

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202490625 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.05.20

(51) Int. Cl. G01N 33/487 (2006.01)  
C12M 1/42 (2006.01)  
G01N 3/317 (2006.01)  
G01N 3/42 (2006.01)  
G01Q 60/36 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.09.30

(54) СПОСОБЫ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАПРЯЖЕНИЯ СДВИГА НА КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

(31) 63/251,169

(72) Изобретатель:  
О'Шей Иан, Кроули Джон, Пауэр  
Мартин, Ронан Алан (US)

(32) 2021.10.01

(33) US

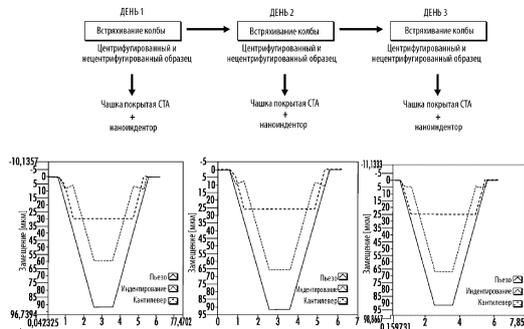
(86) PCT/US2022/045387

(87) WO 2023/056017 2023.04.06

(74) Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:  
РИДЖЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(57) В данном документе предложены способы характеристики механических свойств клеток при различных уровнях стресса. Раскрытые способы позволяют определить влияние напряжения сдвига на клетки в способах биопроизводства.



202490625

A1

A1

202490625

## **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

2420-580969EA/055

### **СПОСОБЫ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАПРЯЖЕНИЯ СДВИГА НА КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

Данная заявка испрашивает преимущества и приоритет предварительной заявки на патент США № 63/251169, поданной 1 октября 2021 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

#### **ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Данное изобретение в целом относится к системам и способам характеристики воздействия напряжения сдвига на клетки.

#### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Гидродинамические силы, создаваемые процессами биопроизводства и способами культивирования клеток, могут иметь пагубные последствия для целостности клеток, продукции рекомбинантных белков и общей жизнеспособности клеточной линии. Таким образом, в данной области существует потребность в количественной оценке воздействия гидродинамических сил, например, напряжения сдвига, на клеточные линии.

Таким образом, целью данного изобретения является создание способов определения чувствительности клеток к изменяющейся степени напряжения сдвига. Данное изобретение дополнительно предполагает использование результатов количественного определения напряжения сдвига для информирования и улучшения процесса биопроизводства.

#### **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Данное изобретение раскрывает способы количественной оценки воздействия напряжения сдвига на клетки. В вариантах реализации, раскрытых в данном документе, данное изобретение включает этапы воздействия на иммобилизованные клетки силами, вызывающими напряжение сдвига, и наноиндентирование иммобилизованных клеток для определения их механических свойств при различных уровнях напряжения.

В некоторых вариантах реализации, раскрытых в данном документе, клетки представляют собой клетки млекопитающих. В дополнительных вариантах реализации клетки млекопитающих представляют собой клетки яичника китайского хомячка (СНО), клетки почки детеныша хомячка (ВНК), клетки почки эмбриона человека 293 (НЕК293), клетки HeLa, клетки рег.сб, несекретирующие клетки миеломы мыши (NSo) и клетки миеломы мыши Sp2/0. В дополнительных вариантах реализации клетки представляют собой суспензионные клетки.

В дополнительных вариантах реализации клетки представляют собой суспензионные клетки. В еще одном варианте реализации клетки иммобилизуют с помощью клея для клеток и тканей (СТА). В некоторых вариантах реализации клеем для клеток и тканей является Cell-Tak. В некоторых вариантах реализации, описанных в данном документе, клетки представляют собой СНО клетки.

В некоторых вариантах реализации, раскрытых в данном документе, силы, которые вызывают напряжение сдвига в клетках, создаются путем перемешивания колбы встряхиванием. В другом варианте реализации силы, которые вызывают напряжение сдвига в клетках, создаются системой жидкостного насоса. В еще одном варианте реализации силы, которые вызывают напряжение сдвига в клетках, создаются за счет перемешивания биореактора.

В нескольких вариантах реализации, раскрытых в данном документе, наноиндентирование клеток осуществляют наноиндентором. В некоторых вариантах реализации наноиндентор содержит оптический зонд. В некоторых вариантах реализации оптический зонд содержит кантилевер. В одном варианте зонд механически опускают с заранее калиброванного расстояния к поверхности клеток. В аналогичных вариантах реализации зонд опускают механически на период около двух секунд.

В некоторых вариантах реализации, раскрытых в данном документе, клетка оказывает силу на кантилевер при контакте с кантилевером, вызывая изгиб кантилевера. В аналогичных вариантах реализации кантилевер находится в контакте с клеткой от около одной секунды до около пяти секунд.

В некоторых вариантах реализации, раскрытых в данном документе, кантилевер находится в контакте с клеткой в течение около шести секунд. В аналогичных вариантах реализации кантилевер генерирует возрастающие частоты колебаний около  $1F$  Гц, около  $2F$  Гц, около  $4F$  Гц и около  $10F$  Гц. В дополнительном варианте реализации частота колебаний не генерируется в течение периода около двух секунд между каждым увеличением частоты колебаний.

В еще одном варианте реализации способов, раскрытых в данном документе, наноиндентор подвергает клетки около шести циклам наноиндентирования. В аналогичных вариантах реализации каждое последующее наноиндентирование располагается на около  $2$  мкм от предыдущего наноиндентирования.

В некоторых вариантах реализации, раскрытых в данном документе, механические свойства клеток определяются после нескольких циклов наноиндентирования. В некоторых вариантах реализации механические свойства клеток включают жесткость клеток. В дополнительных вариантах реализации жесткость клеток измеряют с помощью модуля Юнга ( $Y_M$ ) и эффективного модуля Юнга ( $E_{YM}$ ). В некоторых вариантах реализации  $Y_M$  и  $E_{YM}$  клеток после около 26 часов напряжения сдвига составляет менее чем около  $50 \times$  Па. В других вариантах реализации  $Y_M$  и  $E_{YM}$  клеток после около 46 часов напряжения сдвига составляет менее чем около  $50 \times$  Па. В другом варианте реализации  $Y_M$  и  $E_{YM}$  клеток после 72 часов напряжения сдвига составляет более чем около  $500 \times$  Па.

В нескольких вариантах реализации, раскрытых в данном документе, жесткость клетки определяется путем расчета модуля упругости ( $E'$ ). В некоторых вариантах реализации жесткость клетки определяется путем расчета модуля потерь ( $E''$ ). В некоторых вариантах реализации значение  $E'$  выше значения  $E''$  на частотах около  $1F$ ,

около  $2F$  и около  $10 F$  Гц после по меньшей мере около двух дней перемешивания, что указывает на эластичность клеток. В других определенных вариантах реализации значение  $E''$  выше, чем значение  $E'$  при частоте около  $4F$  Гц после по меньшей мере около двух дней перемешивания, что указывает на вязкость клеток.

Данное изобретение дополнительно предлагает способы получения линии прикрепленных клеток, причем способы включают стадии (a) посева суспензионных клеток в колбы с плотностью посева от около  $2D \times 10^5$  клеток/мл до около  $6D \times 10^5$  клеток/мл; (b) введение в колбы культуральной среды определенного химического состава с добавлением концентрации от около 0,5Y% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) до около 4Y% ФБС; (c) измерение плотности жизнеспособных клеток (VCD) суспензионных клеток с использованием биоанализатора; (d) обеспечение роста клеток до слияния прикрепившихся/суспензионных клеток, составляющего не более 85% общего слияния; (e) пропускание культуральной среды для удаления суспензии клеток из колбы; (f) погружение колбы в фосфатно-буферный раствор (ФСБ); (g) измерение VCD оставшихся прикрепившихся клеток; и (h) повторение этапов b-g в течение по меньшей мере 72 часов и до шести пересевов.

В некоторых аспектах данного изобретения плотность прикрепившихся клеток составляет по меньшей мере  $13,84D \times 10^5$  клеток/мл после шести пересевов.

Другие аспекты данного изобретения, раскрытые в данном документе, описывают клетки, полученные способами, раскрытыми в данном документе.

Данное изобретение дополнительно предлагает способы оптимизации биопроизводства, включающие воздействие на клетки напряжения сдвига, количественную оценку воздействия напряжения сдвига на клетки и использование данных о напряжении сдвига для регулирования уровней силы сдвига, приложенной во время биопроизводства.

В некоторых вариантах реализации оптимизация приводит к увеличению титра и выхода продукта. В другом варианте реализации оптимизация приводит к повышению жизнеспособности клеток. В еще одном варианте реализации оптимизация приводит к повышению качества продукции. В дополнительных вариантах реализации качество продукта определяется эффективностью гликозилирования.

Данное изобретение дополнительно предлагает способы разработки клеточных линий, устойчивых к напряжению сдвига, включающие воздействие на указанные клетки напряжения сдвига до увеличения уровня силы сдвига, количественную оценку воздействия напряжения сдвига на клетки и отбор устойчивых клеток для дальнейшего использования в биопроизводстве.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1А слева показан микроскопический вид образца загрязненной клеточной линии В, который был высеян с плотностью  $4D \times 10^5$  клеток/мл на предметное стекло внутри чашки, и справа - микроскопический вид образца клеточной линии А, который был высеян в количестве  $4D \times 10^5$  клеток/мл на предметное стекло внутри чашки. На Фиг. 1В

слева показан микроскопический вид зонда наноиндентора, демонстрирующий острие кантилевера, и справа - микроскопический вид суспендированных клеток клеточной линии А (ранее адаптированных к прикреплению), фиксирующихся на зонде во время попытки наноиндентирования, особенно вокруг кантилевера.

На Фиг. 2 показано схематическое и микроскопическое изображение сверху вниз клеток, высеянных на покрытие СТА.

На Фиг. 3А представлен обзор экстракции образца в шейкерной колбе и подготовки к наноиндентированию. На Фиг. 3В показаны графики зависимости смещения от времени, полученные при стандартных вдавливаниях в течение шестисекундного периода на трех ежедневных образцах. На Фиг. 3С показан график зависимости смещения от времени в день 1, подчеркивающий первоначальную запись вдавливания. На Фиг. 3D показано сравнение упрощенной схематической кривой нагрузки-вдавливания и кривой, полученной в результате стандартного вдавливания в первый день.

На Фиг. 4А показаны данные зависимости смещения от времени, полученные из углублений на клетках-мишенях, отображающие увеличение частоты (Гц) с течением времени в одной точке поверхности клетки. На Фиг. 4В показана зависимость модуля Юнга от тангенса дельта данных модуля накопления и потерь, полученных с помощью программного обеспечения из эксперимента MIOF.

На Фиг. 5 представлена гистограмма, показывающая средний модуль Юнга (YM) и эффективный модуль Юнга (EYM), зарегистрированный на основе запрограммированной серии из шести вдавливаний на одной целевой клеточной линии А, отобранной в течение трех дней.

На Фиг. 6 представлена схема первоначальных экспериментальных условий прикрепившейся клеточной линии А.

На Фиг. 7 представлен паттерн роста клеток клеточной линии А в течение первых 72 часов, высеянных при трех различных начальных плотностях посева в разных концентрациях ФБС.

На Фиг. 8А представлено схематическое изображение размораживания флакона непосредственно в колбах T75 с концентрациями ФБС 1Y%, 2Y%, 3Y% и 4Y%, при отсутствии ФБС (0% ФБС) в среде, действующей в качестве контроля. На Фиг. 8В представлен график, демонстрирующий плотность жизнеспособных клеток в суспензии и прикрепившихся клеток, присутствующих в семи посевах при отдельных концентрациях ФБС.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### I. Определения

Следует понимать, что данное изобретение не ограничивается описанными в данном документе композициями и способами, а также описанными экспериментальными условиями, поскольку таковые могут варьироваться. Также необходимо понимать, что терминология, применяемая в данном документе, приводится только с целью описания конкретных вариантов осуществления, и не предполагает носить ограничительный

характер, поскольку область настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значение, которое обычно понимается специалистом обычной квалификации в области техники, к которой относится данное изобретение. Хотя любые композиции, способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, могут использоваться при практическом осуществлении или испытании данного изобретения. Все упомянутые публикации включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Применение терминов в единственном числе и подобных ссылок в контексте описания заявленного изобретения (особенно в контексте формулы изобретения) должно толковаться как охватывающее как единственное, так и множественное число, если только иное указано в данном документе или явно противоречит контексту.

Перечисление диапазонов значений в данном документе просто предназначено для использования в качестве сокращенного метода индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в этот диапазон, если иное не указано в данном документе, и каждое отдельное значение включено в спецификацию, как если бы оно было отдельно изложено в данном документе.

Применение буквы «Y» в контексте обозначения процентного содержания фетальной бычьей сыворотки (ФБС) в культуральной среде представляет собой число «3» как множитель, так что, например, 1,5Y% ФБС означает 4,5% ФБС.

Применение буквы «D» в контексте обозначения плотности клеток в культуре клеток представляет собой число «0,25» в качестве множителя, например, 4D x 10<sup>5</sup> клеток/мл означает 1×10<sup>5</sup> клеток/мл.

Применение буквы «Z» в контексте давления представляет собой число «10» как множитель, например, 4Z дин/см<sup>2</sup> означает 40 дин/см<sup>2</sup>.

Применение буквы «X» или «x» в контексте обозначения модуля Юнга или эффективного модуля Юнга представляет число «20» как множитель, так что, например, 0,18X Паскалей (Па) означает 3,6 Паскалей.

Применение буквы «F» в контексте обозначения частоты представляет собой число «1» как множитель, так что, например, 4F Герц (Гц) означает 4 Герца.

Термины «клеточная линия А» и «клеточная линия В», используемые в данном документе, относятся к клеточным линиям яичника китайского хомячка (СНО), которые экспрессируют белки, такие как антитела.

Термин «около» в контексте числовых значений и диапазонов относится к значениям или диапазонам, которые приближаются или близки к указанным значениям или диапазонам, так что данное изобретение может работать, например, иметь искомую скорость, количество, плотность, степень, увеличение, уменьшение, процентное содержание, значение или наличие формы, температуры или количества времени, как очевидно из идей, содержащихся в данном документе. Таким образом, этот термин

охватывает значения, выходящие за рамки тех, которые просто возникают в результате систематической ошибки. Например, «около» может обозначать значения выше или ниже указанного значения в диапазоне прикл. +/- 10% или больше или меньше в зависимости от работоспособности. Предыдущие диапазоны поясняются контекстом, и никаких дополнительных ограничений не подразумевается.

Напряжение сдвига определяется как сила сдвига жидкости, действующая по касательной к поверхности клетки, и выражается как сила на единицу площади (дин/см<sup>2</sup> или Н/м<sup>2</sup>). Напряжение сдвига может быть создано движением возбужденной жидкости мимо статических клеток, перемещением возбужденных клеток через статическую жидкость или движением клеток внутри возбужденной, динамической жидкостной среды. Вязкость жидкости обычно измеряется в пуазах, где 1 пуаз=1 дин-сек/см<sup>2</sup>=100 сантипуаз (сП). Вязкость воды, одной из наименее вязких известных жидкостей, составляет 0,01 сП. Вязкость типовой суспензии эукариотических клеток в среде составляет от 1,0 до 1,1 сП при температуре 25 °С. И плотность, и температура могут влиять на вязкость жидкости.

Термин «наноиндентор», в контексте данного документа, должен относиться к любой контролируемой механической структуре, которая может использоваться для характеристики реакции твердого материала (например, биологической ткани) на приложение силы к области твердый материал.

В контексте данного документа термины «найти образец», «найти образец», «найти поверхность», «найти поверхность» и FS относятся к процедуре определения расстояния между расположенным зондом и поверхностью клетки-мишени под зондом так, чтобы расстояние смещения над каждым образцом можно было вручную регулировать в зависимости от каждого вновь полученного расстояния FS.

В контексте данного документа термины «множественные возрастающие частоты колебаний», MIOF, «динамический механический анализ» и DMA относятся к способу, в котором прямое напряжение прикладывается посредством целенаправленных колебаний на выбранных частотах, чтобы охарактеризовать вязкоупругие свойства материала как функцию частоты. Напряжение прикладывается непосредственно к образцу, и регистрируемая частота является результатом скорости, с которой кантилевер, давящий на образец, перемещается вверх от образца и вниз на образец.

В контексте данного документа термины «серия отметок», SOI и матричное сканирование относятся к способу, который включает нацеливание на различные точки на одной клетке для определения однородности жесткости клетки по одной клетке. Кроме того, с помощью этого способа можно воздействовать на различные точки соседних клеток, чтобы можно было определить однородность жесткости клеток соседних клеток одной и той же культуры.

«Модуль Юнга» или YM представляет собой механическое свойство материала, устройства или слоя, которое относится к отношению напряжения к деформации для данного вещества. Модуль Юнга можно определить выражением:  $E = \text{напряжение} / \text{деформация} = (L_0 / \Delta L) (F/A)$ ; где E - модуль Юнга, L<sub>0</sub> - равновесная длина,

$\Delta L$  - изменение длины под действием приложенного напряжения,  $F$  - приложенная сила, а  $A$  - площадь, к которой прилагается сила. Модуль Юнга также можно выразить через константы Ламе с помощью уравнения:  $E = \mu(3\lambda + 2\mu)$ , где  $\lambda$  и  $\mu$  - константы Ламе.

