

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к способам получения клеток в определенной фазе клеточного цикла, и может быть использовано для получения клеток, синхронизированных в просинтетической фазе клеточного цикла.

Наибольший интерес для биотехнологии представляют клетки в просинтетической фазе (G1-фазе) клеточного цикла, в которых обеспечивается эффективный биосинтез вирусных препаратов, антигенов, ферментов, алкалоидов, инсектицидов и других биологически активных веществ.

Известен способ получения клеток в G1-фазе цикла, состоящий в выращивании клеток в суспензии или монослойной культуре с последующим разделением клеток на фракции и отделением той фракции клеток, которая содержит клетки в G1— фазе [1]. Культивирование клеток осуществляется в стерильных условиях в монослойной или суспензионной культуре в ростовой питательной среде в течение 24 часов (обеспечивается полный клеточный цикл). Затем ростовую среду удаляют и выращенные клетки суспендируют в сбалансированном солевом растворе. Полученную суспензию клеток, содержащую клетки в трех фазах клеточного цикла - G1-фазе, S-фазе и G2+M-фазе, направляют на разделение методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы с последующим отбором фракции клеток в G1-фазе и их накоплением.

Как следует из технической сущности известного способа, выход клеток в G1-фазе зависит от природы клеток в культуре и ограничен особенностями клеточного цикла. Кроме того, способ [1] трудоемок, имеет ряд промежуточных этапов, требует использования дорогостоящих аппаратуры и реактивов, что лимитирует его применение в промышленных условиях.

Подтверждением указанных недостатков способа [1] являются данные, полученные нами при реализации известной технологии с использованием культуры клеток HEP-2, Vero, СПЭВ, RH. Культуру клеток в посевной концентрации $2 \cdot 10^5$ кл/мл высевают в стерильные матрасы вместимостью 1,5 л в 150 мл ростовой питательной среды, содержащей 10% сыворотки крови крупного рогатого скота, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 ЕД/мл стрептомицина. Клетки культивируют 24 часа при температуре 37°C. Затем среду роста заменяют равным объемом раствора Версена для снятия клеток с субстрата. Полученную суспензию клеток центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин для удаления раствора Версена. Осадок, содержащий клетки в G1-фазе, S- и G2+M-фазах клеточного цикла, суспендируют в сбалансированном растворе (растворы Хенкса, 199, Игла), наслаивают на градиент плотности сахарозы и подвергают ультрацентрифугированию при 30 000 об/мин в течение 30 мин при 20°C. Собирают отдельные фракции и осуществляют определение качественного и количественного состава каждой фракции методом проточной цитофлуорометрии после комбинированного окрашивания ядер [Культура животных клеток. Методы. Под ред. Р. Фрешни. - М.: Мир, 1989. - С. 204, 333].

Для этого к 0,8 мл суспензии полученных клеток в концентрации $1 \cdot 10^6$ кл/мл добавляют последовательно 0,1 мл 1%-ного раствора Тритона X-100; 0,02 мл 0,001% раствора бромистого этидия; 0,04 мл 0,01% раствора оливомицетина и 0,05 мл раствора магния хлорида с молярной концентрацией 0,03 моль/л. Окрашивание проводят на лазерном проточном цитофлуориметре "FACStar" фирмы BECTON DISKINSON USA по программе DNA Cell-Cycle Analysis Software-Ver C 5/87 Sum of Broadened Rectangles Model.

Расчет относительного содержания клеток, находящихся в различных фазах цикла, проводят на основании анализа полученных гистограмм и выражают в процентах. Данные представлены в табл. 1, варианты 1-12.

Как следует из представленных данных, известный способ [1] обеспечивает высокую эффективность фракционирования клеток.

Однако выход клеток в G1-фазе зависит от вида клеточной культуры и ограничен свойствами клеточного цикла, т.е. для накопления значительного количества клеток в G1-фазе необходимо обработать большой массив клеточной культуры. Таким образом известный способ характеризуется недостаточно высокой производительностью процесса получения клеток в G1-фазе, требует для реализации дорогостоящее оборудование - центрифуги, что ограничивает его промышленное использование.

