



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107567495 A

(43)申请公布日 2018.01.09

(21)申请号 201580076640.3

(74)专利代理机构 北京市嘉元知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 11484

(22)申请日 2015.12.21

代理人 张永新

(30)优先权数据

62/095,734 2014.12.22 US

(51)Int.Cl.

C12N 5/10(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C12P 21/00(2006.01)

2017.08.21

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/067040 2015.12.21

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/106192 EN 2016.06.30

(71)申请人 建新公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 C·黄 T·约翰森 J·沃尔特

C·程 J·王 N·沙阿 S-A·贝

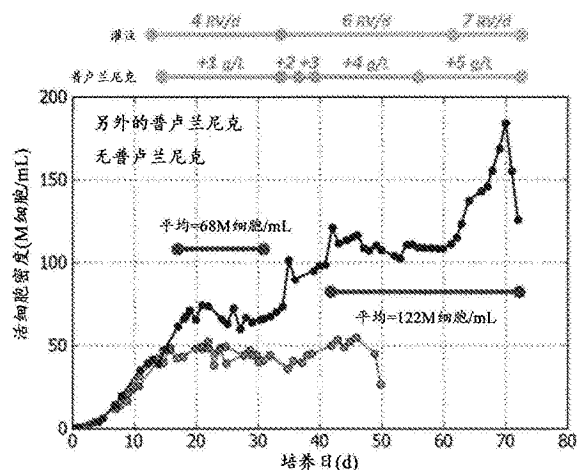
权利要求书6页 说明书56页 附图15页

(54)发明名称

培养哺乳动物细胞的方法

(57)摘要

本申请提供在液体培养基中培养哺乳动物细胞的方法,所述液体培养基包含浓度为1.8g/L或浓度高于1.8g/L的泊洛沙姆-188或者所述液体培养基包含基于选自下组的一个或多个因素选择的泊洛沙姆-188浓度:孔径、孔类型、气体流速、培养基中的活细胞密度和涉及细胞应激的标志物。



1. 一种培养哺乳动物细胞的方法,所述方法包括:

在足够产生重组蛋白的条件下灌注培养哺乳动物细胞,其包含编码所述重组蛋白的核酸,其中

灌注培养包括在包含浓度为1.8g/L或浓度高于1.8g/L的泊洛沙姆-188的液体培养基中培养,且其中所述泊洛沙姆-188在培养步骤前存在于所述培养基中和/或添加至所述培养基和/或在培养步骤过程中添加至所述培养基。

2. 权利要求1的方法,其中所述培养基包含浓度为1.8g/L或浓度高于1.8g/L的泊洛沙姆-188。

3. 权利要求2的方法,其中所述培养基包含浓度为2.8g/L或浓度高于2.8g/L的泊洛沙姆-188。

4. 权利要求3的方法,其中所述培养基包含浓度为4.0g/L或浓度高于4.0g/L的泊洛沙姆-188。

5. 权利要求4的方法,其中所述培养基包含浓度为6.0g/L或浓度高于6.0g/L的泊洛沙姆-188。

6. 权利要求5的方法,其中所述培养基包含浓度为8.0g/L或浓度高于8.0g/L的泊洛沙姆-188。

7. 权利要求6的方法,其中所述培养基包含浓度为10.0g/L或浓度高于10.0g/L的泊洛沙姆-188。

8. 权利要求1-7中任一项的方法,其中所述培养基还包含消泡剂,且所述培养基中消泡剂(g/L)与泊洛沙姆-188(g/L)的比例为所述液体培养基中约0.5%至约6.0%。

9. 权利要求8的方法,其中所述培养基中消泡剂(g/L)与泊洛沙姆-188(g/L)的比例为约1.0%至约5.5%。

10. 权利要求9的方法,其中所述培养基中消泡剂(g/L)与泊洛沙姆-188(g/L)的比例为约1.5%至约5.0%。

11. 权利要求1的方法,其中所述方法包括在培养步骤前将泊洛沙姆-188添加至所述培养基和/或在培养步骤过程中将泊洛沙姆-188添加至所述培养基以在所述培养基中提供浓度为1.8g/L或浓度高于1.8g/L的泊洛沙姆-188。