«Эффективный модуль Юнга» или ЕУМ представляет собой модуль Юнга, который не включает коэффициент Пуассона. Коэффициент Пуассона учитывает возможное сжатие образца наружу в перпендикулярном направлении в ответ на вдавливание.

Модуль упругости ( $E'$ ) в вязкоупругих материалах, таких как, например, клетки, измеряет запасенную энергию, представляющую собой упругую часть. Модуль потерь ( $E''$ ) в вязкоупругих материалах измеряет энергию, рассеиваемую в виде тепла, что представляет собой вязкую часть. Отношение модуля потерь к модулю упругости в вязкоупругом материале определяется как тангенс дельта, который обеспечивает меру демпфирования в материале. Тангенс дельта можно выразить с помощью уравнения:  $\tan \delta = E''/E'$ . Значение тангенс дельта больше 1 указывает на то, что, например, клетка более вязкая, чем эластичная.

«Частота» представляет собой количество повторений повторяющегося события в единицу времени. Ее также иногда называют временной частотой, чтобы подчеркнуть контраст с пространственной частотой, и обычной частотой, чтобы подчеркнуть контраст с угловой частотой. Частота измеряется в герцах (Гц).

Как обсуждается в данном документе, «прикрепленные клетки» и «прикрепленные клеточные линии» относятся к клеткам, в которых первичные культуры прикреплены к твердой основе и, таким образом, являются клетками, зависимыми от закрепления. «Суспензионные клетки» или «суспензионные клеточные линии» относятся к клеткам, в которых культуры суспендированы в жидкой среде и, таким образом, остаются в жидкой среде. Соответственно, данное изобретение дополнительно предлагает способы получения линии прикрепившихся клеток из суспензионных клеток.

«Фетальную бычью сыворотку» или «ФБС» получают из крови, взятой у плода крупного рогатого скота. ФБС предоставляет полный набор компонентов, начиная от факторов роста, жизненно важных питательных добавок, гормонов и факторов пролиферации клеток, электролитов и ферментов, с общей целью поддержки роста и пролиферации клеток. Ключевым компонентом ФБС является множество факторов адгезии, которые способствуют прикреплению клеток к соответствующей поверхности (Devireddy et al., 2019). Соответственно, в одном аспекте данного изобретения колбы, засеянные суспензионными клетками, вносят в культуральную среду определенного химического состава, дополненную концентрацией фетальной бычьей сыворотки (ФБС). В некоторых вариантах реализации культуральная среда определенного химического состава дополнена ФБС в концентрации около 0,5%У, около 1%У, около 1,5%У, около 2%У, около 3%У или около 4%У. В предпочтительных вариантах реализации в культуральную среду определенного химического состава добавляют ФБС в концентрации около 4%У.

В культуре прикрепившихся клеток термин «слияние» относится к проценту поверхности культуральной чашки, покрытому прикрепившимися клетками. В некоторых аспектах данного изобретения клеточной культуре дают возможность вырасти до слияния адгезивных/суспензионных клеток, например, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84% или 85% общего слияния. В других аспектах культура клеток достигает слияния около 85%.

«Пассирование клеток» или «пассирование клеток» в контексте данного документа могут относиться к удалению культуральной клеточной среды и любой суспендированной клеточной культуры. В способах, раскрытых в данном документе, флаконы с клеточными культурами пассируют после по меньшей мере около 85% слияния для удаления суспензионных клеток.

«Фосфатно-солевой буфер» или «ФСБ» относится к изотоническому раствору, широко используемому в биологических приложениях из-за его изотонической и нетоксичной природы для большинства клеток. В некоторых вариантах реализации способов, раскрытых в данном документе, после пассирования суспензионных клеток для облегчения их удаления из колбы колбу погружают в ФСБ, чтобы смыть избыток среды, нежизнеспособные клетки и токсичные метаболиты.

«Титр» относится к измерению концентрации, например, целевого белка в процессе биопроизводства. Титр является основным эталоном, характеризующим эффективность производства на предшествующей стадии, при этом более высокие титры обычно указывают на то, что более желаемый продукт производится с использованием того же или меньшего количества жидкости или заполненного объема биореактора. Соответственно, данное изобретение предлагает способы оптимизации биопроизводства, включающие количественную оценку воздействия напряжения сдвига на клетки и использование данных о напряжении сдвига для регулирования уровней силы сдвига, приложенной во время биопроизводства. В предпочтительных вариантах реализации оптимизация приводит к увеличению титра и выхода продукта.

В некоторых аспектах способов, раскрытых в данном документе, культивирование прикрепившихся клеток из суспензионных клеток длится по меньшей мере 72 часа. В некоторых аспектах способов клетки пассируют около четыре, около пять или около шесть пересевов, например, шесть пересевов.

В некоторых аспектах данного изобретения плотность прикрепившихся клеток составляет по меньшей мере  $13,84D \times 10^5$  клеток/мл после шести пересевов.

Данное изобретение также описывает клетки, такие как клетки СНО, полученные способами, раскрытыми в данном документе.

Все числовые пределы и диапазоны, изложенные в данном документе, включают все числа или значения около них или между числами диапазона или предела. Описанные в данном документе диапазоны и пределы явно обозначают и устанавливают все целые, десятичные и дробные значения, определенные и охватываемые диапазоном или пределом. Описанные в данном документе диапазоны и пределы явно обозначают и

устанавливают все целые, десятичные и дробные значения, определенные и охватываемые диапазоном или пределом. Таким образом, перечисление диапазонов значений в данном документе просто предназначено для использования в качестве сокращенного метода индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в этот диапазон, если иное не указано в данном документе, и каждое отдельное значение включено в спецификацию, как если бы оно было отдельно изложено в данном документе.

Дополнительные подробности раскрытых способов и систем представлены ниже.

## **II. Измерение воздействия напряжения сдвига**

В некоторых аспектах данного изобретения клетки, применяемые в раскрытых в данном документе способах для количественной оценки воздействия напряжения сдвига на клетки, представляют собой клетки млекопитающих. В дополнительных аспектах данного изобретения клетки млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки почки детеныша хомячка (ВНК), клетки эмбриональной почки человека 293 (HEK293), клетки HeLa, клетки per.сб, несекретирующие клетки миеломы мыши (NSo) и клетки миеломы мыши Sp2/0. Гидрофобные поверхностно-активные вещества часто используются в промышленности для смягчения воздействия стресса на клетки CHO. Пенегаситель обычно добавляют в биореакции, чтобы уменьшить снижение скорости газопереноса и удержания клеток в слое пены, обеспечивая защиту клеток от пузырьков, которые разрываются в пене (Ritacco, F.V., Wu, Y. and Khetan, A. (2018), Cell culture media for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells: History, key components, and optimization strategies. *Biotechnol Progress*, 34: 1407-1426. <https://doi.org/10.1002/btpr.2706>). Однако было зарегистрировано, что пеногасители на основе полидиметилсилоксана или симетикон повышают чувствительность клеток CHO к силам сдвига (Wang J., Shah N., Walther J., Lu J., Johnson T., Ren Y., Mclarty J. Methods for Improving Cell Viability in a Production Bioreactor. Genzyme Corporation (Кембридж, Массачусетс, США) (2019). <https://www.freepatentsonline.com/y2019/0285617.html>). Другие добавки, защищающие от сдвига, такие как полоксамер-188 (P-188) и плюроник F-68 (PF-68), могут быть введены в культуральную среду, где должны рассматриваются подходящие концентрации поверхностно-активных веществ для клеточной линии, состав среды и параметры процесса (Sieck J. Addressing Shear Stress in Bioreactors. (2017) <https://cellculturedish.com/addressing-shear-stress-bioreactors/>. Accessed September 23, 2022). P-188 имеет высокий гидрофильно-липофильный баланс, определяемый главным образом содержанием двух гидрофильных боковых цепей поли(этиленоксида), что позволяет ему действовать на границе раздела пузырьков с клетками, смягчая стресс, вызывающий разрыв пузырьков во время барботажа (Chang D., Fox R., Hicks E., Ferguson R., Chang K., Osborne D., Hu W., Velev O.D. Investigation of interfacial properties of pure and mixed poloxamers for surfactant-mediated shear protection of mammalian cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Volume 156. 2017. Pages 358 365. ISSN 0927-7765, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.040>). PF-68 также уменьшает гидродинамическое повреждение клеток в результате уноса пузырьков через защитный слой вокруг клеточной

мембраны, улучшая целостность мембраны (Hu, W., Berdugo, C., & Chalmers, J. J. (2011). The potential of hydrodynamic damage to animal cells of industrial relevance: current understanding. *Cytotechnology*, 63(5), 445-460. <https://doi.org/10.1007/s10616-011-9368-3>), (Ritacco et al., 2018). Многие подходы направлены на оптимизацию функциональности поверхностно-активных веществ, например, при постепенном переходе промышленности к использованию бессывороточной среды определенного химического состава. Сывороточная среда продемонстрировала защитное свойство против напряжения сдвига в клетках животных по сравнению с отсутствием такой защиты в бессывороточной культуре (Cynthia B, Elias T, Rajiv B. Desai T, Milind S. Patole, Jyeshtharaj B., Joshi T and Raghunath A Mashelkar. Turbulent Shear Stress - Effect On Mammalian Cell Culture And Measurement Using Laser Doppler Anemometer. *Chemical Engineering Science*, Vol. 50, no. 15. 1995.). В качестве компенсации, добавки, защищающие от сдвига, были эффективно интегрированы вместе с бессывороточными средами для использования в СНО-зависимых промышленных биопроцессах (Li W., Fan Z., Lin Y. and Wang T.Y. Serum-Free Medium for Recombinant Protein Expression in Chinese Hamster Ovary Cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.646363/full>). Дальнейшая оптимизация привела к попыткам понять общее явление изменчивости партий с P-188 (Peng, H., Ali, A., Lanan, M., Hughes, E., Wiltberger, K., Guan, B., Prajapati, S. and Hu, W. (2016), Mechanism investigation for poloxamer 188 raw material variation in cell culture. *Biotechnol Progress*, 32: 767-775. <https://doi.org/10.1002/btpr.2268>), а также управлять регулировкой концентрации PF-68 и пеногасителя для сохранения оптимального переноса кислорода (Ritacco et al., 2018). Данные добавки устраняют проблемы чувствительности клеток к сдвигу, обеспечивая продуктивность и стабильность биопроизводства.

#### **А. Свойства клеточной линии яичников китайского хомячка и характеристики культуры**

Одним из факторов, влияющих на толерантность клеточной линии к напряжению сдвига, может быть то, как клетки закреплены в условиях их роста. Клетки, независимые от фиксации, называются суспензионными культурами, поскольку они свободно суспендированы в среде. Это типичные условия роста клеток СНО в промышленных биореакторах с мешалкой из-за простоты их использования при масштабировании операций (Rossi G. The design of bioreactors. *Hydrometallurgy*. 2001, 59 (2-3): 217-231). Суспендированные клетки СНО могут переносить высокую степень перемешивания в биореакторе; однако было замечено, что эта толерантность устраняется, если также вводится унос пузырьков (Hu et al., 2011). С другой стороны, прикрепленные клетки СНО зависят от среды микроносителя, в которой они прикрепляются и растут. Следовательно, если возбуждение приведет к отделению этих клеток от их микроносителя, они могут стать нежизнеспособными и склонными к потенциально разрушительному воздействию гидродинамических сил за пределами их зоны комфорта (Hu et al., 2011). В результате клетки в суспензии могут переносить гидродинамические условия лучше, чем

прикрепившиеся клетки, которые зависят от прикрепления к поверхности. Кроме того, известно, что прикрепившиеся клетки СНО более чувствительны к напряжению сдвига, даже когда они прикреплены к среде микроносителя, поскольку они не могут свободно менять свою ориентацию для облегчения любого сфокусированного гидродинамического напряжения на своей мембране таким же образом, как это происходит со суспендированными клетками СНО (Goh S. «Micro-bioreactor Design for Chinese Hamster Ovary Cells.» Department of Materials Science and Engineering. Massachusetts Institute of Technology. (2013). <https://core.ac.uk/download/pdf/18321479.pdf>). Из-за этих обозначенных различий, характеризующих зависимость от закрепления, любая адаптация клеточной линии СНО от суспензии к адгезивной - или наоборот - должна учитывать возможность изменений их внутренней чувствительности к сдвигу, которую невозможно измерить с помощью одного инструмента. Соответственно, в одном варианте реализации данного изобретения способы включают применение клеток СНО. В дополнительных вариантах реализации клетки СНО представляют собой суспензионные клетки. В дополнительных вариантах реализации суспензионные клетки СНО иммобилизуют с использованием клея для клеток и тканей. В некоторых вариантах реализации клеем для клеток и тканей является Cell-Tak.

### **В. Напряжение сдвига**

Воздействие гидродинамического стресса любой степени можно разделить на две отдельные категории: а именно, летальное и сублетальное воздействие на эти клетки. Летальные эффекты, вызванные напряжением сдвига, включают апоптотическую и некротическую гибель клеток, что приводит к снижению жизнеспособности клеток. Было документально подтверждено, что распространенность летальности СНО, вызванной сдвигом, увеличивалась в то же время, когда жизнеспособность клеток снижалась во всей популяции (Godoy-Silva R., Chalmers J.J., Casnocha S.A, Bass L.A, Ma N. Physiological responses of CHO cells to repetitive hydrodynamic stress. *Biotechnology and Bioengineering* Vol. 103, Issue 6. (2009). <https://doi.org/10.1002/bit.22339>). Эта потеря структурной целостности играет центральную роль в снижении жизнеспособности общего количества клеток. Однако разница между некрозом, являющимся «принудительной» гибелью клеток, и апоптозом, целенаправленно инициируемым клетками посредством внутренних и внешних сигналов стресса, может влиять на результат вызванного сдвигового напряжения (Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity*, 73(4), 1907-1916. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005>). А именно, как апоптоз, так и некроз характеризуются различными морфологическими изменениями в клеточной структуре, при которых гибель клеток в конечном итоге завершается прекращением продукции белка (Fink and Cookson, 2005). В одной публикации было установлено, что резкое, интенсивное давление потока жидкости на прикрепившуюся клеточную линию СНО К1 может вызвать некроз (Gregoriades N, Clay J, Ma N, Koelling K, Chalmers JJ. Cell damage of microcarrier cultures as a function of local energy dissipation created by a rapid extensional flow. *Biotechnol*

Bioeng. 2000;69:171-182. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(20000720)69:2<171::AID-BIT6>3.0.CO;2-C.). Другое исследование, в котором сообщалось о разрыве клеток взвешенной версии этой клеточной линии СНО К1, интересно отметило, что клеточный метаболизм глюкозы и лактата не был затронут (Godoy-Silva et al., 2009). Соответственно, данное изобретение предлагает способы оптимизации биопроизводства, включающие количественную оценку воздействия напряжения сдвига на клетки и использование данных о напряжении сдвига для регулирования уровней силы сдвига, приложенной во время биопроизводства. В некоторых предпочтительных вариантах реализации оптимизация приводит к повышению жизнеспособности клеток. В некоторых вариантах реализации жизнеспособность клеток измеряют с помощью биоанализатора с использованием метода исключения трипсинового синего.

В отличие от этих летальных сценариев, менее интенсивные гидродинамические силы были документально подтверждены как вызывающие сублетальные неблагоприятные воздействия на многие аспекты клеток СНО. Гидродинамическое давление, оказываемое на их мембраны, может косвенно изменить внутреннюю структуру цитоскелета, провоцируя сублетальные последствия для клеток. Цитоскелет простирается по всей цитоплазме и состоит преимущественно из трех элементов: актиновых нитей (микрофиламентов), промежуточных филаментов и микротрубочек. Опубликованная литература, исследующая, как напряжение сдвига изменяет структуру цитоскелета, в частности, клеток СНО, обычно скудна. Однако есть несколько подробных примеров, подчеркивающих важность мониторинга его воздействия на клеточную структуру и функцию. Например, было заявлено, что активированные актиновые филаменты в адаптированной к суспензии клеточной линии СНО-SA повышают шансы клеток на выживание при стрессе сдвига, вызванном возбуждением (Walther, C.G., Whitfield, R. & James, D.C. Importance of Interaction between Integrin and Actin Cytoskeleton in Suspension Adaptation of СНО cells. *Appl Biochem Biotechnol* 178, 1286-1302 (2016). <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1945-z>). В этом отчете также обсуждается возникновение актиновых филаментов, взаимодействующих с белками трансмембранных рецепторов интегрин на клетках СНО, обеспечивая связь между внутренним цитоскелетом и внеклеточным матриксом, где эффекты напряжения сдвига могут отражаться на внутренней структуре. Было зарегистрировано, что интегрины опосредуют прикрепление между клетками и гликопротеином фибронектина, покрытием, которое часто используется при обработке адгезивных клеток для прикрепления клеток к поверхности (Wu C, Bauer JS, Juliano RL, McDonald JA. The alpha 5 beta 1 integrin fibronectin receptor, but not the alpha 5 cytoplasmic domain, functions in an early and essential step in fibronectin matrix assembly. *J Biol Chem*. 1993 Oct 15;268(29):21883-8. PMID: 7691819.). Существует потенциальная возможность для будущих исследований, изучающих, как прикрепленные или суспензионные клетки СНО различаются по своей толерантности к сдвиговому стрессу, особенно в результате их альтернативных структур цитоскелета. Например, было показано, что увеличение скорости сдвигового напряжения

на клетках CHO усиливает адгезионные свойства клеток за счет изоформы интегрина (Vijayan K.V., Huang T.C., Liu Y., Bernardo A., Dong J., Goldschmidt-Clermont P.J., B.Rita Alevriadou, Bray P.F. Shear stress augments the enhanced adhesive phenotype of cells expressing the Pro33 isoform of integrin  $\beta 3$ . FEBS Letters. Volume 540, Issues 1-3. 2003. Pages 41-46. ISSN 0014-5793. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00170-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00170-4)). Более того, сообщение о реорганизации актина из фибрилл в сферические оболочки, когда клетки CHO адаптировались из прикрепленной к суспензионной клеточной линии (Walther et al., 2016) может указывать на то, что эти морфологические изменения могут не иметь одинаковой чувствительности к гидродинамическим силам.

