раствор с сульфатом декстрана, cys, met •8,8% вес/об твердых веществ в воде	0,5%
	Распыляемый раствор 4	•Алифатические аминокислоты •4,9% вес/об твердых веществ в воде	3,5%	•Амины с cys и met •20% cys, 36% met (вес твердых веществ) •11% вес/об твердых веществ в воде	0,7%
10	Распыляемый раствор 5	•Распыляемый раствор хелатора железа •0,31% вес/об твердых веществ в воде	0,02%	•Распыляемый раствор хелатора железа •0,31% вес/об твердых веществ в воде	0,02%
	Распыляемый раствор 6	•Распыляемый раствор А с микроэлементами •0,15% вес/об твердых веществ в воде	0,01%	•Распыляемый раствор А с микроэлементами •0,15% вес/об твердых веществ в воде	0,01%
	Распыляемый раствор 7	•Распыляемый раствор В с микроэлементами •5е-3% вес/об твердых веществ в воде	0,0002%	•Распыляемый раствор В с микроэлементами •5е-3% вес/об твердых веществ в воде	0,0002%
15	Распыляемый раствор 8	•Алифатические аминокислоты с cys и met •3,7% cys, 6,7% met (вес твердых веществ) •5,5% вес/об твердых веществ в воде	3,9%		--
	Смесь	• Смесь из каталога	9,5%	• Только плороник F68	3,9%

Для состава 1: Концептуальная разработка #1: для достижения защиты чувствительной группы с помощью нанесения слоев (покрытия) способом нижнего распыления

20 (многослойных, с множеством ингредиентов), он состоит из следующих слоев:

Базовые ингредиенты гранулирования (например, D-глюкоза, соли, аминокислоты, буферы и некоторые витамины), покрытые первым слоем антиоксидантов («Ядро»). Затем они покрыты вторым слоем нутриентов, которые обладают антиоксидантными свойствами. Далее идет третий слой, который содержит чувствительные нутриенты (т.е. 25 концентрация снижается в результате гамма-облучения), смешанные с антиоксидантными нутриентами. Затем может быть нанесен четвертый слой в виде барьера для отделения чувствительных ингредиентов от остальных 3 слоев, которые включают: слой соли, дополнительный барьерный разделительный слой, внешний антиоксидантный слой («Оболочка»).

30 В состав 1 входили 8 покрытий с общей толщиной покрытия приблизительно 10 мкм и D50=180 мкм. Ситовый анализ выполняли перед и после нанесения покрытия нижним распылением (см. Фигуры 6а и 7а). Покрытые гранулы имеют средний размер меньше, чем исходные гранулы без покрытия, ввиду трения гранул в ходе процесса. При ситовом анализе использовали, например, просеивающую машину Retsch, однако может быть 35 использована любая машина. Подробности: 8-дюймовые сита, амплитуда 6, импульсами, длительность 6 минут.

Пример прототипа слоистой AGT или слоистой AGT типа «луковая шелуха» получали способом нижнего распыления. Получали прототип слоистой AGT, в котором 40 реакционноспособные группы были сегрегированы/на них были нанесены слои. Способ представлял собой процесс, расширяемый до 1-2 кг. Образование слоев идентифицировали и подтверждали аналитическими способами. Пример прототипа продукта может состоять из следующих трех слоев: Объемные компоненты гранулирования, Раствор А=Витамины, Раствор В (или суспензия)*=антиоксидантный 45 слой аминокислоты (например, цистеин и метионин), Раствор С=микроэлементы (или другие реагирующие с кислородом компоненты). *Примечание - цистеин может быть представлен в виде раствора в одном гранулировании. Цистеин обладает потенциалом образования цистеина (димеризации) в растворе. Один подход для предотвращения образования цистеина может заключаться в представлении цистеина в виде

микроэмульсии при втором гранулировании.

Для состава 2: Концептуальная разработка #2: для достижения сегрегации реакционноспособной группы с помощью нанесения слоев (покрытия) способом нижнего распыления (многослойных, с множеством ингредиентов), он состоит из следующих слоев:

Базовые ингредиенты гранулирования (например, d-глюкоза, соли, аминокислоты, буферы и некоторые витамины). Раствор А содержит чувствительные нутриенты (т.е. концентрация понижается в результате гамма-облучения). Раствор В содержит нутриенты, которые обладают антиоксидантными свойствами. Раствор С содержит нутриенты, которые могут быть реакционноспособными в отношении базовых гранулированных компонентов.

В состав 2 входили 7 покрытий с общей толщиной покрытия приблизительно 5 мкм и D50=180 мкм. Слоистые типа «луковая шелуха» (тонкие слои). Ситовый анализ выполняли перед и после нанесения покрытия нижним распылением (см. Фигуры 6b и 7b).

Пример слоистой среды, состав 2, готовили так, как описано: Объемные компоненты гранулирования - перечень химических веществ среды для этапа гранулирования; 1й внутренний слой; (Витамины с антиоксидантами)=например, Витамины+цистеин- HCl- H₂O+метионин= 2й слой; (Полиамины с антиоксидантами)*=например, цистеин и метионин+полиамины+этанолламин= 3й слой; Соли #1=(Раствор хелатора железа), например, ЭДТК+сульфат железа 7H₂O= 4й слой; Соли #2 (Раствор А с микроэлементами (0116031))=5й слой ; Соли #3 (Раствор В с микроэлементами (0116026))= 6й слой.