Наиболее близким к изобретению по технической сущности и достигаемому результату является способ синхронизации клеток в присутствии синхронизирующего агента - оксимочевина [2]. Способ реализуется следующим образом. - Для получения массива клеточной культуры культивирование клеток осуществляют в стерильных условиях в монослойной или суспензионной культуре в ростовой питательной среде в течение 30 часов при 37°C. Затем среду роста заменяют равным объемом сбалансированного солевого раствора, содержащего оксимочевину в концентрации $(0,5-1,0) \cdot 10^{-3}$ М и инкубируют в течение 16 часов при 37°C. После завершения процесса инкубирования получают конечный продукт - массив клеток, содержащий клетки в G1-фазе, S-фазе и G2+M-фазе клеточного цикла.

Для определения эффективности известного способа по синхронизации клеток в G1-фазе нами были осуществлены опыты по синхронизации клеток оксимочевинной согласно [2] использовали культуры клеток HEP-2, Vero, СПЭВ и RH. Культуру клеток в посевной концентрации $2 \cdot 10^5$ кл/мл высевают в стерильные матрасы вместимостью 1,5 л в 150 мл ростовой питательной среды, содержащей 10% сыворотки крови крупного рогатого скота, 100 ЕД/мл пенициллина и 10 ЕД/мл стрептомицина. Клетки культивируют 20 часов при 37°C. Затем среду роста заменяют равным объемом сбалансированного солевого раствора (растворы Хенкса, Игла, 199), содержащего оксимочевину в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ М ($6 \cdot 10^{-2}$ г/дм³). Клетки инкубируют в термостате в течение 16 часов при 37°C. После завершения процесса инкубирования солевой раствор, содержащий оксимочевину, сливают и заменяют равным объемом раствора Версена, для снятия клеток с субстрата. Полученный конечный продукт представляет собой массив клеток, содержащий клетки в G1-, S-и G2+M-фазах клеточного цикла. Определение содержания клеток в каждой из указанных фаз клеточного цикла осуществляют методом проточной цитофлуорометрии.

Данные представлены в табл. 2, варианты 1-12.

Из данных табл. 2 следует, что выход клеток в G1-фазе при использовании известного способа [2] зависит от природы клеток, причем за один клеточный цикл не достигается максимально полная

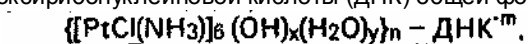
синхронизация клеток в G1-фаза ни для одного вида клеточной культуры. Для увеличения выхода клеток, синхронизированных в G1-фаза клеточного цикла, необходимо либо многократная обработка массива клеточной культуры, либо отделение и накопление клеток в G1-фаза при обработке большого массива клеточной культуры, что удорожает и усложняет технологию при ограниченном объеме обрабатываемой культуры клеток.

Таким образом, из уровня техники следует, что известные способы синхронизации клеток в G1-фаза клеточного цикла не обеспечивают высокую производительность процесса получения клеток в G1-фаза, что ограничивает их промышленное использование.

В основу изобретения поставлена задача усовершенствовать способ синхронизации клеток в G1-фаза клеточного цикла, основанный на обработке массива клеточной культуры синхронизирующим агентом, путем использования нового синхронизирующего агента - комплексных производных платины, что привело бы к достижению высокой производительности технологического процесса получения функционально однородного (гомогенного) пула клеток, синхронизированных в G1-фаза, независимо от способа культивирования клеток и их природы, обеспечению возможности обрабатывать неограниченный объем клеточной культуры, что позволит применять предложенный способ в промышленных условиях.

Поставленная задача решается путем разработки способа синхронизации клеток в G1-фаза клеточного цикла, включающего выращивание клеток, добавление к выращенным клеткам синхронизирующего агента и дальнейшую инкубацию, в котором, "вчасно изобретению, в качестве синхронизирующего агента используют цис-дихлордиаминплатину (II) формулы

лордиаминплатину (II) формулы $PtCl_2(NH_3)_2$ или производные платины (II) с полианионом дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) общей формулы



где $ДНК^m = (C_{39}H_{55-r}O_{32}N_{15}P_4)_n^m$,

$n = 1800-2200$,

при $x=0, y=12, m=6n, r=6$,

$x=2, y=10, m=4n, r=4$,

$x=0, y=6, m=6n, r=6$.