12. 权利要求1或11的方法,其中泊洛沙姆-188存在于所述培养基。

13. 权利要求11或12的方法,其中所述方法包括在培养步骤前将泊洛沙姆-188添加至所述培养基和/或在培养步骤过程中将泊洛沙姆-188添加至所述培养基以在所述培养基中提供浓度为2.8g/L或浓度高于2.8g/L的泊洛沙姆-188。

14. 权利要求13的方法,其中所述方法包括在培养步骤前将泊洛沙姆-188添加至所述培养基和/或在培养步骤过程中将泊洛沙姆-188添加至所述培养基以在所述培养基中提供浓度为4.0g/L或浓度高于4.0g/L的泊洛沙姆-188。

15. 权利要求14的方法,其中所述方法包括在培养步骤前将泊洛沙姆-188添加至所述培养基和/或在培养步骤过程中将泊洛沙姆-188添加至所述培养基以在所述培养基中提供浓度为6.0g/L或浓度高于6.0g/L的泊洛沙姆-188。

16. 权利要求15的方法,其中所述方法包括在培养步骤前将泊洛沙姆-188添加至所述培养基和/或在培养步骤过程中将泊洛沙姆-188添加至所述培养基以在所述培养基中提供

浓度为8.0g/L或浓度为8.0g/L的泊洛沙姆-188。

17. 权利要求16的方法,其中所述方法包括在培养步骤前将泊洛沙姆-188添加至所述培养基和/或在培养步骤过程中将泊洛沙姆-188添加至所述培养基以在所述培养基中提供浓度为10.0g/L或浓度高于10.0g/L的泊洛沙姆-188。

18. 权利要求1-17中任一项的方法,其中所述方法包括将所述培养基中的泊洛沙姆-188浓度随时间增加。

19. 权利要求18的方法,其中所述培养基中的泊洛沙姆-188浓度随时间增加基于培养基中的活细胞密度。

20. 权利要求19的方法,其中所述方法包括当所述培养基中的活细胞密度为约 35×10^6 细胞/mL至约 60×10^6 细胞/mL时,将培养基中的泊洛沙姆-188浓度增加到大于1.8g/L。

21. 权利要求20的方法,其中所述方法包括当所述培养基中的活细胞密度为约 35×10^6 细胞/mL至约 60×10^6 细胞/mL时,将培养基中的泊洛沙姆-188浓度增加到约1.8g/L至约3.0g/L。

22. 权利要求21的方法,其中所述方法包括当所述培养基中的活细胞密度为约 35×10^6 至约 60×10^6 细胞/mL时,将培养基中的泊洛沙姆-188浓度增加到约2.3g/L至约3.0g/L。

23. 权利要求19-22中任一项的方法,其中所述方法包括当所述培养基中的活细胞密度为约 60×10^6 细胞/mL至约 90×10^6 细胞/mL时,将培养基中的泊洛沙姆-188浓度增加到大于3.0g/L。

24. 权利要求23的方法,其中所述方法包括当所述培养基中的活细胞密度为约 60×10^6 细胞/mL至约 90×10^6 细胞/mL时,将培养基中的泊洛沙姆-188浓度增加到约3.0g/L至约6.0g/L。

25. 权利要求24的方法,其中所述方法包括当所述培养基中的活细胞密度为约 60×10^6 细胞/mL至约 90×10^6 细胞/mL时,将培养基中的泊洛沙姆-188浓度增加到约3.6g/L至约6.0g/L。

26. 权利要求19-25中任一项的方法,其中所述方法包括当所述培养基中的活细胞密度为大于 90×10^6 细胞/mL时,将培养基中的泊洛沙姆-188浓度增加到大于6.0g/L。

27. 权利要求26的方法,其中所述方法包括当所述培养基中的活细胞密度为大于 90×10^6 细胞/mL时,将培养基中的泊洛沙姆-188浓度增加到大于7.0g/L。

28. 权利要求27的方法,其中所述方法包括当所述培养基中的活细胞密度为大于 90×10^6 细胞/mL时,将培养基中的泊洛沙姆-188浓度增加到大于8.0g/L。

29. 权利要求28的方法,其中所述方法包括当所述培养基中的活细胞密度为大于 90×10^6 细胞/mL时,将培养基中的泊洛沙姆-188浓度增加到大于10.0g/L。