Для состава 3: Пример слоистой среды, состав 3 (F3), готовили так, как описано в настоящем документе: Слоистую AGT типа «Ядро-Оболочка» получали способом нижнего распыления (нанесения слоев «Ядро-Оболочка»). Внедрение в практику способа (ов) нанесения слоев микросуспензией (т.е. процесса, расширяемого до 1-2 кг), состав 3 (F3), описан в настоящем документе: Объемные компоненты гранулирования, 1й внутренний слой; Покрытие #2 (Витамины с антиоксидантами)=Витамины+цистеин- HCl- H₂O+метионин=2й слой; (Микросуспензия с антиоксидантами)*=(цистеин и метионин, микронизированные/суспендированные в растворе носителя плуроник/вода или растворе носителя ПЭГ/вода)=3й слой; Соли #1=(Раствор хелатора железа)=ЭДТК+сульфат железа, 7H₂O= 4й слой; Соли #2 (Раствор А с микроэлементами (0116031))=5й слой ; Соли #3 (Раствор В с микроэлементами (0116026))= 6й слой. Или же слои 4, 5 и 6 могут быть скомбинированы.

*Примечание: Цистеин обладает потенциалом образования цистеина (димеризации) в растворе. Один подход для предотвращения образования цистеина может заключаться в представлении цистеина в виде микроэмульсии. Испытание пригодности использования плуроника или ПЭГ в качестве растворителей для микросуспензий, поскольку эти полимеры совместимы с соединениями, растворимыми и не растворимыми в воде.

Процессы составов для растворов для нижнего распыления: Слоистую AGT по типу «луковой шелухи» получали способом нижнего распыления. Этапы приготовления состава 2 (F2)или состава 3 (F3) описаны в настоящем документе. Объемные компоненты гранулирования (внутренней ядро). *Примечание- полиамины с антиоксидантами могут быть представлены в виде раствора, см. ниже. Этап 1. Раствор полиаминов (диапазон pH=6,4-6,6) был предварительно составлен, стерильно отфильтрован (0,2 мкм). Этап 2. Добавление антиоксидантов в раствор полиаминов, приготовленный на этапе 1, перемешивание раствора (магнитной плитой смесителя) до растворения (образуется

прозрачный раствор). Этап 3. Измерение и запись pH прозрачного раствора (диапазон pH 2,0-3,0). Этап 4. Регулирование pH раствора до 6,5-7,5 с помощью 5N NaOH. Раствор должен оставаться прозрачным и может быть использован для получения слоистого гранулирования нижним распылением.

Физические свойства составов 1 и 2

Таблица 4: Состав 1 Физические свойства, толщина покрытия	≈10 мкм
Плотность утряски	0,89
Насыпная плотность	0,82
Индекс Карра	7,9

Таблица 5: Состав 2 Физические свойства, толщина покрытия	≈5 мкм
Плотность утряски	0,84
Насыпная плотность	0,75
Индекс Карра	10,7

Также выполняли сравнение размера базовой гранулированной частицы (Фигуры 9a и b) и размера измельченной базовой гранулированной частицы (Фигуры 10a и b).

Пример 4: Аналитическое испытание состава 1 и 2 перед и после гамма-облучения

Сухую, слоистую среду для клеточной культуры (составы 1 и 2), приготовленная описанными выше способами, дополнительно испытывали на устойчивость к гамма-облучению. Целью данного эксперимента было определение того, может ли быть приготовлена радиационно-стойкая среда путем изменения только условий процесса, здесь, компонентов слоев, наносимых на среду/сырье (т.е. без изменений состава среды для клеточной культуры). Слоистую среду обрабатывали гамма-облучением в диапазон доз от приблизительно 20 кГр до приблизительно 70 кГр, как показано в Таблице ниже. Стойкость полученной в результате слоистой гранулированной среды к гамма-облучению анализировали путем измерения концентрации чувствительных химических маркеров (например, витаминов, таких как тиамин, витамин B-12 и т.д.) перед и после гамма-облучения. Для каждого состава (F1 и F2) и условий гамма-облучения готовили две партии среды 1-L с помощью воды MilliQ. Каждую пробу также испытывали (посредством ВЭЖХ) на триптофан, ниацинамид, фолиевую кислоту, тиамин и витамин B12. В столбце с дозами перечислены средние дозы гамма-облучения, которым подвергали состав для данного исследования. Результаты представлены ниже в Таблице 6 и на Фигуре 11. Кроме того, выполняли физическую характеристику полученных гранул (Таблицы 4 и 5). Было обнаружено, что многокомпонентные среды для клеточных культур, приготовленные с помощью технологий нанесения слоев нижним распылением, дают превосходную равномерность содержания. Было также отмечено, что контролируемое расположение каждого слоя вокруг базового гранулированного порошка обеспечило способ физического разделения реакционноспособных и чувствительных химических веществ внутри одного и того же состава. Сгруппированные слои дополнительно улучшили химическую устойчивость при воздействии со стороны условий, которые вызывали тепловую реакционную способность или разложение, фотохимическую реакционную способность или разложение, индуцированную облучением реакционную способность или разложение.