в действующей концентрации.

При этом, цис-дихлордиаминплатину (II) используют в концентрации $(5,3-530) \times 10^{-8}$ г/дм³, и соединения платины (II) с полианионом ДНК - в концентрации $(9-900) \cdot 10^{-4}$ г/дм ; а инкубацию клеток проводят в течение 6-8 часов.

Установлено, что при инкубировании выращенной массы клеточной культуры, содержащей клетки в G1-, S- и G2+M- фазах клеточного цикла, в присутствии заявляемых комплексных соединений платины, создаются условия, обеспечивающие блок клеточного цикла на уровне S-фазы и накопления клеток в G 1-фаза; при этом клетки, уже находящиеся в момент блокирования в S- и G2+M-фазах продолжают клеточный цикл до момента их вступления в G1-фазу. Т.о. в процессе инкубирования клеток культуры происходит регуляция клеточного цикла под воздействием соединений платины, в результате которой достигается практически полная синхронизация клеток в G1-фаза, на 95-100%. При этом, независимо от способа культивирования клеток культуры, значительно увеличивается производительность технологического процесса синхронизации клеток в G1-фаза - в 1,2-2,6 раза для культур СПЭВ, НЕР-2, Vero и RH; неограниченно возрастает объем перерабатываемой клеточной массы, что делает предложенный способ технологичным и экономичным.

Известны используемые в данном способе комплексные производные платины: цис-дихлордиаминплатина (II) [Rosenberg B. Clinical aspects of platinum anticancer drugs.// Metal Ions Biol. Syst., 1980, p.127-196]; производные платины (II) с полианионом дезоксирибонуклеиновой кислоты [Патент EP № 0374267, кл. А 61 К 35/28, 31/555, 1990]. Указанные соединения являются активными компонентами противоопухолевых лекарственных препаратов.

Способ реализуется следующим образом.

Предварительно выращивают массив клеточной культуры. Культивирование клеток осуществляют в стерильных условиях в монослойной или суспензионной культуре в ростовой питательной среде в течение 24 часов при температуре 37°C. Затем среду роста заменяют равным объемом сбалансированного солевого раствора, содержащего комплексные соединения платины в заявляемых концентрациях и инкубируют в течение 6-8 часов при 37°C. После окончания инкубирования получают конечный продукт - синхронизированную в G1-фаза монослойную клеточную структуру или взвесь клеток, которые используют для соответствующих целей биотехнологии.

Для реализации способа используют следующие клеточные культуры:
Vero - клетки почки зеленой мартышки;
СПЭВ - клетки эмбриона свиньи;
НЕР-2 - клетки карцинома гортани человека;
RH - клетки почки эмбриона человека.

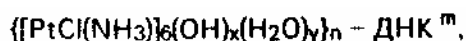
В качестве стандартного сбалансированного солевого раствора применяют раствор Хенкса, а также среды Игла и 199.

В качестве комплексных соединений платины используют:

1. Цис-дихлордиаминплатину (II) формулы

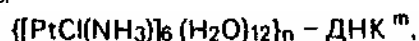
$PtCl_2(NH_3)_2$ (ДДП);

2. Производные платины (II) с полианионом дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) общей формулы



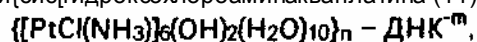
где $ДНК^m = (C_{39}H_{55}rO_{32}N_{15}P_4)_n^m$,
 $n = 1800 - 2200$.

Соединение I при $x=0$, $y=12$, $m=6n$, $r=6$, поли{гексакис[хлороаминдиакваплатина(II)]}-μ-дезоксирибонуклеат формулы



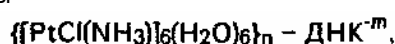
где $ДНК^m = (C_{39}H_{49}O_{32}N_{15}P_4)_n^m$
 $n = 1810 - 1990$, $m = 6n$;

Соединение II при $x=2$; $y=10$; $m=4n$; $r=4$;
 поли{бис[гидрооксхлороаминдиакваплатина (II)]}-μ-дезоксирибонуклеат формулы



где $ДНК^m = (C_{39}H_{51}O_{32}N_{15}P_4)_n^m$
 $n = 1900 - 2100$, $m = 4n$;

Соединение III при $x=0$; $y=6$; $m=6n$; $r=6$; поли{гексакис[хлороаминдиакваплатина (II)]}-μ-дезоксирибонуклеат формулы



где $ДНК^m = (C_{39}H_{49}O_{32}N_{15}P_4)_n^m$
 $n = 2000 - 2200$, $m = 6n$.