30. 权利要求19的方法,其中所述方法包括:

当所述培养基中的活细胞密度为约 35×10^6 至约 60×10^6 细胞/mL时,将培养基中的泊洛沙姆-188浓度增加到约1.8g/L至约3.0g/L;

当所述培养基中的活细胞密度为约 60×10^6 细胞/mL至约 90×10^6 细胞/mL时,将培养基中的泊洛沙姆-188浓度增加到约3.0g/L至约6.0g/L;和

当所述培养基中的活细胞密度为大于 90×10^6 细胞/mL时,将培养基中的泊洛沙姆-188浓度增加到大于6.0g/L。

31. 权利要求19-30中任一项的方法,还包括在培养过程中在一个或多个时间点确定所述培养基中的活细胞密度。

32. 权利要求1-31的方法,其中灌注培养包括:

提供包含配置于第一液体培养基中的哺乳动物细胞的容器;

在搅拌下温育所述容器并在约32°C至约40°C的温度进行至少约7天的培养期;和

在培养期的首个48至96小时后连续地或周期地移出第一体积的第一液体培养基并向第一液体培养基添加第二体积的第二液体培养基,其中所述第一和第二体积是大约相等的。

33. 权利要求32的方法,其中第二液体培养基以高于第一液体培养基中的浓度包含泊洛沙姆-188。

34. 权利要求32的方法,其中第一液体培养基包含浓度为1.8g/L或浓度低于1.8g/L的泊洛沙姆-188,且第二液体培养基包含浓度高于1.8g/L的泊洛沙姆-188。

35. 权利要求34的方法,其中第二液体培养基包含浓度高于2.8g/L泊洛沙姆-188的泊洛沙姆-188。

36. 权利要求35的方法,其中第二液体培养基包含浓度高于4.0g/L泊洛沙姆-188的泊洛沙姆-188。

37. 权利要求36的方法,其中第二液体培养基包含浓度高于6.0g/L泊洛沙姆-188的泊洛沙姆-188。

38. 权利要求37的方法,其中第二液体培养基包含浓度高于8.0g/L泊洛沙姆-188的泊洛沙姆-188。

39. 权利要求38的方法,其中第二液体培养基包含浓度高于10.0g/L的泊洛沙姆-188。

40. 权利要求32的方法,其中所述方法包括在将第二体积的第二液体培养基添加至第一液体培养基之前或之后,将泊洛沙姆-188添加至第二液体培养基以在所述第二培养基中提供浓度为1.8g/L或浓度高于1.8g/L的泊洛沙姆-188。

41. 权利要求40的方法,其中将泊洛沙姆-188添加至第二液体培养基以在第二培养基中提供浓度高于2.8g/L的泊洛沙姆-188。

42. 权利要求41的方法,其中将泊洛沙姆-188添加至第二液体培养基以在第二培养基中提供浓度高于4.0g/L的泊洛沙姆-188。

43. 权利要求42的方法,其中将泊洛沙姆-188添加至第二液体培养基以在第二液体培养基中提供浓度高于6.0g/L的泊洛沙姆-188。

44. 权利要求43的方法,其中将泊洛沙姆-188添加至第二液体培养基以在第二液体培养基中提供浓度高于8.0g/L的泊洛沙姆-188。

45. 权利要求44的方法,其中将泊洛沙姆-188添加至第二液体培养基以在第二液体培养基中提供浓度高于10.0g/L的泊洛沙姆-188。

46. 权利要求32-45中任一项的方法,还包括:

从所述哺乳动物细胞、从第一液体培养基或第二液体培养基,或其任何组合收集重组蛋白。

47. 权利要求46的方法,还包括将收集的重组蛋白配制成药物组合物。

48. 权利要求46的方法,其中收集在所述培养实现大于 30×10^6 细胞/mL的活细胞密度之

后进行。

49. 权利要求48的方法,其中收集在所述培养实现大于 50×10^6 细胞/mL的活细胞密度之后进行。

50. 权利要求49的方法,其中收集在所述培养实现大于 100×10^6 细胞/mL的活细胞密度之后进行。

51. 权利要求50的方法,其中收集在所述培养实现大于 150×10^6 细胞/mL的活细胞密度之后进行。

52. 权利要求51的方法,其中收集在所述培养实现大于 200×10^6 细胞/mL的活细胞密度之后进行。

53. 一种培养哺乳动物细胞的方法,所述方法包括:

提供培养系统,其包含容器、配置于所述容器内的液体培养基和配置在所述容器内的喷雾器,所述喷雾器包含多个孔,所述孔径配置以将气体通过所述喷雾器分配入所述液体培养基;和

在所述培养系统中在足够在该系统中产生重组蛋白的条件和气体流速下灌注培养哺乳动物细胞,其包含编码重组蛋白的核酸,其中所述培养基包含的泊洛沙姆-188浓度基于选自下组的一个或多个因素选择:孔径、孔类型、气体流速、培养基中的活细胞密度和涉及细胞应激的标志物。

54. 权利要求53的方法,其中所述选择的泊洛沙姆-188浓度通过如下实现:在培养步骤前将泊洛沙姆-188添加至所述培养基和/或在所述培养步骤过程中将泊洛沙姆-188添加至所述培养基。

55. 权利要求53或54的方法,其中所述因素为孔类型而且所述孔类型为烧结孔或钻孔。

56. 权利要求53的方法,其中所述方法包括当所述孔类型为钻孔且所述孔径为约 $750 \mu\text{m}$ 至约 1.5mm 时,基于孔类型和孔径选择浓度为约 2.3g/L 至约 3.3g/L 的泊洛沙姆-188。

57. 权利要求56的方法,其中所述方法包括当所述孔类型为钻孔且所述孔径为约 $900 \mu\text{m}$ 至约 1.1mm 时,基于孔类型和孔径选择浓度为约 2.5g/L 至约 3.1g/L 的泊洛沙姆-188。

58. 权利要求53的方法,其中所述方法包括当所述孔类型为钻孔且所述孔径为约 $250 \mu\text{m}$ 至约 $750 \mu\text{m}$ 时,基于孔类型和孔径选择浓度为约 3.3g/L 至约 4.3g/L 的泊洛沙姆-188。

59. 权利要求58的方法,其中所述方法包括当所述孔类型为钻孔且所述孔径为约 $400 \mu\text{m}$ 至约 $600 \mu\text{m}$ 时,基于孔类型和孔径选择浓度为约 3.5g/L 至约 4.1g/L 的泊洛沙姆-188。

60. 权利要求53的方法,其中所述方法包括当所述孔类型为钻孔且所述孔径为约 $1 \mu\text{m}$ 至约 $250 \mu\text{m}$ 时,基于孔类型和孔径选择浓度高于 4.3g/L 的泊洛沙姆-188。

61. 权利要求60的方法,其中所述方法包括当所述孔类型为钻孔且所述孔径为约 $1 \mu\text{m}$ 至约 $200 \mu\text{m}$ 时,基于孔类型和孔径选择浓度高于 4.3g/L 的泊洛沙姆-188。

62. 权利要求61的方法,其中所述方法包括当所述孔类型为钻孔且所述孔径为约 $160 \mu\text{m}$ 至约 $190 \mu\text{m}$ 时,基于孔类型和孔径选择浓度高于 4.3g/L 的泊洛沙姆-188。

63. 权利要求62的方法,其中所述方法包括当所述孔类型为钻孔且所述孔径为约 $170 \mu\text{m}$ 至约 $180 \mu\text{m}$ 时,基于孔类型和孔径选择浓度高于 4.3g/L 的泊洛沙姆-188。