Таблица 6: Таблица анализа облучения (дозы в кГр)

% остатка						
Проба	Доза	L-триптофан	Ниацинамид	Фолиевая кислота	Тиамин HCl	B ₁₂
Состав 1-0	0	100%	100%	100%	100%	100%
Состав 1-2	25	100%	97%	95%	94%	78%

Состав 1-1	35	100%	99%	96%	96%	73%
Состав 1-3	65	99%	101%	96%	95%	64%
Состав 2-0	0	100%	100%	100%	100%	100%
Состав 2-1	25	102%	97%	94%	95%	73%
Состав 2-2	35	101%	98%	95%	94%	69%
Состав 2-3	65	99%	98%	94%	91%	56%
Каталог-0	0	100%	100%	100%	100%	100%
Каталог-1	25	100%	100%	99%	96%	72%
Каталог-2	35	101%	99%	100%	96%	67%
Каталог-3	65	100%	99%	99%	93%	51%

Резюме Таблицы 6 и других анализов составов 1 и 2: Тиамин разложился до 9% дозозависимым образом, а витамин B12 разложился вплоть до 49% дозозависимым образом. Разложение тиамина и витамина B12 показано на Фигуре 11. Разложение витамина B12 при 60-70 кГр было уменьшено на 18% и 26% относительно контроля из каталога для составов 1 и 2 соответственно (Защита чувствительных к гамма-облучению нутриентов в слоистых гранулированиях). Обработка гамма-облучением- AGT контроль CD OptiCHO из каталога, состав 1 и состав 2 доставляли, например, в Steris для обработки гамма-облучением. Все пробы хранили при 5°C и доставляли и облучали при температуре сухого льда (-78°C). Каждый состав разделяли на четыре партии и хранили (а) при 5°C или (b) облучали общей дозой, составляющей (b) 20-30 кГр, (c) 30-40 кГр или (d) 60-70 кГр.

Уровни анализа триптофана и ниацинамина находились в пределах 3% необлученной среды для всех испытанных уровней облучения. Содержание фолиевой кислоты находилось в пределах 6% необлученной среды для всех доз облучения. Обработка гамма-облучением- AGT контроль CD OptiCHO из каталога, состав 1 и состав 2 доставляли, например, в Steris для обработки гамма-облучением. Все пробы хранили при 5°C и доставляли и облучали при температуре сухого льда (-78°C). Каждый состав разделяли на четыре партии и хранили (а) при 5°C или облучали общей дозой, составляющей (b) 20-30 кГр, (c) 30-40 кГр или (d) 60-70 кГр.

Процессы, описанные выше, применимы для культивирования клеток любого типа: млекопитающих, бактерий, насекомых, грибов и т.д., которые получают свою поддержку нутриентами из разведенной слоистой среды для клеточной культуры в сухом виде, описанной в настоящем описании. Как описано в некоторых вариантах реализации выше, в объем изобретения также включено применение слоя, состоящего из ингредиентов, представленных в виде микросуспензии, или в виде покрытия для гранулированной среды для клеточной культуры. Широкий ряд перестановок, при которых ингредиенты среды для клеточной культуры могут быть сгруппированы, разделены или иным образом упорядочены внутри слоев вокруг любой порошкообразной среды/сырья для клеточной культуры, или гранулированная среда/сырье для клеточной культуры делает данную методологию полезной для широкого разнообразия применений, таких как для увеличения тепловой устойчивости, стойкости к облучению, модифицированным профилям растворимости и т.д., как будет явным образом понятно специалисту в данной области техники.

(57) Формула изобретения

1. Способ получения слоистой среды или сырьевой композиции для клеточной культуры, включающий:

i) подвергание сухого порошка исходной композиции среды для культуры клеток суспендированию в подвижной колонке газа в аппарате с псевдоожиженным слоем;

ii) введение по меньшей мере одного растворителя с растворенным в нем компонентом или смесью компонентов среды, слой которого подлежит нанесению с помощью распылителя в сухой порошок этапа (i) для образования слоистой базовой частицы; и

5 (iii) сушку слоистой базовой частицы, где каждый растворитель имеет один компонент или одни и те же компоненты; или каждый растворитель имеет разные компоненты; или каждый растворитель имеет смесь компонентов;

где компоненты распадаются на реакционноспособные виды и на чувствительные виды, которые распыляют отдельно для получения слоистой базовой частицы;

10 где реакционноспособные виды и чувствительные виды являются компонентами среды, которые нежелательно взаимодействуют друг с другом, и где слоистая базовая частица представляет собой компонент среды с нанесенным покрытием с помощью по меньшей мере одного растворителя с растворенным компонентом или смесью компонентов среды и представляет собой слоистую среду или сырьевую композицию для клеточной культуры.

15 2. Способ получения слоистой среды или сырьевой композиции для клеточной культуры, включающий:

i) подвергание сухого порошка исходной композиции среды для культуры клеток суспендированию в подвижной колонке газа в аппарате с псевдоожиженным слоем;

20 ii) введение первого растворителя с растворенным в нем компонентом или смесью компонентов среды, слой которого подлежит нанесению с помощью первого распылителя на сухой порошок этапа (i) для образования базовой гранулы;

iii) введение по меньшей мере одного второго растворителя с помощью второго распылителя на базовую гранулу этапа (ii) для образования слоистой базовой гранулы;

25 и

iv) сушку слоистой базовой гранулы, где каждый растворитель имеет один компонент или одни и те же компоненты; или каждый растворитель имеет разные компоненты; или каждый растворитель имеет смесь компонентов;

30 где компоненты распадаются на реакционноспособные виды и на чувствительные виды, которые распыляют отдельно для получения слоистой базовой гранулы;

где реакционноспособные виды и чувствительные виды являются компонентами среды, которые нежелательно взаимодействуют друг с другом, и где слоистая базовая гранула представляет собой компонент среды с нанесенным покрытием с помощью по меньшей мере одного растворителя с растворенным компонентом или смесью 35 компонентов среды и представляет собой слоистую среду или сырьевую композицию для клеточной культуры.