В недавнем исследовании регуляция экспрессии актина в цитоскелете клеток CHO была связана с их продуктивностью (Pourcel, L., Buron, F., Arib, G., Le Fourn, V., Regamey, A., Bodenmann, I., Girod, P. A., & Mermod, N. (2020). Influence of cytoskeleton organization on recombinant protein expression by CHO cells. *Biotechnology and bioengineering*, 117(4), 1117-1126. <https://doi.org/10.1002/bit.27277>). Поскольку напряжение сдвига может повлиять на эту структуру и, следовательно, на продуктивность клеточной линии, этот аспект следует серьезно учитывать в любом процессе для поддержания желаемых CQA. Было обнаружено, что в высокопродуктивных клонах CHO ген актина «ACTC1» сверхэкспрессируется, причем авторы связывают эту высокую экспрессию непосредственно с количественным улучшением продуктивности клеток CHO (Pourcel et al., 2020). Кроме того, авторы сообщают, что низкий уровень полимеризации актина совпал с более высокой продуктивностью. В своих заключительных замечаниях они предполагают, что белок, активирующий гуанозинтрифосфат ГТФаза, известный как TAGAP, может улучшить пролиферацию клеток, опосредуя передачу сигналов актин-интегрин. Поскольку отношения актин-интегрин потенциально играют роль в пролиферации, а также их вышеупомянутую роль при сдвиговом стрессе, этот феномен демонстрирует интригующую, неизведанную область.

Повышение регуляции актина в клетках CHO представляет дополнительный интерес, поскольку, как сообщается, оно снижает уровни токсичных побочных продуктов лактата, образующихся во время метаболической активности (Pourcel et al., 2020). Интересно, что в другой ранее цитированной статье было обнаружено, что при изучении воздействия повторяющегося напряжения сдвига на клетки CHO не было выявлено существенной разницы в использовании глюкозы и выработке лактата между опытными и контрольными группами (Godoy-Silva et al., 2009). Данная область метаболических исследований заслуживает дальнейшего изучения, особенно с учетом ранее упомянутых цитат (Fan, Y., Jimenez Del Val, I., Müller, C., Wagtberg Sen, J., Rasmussen, S.K., Kontoravdi, C., Weilguny, D. and Andersen, M.R. (2015), Amino acid and glucose metabolism in fed- batch CHO cell culture affects antibody production and glycosylation. *Biotechnol. Bioeng.*, 112: 521-535. <https://doi.org/10.1002/bit.25450>) обсуждает, как лактат вреден для роста клеток CHO и может повысить их восприимчивость к напряжению сдвига. Следовательно,

метаболические субстраты и побочные продукты могут оказывать заметное влияние на клеточную структуру CHO, целостность и устойчивость к гидродинамическому стрессу.

Серьезной потенциальной угрозой целостности продукта является то, как напряжение сдвига влияет на CQA белка, полученного в ходе биореакции. Гликозилирование является одним из наиболее тщательно контролируемых CQA при производстве белка, особенно при производстве терапевтических моноклональных антител с использованием промышленных клеточных линий CHO. Было показано, что сдвиговое напряжение оказывает физическое влияние на эффективность гликозилирования: одно исследование показало, что гидродинамический стресс выше  $0,005 \text{ Нм}^{-2}$  изменяет эндоплазматический ретикулум (ЭР) клеток CHO (Keane J.T., Ryan D., Gray P.P. Effect of shear stress on expression of a recombinant protein by Chinese hamster ovary cells *Biotechnol. Bioeng.*, 81 (2003), pp. 211-220 <https://doi.org/10.1002/bit.10472>), the organelle where glycan precursor assembly and initial modifications are performed (Schoberer J, Shin YJ, Vavra U, Veit C, Strasser R. Analysis of Protein Glycosylation in the ER. *Methods Mol Biol.* 2018;1691:205-222. doi: 10.1007/978-1-4939-7389-7\_16. PMID: 29043680; PMCID: PMC7039702.). Это подтверждается другим исследованием, где преимущественно наблюдаемым физиологическим воздействием сдвига на клетки CHO было изменение паттерна гликозилирования, приписываемое повторной деформации ER (Godoy-Silva et al., 2009). Напряжение сдвига также может влиять на время внутриклеточного перемещения клеток CHO и, таким образом, влиять на гликопрофиль. Согласно одному исследованию, рекомбинантный белок-активатор плазминогена тканевого типа, синтезируемый этими клетками, имел сокращенное время пребывания в ЭР (Senger, R.S. and Karim, M.N. (2003), Effect of Shear Stress on Intrinsic CHO Culture State and Glycosylation of Recombinant Tissue- Type Plasminogen Activator Protein. *Biotechnol Progress*, 19: 1199-1209. <https://doi.org/10.1021/bp025715f>). Они заметили, что напряжение сдвига коррелирует с увеличением синтеза белка как защитной реакции, за которой следует ограничение доступа гликоферментов, подчеркнув серьезное влияние напряжения сдвига на качество продукции. Соответственно, в данном документе раскрыт процесс оптимизации биопроизводства, включающий этапы количественной оценки воздействия напряжения сдвига на клетки и использования данных о напряжении сдвига для регулирования уровней силы сдвига, приложенной во время биопроизводства. В предпочтительных вариантах реализации оптимизация приводит к повышению качества продукции. В дополнительных вариантах реализации качество продукта определяется эффективностью гликозилирования. В дополнительных вариантах реализации эффективность гликозилирования измеряют хроматографическими методами.

## **1. Создание напряжения сдвига**

### ***a. Механическое перемешивание***

Вышестоящие процессы биопроизводства, которые требуют механического перемешивания либо для диспергирования кислорода в клетках в среде, либо для содействия передаче тепла посредством конвекции, либо для поддержания клеток в

суспензии, должны тщательно отслеживаться и контролироваться для поддержания целостности клеток (Nair A.J. *Introduction to Biotechnology and Genetic Engineering (Principles of Biotechnology)*, Infinity Science Press LLC. Laxmi Publications. 2008. ISBN: 978-1-934105-16-2). Общее опасение по поводу нанесения вреда клеткам СНО, склонным к повреждению высокой силой жидкости, может перерасти в нежелание работать в оптимальных условиях возбуждения. Поток объемной жидкости в биореакторе в значительной степени контролируется мощностью механического перемешивания, а также выбором рабочего колеса, которое в конечном итоге создает структуру потока (Rossi, 2001). Крыльчатки турбин могут вызвать чрезмерную скорость сдвига вследствие высокого радиального потока и последующих продольных и тангенциальных потоков, которые возникают во время его эффективного перемешивания (Lebranchu A., Delaunay S., Marchal P., Blanchard F., Pacaud S., Fick M., Olmos E. *Impact of shear stress and impeller design on the production of biogas in anaerobic digesters*, *Bioresource Technology*. Volume 245, Part A. (2017). Pages 1139-1147. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.113>). Было документально подтверждено, что крыльчатки турбины Раштона вызывают напряжение сдвига на чувствительных клетках СНО, тогда как крыльчатки с шаговыми лопастями идеально подходят для бережного смешивания этих чувствительных к сдвигу клеток (Mirro R. and Voll K. *Which Impeller Is Right For Your Cell Line?* *BioProcess International*. 2021.). Крыльчатки турбины Раштона можно комбинировать с наклонными лопастями, чтобы снизить общее напряжение сдвига, обеспечивая при этом эффективный массоперенос в биореакторе (Karimi, A., Golbabaee, F., Mehrnia, M.R. et al. *Oxygen mass transfer in a stirred tank bioreactor using different impeller configurations for environmental purposes*. *J Environ Health Sci Engineer* 10, 6 (2013). <https://doi.org/10.1186/1735-2746-10-6>). Лопастные импеллеры - наряду с установкой перегородок - можно использовать, чтобы вызвать легкое возбуждение и преодолеть чувствительность клеток СНО к силе сдвига жидкости (Nair, 2008), (Mirro and Voll, 2021). Различные ламинарные и турбулентные потоки, создаваемые движением крыльчатки в жидкости, могут оказывать ряд воздействий на целостность клеток; от незначительных до крупных морфологических изменений, вплоть до разрушения всей клетки (Mollet M., Godoy-Silva R., Berdugo C., Chalmers J.J. *Acute hydrodynamic forces and apoptosis: A complex question*. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 98, Issue 4. 2007. <https://doi.org/10.1002/bit.21476>). Таким образом, при оценке условий процесса важно отметить, что толерантность этих клеток к более высоким уровням механического воздействия зависит от степени гидродинамической силы, создаваемой перемешиванием, а также от характерной чувствительности клеток СНО к этой силе (Godoy-Silva et al., 2009).

Клетки могут быть подвергнуты воздействию гидродинамических сил, создаваемых специальной системой жидкостного насоса. В системе жидкостного насоса образцы можно приготовить путем посева клеток в прилипших условиях внутрь соответствующих предметных стекол для достижения желаемой скорости потока. Выбор направляющих, обеспечивающих различные внутренние объемы, можно комбинировать с

различными размерами подключенных систем трубок для создания широкого диапазона возможных условий сдвига. Например, разные объемы каналов на этих предметных стеклах приводят к тому, что поток жидкости проходит с разной скоростью, несмотря на то, что фактическая площадь основной поверхности, на которой находятся адгезивные клетки, одинакова для всех предметных стекол. Трубка, связанная с насосным устройством, может быть соединена с предметными стеклами через два канала на поверхности с закрытым верхом, так что насос может проталкивать некультивируемую среду через трубки во внутреннюю часть предметного стекла. Это образует идеальную перфузионную систему, многократно обходящую контролируемый гидродинамический поток вокруг системы, особенно над подготовленными адгезивными клетками, иммобилизованными внутри предметных стекол. Этот однонаправленный поток может воздействовать на прикрепленные клетки, оказывая силу, параллельную поверхности зафиксированной клетки (Wang, Lu & Wu, Shuai & Fan, Yubo & Dunne, Nicholas & Li, Xiaoming. (2019). Biomechanical studies on biomaterial degradation and co-cultured cells: mechanisms, potential applications, challenges and prospects. *Journal of Materials Chemistry B*. 7. 10.1039/C9TB01539F.). Сила, действующая на определенную параллельную поверхность клеток, вызывает напряжение сдвига, которое в зависимости от предельного напряжения может вызвать летальную или сублетальную деформацию с потенциальным длительным воздействием на их внутренние вязкоупругие свойства (Kim L., Toh Y.C., Voldman J. and Yu H. A practical guide to microfluidic perfusion culture of adherent mammalian cells. *The Royal Society of Chemistry*, 7, 681-694. (2007). [https://www.rle.mit.edu/biomicro/documents/lykim\\_LOC2007.pdf](https://www.rle.mit.edu/biomicro/documents/lykim_LOC2007.pdf)). Соответственно, в некоторых вариантах реализации данного изобретения силы, вызывающие напряжение сдвига в клетках, создаются системой жидкостного насоса.

Перемешивание клеток для индукции напряжения сдвига также можно инициировать с помощью встряхивания колбы или перемешивания в биореакторе. Перемешивание во встряхиваемой колбе можно инициировать путем посева клеток в встряхиваемую колбу с последующим помещением колбы на качалку. Затем коромысло можно установить на различные обороты в минуту (об/мин). Перемешивание биореактора может быть вызвано внутренней мешалкой или аэратором. Соответственно, в некоторых вариантах реализации данного изобретения силы, которые вызывают напряжение сдвига в клетках, генерируются путем перемешивания встряхиваемой колбы. В других вариантах реализации данного изобретения силы, вызывающие напряжение сдвига в клетках, создаются за счет перемешивания биореактора.

### ***в. Дестабилизация пузырьков***

Имеются существенные доказательства того, что клетки СНО склонны к вредным гидродинамическим стрессам, вызванным дестабилизацией пузырьков, содержащих газообразный кислород. В одном исследовании подробно описывается явление, называемое «уносом пузырьков», при котором пузырьки попадают в области турбулентного потока, создаваемого механическим перемешиванием или аэрацией

посредством барботаж (Hu et al., 2011). Пузырьки, которые становятся нестабильными, могут лопаться в среде биореакции, создавая силу, которая может повредить клетки животных (включая СНО), особенно из-за отсутствия защитной клеточной стенки (Nair, 2008). Исследователи заметили, что клетки СНО были способны выдерживать более высокие степени возбуждения в промышленном биореакторе, когда унос пузырьков был уменьшен (Li F, Hashimura Y, Pendleton R, Harms J, Collins E, Lee B. *Biotechnol Prog.* 2006 May-Jun; 22(3):696-703. A systematic approach for scale-down model development and characterization of commercial cell culture processes.). Это было достигнуто за счет того, что более высокая скорость перемешивания снизила скорость аэрационного потока из барботера. Это демонстрирует параметр, который можно регулировать для уменьшения напряжения сдвига, сохраняя при этом ту же оптимальную скорость переноса кислорода в клетки. Хотя процессами перемешивания и аэрации можно манипулировать, пытаясь смягчить их аддитивное разрушение целостности клеток, исследования показали, что снижение мощности перемешивания может фактически способствовать разрыву пузырьков и последующему повреждению клеток (Ma N, Chalmers JJ, Auniş JG, Zhou W and Xie L (2004). Quantitative Studies of Cell Bubble Interactions and Cell Damage at Different Pluronic F-68 and Cell Concentrations. *Biotechnology Progress.* 20: 1183-1191.).

### **С. Измерение напряжения сдвига**

Чтобы оценить влияние гидродинамического стресса на производственные линии клеток СНО, необходимо выполнить соответствующие стратегии количественного определения для получения информативных данных. В литературе описан ряд способов, в которых основное внимание уделяется различным биомаркерам для количественной оценки вызванного напряжения сдвига. Анализы лактатдегидрогеназы (ЛДГ) на протяжении многих лет использовались в ряде исследований цитотоксичности, а именно в изучении летальности в ответ на сдвиговое напряжение (Kaja, S., Payne, A. J., Naumchuk, Y., & Koulen, P. (2017). Quantification of Lactate Dehydrogenase for Cell Viability Testing Using Cell Lines and Primary Cultured Astrocytes. *Current protocols in toxicology*, 72, 2.26.1-2.26.10. <https://doi.org/10.1002/cptx.21>). Этот анализ обнаруживает высвобождение внутриклеточной ЛДГ из поврежденных нежизнеспособных клеток в результате летальных скоростей сдвига. В типовых анализах используются такие компоненты, как водорастворимые соли тетразолия, которые взаимодействуют с НАДН, образующимся в результате целенаправленного преобразования ЛДГ в пируват, для измерения флуоресценции, которая пропорциональна высвобождению ЛДГ и, следовательно, повреждению клеток (Kaja et al., 2017). Скорость диссипации энергии (СДЭ) также использовалась для измерения гидродинамического стресса на клетках СНО, особенно сублетальных воздействий, когда паттерны гликозилирования значительно смещались при более высоких СДЭ (Godoy-Silva et al., 2009). В этом исследовании среди других используются биореакторы уменьшенного масштаба для воспроизведения скорости сдвига производства. В других исследованиях использовались микрофлюидные устройства для концентрации контролируемого ламинарного перфузионного потока для

количественной оценки гидродинамического стресса и последующих (суб)летальных воздействий (Kim et al., 2007).