Соединения ДДП, I, II, III представляют собой мелкокристаллические порошки желтого цвета без запаха, устойчивые на воздухе, способные в течение года храниться без изменения свойств.

Контроль качества готового продукта осуществляли методом проточной цитофлюорометрии после комбинированного окрашивания ядер.

Примеры реализации способа.

Пример 1. Культуру клеток НЕР-2 в посевной концентрации $2 \cdot 10^5$ кл/мл высевают в стерильные матрасы вместимостью 1,5 л в 150 мл ростовой питательной среды, содержащей 10% сыворотки крови крупного рогатого скота, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 ЕД/мл стрептомицина. Клетки культивируют 24 часа при температуре 37°C и получают клеточную массу, содержащую $7,5 \cdot 10^7$ клеток. Затем среду роста заменяют равным объемом сбалансированного солевого раствора Хенкса, содержащего $180 \cdot 10^{-4}$ г/дм³ поли{гексакис[хлороаминдиакваплатины (II)]}-μ-дезоксирибонуклеата (соединение III).

Клетки инкубируют в термостате в течение 6 часов при температуре 37°C. После окончания инкубирования полученная клеточная масса, содержащая $7,5 \cdot 10^7$ клеток, представляет собой конечный продукт - синхронизированную в G1-фазе монослойную клеточную культуру. Анализ полученного продукта показывает, что 100% клеток находится в G1-фазе цикла, а клетки в S- G2+M-фазах не обнаружены (табл. 3, вариант 4).

Пример 2. С целью выяснения влияния сбалансированного солевого раствора на качественный и количественный состав конечного продукта в процессе инкубирования клеток культуры, был осуществлен следующий опыт. Культивирование клеток осуществляют как в примере 1, с получением $7,5 \cdot 10^7$ клеток культуры. Затем среду роста заменяют равным объемом сбалансированного солевого раствора Хенкса и клетки инкубируют в термостате в течение 6 часов при температуре 37°C. После окончания инкубирования клеточная масса содержала те же $7,5 \cdot 10^7$ клеток. Анализ полученного продукта показывает, что 62,6% клеток находится в G1-фазе, 2,7% - в S-фазе и 34,7% - в G2+M-фазе клеточного цикла (табл. 3, вариант 35).

Сопоставительный анализ составов конечного продукта, представленных в варианте 35, табл.3 и варианте 1, табл. 1, показывает, что содержание клеток в различных

фазах цикла при инкубировании клеток культуры НЕР-2 только в сбалансированном солевом растворе не отличается от такового интактной суточной культуры (после культивирования).

Пример 3. Культуру клеток НЕР-2 в посевной концентрации $2 \cdot 10^5$ кл/мл высевают в стерильные матрасы вместимостью 1,5 л в 150 мл ростовой питательной среды, содержащей 10% сыворотки крови крупного рогатого скота 100 ЕД/мл пенициллина и 100 ЕД/мл стрептомицина. Клетки культивируют 24 часа при температуре 37°C и получают клеточную массу, содержащую $7,5 \cdot 10^7$ клеток. Затем среду роста заменяют равным объемом среды Игла, содержащим $53 \cdot 10^{-8}$ г/дм³ цисдихлордиаминплатины (II) $PtCl_2(NH_3)_2$ (ДДП).

Клетки инкубируют в термостате в течение 6 часов при температуре 37°C. После окончания инкубирования получают клеточную массу, содержащую $7,5 \cdot 10^7$ клеток, которая представляет собой конечный продукт - синхронизированную в G1-фазе монослойную клеточную культуру. Согласно анализу, конечный продукт содержит 99,5% клеток, находящихся в G1-фазе; 0,5% клеток, находящихся в G2+M-фазе и не обнаружены клетки, находящиеся в S-фазе клеточного цикла (табл. 3, вариант 16).