3. Способ получения слоистой среды или сырьевой композиции для клеточной культуры по п. 1 или 2, отличающийся тем, что сухой порошок представляет собой порошок базальной среды, порошок полной среды, сырье для клеточной культуры, 40 добавку для клеточной культуры, среду для клеточной культуры, или сырьевой концентрат, или смесь аминокислот, или где сухой порошок выбирают из группы, состоящей из витаминов, объемных неорганических солей и сахаров.

4. Способ получения слоистой среды или сырьевой композиции для клеточной культуры по п. 1, отличающийся тем, что первый распылитель выбирают из группы, 45 состоящей из верхнего распылителя, нижнего распылителя и тангенциального распылителя, и/или дополнительно содержащий второй распылитель, который распыляет множество растворителей на базовую частицу для образования многослойной базовой частицы.

5. Способ получения слоистой среды или сырьевой композиции для клеточной культуры поп. 2 или 3, отличающийся тем, что первый или второй распылитель выбирают из группы, состоящей из верхнего распылителя, нижнего распылителя и тангенциального распылителя, и/или где второй распылитель является нижним распылителем; и/или где второй распылитель распыляет множество растворителей на базовую гранулу для образования многослойной базовой гранулы.

6. Способ получения слоистой среды или сырьевой композиции для клеточной культуры по любому из предыдущих пунктов, где второй распылитель распыляет множество растворителей последовательно с чередующимися этапами сушки между каждым этапом распыления и/или где второй распылитель распыляет множество растворителей последовательно без чередующихся этапов сушки между каждым этапом распыления.

7. Способ по любому из предыдущих пунктов, где указанные реакционноспособные виды выбирают из группы, состоящей из одного или более микроэлементов, одной или более реакционноспособных аминокислот, одной или более солей металлов, одной или более растворимых в кислоте реакционноспособных групп, одной или более растворимых в спирте реакционноспособных групп и одной или более групп модификатора pH.

8. Способ по любому из предыдущих пунктов, где указанные чувствительные виды выбирают из группы, состоящей из одного или более полиаминов, одного или более витаминов, одного или более усиливающих рост веществ и одной или более лабильных аминокислот, необязательно где один или более витамины выбирают из группы, состоящей из: витамина B₁₂, биотина, холина, фолиевой кислоты, ниацинамида, пиридоксина, рибофлавина, тиамина, аскорбиновой кислоты и парааминобензойной кислоты (ПАБК).

9. Способ получения слоистой среды или сырьевой композиции для клеточной культуры по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что приблизительная температура входного газа, используемого в способе, составляет от 20 до 30°C, необязательно приблизительно 25°C.

10. Способ получения слоистой среды или сырьевой композиции для клеточной культуры по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что температура этапа сушки составляет приблизительно 50°C-60°C.

11. Способ получения слоистой среды или сырьевой композиции для клеточной культуры по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что слоистую базовую частицу или слоистую базовую гранулу сушат до приблизительного содержания влаги от 0,5% до 10%.

12. Способ получения слоистой среды или сырьевой композиции для клеточной культуры по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что растворитель содержит реакционноспособные виды.

13. Способ получения слоистой среды или сырьевой композиции для клеточной культуры по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что растворитель дополнительно содержит по меньшей мере один антиоксидант.

14. Способ получения слоистой среды или сырьевой композиции для клеточной культуры по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что инертные компоненты и/или гасители, такие как антиоксиданты, смешивают с чувствительными компонентами, и/или реакционноспособные компоненты, или инертные компоненты и/или гасители, такие как антиоксиданты, наносят слоями между реакционноспособным и чувствительным слоем.

15. Способ получения слоистой среды или сырьевой композиции для клеточной культуры по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что компоненты в слоистой базовой грануле или слоистой базовой частице сегрегированы или сгруппированы в соответствии с их химической реактивностью/свойствами; их подверженностью тепловым повреждениям или повреждениям излучением, или фотохимическим повреждениям, или в соответствии с их растворимостью в растворителе.

16. Слоистая среда для клеточной культуры, полученная способом по любому из пп. 1-15, где указанная слоистая среда для клеточной культуры представлена одной или более слоистыми базовыми частицами или слоистыми базовыми гранулами размером от 0,05 мм до 7 мм.

17. Сырьевая композиция для клеточной культуры, полученная способом по любому из пп. 1-15, где указанная сырьевая композиция для клеточной культуры представлена одной или более слоистыми базовыми частицами или слоистыми базовыми гранулами размером от 0,05 мм до 7 мм.