### **1. Наноиндентирование**

Лабораторный подход для количественной оценки вязкоупругих свойств клеток, испытывающих разные скорости сдвига, был реализован с использованием наноиндентора. Наноиндентеры способны измерять механические и физические свойства небольших образцов с точностью и точностью. Это измерение обычно выполняется путем вдавливания образца на желаемую и контролируруемую глубину с использованием компонента с твердым наконечником, чтобы определить неизвестные физические свойства исследуемого образца (Bull S.J. Nanoindentation of coatings. 2005 J. Phys. D: Appl. Phys. 38 R393.). За последнее столетие во многих приложениях использовался ряд наноинденторов, наиболее широко для исследования чувствительности материала к проникновению контролируемой силы нагрузки. Степень легкости или сложности проникновения индентора может дать представление о твердости материала (Bull, 2005). Соответственно, в предпочтительных вариантах реализации способов, раскрытых в данном документе, механические свойства клеток при различных уровнях напряжения измеряют путем наноиндентирования с использованием наноиндентора, как описано в данном документе.

Наноиндентор потенциально способен измерять воздействие гидродинамических сил сдвига на образцы культуры, помещенные под установленный инвертированный микроскоп. Во время работы оптический зонд, прикрепленный к головке наноиндентора, можно механически опустить с известного, заранее откалиброванного расстояния над культуральной чашкой к поверхности образца. В некоторых вариантах реализации способов, раскрытых в данном документе, зонд опускается на период около двух секунд. Зонд имеет тонкий кантилевер, который изгибается при контакте с поверхностью образца. Опускание головки наноиндентора известно как «смещение», из которого программное обеспечение вычитает степень изгиба кантилевера для расчета отпечатка, возникающего на образце. Это углубление создает силу, известную как «нагрузка», при контакте с поверхностью. В некоторых вариантах реализации способов, раскрытых в данном документе, кантилевер находится в контакте с поверхностью клетки в течение около одной секунды. В других вариантах реализации кантилевер находится в контакте с поверхностью клетки в течение около шести секунд. В некоторых вариантах реализации данного изобретения способы включают определение механических свойств клетки после одного цикла наноиндентирования. В других вариантах реализации данного изобретения способы включают определение механических свойств клетки после нескольких циклов наноиндентирования, например, около двух, около трех, около четырех, около пяти или около шести циклов наноиндентирования. В одном предпочтительном варианте способы включают определение механических свойств клетки после около шести циклов наноиндентирования. В еще одном предпочтительном варианте каждое последующее

нановыдавливание располагается на расстоянии около 2 мкм от предыдущего нановыступа.

В некоторых других вариантах реализации способов, раскрытых в данном документе, кантилевер генерирует несколько повышающихся частот колебаний (MIOF) около 1F Гц, около 2F Гц, около 4F Гц и около 10F Гц при контакте с поверхностью клетки в течение по меньшей мере около шести секунд. Напряжение прикладывается непосредственно к образцу, и регистрируемая частота является результатом скорости, с которой кантилевер, давящий на образец, перемещается вверх от образца и вниз на образец. Если бы углубления указывали на вязкоупругость (зависимость от времени), эксперимент MIOF пролил бы больше света на различные типы присутствующих частотно-зависимых значений модулей Юнга (Yablon D. Confusion of moduli. Wiley Analytical Science, Microscopy and Scanning Probe Microscopy, (2017). <https://analyticalscience.wiley.com/do/10.1002/micro.2417>). Например, измеренная реакция запасенной энергии позволит определить модуль накопления ( $E'$ ), представляющий большую эластичность, в то время как измеренное высвобождение энергии укажет на модуль потерь ( $E''$ ), представляющий большую вязкость (Yablon, 2017). Соответственно, в дополнительных вариантах реализации способов, раскрытых в данном документе, MIOF устанавливали на уровне около 1F Гц, около 2F Гц, около 4F Гц и около 10F Гц с периодами релаксации около двух секунд между каждым увеличением частоты.

В некоторых вариантах реализации зонд механически поднимают над поверхностью клетки на период около двух секунд.

Используя значения, полученные в результате наноиндентирования, система также генерирует кривую нагрузки-индентирования, которая подчеркивает приближение смещения вниз к образцу, прежде чем измерять нагрузку и разгрузку индентирующего зонда. В данном документе графическая кривая нагрузки-вдавливания в точке вдавливания может позволить программному обеспечению определить жесткость образца или «модуль Юнга» (YM), который может быть задокументирован на основе нескольких вдавливаний для выяснения механических свойств образца.

YM представляет собой общее измерение способности образца сохранять энергию, создаваемую в результате вдавливания (Jastrzebski, D. Nature and Properties of Engineering Materials (Wiley International ed.). John Wiley & Sons, Inc. (1959)). Проще говоря, он измеряет устойчивость образца к определенным вмятинам, при этом образец с более низкой зафиксированной жесткостью может указывать на большую восприимчивость к напряжению и деформации. Эта система также рассчитывает коэффициент Пуассона, который учитывает возможное сжатие образца наружу в перпендикулярном направлении в ответ на вдавливание (Sokolnikoff, S., Mathematical theory of elasticity. Krieger, Malabar FL, second edition, (1983)). Производная от YM, называемая «Объемным модулем Юнга», включает это соотношение, тогда как эффективный модуль Юнга (EYM) не учитывает это явление сжатия в своих результатах. Они предоставляют множество параметров, которые можно использовать при оценке жесткости образца клеток при воздействии напряжения

сдвига. YM может представлять интерес для поддержания жизнеспособности клеток в производственных процессах, которые могут испытывать множество потенциальных возбудителей напряжения сдвига на критических стадиях. В предпочтительных вариантах реализации данного изобретения способы включают определение жесткости клетки путем расчета значений модуля Юнга (YM) и эффективного модуля Юнга (EYM). В некоторых аспектах изобретения YM и EYM клеток после 24 часов напряжения сдвига составляет менее чем около 50х Па. В некоторых аспектах изобретения YM и EYM клеток после 48 часов напряжения сдвига составляет менее чем около 50х Па. В некоторых аспектах изобретения YM и EYM клеток после 72 часов напряжения сдвига превышает около 500х Па.

Все способы, описанные в данном документе, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если иное не указано в данном документе или иное явно не противоречит контексту. Использование любых и всех примеров или примерных формулировок (например, «таких как»), представленных в данном документе, предназначено просто для лучшего освещения изобретения и не накладывает ограничения на объем изобретения, если не заявлено иное. Никакие формулировки в описании не должны быть истолкованы как указывающие на какой-либо не заявленный элемент как существенный для практического применения изобретения.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1: Наноиндентирование клеток, находящихся в условиях сдвигового напряжения**

#### *Экспериментальные способы наноиндентирования, выбранные для клеток*

Ряд способов был выбран и соответствующим образом модифицирован для документирования механических свойств подготовленных клеток. Во-первых, для начала каждого нового измерения образца была реализована процедура «найти образец» (FS) для определения расстояния между расположенным зондом и поверхностью клетки-мишени под ним. Далее была настроена стандартная процедура вдавливания продолжительностью 6 секунд с возможностью ручной регулировки расстояния смещения над каждым образцом в зависимости от каждого вновь полученного расстояния FS. Кроме того, эта процедура вдавливания была продлена до 10 секунд, чтобы дополнительно уточнить свойства целевой клетки. А именно, как упругие образцы не зависят от времени, так и вязкоупругие образцы зависят от времени (Ozkaya N. et al.. Fundamentals of Biomechanics: Equilibrium, Motion, and Deformation. Springer Science+ Business Media, LLC (2012). Pages 368-373. DOI 10.1007/978-1-4614-1150-5\_15.), заметное изменение YM, зарегистрированное между двумя разновременными углублениями, может пролить свет на механические свойства клетки. Поскольку в литературе и производителем для наноиндентирования рекомендована максимальная глубина отпечатка, составляющая 16% от радиуса кончика зонда и 10% от толщины образца, процедура управления глубиной, обеспечивающая контроль этой глубины, была реализована отдельно (Lin, D.C., Shreiber D.I., Dimitriadis E.K., Horkay F. “Spherical Indentation of Soft Matter beyond the Hertzian

Regime: Numerical and Experimental Validation of Hyperelastic Models.” *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 8, no. 5 (2009): 345-58. <https://doi.org/10.1007/s10237-008-0139-9>). Если бы углубления указывали на вязкоупругость (зависимость от времени), эксперимент с множественным увеличением частоты колебаний (MIOF) мог бы пролить больше света на различные типы присутствующих частотно-зависимых значений модулей Юнга (Yablon, 2017). Например, измеренная реакция запасенной энергии позволит определить модуль накопления ( $E'$ ), представляющий большую эластичность, в то время как измеренное высвобождение энергии укажет на модуль потерь ( $E''$ ), представляющий большую вязкость (Yablon, 2017). Наконец, была создана серия углублений (SOI), нацеленных на различные точки на одной клетке, чтобы определить однородность YM в одной клетке.

### *Оценка совместимости системы сдвигового насоса с наноиндендером*

Поскольку некоторые прикрепившиеся клетки были извлечены из системы индуцирующего сдвиг насоса, была оценена методика подготовки этих извлеченных клеток к наноиндентированию. Извлеченные клетки клеточной линии А и В высевали в чашки Петри, а не в колбы T75, чтобы обеспечить наноинденторному зонду прямой доступ к образцу клеток. Поскольку в этой нестерильной испытательной среде для проведения испытаний крышку с чашки Петри приходилось снимать, образец был признан испорченным и после использования был выброшен. В лаборатории можно было сразу получить два типа чашек Петри; большую стеклянную чашку Петри и меньшую пластиковую чашку Петри, не обработанную тканевой культурой. Стеклянная чашка Петри была слишком велика для размещения под микроскопом и, следовательно, несовместима с установленным наноиндентором; однако она все еще использовалась для сравнения. Поскольку иммобилизация образца необходима для получения точных результатов вдавливания, обе чашки были оценены на предмет подтверждения их способности облегчать прилипание клеток через 24 часа. Для обеих клеточных линий после этого момента времени в больших стеклянных чашках Петри была отмечена адгезионная морфология, при этом в меньшей пластиковой чашке идентифицировались только сферические клетки. Однако не следует считать морфологию сферической формы полностью суспензионной. Чтобы подтвердить характерное для них неприкрепление к этой пластиковой чашке, образец наклоняли, и было видно, что все клетки двигались вместе со смещением среды, что подтверждало неприкрепление.

Чтобы решить проблемы, связанные со слишком большим размером стеклянной чашки и отсутствием прилипания пластиковой чашки, был применен другой подход, при котором два голых стеклянных предметных стекла были засеяны адгезивными клетками клеточной линии А и В соответственно и погружены в среду внутри большой стеклянной чашки Петри, чтобы они оставались стерильными в инкубаторе в течение 72 часов. Затем это предметное стекло с клетками, закрепленными на его поверхности, можно было перенести в пластиковую чашку меньшего размера, подходящую для наноиндентирования. Большую чашку выбирали для периода инкубации, чтобы сравнить

любую разницу в адгезии между клетками на предметном стекле или поверхности чашки при одинаковой плотности. После этого момента времени на предметных стеклах наблюдали обе клеточные линии (Фиг. 1). Клеточная линия А имела сферическую форму без выявленного удлинения; однако при наклоне чашки клетки, казалось, оставались на месте. В стеклянной чашке Петри наблюдалась большая подвижность клеток, но фиксация все же определялась. Для клеточной линии В сразу же было выявлено изменение цвета и повышенная мутность среды, несмотря на то, что обе чашки были засеяны и инкубированы в одних и тех же условиях. Микроскоп показал наличие загрязнения посредством видимого присутствия исключительно неожиданных форм и деформаций клеток (Фиг. 1А). Поэтому только образец клеточной линии А был осторожно перенесен в чашку меньшего размера, чтобы оценить его пригодность для наноиндентирования. На этой стадии было принято решение не продолжать попытку наноиндентирования по следующим причинам, связанным с тем, как был подготовлен образец. Хотя фиксацию клеток можно было наблюдать, проблематичное количество суспендированных клеток фиксировалось на зонде при его опускании в образец (Фиг. 1В). Это сильно нарушило показания интерферометра, который фиксирует необходимый путь оптической длины волны через среду для начальной процедуры FS на целевом образце. Это также создавало риск повреждения чувствительного кантилевера и получения ненадежных результатов измерения. Наклон для подтверждения того, что целевая клетка сферической формы закрепилась, можно было выполнить только тогда, когда зонд был сильно поднят над образцом. Позиционирование опущенного зонда непосредственно над идентифицированной сферической закрепленной клеткой неоднократно смещало окружающие структуры суспензии, что затрудняло идентификацию целевой клетки под микроскопом. Поэтому было признано, что эта методология требует пересмотра для изучения клеток, испытывающих стресс.

#### ***Оценка клеточного и тканевого клея как раствора для подготовки проб для наноиндентирования***

Трудности с подготовкой и отступом прикрепившихся клеток подчеркнули необходимость переоценки существующей методологии. Хотя получение стеклянных чашек меньшего размера могло решить проблемы с размером чашек и прикреплением к поверхности, был реализован более экономичный и дальновидный подход. В настоящее время возможность суспензионных клеток переориентировать свое положение в среде, чтобы приспособиться к любому возникающему напряжению, затруднит документирование прямого влияния условий напряжения сдвига на жесткость клеток (Goh, 2013). Заказав запас раствора клеточного и тканевого клея (СТА), такого как Cell-Tak, можно иммобилизовать как прикрепившиеся, так и суспензионные клетки на пластиковых и стеклянных чашках, а также на предметных стеклах. Это позволило решить некоторые проблемы, препятствующие наноиндентированию прикрепившихся клеток, а также расширить будущие возможности наноиндентора по исследованию иммобилизованных суспензионных клеток. Поскольку пластиковые чашки идеально

подходили для предметного столика микроскопа, раствор СТА был приготовлен путем нейтрализации для активизации его адгезионных свойств, а затем нанесен на эти чашки в качестве доказательства концепции.

Проверка концепции была протестирована с использованием оригинальной суспендированной формы клеточной линии А, поскольку можно было достичь более высокой плотности посева по сравнению с нынешним низким выходом прикрепившихся клеток, экстрагированных из предметных стекол насоса. Плотность  $51D \times 10^5$  клеток/мл суспензии Клеточной линии А, полученной из встряхиваемой колбы через день после инокуляции, высевалась на пластиковую чашку Петри, подготовленную с покрытием СТА. Целью было определить, был ли раствор приготовлен оптимально и имел ли он достаточную нейтрализацию рН для активации СТА и опосредования иммобилизации клеток. После того, как клеткам дали отстояться в инкубаторе в течение десяти минут, микроскопическое наблюдение подтвердило, что в ожидаемой зоне иммобилизации присутствовала высокая плотность клеток, тогда как за пределами этой зоны указывалась низкая плотность суспензионных клеток (Фиг. 2). Для подтверждения иммобилизации чашку наклоняли, подвижность клеток отмечали только за пределами зоны покрытия. После удаления всего содержания среды клетки преимущественно оставались внутри зоны СТА и преимущественно удалялись за ее пределами. Добавление свежей среды обратно в планшет, по-видимому, не привело к смещению каких-либо иммобилизованных клеток в зоне СТА.

#### ***Наноиндентирование суспензионных клеток, иммобилизованных с помощью СТА, полученных из встряхиваемой колбы в течение 72 часов***

От плана по удалению прикрепленных клеток из стационарной колбы T75 отказались из-за отсутствия соответствующего выхода клеток после сдвига для сравнения. Поэтому было проведено сравнение жесткости суспензии клеточной линии А в процессе перемешивания во встряхиваемой колбе. Чтобы проверить совместимость этого наноиндентора с суспензионными клетками, иммобилизованными раствором СТА, хранившийся флакон с клеточной линией А размораживали во встряхиваемой колбе с последующим высеванием образцов на чашки, покрытые СТА. Целью этого исследования было документирование любых изменений в записанных данных о жесткости клеток в течение 72-часового периода работы встряхиваемой колбы (Фиг. 3А). Вскоре после инокуляции во встряхиваемой колбе образец клеток в день 0 извлекали и иммобилизовали для наноиндентирования. Этот первоначальный тест выявил проблемы, аналогичные свободной суспензионной попытке наноиндентирования; клетки, которые не были иммобилизованы, снова прикреплялись к зонду, и поскольку открытая чашка была скомпрометирована, со временем стало видно накопление взвешенных инородных загрязнений. Кроме того, первое испытание на вдавливание после процедуры FS вызвало сильный фоновый шум на нагрузке, зарегистрированный из-за нежелательного прикрепления подвески к зонду, что привело к прекращению эксперимента и пересмотру. Наиболее важной поправкой было пятикратное увеличение плотности посева клеток,

осуществляемое путем центрифугирования каждого образца, взятого в течение Дней 1-3, и ресуспендирования его в меньшем объеме для посева с высокой плотностью на чашки. Однако было признано, что центрифугирование потенциально может вызвать нежелательный сдвиг от центробежных сил (Pembrey RS, Marshall KC, Schneider RP. Cell surface analysis techniques: What do cell preparation protocols do to cell surface properties?. Appl Environ Microbiol. 1999 Jul; 65(7):2877-94). Таким образом, для каждого ежедневного анализа проб также отбирались нормальные, нецентрифугированные пробы, чтобы сравнить их пригодность с центрифугированными пробами в соответствующих центрах VCD в течение трех дней с момента отбора проб. Кроме того, для удаления и уменьшения помех от мобильных ячеек использовался этап промывки ФСБ.