Пример 4. Для синхронизации клеток в G1-фазе в суспензии используют культуру клеток Vero. Готовят суспензию клеток Vero в модифицированной среде Игла: из состава среды исключают ионы кальция и магния, и добавляют 10 глицерина, $10 \cdot 10^{-4}$ М серина, 10 инозитам 10% сыворотки крови крупного рогатого скота. Посевная концентрация - $2 \cdot 10^5$ клеток в 1 мл 700 мл полученной суспензии, содержащей $1,4 \cdot 10^8$ клеток вносят в 1-литровый сосуд (колбу), туда же помещают стерильный магнит и клетки культивируют в термостате при температуре 37°C в течение 24 часов при перемешивании со скоростью 250 об/мин.

Получают клеточную массу, содержащую 2,8-10 клеток. Клетки осаждают центрифугированием, суспендируют в 700 мл среды Игла, содержащей $180 \cdot 10^{-8}$ соединения III и инкубируют в термостате в течение

8 часов при 37°C и скорости перемешивания 250 об/мин. Получают конечный продукт - $2,8 \cdot 10^8$ (слеток, синхронизированных в G1-фазе (вариант 34).

В табл. 3 отражена эффективность способа синхронизации клеток в G1-фазе клеточного цикла, характеризующая содержанием в конечном продукте клеток в G1-, S- и G2+M-фазах цикла, при проведении инкубирования различного вида клеточной культуры в присутствии различных по химическому строению комплексных соединений платины, используемых как в заявляемом диапазоне концентраций, так и при за пределами их значениях (табл. 3, варианты 1-41).

Установлено, что заявляемые соединения платины (II)(PtCl₂(NH₃)₂ и производные платины (II)с полианионом ДНК используют в концентрациях, обеспечивающих высокую степень синхронизации клеток в культуре в G1-фазе на уровне 95-100%, достигаемую при оптимальном времени инкубирования - 6-8 часов (табл. 3, варианты 1-34).

При снижении концентрации комплексного соединения платины ниже граничного значения, например, соединения III до $4,5 \cdot 10^{-4}$ г/дм³, а ДДП - до $2,7 \cdot 10^{-8}$ г/дм³, не обеспечивается регулирование клеточного цикла: содержание клеток в конечном продукте в G1-, S- и G2+M-фазах цикла (варианты 36 и 40, соответственно), практически соответствует их содержанию в клеточной массе после инкубирования в присутствии синхронизирующего агента - океимочевина, используемой в способе-прототипе (табл. 3, вариант 42).

Верхний предел значений концентраций соединений платины ограничен тем, что дальнейшее ее повышение (например, соединения III до $1350 \cdot 10^{-4}$ г/дм³, а ДДП - до $795 \cdot 10^{-8}$ г/дм³), приводит к гибели клеток культуры (варианты 37 и 41, соответственно).

Оптимальными концентрациями соединений платины, обеспечивающими максимальную производительность предложенного способа, то есть 100%-ную синхронизацию клеток в G1-фазе в конечном продукте, являются: для ДДП - $(106-530) \cdot 10^{-8}$ г/дм³, для соединений I, II, III - $(180-900) \cdot 10^{-4}$ г/дм³.

Проведение процесса инкубирования клеток в присутствии комплексных соединений платины в заявляемых концентрациях, но в течение времени, менее 6 часов, например 5 часов, обеспечивает синхронизацию клеток НЕР-2 в G-1-фазе всего на 72,55%, при этом, 2,7% клеток находится в S-фазе и 24,75% - в G2+M-фазе (вариант 38). В этом случае эффективность предложенного способа находится практически на уровне способа-прототипа.

Увеличение же времени инкубирования более 8 часов является нецелесообразным, так как не приводит к увеличению эффективности синхронизации клеток в G1-фазе (вариант 39).