18. Способ культивирования клетки в жидкости, разведенной из слоистой среды или сырьевой композиции для клеточной культуры, полученной согласно способу по п. 1 или 2, включающий:

i) разведение слоистой базовой частицы или слоистой базовой гранулы в подходящей жидкости или буфере; причем указанная слоистая базовая частица или слоистая базовая гранула представляет собой слоистую среду или сырьевую композицию для клеточной культуры; и

ii) культивирование клетки в разведенной жидкости при условиях, подходящих для роста клетки.

19. Способ культивирования клетки по п. 18, отличающийся тем, что культивирование используют для получения увеличенного количества полипептида.

20. Способ культивирования клетки по пп. 18-19, отличающийся тем, что полипептид представляет собой рекомбинантный полипептид.

21. Способ культивирования клетки по пп. 18-20, отличающийся тем, что культивирование увеличивает выход продукта и/или рост клеток по сравнению с культурой с жидкой средой, выполненной не из слоистой среды или сырьевой композиции для клеточной культуры.

22. Набор для культивирования клетки, содержащий:

i) первый контейнер, содержащий слоистую среду или сырьевую композицию для клеточной культуры, полученную способом по любому из пп. 1-15; и

ii) инструкции по применению слоистой среды или сырьевой композиции для клеточной культуры.

23. Система для культивирования клетки, содержащая жидкую среду, разведенную из слоистой среды или сырьевой композиции для клеточной культуры, полученной согласно способу по пп. 1-15, и клетку.

24. Система по п. 23, отличающаяся тем, что разведенная жидкая среда используется для культивирования клетки, которая продуцирует рекомбинантный полипептид, вирус, секретируемый белок, или для культивирования клетки в суспензии или клетки, которая является закрепленной.

25. Способ получения слоистой среды или сырьевой композиции для клеточной культуры по любому из пп. 1-15, или набор по п. 22, или система по пп. 23-24, причем аминокислоты выбраны из одной или более из двадцати аминокислот, их солей или их производных.

26. Способ получения слоистой среды или сырьевой композиции для клеточной

культуры по любому из пп. 1-15, или набор по п. 22, или система по пп. 23-24, причем аминокислоты выбраны из одного или более глицина, аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, гистидина, изолейцина, метионина, фенилаланина, пролина, гидроксипролина, серина, треонина, триптофана, валина, тирозина, цистеина и лизина.

27. Применение слоистой среды или сырьевой композиции для клеточной культуры, полученной способом согласно любому из пп. 1-15, 25, 26, для культивирования клетки.

28. Применение по п. 27, отличающееся тем, что клетка представляет собой клетку млекопитающего.

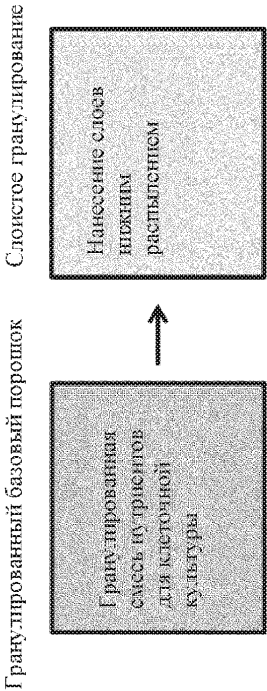
29. Применение по пп. 27-28, отличающееся тем, что клетка выбрана из группы, состоящей из клеток CHO, ВНК, НЕК 293 и VERO.

30. Применение по пп. 27-28, отличающееся тем, что клетка представляет собой растительную клетку, животную клетку, эукариотическую клетку, клетку водоросли, клетку гриба и бактериальную клетку.

1

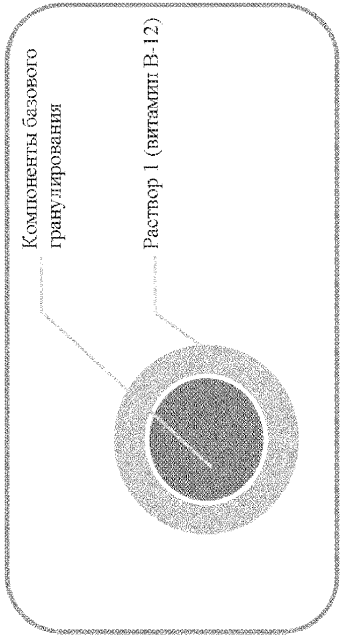
1/21

Фигура 1. Пример процесса I получения составов слоистой гранулы для культуральной среды



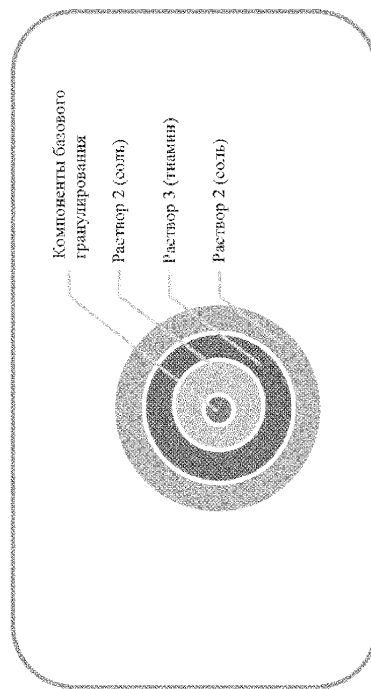
2

Фигура 1а: Прототип-А слоистой гранулы (с одним слоем, с одним ингредиентом)