Стандартные и расширенные идентифирования суспензионных клеток иммобилизованных СТА

Для образцов, центрифугированных в Дни 1-3, первоначальная методика FS перед каждым экспериментом по вдавливанию образца выполнялась с минимальными проблемами. Первоначальная процедура вдавливания для оценки успешного взаимодействия зонда с поверхностью каждой клетки-мишени позволила получить четкий график зависимости смещения от времени для каждого ежедневного образца (Фиг. 3B). Стандартное идентифирование Дня 1 около на плотность посева  $120D \times 10^5$  клеток/мл зарегистрировала YM 0,18X Па и EYM 0,24X Па, а на следующий день при вдавливании над более высокой плотностью были зафиксированы более низкие YM и EYM 0,1X Па и 0,13X Па, соответственно. Это должно указывать на снижение жесткости, зафиксированное на стандартном идентифирании на День 2. Однако, поскольку образец Дня 3 зафиксировал более высокие значения YM 0,4X Па и EYM 0,54X Па, опция программного обеспечения для проведения эксперимента в той же позиции была повторена еще два раза, отображая аналогичные кривые вдавливания, но записывая немного более низкие значения YM и EYM. При нацеливании на другую клетку YM и EYM составили 3,8X Па и 5,1X Па соответственно, что резко контрастирует с предыдущими результатами. Оценка показала, что для всех образцов изгиб кантилевера произошел намного раньше, чем ожидалось, когда зонд начал расстояние смещения, рассчитанное с помощью FS, вниз по направлению к каждому образцу (Фиг. 3C). Это указывает на то, что движение смещения вниз немедленно оказывает воздействие на образец, несмотря на то, что процедура FS определяет расстояние между датчиком и образцом как минимум 90 мкм. Эта немедленная нагрузка была подтверждена кривыми нагрузка-вдавливание для всех стандартных вдавливаний (Фиг. 3D).

Также были выполнены идентифирования с более длительным временем выдержки на поверхности клетки-мишени, при этом все зарегистрированные YM указывали на измененную, более прочную жесткость по сравнению с этим увеличенным временем, как и ожидалось от зависящих от времени вязкоупругих образцов (Ozkaya et al., 2012). Однако YM, составляющий 0,4X кПа, зарегистрированный на целевой клетке Дня 3, был намного выше, чем YM, равный 20,6X Па и 25,7X Па для образцов на День 1 и 2, соответственно.

Хотя изменение  $YM$  было ожидаемым, большая разница, зафиксированная в данном документе, оказалась ненадежной, особенно с учетом того, что до сих пор несколько идентифицированных давали разные значения. Эксперимент по управлению глубиной на этих же клетках-мишенях был проведен с расчетным средним диаметром клеток с помощью рассматриваемого биоанализатора, чтобы гарантировать, что углубление в клетках-мишенях клеточной линии А не превышало рекомендуемую глубину. Консервативный порог глубины был интегрирован и подходил для всех тестов, поскольку стандартное отклонение между средними диаметрами клеток в Дни 1-3 составляло всего 0,8 мкм.

*Множественные возрастающие частоты колебаний, воздействующие на суспензионные клетки иммобилизованные СТА*

Введение МЮФ в углубление увеличенной длины позволило получить аналогичные графики зависимости смещения от времени, демонстрирующие разнесенные увеличивающиеся частоты по поверхности трех образцов (Фиг. 4А). Однако график зависимости модуля упругости ( $E'$ ) от модуля потерь ( $E''$ ), дающий представление о вязкоупругости, различался между тремя образцами (Фиг. 4В). Образец Дня 1, по-видимому, не смог эффективно зарегистрировать эти модули, однако было рассчитано значение тангенса дельта отношения между  $E''$ : $E'$ . Лучшая интерпретация может быть найдена на примере данных образца Дня 2, которые в первую очередь указывают на доминирование эластичности образца над частотами 1F, 2F и 10F Гц, причем только частота 4F Гц демонстрирует доминирование  $E''$ , обозначающей вязкость. Любопытно, что та же самая тенденция наблюдалась в образце на день 3, обе кривые тангенса дельта на день 2-3 демонстрировали одинаковую общую характеристическую тенденцию вязкоупругости.

*Серия идентифицированных в СТА-иммобилизованных суспензионных клетках*

Для экспериментов SOI каждый день выполнялось шесть вдавливаний в клетку-мишень. Гистограммы, созданные с помощью программного обеспечения, показали, что все шесть отступов, указывающих на по-разному расположенные и измеренные точки каждой клетки, успешно повлияли на образцы. Таким образом, кантилевер не пропускал поверхность клетки, отходя от края клетки при смене точек для отступа над прогнозируемой областью. На основе полученных данных были созданы новые гистограммы для оценки однородности средней жесткости образца в течение 3-дневного процесса встряхивания колбы (Фиг. 5). Данные из клеток-мишеней Дней 1-2 показали аналогичные средние значения  $YM$  и  $EYM$ , при этом образец Дня 1 имел меньшее стандартное отклонение от среднего значения. Как  $YM$ , так и  $EYM$  образца Дня 3 были зарегистрированы выше 500X Па, с большим стандартным отклонением от среднего значения. Эти большие значения Дня 3 демонстрируют аналогичную тенденцию увеличения значений в День 3 по сравнению с  $YM$  и  $EYM$ , полученными со стандартным идентифицированием для того же Дня 3, что указывает на согласованность данных этого третьего дня, если не с двумя предыдущими образцами. Значения  $P_a$  на День 3 указывают на то, что клетки имели более жесткую мембрану на День 3, чем на Дни 1 и 2. К Дню 3

для нецентрифугированного образца была зафиксирована плотность  $120D \times 10^5$  клеток/мл, что соответствовало плотности тестируемого центрифугированного образца в День 1. Теоретически эта плотность должна быть подходящей, исходя из совместимости в День 1, однако образец был оставлен на несколько часов и начал отслаиваться от покрытия СТА, что помешало дальнейшему исследованию.

### **Пример 2: Создание адгезивной клеточной линии А**

#### ***Стратегия создания адгезивных клеток из клеточной линии А***

Чтобы поддержать адаптацию суспензионных клеток к адгезивному росту, а также их продолжающуюся пролиферацию в этой новой клеточной форме, в химически определенную культуральную среду добавляли фетальную бычью сыворотку (ФБС). Эта сыворотка содержала полный набор компонентов, начиная от факторов роста, жизненно важных питательных добавок, гормонов и факторов пролиферации клеток, электролитов и ферментов, с общей целью поддержки роста и пролиферации клеток. Ключевым компонентом ФБС является множество факторов адгезии, которые способствуют прикреплению клеток к соответствующей поверхности (Devireddy L.R., Myers M., Screven R., Liu Z., Boxer L. and Ambrósio C.E. A serum-free medium formulation efficiently supports isolation and propagation of canine adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells. PLoS One Journal, 2019; 14(2): e0210250. DOI: 10.1371/journal.pone.0210250). Присутствие молекул адгезии в сыворотке представляло собой идеальную возможность начать переход суспензионной культуры к адгезивному росту. С того момента, как флакон с установленной суспензией клеточной линии А был разморожен, клетки вводили в эту сыворотку для обеспечения необходимых факторов для начала этой адаптации.

Первоначальный тест был проведен с альтернативной плотностью посева суспензионных клеток клеточной линии А во флаконах T75 с добавлением ряда концентраций ФБС в химически определенную среду (Фиг. 6). Из-за логистических ограничений целью этого первоначального эксперимента было понять рост, пролиферацию и развитие любых прикрепившихся клеток с течением времени, прежде чем переходить к более усовершенствованному протоколу посева. Выбранная первоначальная плотность посева для клеточной линии А была основана на предыдущих исследованиях клеточной линии В, поскольку обе клеточные линии имеют схожие свойства. В этом исследовании оптимальные условия для роста адгезивной клеточной линии В были установлены как  $4D \times 10^5$  клеток/мл, снабженных 1Y% ФБС. В этом первоначальном исследовании клеточной линии А применялись верхняя и нижняя плотность посева и концентрация ФБС, близкая к ранее установленным оптимальным условиям для клеточной линии В. Ожидалось, что результаты будут близки, но будут отличаться от предыдущих результатов, поскольку ожидалось различия между обеими клеточными линиями, возможно, связанные с их ростом в контрастных химически определенных составах сред и их внутренними генетическими свойствами.

После посева в эти колбы T75 прикрепившиеся клетки были идентифицированы под микроскопом по их удлинённой морфологии, отличающейся от круглых

супендированных клеток, присутствующих в той же колбе (Abcam (н.о.) Cell Culture Guidelines. No date. Доступ: 10 июля 2021 г. по адресу: [https://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/cell\\_cultural.pdf](https://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/cell_cultural.pdf)). Флаконы особенно наблюдали после периода времени, в течение которого можно было ожидать пересева, при необходимости, чтобы сравнить и сопоставить рост и пролиферацию клеток в каждом из условий в этой критической точке (Фиг. 7). На этой стадии в большинстве колб общее слияние адгезивных клеток/супензионных клеток превышало 70%, после чего было решено установить параметр общего слияния 70-85% в качестве индикатора необходимости неизбежного пересева. Контроль, состоящий из сред без ФБС, продемонстрировал полное отсутствие четкой морфологии клеток с момента каждой инокуляции до конца эксперимента. Напротив, все остальные колбы, содержащие среду с добавлением ФБС, демонстрировали характерную адгезивную морфологию после 24 часов роста. В частности, результаты показали, что постепенное увеличение пролиферации прикрепившихся клеток коррелирует с более высокими концентрациями ФБС. Плотность посева  $4D \times 10^5$  клеток/мл и 1Y% ФБС в среде - имитирована из предыдущей адгезивной клеточной линии В.

#### ***Оптимизация процесса создания адгезивных клеток из клеточной линии А***

Благодаря приобретенному пониманию скорости и эффективности генерации адгезивной клеточной линии А можно было бы установить более контролируемую и предсказуемую временную шкалу для изучения того, какие условия являются оптимальными для продолжения пролиферации этих клеток после пересева. Оптимальная плотность посева на данный момент ( $4D \times 10^5$  клеток/мл) была выбрана для более эффективного управления колбами Т75 и сужения оптимальных условий ФБС. Поскольку предыдущее исследование клеточной линии А показало, что увеличение градиента концентрации ФБС приводило к большей фиксации клеток, было исследовано более широкий диапазон концентраций ФБС (Фиг. 8А). Результаты этого конкретного исследования подтвердили экстраполяцию концентраций ФБС, которые позволили добиться увеличения прикрепления клеток к поверхности. До того, как было проведено первый пересев колб, наблюдалось более высокое слияние прикрепившихся клеток в концентрациях 2Y%, 3Y% и 4Y% ФБС по сравнению с более низкими тестами ФБС в первоначальном исследовании. Что касается самого протокола пересева, биоанализатор использовали для записи VCD супензионных клеток перед пересевом, чтобы его можно было сравнить с VCD прикрепленных клеток, сохранившихся во время пересева (Фиг. 8В). Этот мотив лучше всего объяснить, если сначала посмотреть на контрольный результат во время пересева, который, как ожидалось, не имел прикрепившихся клеток. В отсутствие ФБС (0%) перед пересевом VCD контрольной супензии был высоким. Во время пересева культуральную среду, содержащую супензионные клетки, удаляли, а поверхность колбы Т75 погружали в тонкий слой фосфатно-буферного раствора (ФСБ), чтобы смыть избыток среды, нежизнеспособные клетки и высвобожденные токсичные метаболиты (Segeritz, CP, & Vallier, L. (2017). Cell Culture: Growing Cells as Model Systems

In Vitro. Basic Science Methods for Clinical Researchers, 151-172. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6>). ФБС также способствует эффективному извлечению прикрепившихся клеток из колбы, поскольку стадия промывания позволяет последующему добавлению трипсина сосредоточиться на отделении оставшихся прилипших клеток, а не на разрушении культурных белков, которые в противном случае остались бы. Добавление трипсина использовалось для гидролиза белков адгезии на клеточной поверхности, облегчающих закрепление на поверхности (Olsen J. V., Ong S., Mann M. Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues. *Technology, Molecular & Cellular Proteomics* 3:608-614 (2009). <https://doi.org/10.1074/mcp.T400003-MCP200>). В случае контрольных условий с 0% ФБС трипсинизация давала чрезвычайно низкий выход клеток, что резко контрастировало с суспензией, зарегистрированной перед пересевом (Фиг. 8В); поэтому предполагалось, что выходом являются суспензионные клетки, оставшиеся после стадии промывки ФБС. Контроль пришлось прекратить после того, как потребовался недостаточный объем ресуспендированной культуры для посева оставшихся клеток обратно в новую колбу T75 после пассирования. Был сделан вывод, что этот контроль демонстрирует необходимость ФБС для образования прикрепившихся клеток.

Трипсинизация клеток в диапазоне концентраций ФБС приводила к нерегулярному характеру регистрируемых суспензий и прилипших VCD (Фиг. 8В). Данные показали, что для всех четырех протестированных концентраций ФБС соотношение суспензии и прикрепления в целом было в пользу прикрепленного роста после 72-часового периода. VCD с низким содержанием суспензии, зарегистрированный через 72 часа (пересев 4 и 5) - наряду с обычно более высоким выходом прикрепившихся клеток - показал, что большее количество клеток адаптировалось в течение 72 часов от начальной плотности посева суспендированной культуры, инокулированной в конце каждого пересева. Пересев 6, в частности, подчеркнул доминирование неприкрепившихся клеток, возможно, из-за снижения фиксации в течение длительного периода времени. Поскольку в этом тесте также повторялась та же плотность посева и, в частности, условия 1Y% ФБС, которые наблюдались в предыдущей попытке (Фиг. 7), это дало хорошее представление о воспроизводимости сравнительного роста адгезии, наблюдаемого под микроскопом. Прикрепленный рост при более высоких концентрациях ФБС также продемонстрировал отклонение от предыдущих исследований по оптимизации прикрепления, поскольку 2Y% ФБС приводило к неконтролируемому росту клеточной линии В. Однако для клеточной линии А все условия с концентрацией до 4Y% ФБС демонстрировали повышенное прикрепление. После семи пересевов 3Y% ФБС при такой плотности посева была выбрана в качестве оптимальных условий для получения прикрепившейся клеточной линии А, поскольку ее средний выход и максимальный единичный выход (пересев 4 и 6) были наибольшими.

### **Пример 3: Оптимизация способа биопроизводства**

Клетки сначала подвергают воздействию сил сдвига, например, гидродинамических сил, создаваемых перемешиванием встряхиваемой колбы или перемешиванием биореактора, чтобы вызвать напряжение сдвига на клетках, используя способы, описанные в Примере 1. Затем отбирали образцы клеток на различных стадиях клеточного роста или процессов биопроизводства и подвергали наноиндентированию, чтобы определить вязкоупругую природу клеток после воздействия напряжения сдвига. Чтобы определить, зависит ли модуль Юнга от времени или нет, использовали метод поиска образца, за которым следует одно вдавливание в два разных периода времени (секунды). Для управления глубиной отступа выполняли процедуру управления глубиной. Эксперименты по наноиндентированию для определения жесткости клеток включают эксперименты с множественным увеличением частоты колебаний (MIOF) и серией вдавливаний (SOI). Эксперименты MIOF показывают, зависит ли вязкоупругая природа клетки от частоты. Эксперименты SOI показывают, является ли вязкоупругая природа клетки однородной по всей поверхности клетки. Клетки с более высокой степенью жесткости считаются более устойчивыми к напряжению сдвига, чем клетки с более низкой степенью жесткости, что определяется путем расчета модуля Юнга и эффективного модуля Юнга.

Когда результаты наноиндентирования показывают, что клетки более восприимчивы к напряжению сдвига при определенных уровнях сил сдвига, уровни сил сдвига, создаваемых перемешиванием, можно регулировать, чтобы снизить уровни напряжения сдвига, оказываемого на клетки. Уменьшение напряжения сдвига в клетках приведет к увеличению жизнеспособности клеток на протяжении всего процесса биопроизводства. Уменьшение напряжения сдвига также приведет к увеличению титра, выхода и качества продуктов биопроизводства, например, эффективности гликозилирования. Жизнеспособность клеток измеряют с помощью биоанализатора с использованием метода исключения трипанового синего. Эффективность гликозилирования, титр и выход продукта измеряют хроматографическими методами.

Когда наноиндентирование показывает, что определенная клетка или линия клеток более устойчивы к напряжению сдвига при более высоких уровнях сил сдвига, клетка или линия клеток размножаются и используются в процессах биопроизводства.

#### **Пример 4: Материалы и способы**

##### ***Оттаивание флакона с суспензией клеточной линии А клеточного банка***

Около 150 мл среды клеток линии А нагревали в течение приемлемого периода времени при назначенной температуре инкубации. Флакон с суспензией клеточной линии А оттаивали на водяной бане при другой заданной температуре в течение нескольких минут в пределах приемлемого диапазона времени. Размороженные флаконы пипеткой помещали в определенный объем для отделения клеток от замораживающей среды центрифугированием. Полученный осадок ресуспендировали в объеме свежей среды, идентичном исходному объему флакона, а затем непосредственно высевали в соответствующий объем среды во флаконе T75. Образец культуры позже аспирировали из

этой колбы T75, чтобы определить, что VCD находился в пределах приемлемого диапазона, прежде чем колбу вернули в инкубатор при назначенных значениях CO<sub>2</sub> и температуре.