В табл. 4 представлены сопоставительные данные по производительности предложенного способа и способа-прототипа [2], выраженные количеством клеток в G1-фазе в конечном продукте, полученные при их реализации в оптимальных режимах. Как следует из представленных данных, предложенный способ обеспечивает достижение максимальной производительности - 100%-ной синхронизации клеток клеточного массива культур в G1-фазе, независимо от вида используемых культур. При этом достигаемая Производительность превышает производительность способа (2) в случае использования культуры Vero - в 1,2 раза, культуры НЕР-2 - в 1,4 раза, культуры СПЭВ - в 1,0 рбза, культуры RH - в 2,6 раза.

Таким образом, основным преимуществом предложенного способа является достижение максимально полной синхронизации клеточной культуры в G1-фазе, независимо от вида клеточной культуры, способа культивирования и объема перерабатываемой клеточной массы, что не достигается ни одним из известных способов. Это приводит к значительному увеличению производительности процесса получения клеток в G1-фазе: при использовании широко применяемых культур клеток Vero, СПЭВ, НЕР-2, RH производительность увеличивается в 1,2-2,6 раза.

Следует также отметить, что высокая производительность предложенного способа синхронизации клеток в G1-фазе клеточного цикла достигается с использованием простой технологии, не требующей больших затрат энергии, дорогостоящих оборудования и реактивов, что делает предложенный способ технологичным и экономным.

Таблица 1

№ п/п	Обозначение клеточной культуры	Вид сбалансиро- ванного солевого раствора	Содержание клеток в различных фазах цикла, %		
			G1	S	G2+M
1	HER-2	Хенкса	62,57	2,70	34,73
2		199	62,57	2,70	34,73
3		Игла	62,57	2,70	34,73
4	Vero	Хенкса	76,00	12,00	12,00
5		199	76,00	12,00	12,00
6		Игла	77,18	11,41	11,41
7	СПЭВ	Хенкса	39,70	48,60	11,70
8		199	39,70	48,60	11,70
9		Игла	40,00	49,30	10,70
10	РН	Хенкса	19,50	76,50	4,00
11		199	20,00	74,00	6,00
12		Игла	19,00	77,00	4,00

Таблица 2

№ п/п	Обозначение клеточной культуры	Вид сбалансиро- ванного солевого раствора	Содержание клеток в различных фазах цикла, %		
			G1	S	G2+M
1	HER-2	Хенкса	70,30	5,10	24,60
2		199	71,20	5,30	23,50
3		Игла	70,80	5,80	23,40

Продолжение табл. 2

№ п/п	Обозначение клеточной культуры	Вид сбалансиро- ванного солевого раствора	Содержание клеток в различных фазах цикла, %		
			G1	S	G2+M
4	Vero	Хенкса	80,80	14,50	4,70
5		199	80,40	14,20	5,40
6		Игла	79,80	14,80	5,40
7	СПЭВ	Хенкса	53,10	32,70	14,20
8		199	54,20	32,30	13,50
9		Игла	51,70	30,90	17,40
10	РН	Хенкса	35,50	40,70	23,80
11		199	38,40	42,30	19,30
12		Игла	36,80	41,90	21,30

№№ п/п	Культура	Условия инкубирования клеток в культуре				Содержани
		Природа синхронизирующего агента	Концентрация синхронизирующего агента, г/дм ³	Вид сбалансированного солевого раствора	Время, ч	G1
1	HEP-2	Соединение III	$9 \cdot 10^{-4}$	р-р Хенкса	6	95,50
2			$45 \cdot 10^{-4}$		6	97,65
3			$90 \cdot 10^{-4}$		6	99,95
4			$180 \cdot 10^{-4}$		6	100,00
5			$450 \cdot 10^{-4}$		6	100,00
6			$900 \cdot 10^{-4}$		6	100,00
7			$45 \cdot 10^{-4}$		8	97,65
8			$450 \cdot 10^{-4}$		8	100,00
9		Соединение II	$9 \cdot 10^{-4}$	среда Игла	6	95,70
10			$180 \cdot 10^{-4}$		8	100,00
11			$900 \cdot 10^{-4}$		6	100,00
12		Соединение I	$9 \cdot 10^{-4}$	среда 199	8	95,70
13	HEP-2	Соединение I	$90 \cdot 10^{-4}$	р-р Хенкса	6	97,80
14			$900 \cdot 10^{-4}$		6	100,00
15		ДДП	$5,3 \cdot 10^{-8}$		8	95,80
16			$5,3 \cdot 10^{-8}$		6	99,50
17			$106 \cdot 10^{-8}$		6	100,00
18			$212 \cdot 10^{-8}$		8	100,00
19			$530 \cdot 10^{-8}$		6	100,00
20		Соединение III	$180 \cdot 10^{-4}$		6	100,00
21			$180 \cdot 10^{-4}$	среда 199	6	100,00