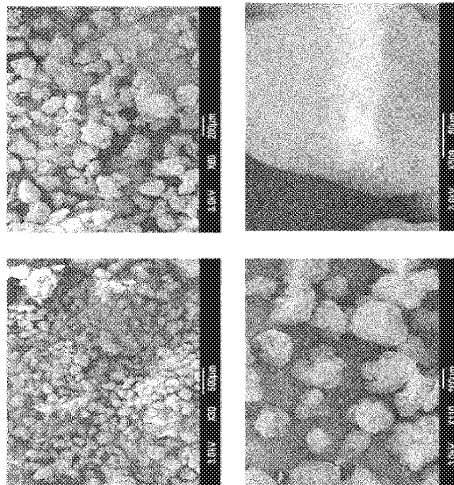
3/21

Фигура 1б: Прототип-В слоистой гранулы
(многослойная, один компонент в каждом слое)



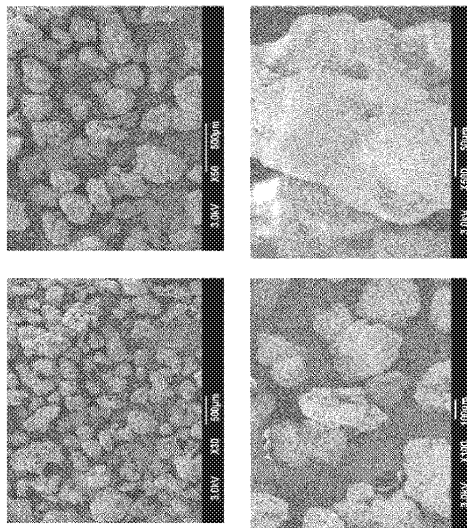
4/21

Фигура 2а: РЭМ-изображения Прототипа-А слоистой гранулы (с одним слоем, с одним ингредиентом)



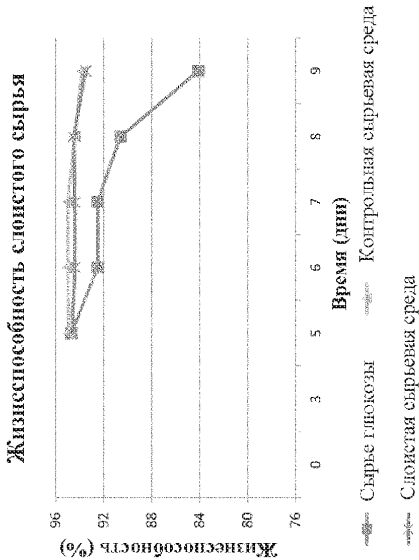
5/21

Фигура 2b: РЭМ-изображения Прототипа-В слонистой гранулы (многослойная, с одним ингредиентом)

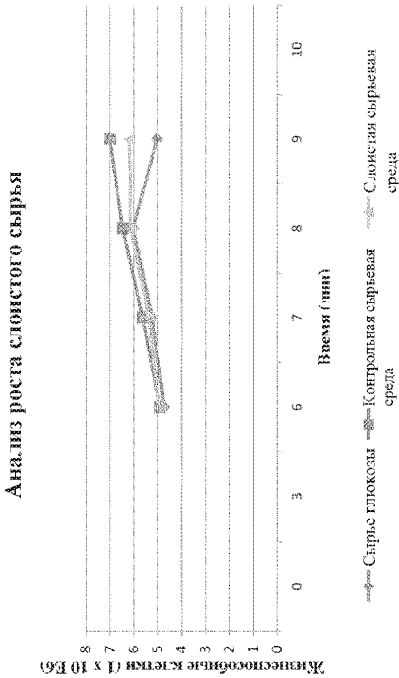


6/21

Фигура 3а: Анализ жизнеспособности слоистой клетки сырья прототипа А

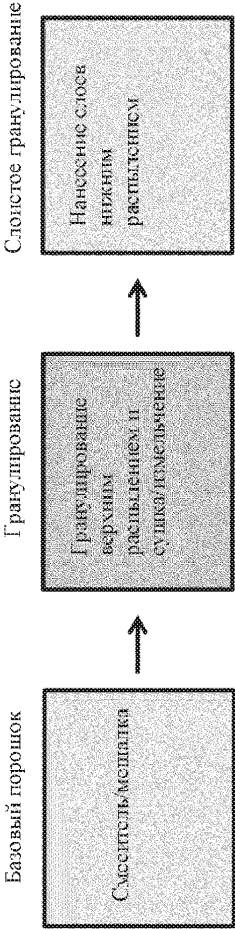


Фигура 3b: Анализ роста слоистой клетки сыра
прототипа А

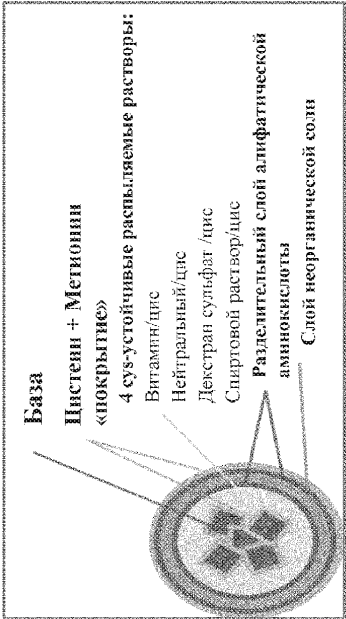


8/21

Фигура 4: Пример процесса 2 получения слоистых гранул среды/сырья для клеточной культуры