64. 权利要求60-63中任一项的方法,其中所述方法包括选择浓度高于 5.0g/L 的泊洛沙姆-188。

65. 权利要求64的方法,其中所述方法包括选择浓度高于6.0g/L的泊洛沙姆-188。
66. 权利要求65的方法,其中所述方法包括选择浓度高于8.0g/L的泊洛沙姆-188。
67. 权利要求66的方法,其中所述方法包括选择浓度高于10.0g/L的泊洛沙姆-188。
68. 权利要求53的方法,其中所述方法包括当所述孔类型为烧结孔且所述孔径为大于150 μm 时,基于孔类型和孔径选择浓度为约1.8g/L至约3.3g/L的泊洛沙姆-188。
69. 权利要求68的方法,其中所述方法包括当所述孔类型为烧结孔且所述孔径为约80 μm 至约150 μm 时,基于孔类型和孔径选择浓度为约3.3g/L至约4.3g/L的泊洛沙姆-188。
70. 权利要求69的方法,其中所述方法包括当所述孔类型为烧结孔且所述孔径为约90 μm 至约110 μm 时,基于孔类型和孔径选择浓度为约3.5g/L至约4.1g/L的泊洛沙姆-188。
71. 权利要求53的方法,其中所述方法包括当所述孔类型为烧结孔且所述孔径为约1 μm 至约80 μm 时,基于孔类型和孔径选择浓度高于4.5g/L的泊洛沙姆-188。
72. 权利要求71的方法,其中所述方法包括选择浓度高于5.0g/L的泊洛沙姆-188。
73. 权利要求72的方法,其中所述方法包括选择浓度高于6.0g/L的泊洛沙姆-188。
74. 权利要求73的方法,其中所述方法包括选择浓度高于8.0g/L的泊洛沙姆-188。
75. 权利要求74的方法,其中所述方法包括选择浓度高于10.0g/L的泊洛沙姆-188。
76. 权利要求53-75中任一项的方法,其中所述灌注培养包括:
在搅拌下温育包含第一液体培养基的培养系统且在约32 $^{\circ}\text{C}$ 至约40 $^{\circ}\text{C}$ 的温度进行至少约7天的培养期;并
在培养期的首个48至96小时之后,连续地或周期地移出第一体积的第一液体培养基并向第一液体培养基添加第二体积的第二液体培养基。
77. 权利要求76的方法,其中第二液体培养基以高于第一液体培养基中泊洛沙姆-188浓度的浓度包含泊洛沙姆-188。
78. 权利要求76或77的方法,其中所述第二培养基包含选择的泊洛沙姆-188浓度。
79. 权利要求76-78中任一项的方法,进一步包括:
从哺乳动物细胞的内部、从第一液体培养基或第二液体培养基,或其任何组合收集重组蛋白。
80. 权利要求79的方法,还包括将所述收集的重组蛋白配制成药物组合物。
81. 权利要求32或53的方法,其中所述容器为灌注生物反应器。
82. 权利要求81的方法,其中所述灌注生物反应器具有约1.5L至约25,000L的体积。
83. 权利要求32或53的方法,其中培养期为大于10天。
84. 权利要求32或53的方法,其中(c)中移出第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是连续进行的。
85. 权利要求32或53的方法,其中(c)中移出第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是周期进行的。
86. 权利要求32或53的方法,其中(c)中移出的第一体积的第一液体培养基和添加的第二体积的第二液体培养基随时间增加。
87. 权利要求32或53的方法,其中第一液体培养基和/或第二液体培养基选自下组:化学成分确定的液体培养基、无血清液体培养基、含有血清的液体培养基、无动物衍生组分的液体培养基、和无蛋白的培养基。

88. 权利要求32或53的方法,其中在时间期的约首个48至96小时后,在每24-小时时间中,(c)中移出的第一体积的第一液体培养基和添加的第二体积的第二液体培养基为第一液体培养基体积或容器体积的约0.3x至约10x。

89. 权利要求1-88中任一项的方法,其中所述哺乳动物细胞为中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、人胚胎肾(HEK)细胞、NSO细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、PerC6细胞、Vero细胞、或HT-1080细胞系。

90. 权利要求1-89中任一项的方法,其中所述重组蛋白为免疫球蛋白、酶、生长因子、蛋白片段、或工程化的蛋白。

培养哺乳动物细胞的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 此申请要求要求2014年12月22日提交的美国临时专利申请序列号62/095,734的优先权,其全部内容通过提述并入本文。

技术领域

[0003] 此发明涉及生物技术和制造重组蛋白的方法。

[0004] 背景

[0005] 含有编码重组蛋白的核酸的哺乳动物细胞常常用于产生治疗上或商业上重要的蛋白。在多样化的产品管线的当前环境中,生物技术公司越来越多地被驱动以开发用于高度灵活且具有成本效益地生产治疗性蛋白药物物质的创新解决方案。