#### ***Способы пересева и культивирования клеток***

Слияние в колбе T75 наблюдали каждые 24 часа под инвертированным микроскопом, при этом предполагаемое общее визуальное слияние клеток 70-85% использовали в качестве индикатора инициации пересева. Перед пересевом необходимое количество соответствующей среды клеток линии А и линии В нагревали в течение приемлемого периода времени при назначенной температуре инкубации. Соответствующие объемы ФБС и трипсина размораживали перед экспериментом. Концентрации ФБС для соответствующих пересевов во флаконах T75 рассчитывали на основе среды, необходимой для нескольких флаконов. В боксе биологической безопасности отработанный среду извлекали из колб T75 для отбора проб для VCD и для определения жизнеспособности суспензионных клеток и впоследствии выбрасывали. Внутреннюю поверхность колбы промывали определенным объемом ФБС и заливали трипсином. Остаток трипсина удаляли и колбы сразу же инкубировали в течение 3 минут. По дну и по бокам колбы T75 постукивали, чтобы удалить клетки. Оставшийся трипсин нейтрализовали свежей средой. Нейтрализованную культуральную среду экстрагировали для центрифугирования и для удаления трипсина, а избыток культуры использовали для VCD и отбора для определения жизнеспособности прикрепившихся клеток. Осадки центрифугированной культуры ресуспендировали в свежей среде и высевали обратно до заданной плотности в свежие колбы T75 на основании расчетов отбора прикрепленных клеток VCD, зарегистрированных биоанализатором. Колбы T75 возвращали в инкубатор при указанных значениях CO<sub>2</sub> и температуры.

#### ***Подсчет клеток гемацитометром***

Соотношение клеточной суспензии и раствора трипанового синего готовили в виде смеси с коэффициентом разбавления 2. Клетки высевали в две отдельные канавки гемацитометра, каждая с отдельными внутренними сетками по четыре штуки. Оба подсчета сетки требовали количества жизнеспособных клеток от 80 до 200 клеток. Было подтверждено, что окончательное количество клеток для обеих областей бороздок находится в пределах 10% друг от друга по точности. VCD и жизнеспособность определяли посредством расчетов, включающих среднее значение подсчитанного VCD, коэффициент разведения и количество сеток гемацитометра, в которых подсчитывали клетки.

#### ***Создание напряжения сдвига с помощью системы жидкостного насоса***

Соответствующие объемы среды клеточной линии А и клеточной линии В нагревали в течение приемлемого периода времени при назначенной температуре инкубации. Прикрепившиеся клетки извлекали в ходе процесса пассирования и высевали на предметное стекло С в необходимом объеме. Каналы для предметных стекол закрывали пластиковыми колпачками и возвращали в инкубатор при определенных значениях CO<sub>2</sub> и

температуре для прилипания на ночь. Выбранную пробирку А помещали в те же условия инкубации на ночь, чтобы облегчить дегазацию пробирок. После инкубации четыре набора перфузионных насосов были установлены с закрытыми трубками А, и два набора были заполнены соответствующими средами клеточных линий А и В. Перфузионные наборы были подключены к насосу оборудованию с помощью кабелей и воздухозаборной трубки и вставлены в инкубатор. Предэкспериментальное уравнивание системы было установлено в течение десяти минут с запрограммированной стадией удаления пузырьков. Перфузионные наборы отсоединяли от насоса и подключали к соответствующим предметным стеклам С в боксе биологической безопасности через зажатую трубку. Перфузионные наборы возвращали в инкубатор. Период предварительного уравнивания  $0,5Z$  дин/см<sup>2</sup> в течение 2 часов и экспериментальный период  $Z$  дин/см<sup>2</sup> проводили первоначально в течение 26 часов на прикрепившихся клетках, полученных во втором пересеве, высевая  $4D \times 10^5$  клеток/мл с 9% среды ФБС в предметное стекло С. Обе скорости сдвига были уменьшены вдвое в более поздних экспериментах с использованием клеток из пересева 6 и 10 при плотности посева  $4D \times 10^5$  клеток/мл и  $60D \times 10^5$  клеток/мл, соответственно. VCD  $60D \times 10^5$  клеток/мл получали центрифугированием прикрепившихся клеток, оставшихся после 10 пересева, ресуспендированных для достижения соответствующей плотности.

#### ***Приготовление раствора СТА и посев клеток***

Приготовленный раствор 0,1 М бикарбоната натрия (84 г/моль) с уровнем pH 8,0 смешивали с приготовленным 1 н. раствором NaOH (40 г/моль) для достижения уровня pH в диапазоне 6,5-8,0, позволяя активировать адгезионные свойства смешанного раствора СТА. Рекомендации поставщика были соблюдены в отношении соотношения раствора СТА к каждому основанию для получения желаемой концентрации. Небольшой объем раствора СТА наносили пипеткой прямо в центр чашки Петри. Чашку Петри помещали в инкубатор при указанных значениях CO<sub>2</sub> и температуры более чем на двадцать минут. Затем чашки промывали очищенной водой для удаления остатков и давали высохнуть на воздухе перед хранением при температуре 4 °С, если они не использовались немедленно для экспериментов. Клетки высевали непосредственно на зону, покрытую СТА, в центре чашки Петри. Клетки инкубировали в течение 20 минут для облегчения иммобилизации, затем остатки культуры смывали ФБС и чашки дополняли соответствующей средой. Посев клеточной культуры, содержащей ФБС, требовал ресуспендирования осадка в свежей среде, не содержащей ФБС, чтобы предотвратить преимущественное связывание покрытия СТА с ФБС. Позже ФБС добавляли в дополняемую среду, как только клеткам давали иммобилизоваться в условиях инкубации.

#### ***Установка наноиндендера***

Наноиндендер крепился перпендикулярно к монтажной стойке, расположенной вертикально на антивибрационном столе. Этот стол был подключен на входе к насосу воздушного компрессора, который подавал сжатый воздух заданного значения давления через воздушные шланги к изолирующим креплениям, расположенным в четырех углах

рамы стола. Первоначальная подача воздуха, подаваемого к изолирующим опорам, контролировалась регулятором давления воздуха. Высота макета антивибрационного стола поверх опорной рамы активной изоляции регулировалась после того, как подача воздуха на выходе насоса обеспечивала достаточное количество воздуха для поднятия макета над поверхностью рамы. Инструмент наноиндентора был прочно закреплен болтами на стойке, к которой он был подключен, чтобы уменьшить любую потенциальную вибрационную нагрузку. Затем головку наноиндентора поместили на одну линию с объективом инвертированного микроскопа, чтобы обеспечить более четкое представление об исследуемой области под микроскопом. Наноиндентор был подключен кабелями к интерферометру и блоку контроллера, расположенному рядом со специальным ноутбуком, подключенным к этому оборудованию.

### *Эксперименты с наноиндентором*

Экспериментальные параметры были установлены в программном обеспечении наноиндентора до начала экспериментов. Конкретный зонд наноиндентора был выбран и установлен в системе исходя из соответствия его размеров для индентирования небольшой одиночной клетки. Процедуру калибровки проводили путем помещения наноинденторного зонда в среду клеточной линии А. Поверхность чашки Петри определяли во время калибровки. Была создана процедура FS для поиска поверхности образца и определения расстояния, покоящегося наноиндентора от ближайшего целевого образца. Глубина вдавливания между экспериментами с образцами была динамической и зависела от записываемого расстояния FS каждый отдельный день. Стандартные углубления смещались вокруг этого расстояния FS на 0,5 секунды после начала эксперимента, перемещались вниз в течение 2 секунд, прежде чем удерживать контакт с поверхностью образца в течение 1 секунды, снова поднимались вверх еще на 2 секунды, а затем оставались неподвижными в исходном положении до начала эксперимента. Расширенная процедура индентирования отличалась лишь 5-секундным временем выдержки в контакте с поверхностью образца. Процедура управления глубиной учитывала средний диаметр клеток, зарегистрированный биоанализатором для клеточной линии А, с отступом чуть ниже максимальной глубины отпечатка, составляющей 16% радиуса кончика зонда и 10% толщины образца. MIOF были установлены на частотах 1F, 2F, 4F и 10F Гц с периодами релаксации в 2 секунды между каждым увеличением частоты. Амплитуда частоты колебаний была установлена на уровне амплитуды системы по умолчанию. SOI располагались на расстоянии 2 мкм друг от друга в 6 запрограммированных направлениях над каждой целевой клеткой. Хранящийся флакон с клеточной линией А размораживали во встряхиваемой колбе при заданной скорости вращения в течение 72 часов. Образцы в течение трех дней получали через 26 часов, 46 часов и 72 часа и впоследствии высевали на подготовленные чашки с покрытием СТА для наноиндентирования.

Хотя в предшествующем описании данное изобретение было описано в отношении некоторых его вариантов реализации, и многие детали были изложены с целью

иллюстрации, специалистам в данной области техники будет очевидно, что данное изобретение допускает дополнительные варианты реализации и что некоторые детали, описанные в данном документе, могут быть значительно изменены без отступления от основных принципов данного изобретения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ количественной оценки воздействия напряжения сдвига на клетки, включающий стадии:

(а) воздействия на иммобилизованные клетки силами, вызывающими напряжение сдвига; и

(б) наноиндентирования клеток, полученных на стадии (а), для определения их механических свойств при различных уровнях напряжения.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что клетки представляют собой клетки млекопитающих.

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что клетки млекопитающих представляют собой клетки яичника китайского хомячка (СНО), клетки почки детеныша хомячка (ВНК), клетки почки эмбриона человека 293 (НЕК293), клетки HeLa, клетки per.c6, несекретирующие клетки миеломы мыши (NSo) и клетки миеломы мыши Sp2/0.

4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что клетки представляют собой суспензионные клетки.

5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что клетки иммобилизуют с помощью клея для клеток и тканей.

6. Способ по любому из пп. 4-5, отличающийся тем, что клетки представляют собой клетки СНО.

7. Способ по п. 5, отличающийся тем, что клеем для клеток и тканей является Cell-Tak.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что силы, вызывающие напряжение сдвига в клетках, создаются путем перемешивания встряхиваемой колбы.

9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что силы, вызывающие напряжение сдвига в клетках, создаются перемешиванием биореактора.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что наноиндентирование клеток осуществляют наноиндентором.

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что наноиндентор содержит оптический зонд.

12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что оптический зонд содержит кантилевер.

13. Способ по любому из пп. 11-12, отличающийся тем, что зонд механически опускают с заранее калиброванного расстояния к поверхности клеток.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что зонд опускают на период две секунды.

15. Способ по любому из пп. 12-14, отличающийся тем, что при приведении в контакт с кантилевером клетка оказывает на кантилевер силу, вызывающую изгиб кантилевера.

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что зонд механически поднимают на период в две секунды.

17. Способ по п. 15, отличающийся тем, что кантилевер приводят в контакт с поверхностью клетки в течение одной секунды.

18. Способ по п. 15, отличающийся тем, что кантилевер приводят в контакт с поверхностью клетки в течение пяти секунд.

19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что при приведении в контакт с клеткой кантилевер генерирует несколько повышающихся частот колебаний 1F Гц, 2F Гц, 4F Гц и 10F Гц.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что частота колебаний не генерируется в течение периода двух секунд между генерацией каждой увеличивающейся частоты колебаний.

21. Способ по любому из пп. 10-20, отличающийся тем, что наноиндентор подвергает клетки шести циклам наноиндентирования.

22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что каждое последующее наноиндентирование располагается на расстоянии 2 мкм от предыдущего наноиндентирования.

23. Способ по п. 1, отличающийся тем, что механические свойства клеток определяют после наноиндентирования.

24. Способ по п. 1, отличающийся тем, что механические свойства клеток включают жесткость клеток.

25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что жесткость клетки определяют путем расчета модуля Юнга (YM) и эффективного модуля Юнга (EYM).

26. Способ по п. 25, отличающийся тем, что YM и EYM клеток после 26 часов напряжения сдвига составляет менее чем около 50X Па.

27. Способ по п. 25, отличающийся тем, что YM и EYM клеток после 46 часов напряжения сдвига составляют менее чем около 50X Па.

28. Способ по п. 25, отличающийся тем, что YM и EYM клеток после 72 часов напряжения сдвига составляют более чем около 500X Па.

29. Способ по п. 24, отличающийся тем, что жесткость клетки определяют путем расчета модуля упругости (E').

30. Способ по п. 24, отличающийся тем, что жесткость клетки определяют путем расчета модуля потерь (E'').

31. Способ по любому из пп. 29-30, отличающийся тем, что значение E' превышает значение E'' на частотах 1F, 2F и 10F Гц после по меньшей мере двух дней перемешивания, что указывает на эластичность клеток.

32. Способ по любому из пп. 29-30, отличающийся тем, что значение E'' выше, чем значение E' при частоте 4F Гц после по меньшей мере двух дней перемешивания, что указывает на вязкость клеток.

33. Способ оптимизации биопроизводства, включающий:

(а) создание напряжения сдвига на клетках;

(б) количественную оценку воздействия напряжения сдвига на клетки по способу по п. 1; и

(с) применение данных, полученных на стадии (b), для корректировки уровней сдвигающей силы, применяемой во время биопроизводства.

34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что оптимизация приводит к увеличению титра и выхода продукта.

35. Способ по п. 33, отличающийся тем, что оптимизация приводит к повышению жизнеспособности клеток.

36. Способ по п. 33, отличающийся тем, что оптимизация приводит к повышению качества продукта.

37. Способ по п. 36, отличающийся тем, что качество продукта определяется эффективностью гликозилирования.

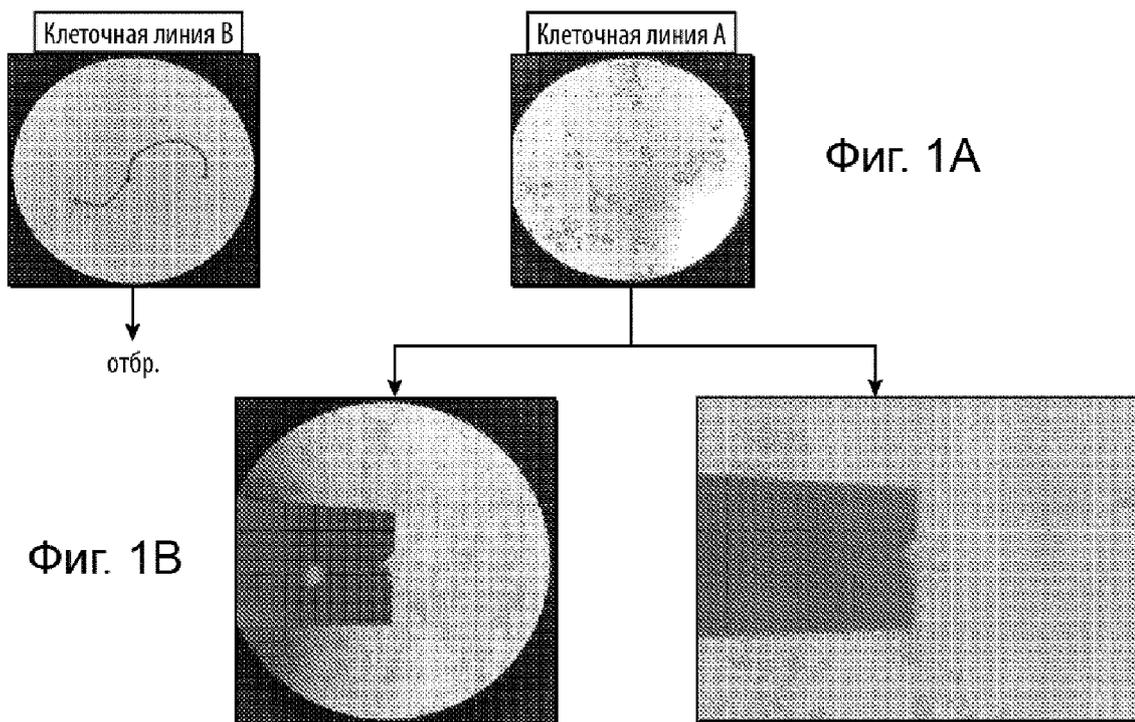
38. Способ разработки клеточных линий, устойчивых к сдвиговому напряжению, включающий