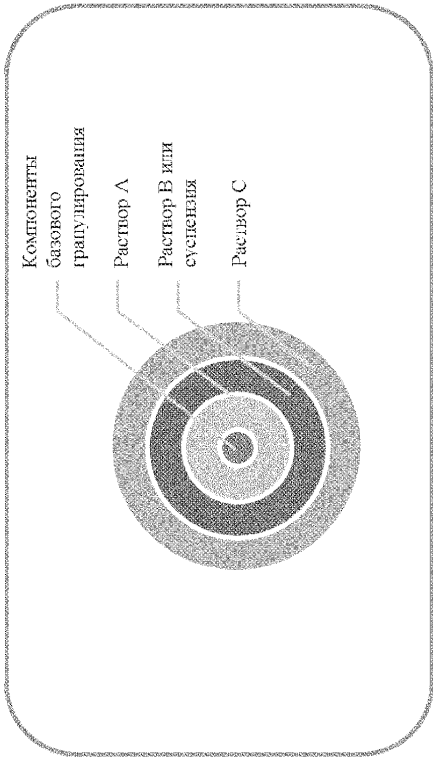


Фигура 5а. Слоистые гранулы среды для клеточной культуры-Состав 1



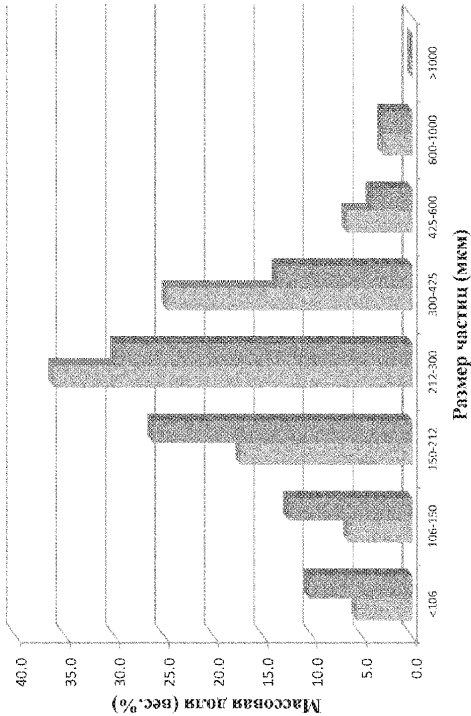
10/21

Фигура 5b. Слоистые гранулы среды для клеточной культуры-Состав 2



11/21

Фигура 6а: Анализ размера частиц состава I

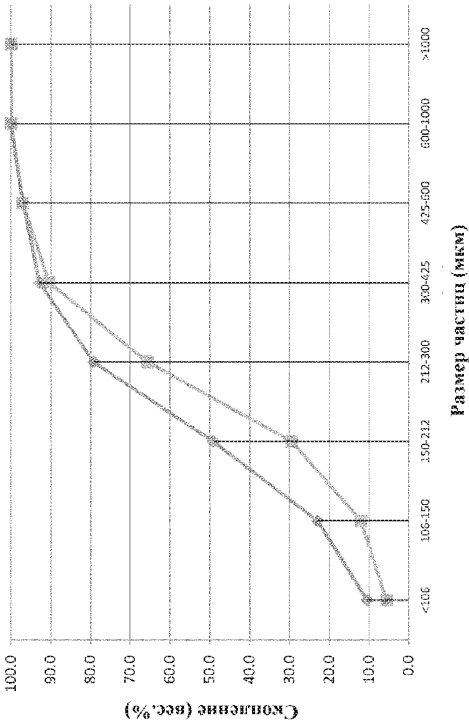


12/21

Фигура 6b: Анализ размера частиц состава 2

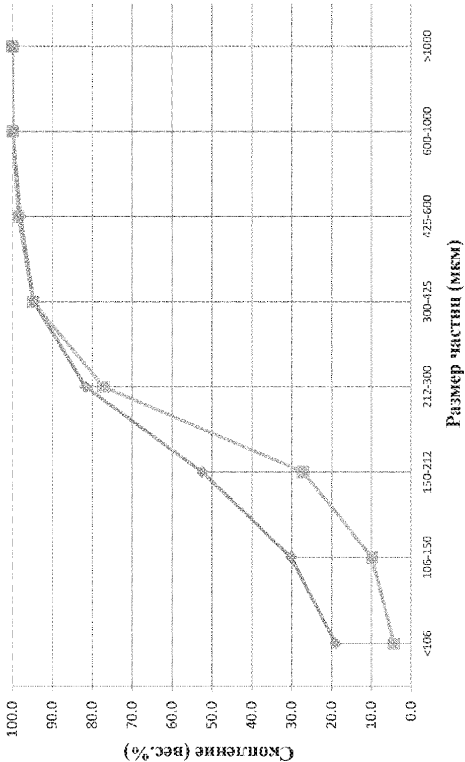


Фигур 7а: кумулятивный анализ размера частиц состава I



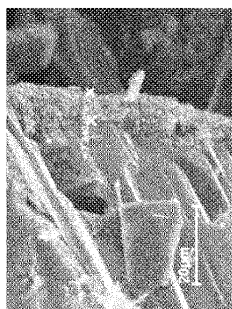
14/21

Фигура 7б: Кумулятивный анализ размера частиц состава 2

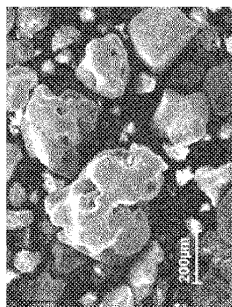


15/21

Фиг. 8а. РЭМ состава 1



1500X РЭМ