[0006] 总结

[0007] 本发明基于,至少部分基于,如下发现:包括编码重组蛋白的核酸的哺乳动物细胞在包含浓度为1.8或浓度大于1.8g/L的泊洛沙姆-188(例如,大于2.0g/L,大于2.5g/L,大于3.0g/L,大于3.5g/L,大于4.0g/L,大于4.5g/L,大于5.0g/L,大于5.5g/L,大于6.0g/L,大于6.5g/L,或大于7.0g/L泊洛沙姆-188)的培养基中存活且增殖,以泊洛沙姆-188与消泡剂的特定比例实现最佳细胞生长,通过作为活细胞密度的函数增加细胞培养物中的泊洛沙姆-188浓度来实现高细胞密度,且添加至细胞培养物以促进细胞增殖的最佳泊洛沙姆-188浓度取决于来自下组的一个或多个因素:孔径、孔类型、气体流速、培养基中的活细胞密度、和涉及细胞应激(cell stress)的标志物(markers)。

[0008] 本申请中提供的是培养哺乳动物细胞的方法,其包括:在足够产生重组蛋白的条件下灌注培养包含编码所述重组蛋白的核酸的哺乳动物细胞,其中灌注培养包括在包含浓度为1.8g/L或浓度高于1.8g/L的泊洛沙姆-188的液体培养基中培养,且其中所述泊洛沙姆-188在培养步骤前存在于所述培养基中和/或添加至所述培养基和/或在培养步骤过程中添加至所述培养基。在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,所述培养基包含浓度为1.8g/L或浓度高于1.8g/L(例如,浓度为2.8g/L或浓度高于2.8g/L,浓度为4.0g/L或浓度高于4.0g/L,浓度为6.0g/L或浓度高于6.0g/L,浓度为8.0g/L或浓度高于8.0g/L,或者浓度为10.0g/L或浓度高于10.0g/L)的泊洛沙姆-188。

[0009] 在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,所述培养基还包含消泡剂且所述培养基中消泡剂(g/L)与泊洛沙姆-188(g/L)的比例为所述液体培养基中约0.5%至约6.0%(例如,约1.0%至约5.5%,或约1.5%至约5.0%)。在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,所述方法包括在培养步骤前将泊洛沙姆-188添加至所述培养基和/或在培养步骤过程中将泊洛沙姆-188添加至所述培养基以在所述培养基中提供浓度为1.8g/L或浓度高于1.8g/L的泊洛沙姆-188。在本申请提供的任何方法的一些实施方案中,泊洛沙姆-188存在于所述培养基中。在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,所述方法包括在培养步骤前将泊洛沙姆-188添加至所述培养基和/或在培养步骤过程中将泊洛沙姆-188添加至所述培养基以在所述培养基中提供浓度为2.8g/L或浓度高于2.8g/L(例如,浓度为4.0g/L或浓

度为大于4.0g/L,浓度为6.0g/L或浓度高于6.0g/L,浓度为8.0g/L或浓度高于8.0g/L,或者浓度为10.0g/L或浓度高于10.0g/L)的泊洛沙姆-188。

[0010] 在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,所述方法包括将培养基中的泊洛沙姆-188浓度随时间增加。在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,将培养基中的泊洛沙姆-188浓度随时间增加是基于所述培养基中的活细胞密度。在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,所述方法包括当所述培养基中的活细胞密度为约 35×10^6 细胞/mL至约 60×10^6 细胞/mL时,将培养基中的泊洛沙姆-188浓度增加到大于1.8g/L(例如,约1.8g/L至约3.0g/L,或约2.3g/L至约3.0g/L)。在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,所述方法包括当所述培养基中的活细胞密度为约 60×10^6 细胞/mL至约 90×10^6 细胞/mL时,将培养基中的泊洛沙姆-188浓度增加到大于3.0g/L(例如,约3.0g/L至约6.0g/L,或约3.6g/L至约6.0g/L)。在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,所述方法包括当所述培养基中的活细胞密度为大于 90×10^6 细胞/mL时,将培养基中的泊洛沙姆-188浓度增加到大于6.0g/L(例如,大于7.0g/L,大于8.0g/L,或大于10.0g/L)。本申请所述的任何方法的一些实施方案包括:当所述培养基中的活细胞密度为约 35×10^6 细胞/mL至约 60×10^6 细胞/mL时,将培养基中的泊洛沙姆-188浓度增加到约1.8g/L至约3.0g/L;当所述培养基中的活细胞密度为约 60×10^6 细胞/mL至约 90×10^6 细胞/mL时,将培养基中的泊洛沙姆-188浓度增加到约3.0g/L至约6.0g/L;并且当所述培养基中的活细胞密度为大于 90×10^6 细胞/mL时,将培养基中的泊洛沙姆-188浓度增加到大于6.0g/L。本申请所述的任何方法的一些实施方案还包括在培养过程中在一个或多个时间点确定所述培养基中的活细胞密度。