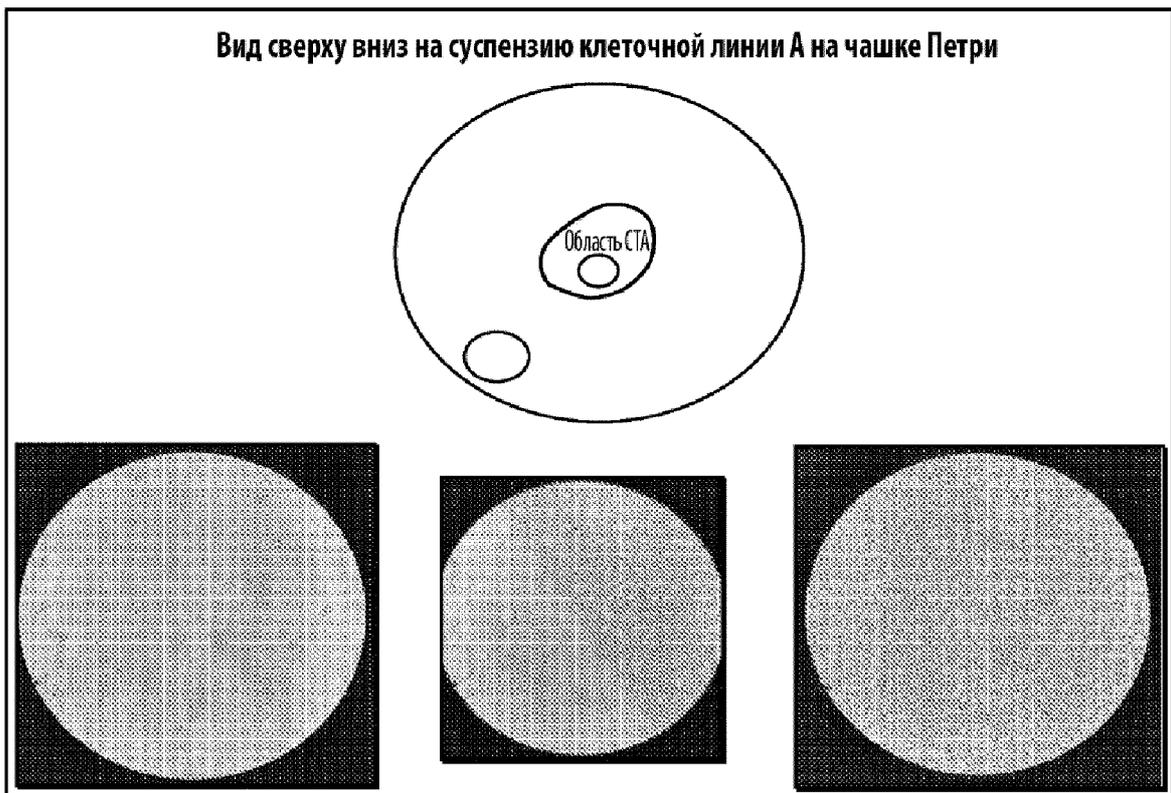
(а) приложение напряжения сдвига к указанным клеткам с увеличением уровня силы сдвига;

(b) количественную оценку воздействия напряжения сдвига на клетки по способу по п. 1; и

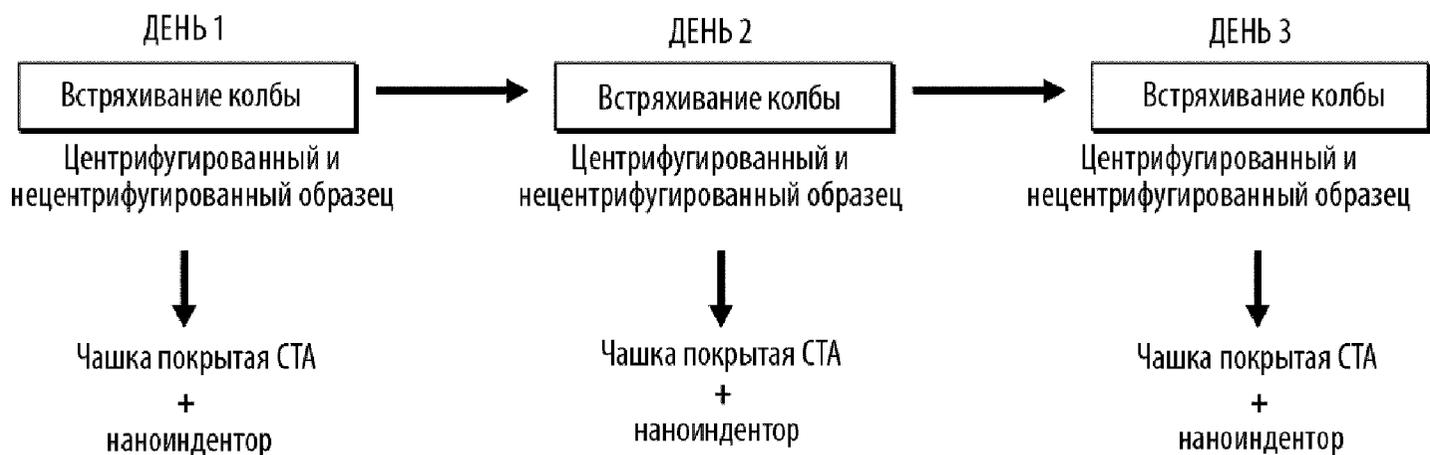
(с) отбор устойчивых клеток на стадии (b) для дальнейшего применения в биопроизводстве.