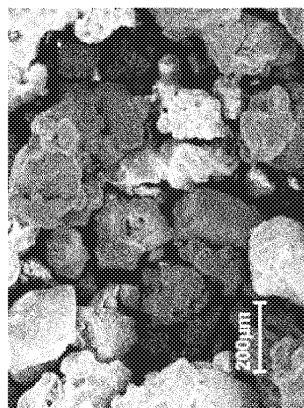
100X РЭМ

16/21

Фигура 8b: РЭМ состава 2

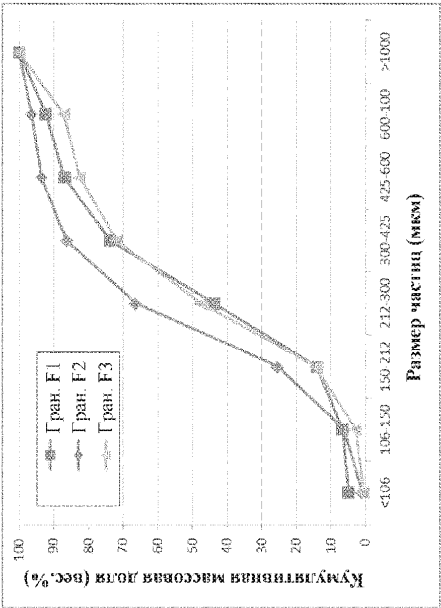


1500X

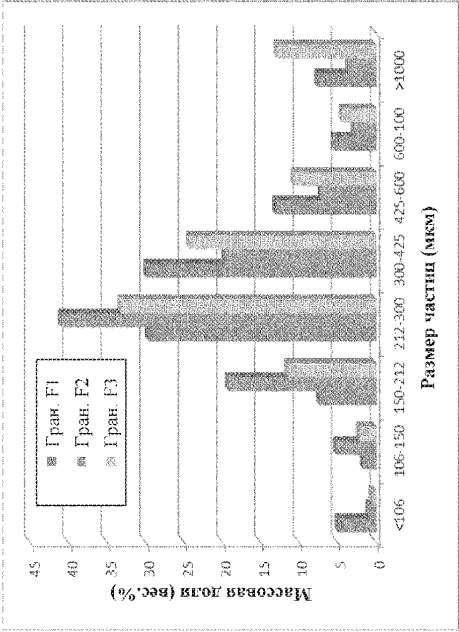


100X

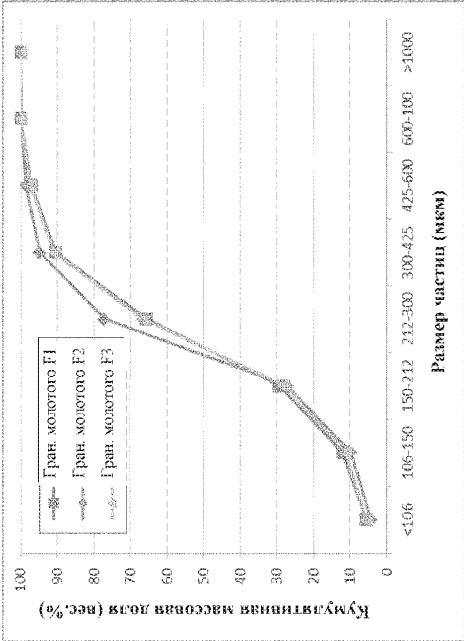
Фигура 9а. Анализ размера частиц гранулированных базовых порошков



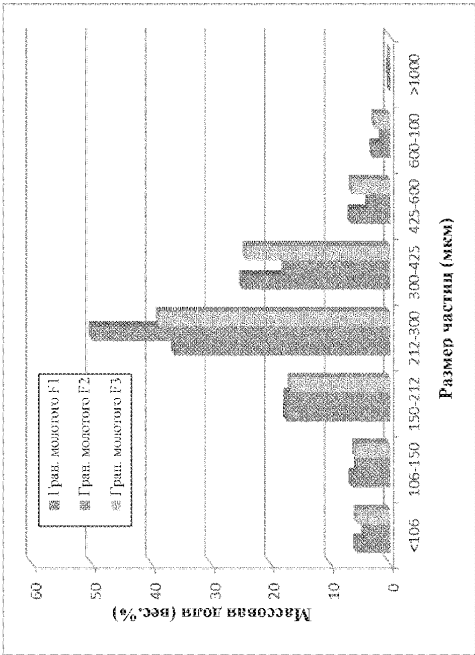
Фиг. 9b: Гистограмма анализа размера частиц гранулированных базовых порошков



Фиг. 10а: Анализ размера молотых частиц гранулированных базовых порошков



Фиг. 10b: Гистограмма анализа размера молотых частиц гранулированных базовых порошков



21/21

Фигура 11: Распад питательных веществ в слоистых гранулированных, индуцированный облучением