(ЦИПИЯЧНЯШ

№№ п/п	Культура	Условия инкубирования клеток в культуре				Содержани
		Природа синхрони- зирующего агента	Концентрация синхронизиру- ющего агента, г/дм ³	Вид сбалан- сированного солевого раствора	Время, ч	G1
22	Vero	ДДП	106·10 ⁻⁸	среда Игла	6	100,00
23		соед. I	450·10 ⁻⁴	р-р Хенкса	6	100,00
24		соед. II	180·10 ⁻⁴	р-р Хенкса	6	100,00
25		соед. III	180·10 ⁻⁴	среда 199	6	100,00
26	СПЭВ	ДДП	53·10 ⁻⁸	р-р Хенкса	6	99,65
27		соед. I	180·10 ⁻⁴	среда Игла	6	100,00
28		соед. II	90·10 ⁻⁴	среда Игла	6	99,90
29		соед. III	450·10 ⁻⁴	среда 199	6	100,00
30	РН	ДДП	106·10 ⁻⁸	р-р Хенкса	6	100,00
31		соед. I	9·10 ⁻⁴	р-р Хенкса	8	96,10
32		соед. II	450·10 ⁻⁴	среда Игла	6	100,00
33		соед. III	90·10 ⁻⁴	среда 199	6	99,98
34	Vero	соед. III	180·10 ⁻⁴	среда Игла	8	100,00
Запредельные значения						
35	HEP-2	—	—	р-р Хенкса	8	62,60
36		соед. III	4,5·10 ⁻⁴		8	66,65
37			1350·10 ⁻⁴		6	гибель клеток
38			180·10 ⁻⁴		5	72,55
39			180·10 ⁻⁴		12	100,00
40		ДДП	2,7·10 ⁻⁸		8	64,90
41			795·10 ⁻⁸		6	гибель клеток

 $\wedge \Psi \wedge \Psi \Gamma \wedge \wedge \top \text{TM}$

№№ п/п	Культура	Условия инкубирования клеток в культуре				Содержани
		Природа синхронизирующего агента	Концентрация синхронизирующего агента, г/дм ³	Вид сбалансированного солевого раствора	Время, ч	G1
По прототипу						
42	HEP-2	оксимочевина	$6 \cdot 10^{-2}$	р-р Хенкса	16	70,30

№ п/п	Наименование показателя	Известный способ [3], (инкубирование в присутствии оксимочевина)				Предлагаемый способ в присутствии оксимочевина
		HER-2	СПЭВ	Vero	RH	HER-2
1	Посевная концентрация клеток в общем объеме (15 л)	$3 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^9$
2	Коэффициент пролиферации клеточной культуры	2,5	1,5	0,7	1,4	2,5
3	Конечная концентрация клеток в общем объеме (15 л)	$7,5 \cdot 10^9$	$4,5 \cdot 10^9$	$8,1 \cdot 10^9$	$4,2 \cdot 10^9$	$7,5 \cdot 10^9$
4	Содержание клеток в G1-фазе в конечном продукте	$5,27 \cdot 10^9$	$2,4 \cdot 10^9$	$6,5 \cdot 10^9$	$1,6 \cdot 10^9$	$7,5 \cdot 10^9$
5	Содержание клеток в G1-фазе в конечном продукте	70,3	54,2	80,4	38,4	100,00

№ п/п	Наименование показателя	Известный способ [3], (инкубирование в присутствии оксимочевина)				Предлагаемый способ в присутствии оксимочевина
		HER-2	СПЭВ	Vero	RH	HER-2
6	Увеличение производительности предложенного способа по сравнению со способом [2], разы	—	—	—	—	1,40