По доверенности

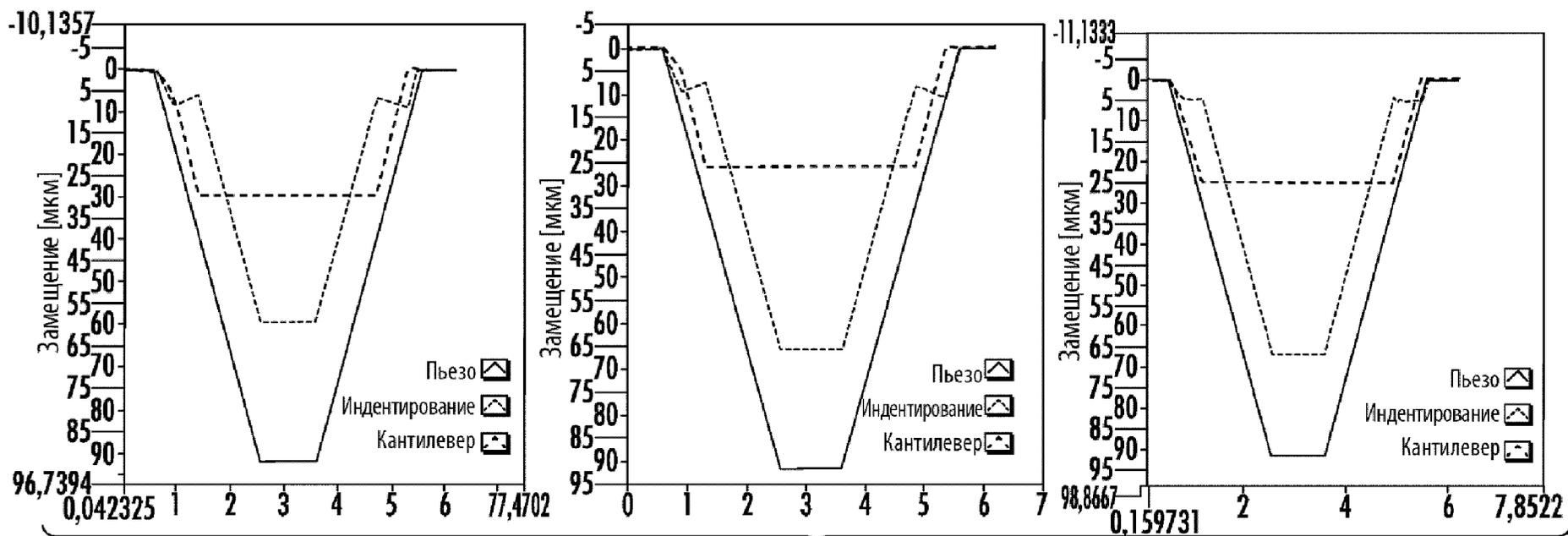




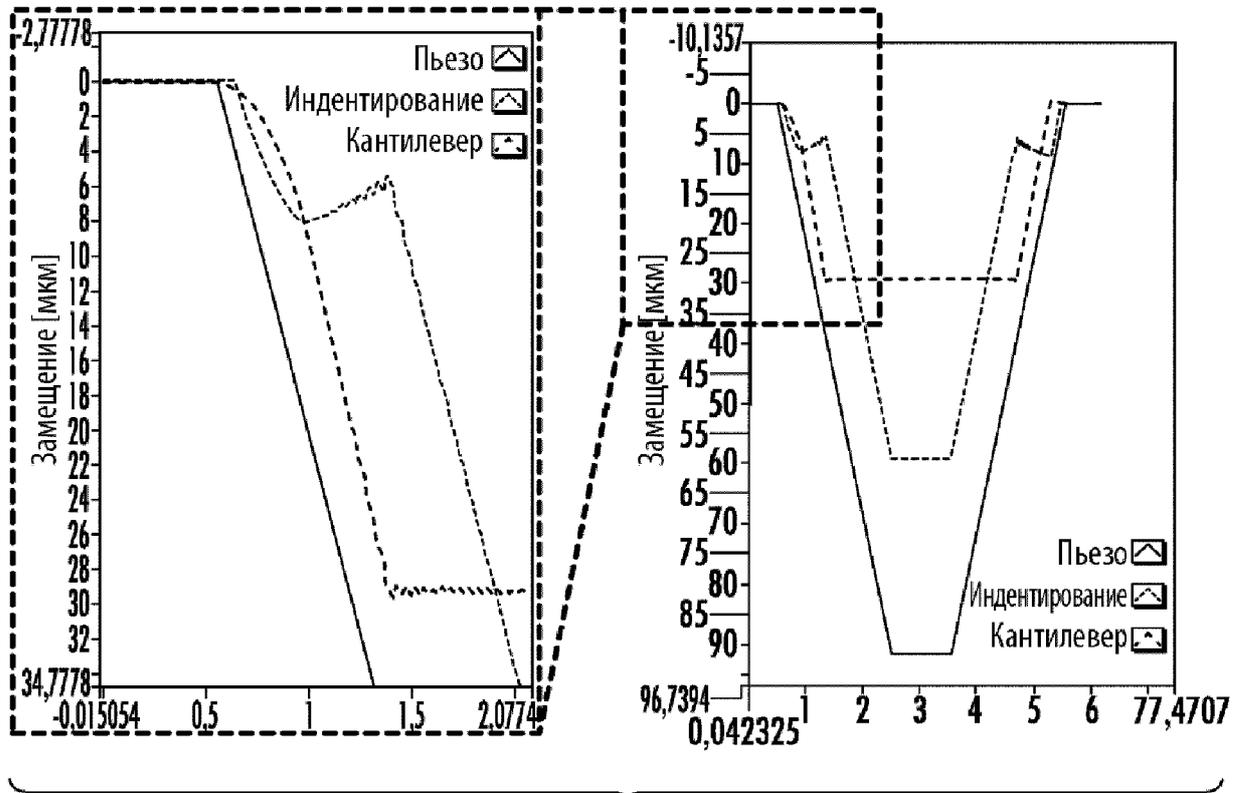
Фиг. 2



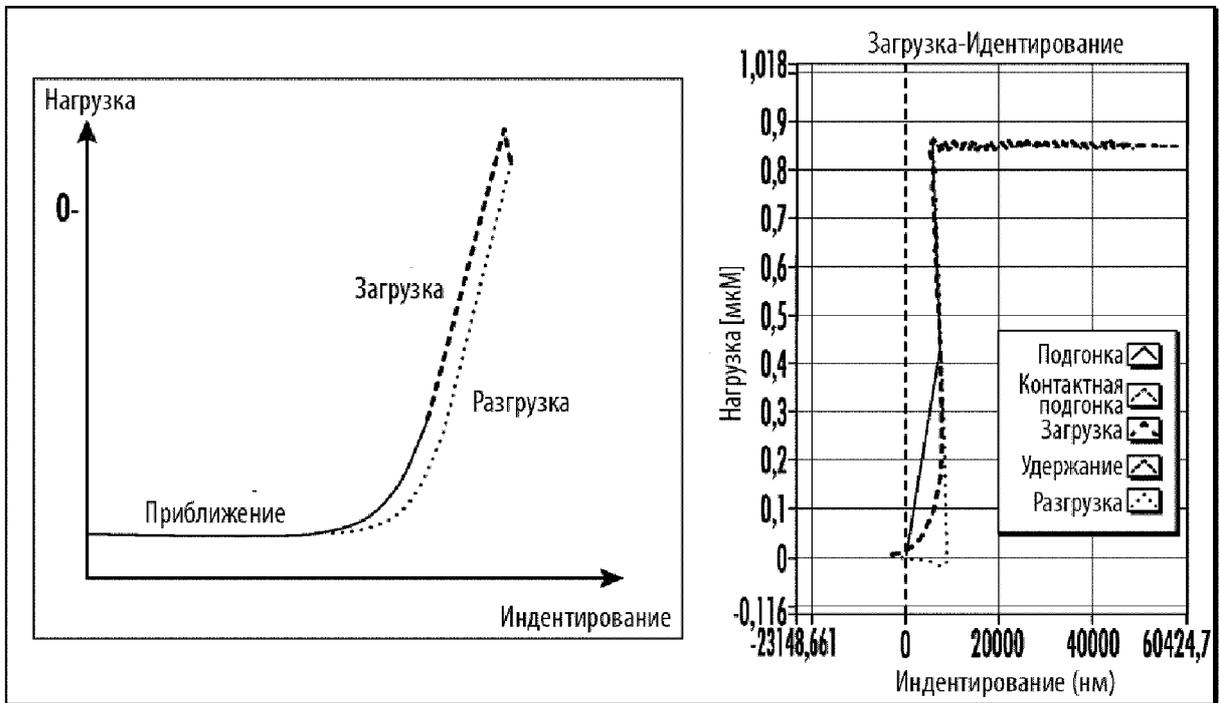
Фиг. 3А



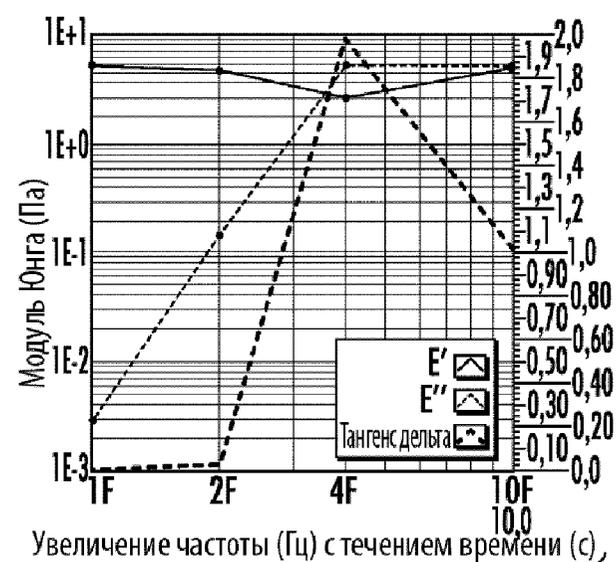
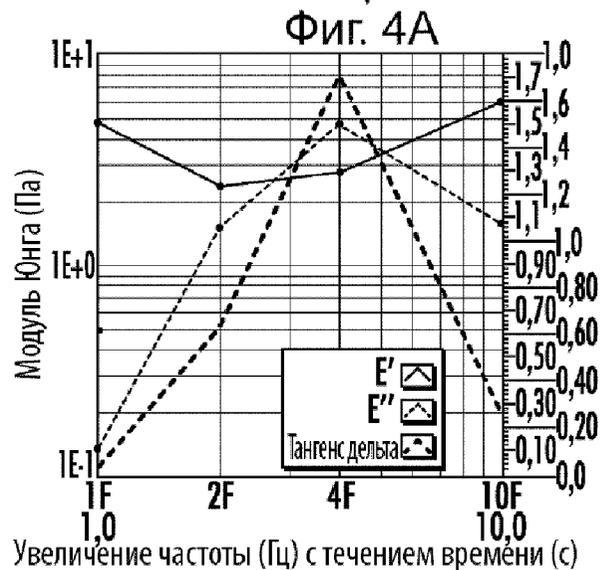
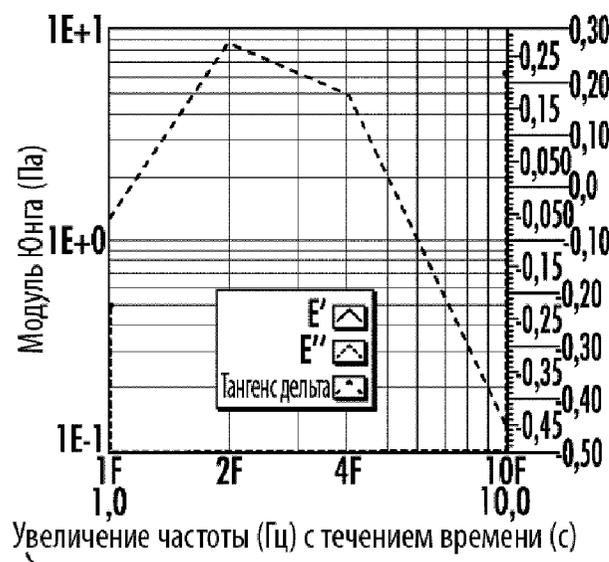
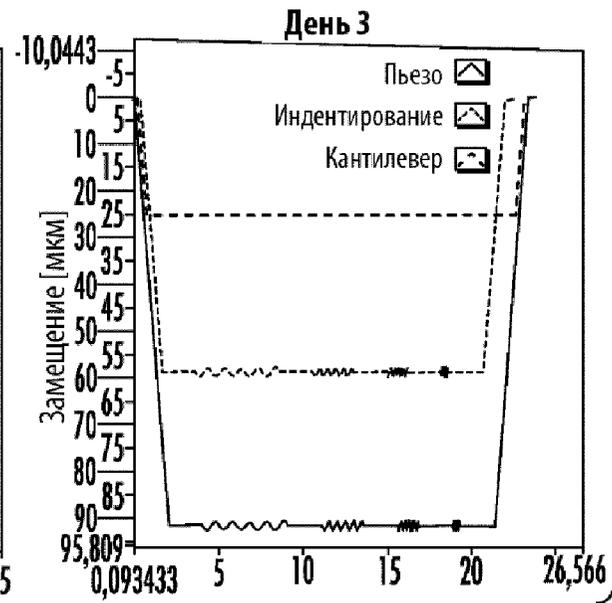
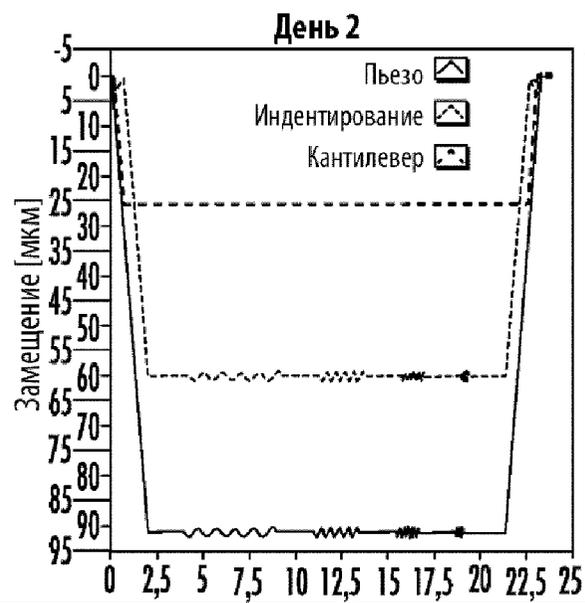
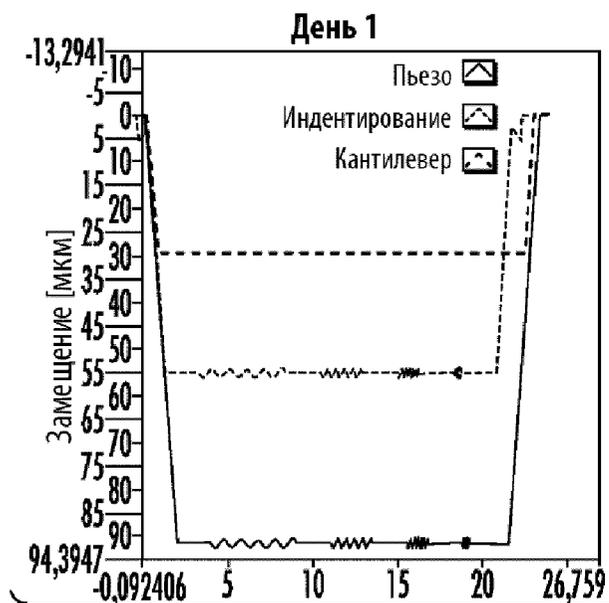
Фиг. 3В



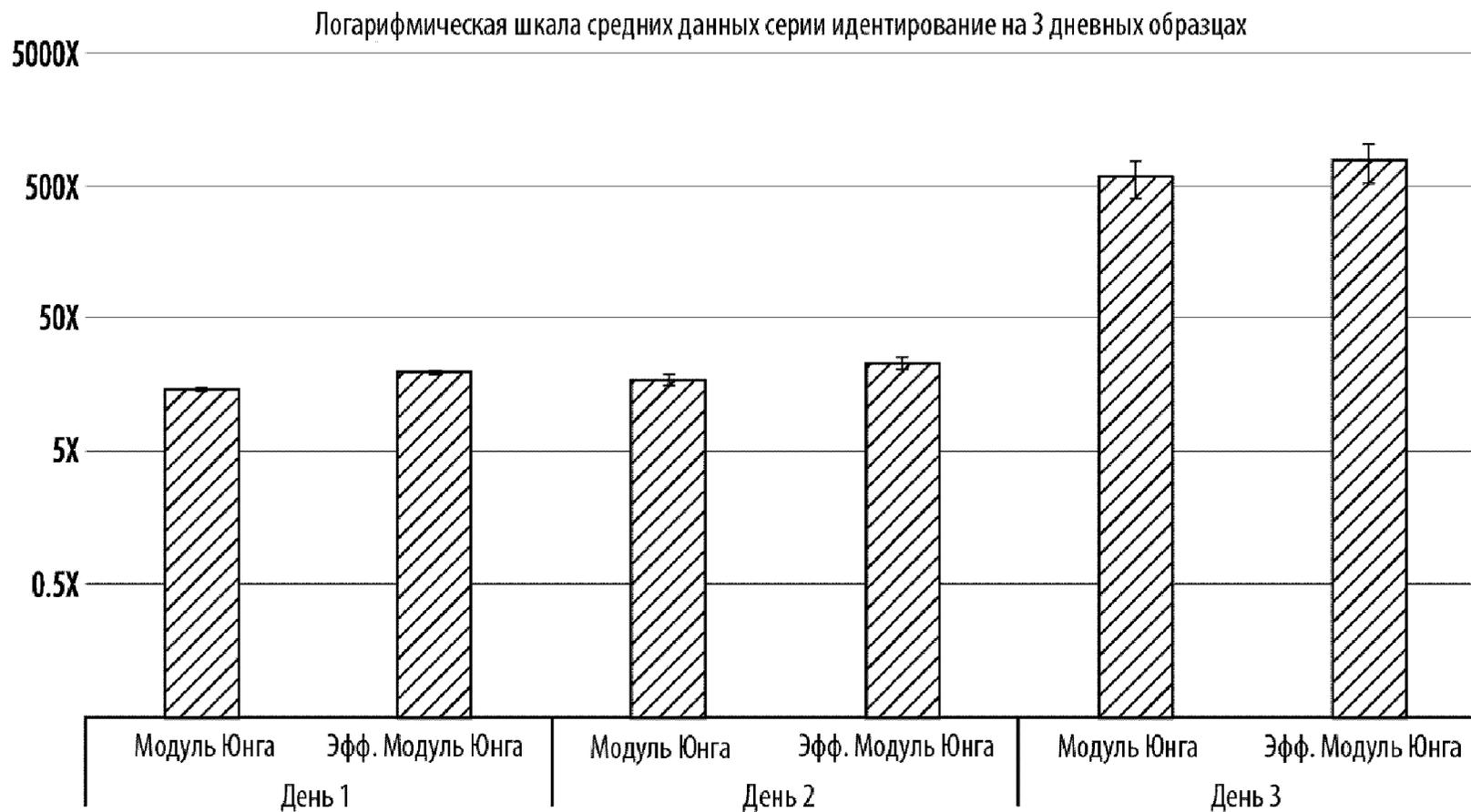
Фиг. 3С



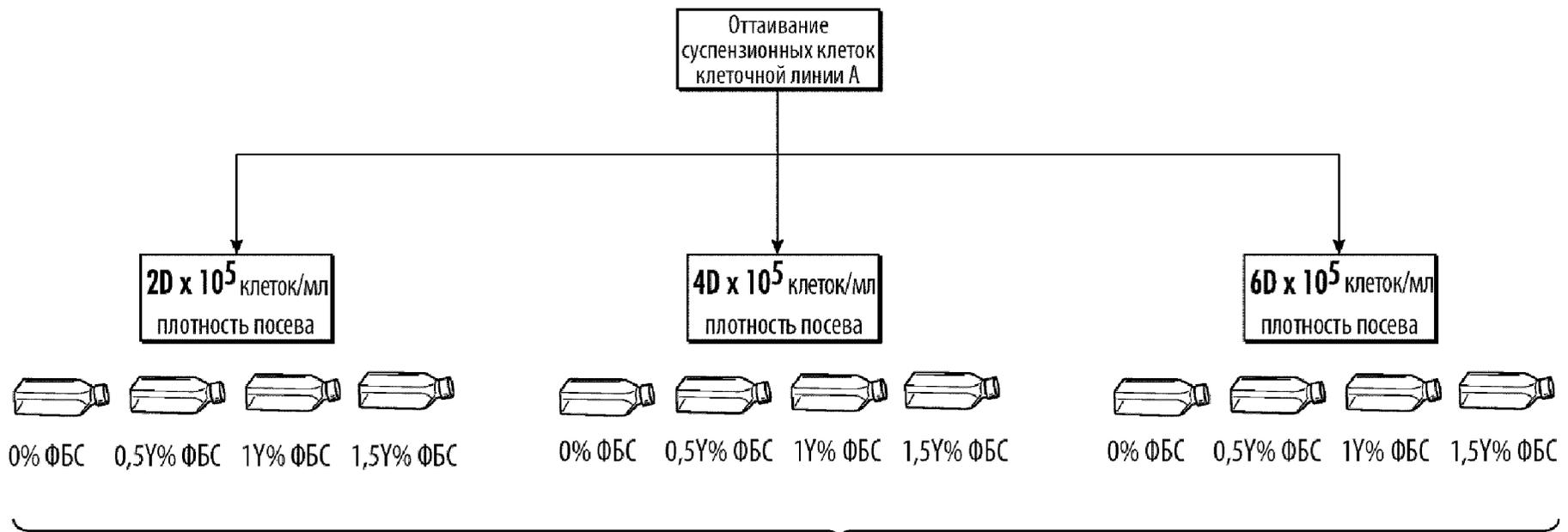
Фиг. 3D



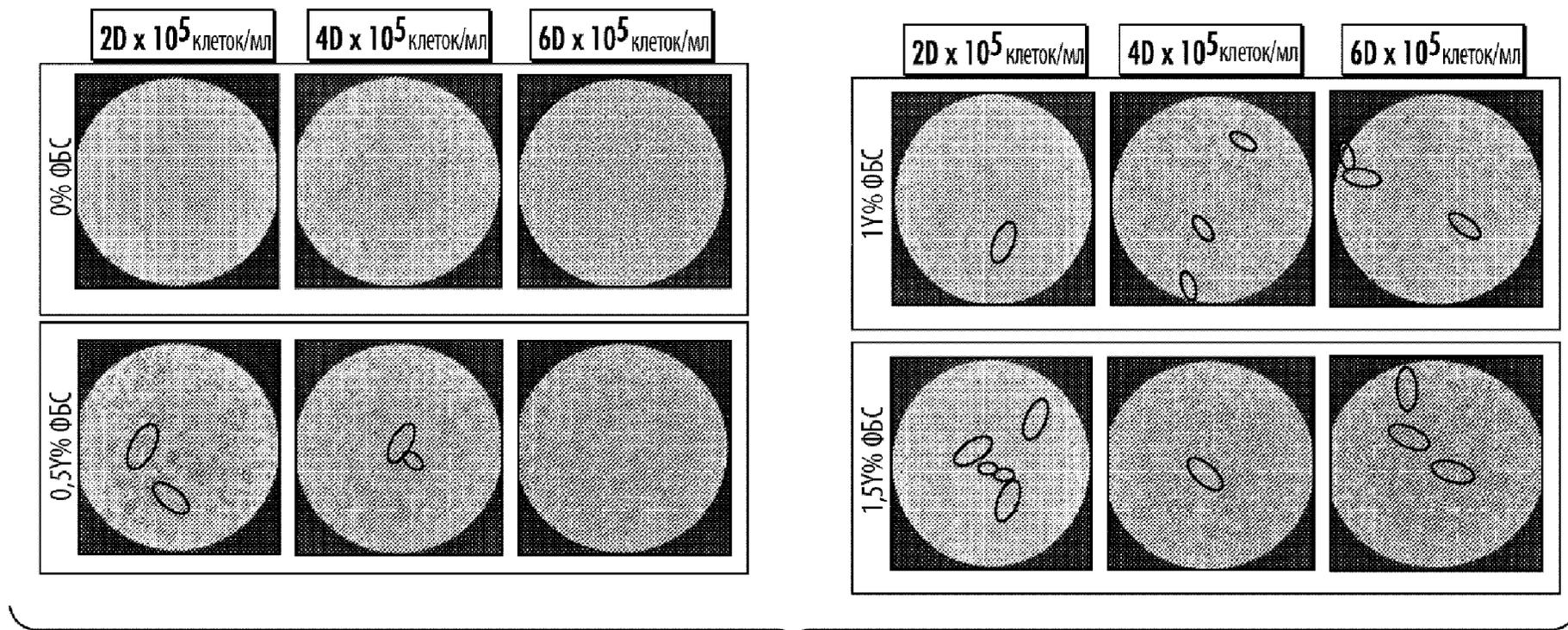
Фиг. 4В



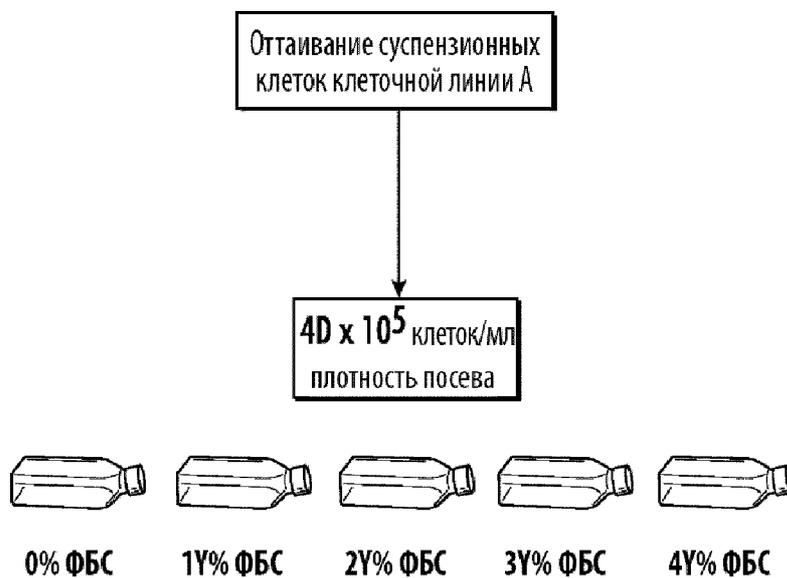
Фиг. 5



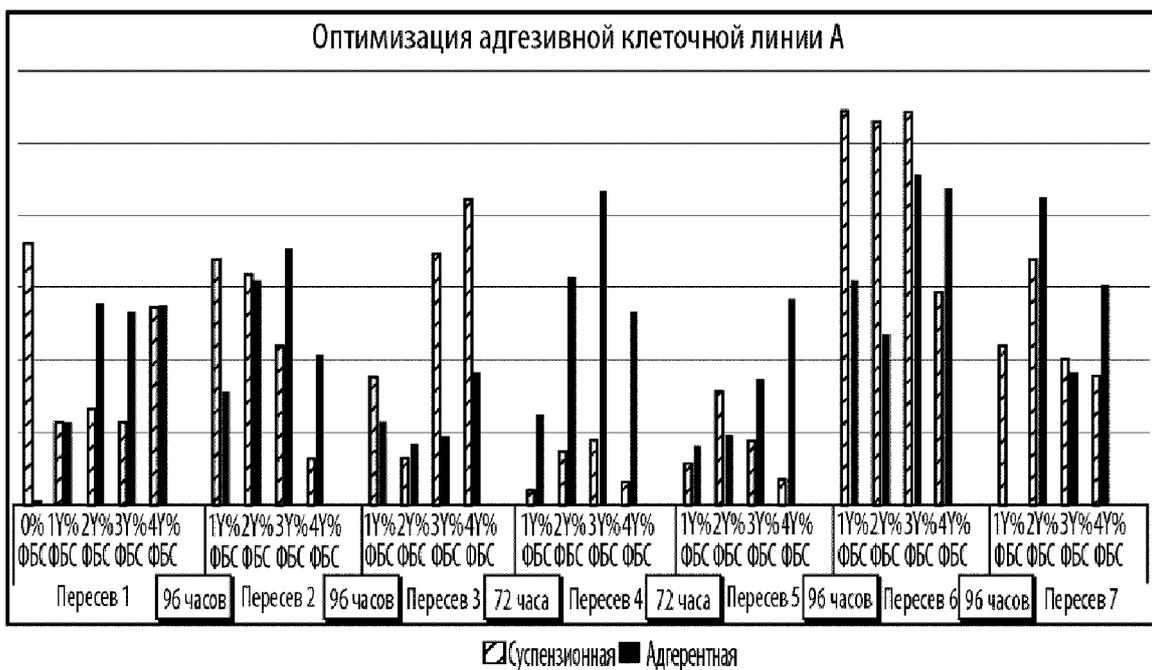
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8А



Фиг. 8В