[0011] 在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,所述灌注培养包括:提供包含配置于第一液体培养基中的哺乳动物细胞的容器;在搅拌下温育所述容器并在约32°C至约40°C的温度进行至少约7天的培养期;和在培养期的首个48至96小时后连续地或周期地移出第一体积的第一液体培养基并向第一液体培养基添加第二体积的第二液体培养基,其中第一和第二体积是大约相等的。在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,第二液体培养基以高于第一液体培养基中的浓度包含泊洛沙姆-188。在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,第一液体培养基包含浓度为1.8g/L或浓度低于1.8g/L的泊洛沙姆-188,且第二液体培养基包含浓度高于1.8g/L(例如,浓度高于2.8g/L,浓度高于4.0g/L,浓度高于6.0g/L,浓度高于8.0g/L,或浓度高于10.0g/L)的泊洛沙姆-188。在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,所述方法包括在将第二体积的第二液体培养基添加至第一液体培养基之前或之后,将泊洛沙姆-188添加至第二液体培养基以在所述第二培养基中提供浓度为1.8g/L或浓度高于1.8g/L(例如,浓度高于2.8g/L,浓度高于4.0g/L,浓度高于6.0g/L,浓度高于8.0g/L,或浓度高于10.0g/L)的泊洛沙姆-188。

[0012] 本申请所述的任何方法的一些实施方案还包括:从哺乳动物细胞、从第一液体培养基或第二液体培养基,或其任何组合收集重组蛋白。本申请所述的任何方法的一些实施方案还包括将收集的重组蛋白配制成药物组合物。在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,在培养实现大于 30×10^6 细胞/mL(例如,大于 50×10^6 细胞/mL,大于 100×10^6 细胞/mL,大于 150×10^6 细胞/mL,或大于 200×10^6 细胞/mL)的活细胞密度后进行收集。

[0013] 本申请中还提供的是培养哺乳动物细胞的方法,其包括:提供培养系统,其包含容器、配置于所述容器内的液体培养基和配置在所述容器内的喷雾器,所述喷雾器包含多个

孔,所述孔径配置以将气体通过所述喷雾器分配入所述液体培养基;和在所述培养系统中在足够在该系统中产生重组蛋白的条件和气体流速下灌注培养包含编码所述重组蛋白的核酸的哺乳动物细胞,其中所述培养基包含的泊洛沙姆-188浓度基于选自下组的一个或多个因素选择:孔径、孔类型、气体流速、培养基中的活细胞密度和涉及细胞应激的标志物。在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,所述选择的泊洛沙姆-188浓度通过如下实现:在培养步骤前将泊洛沙姆-188添加至所述培养基和/或在所述培养步骤过程中将泊洛沙姆-188添加至所述培养基。

[0014] 在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,所述因素为孔类型且所述孔类型是烧结孔或钻孔。在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,所述方法包括当所述孔类型为钻孔且所述孔径为约750 μm 至约1.5mm时,基于孔类型和孔径选择浓度为约2.3g/L至约3.3g/L的泊洛沙姆-188,或当所述孔类型为钻孔且所述孔径为约900 μm 至约1.1mm时,基于孔类型和孔径选择浓度为约2.5g/L至约3.1g/L的泊洛沙姆-188。在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,所述方法包括当所述孔类型为钻孔且所述孔径为约250 μm 至约750 μm 时,基于孔类型和孔径选择浓度为约3.3g/L至约4.3g/L的泊洛沙姆-188,或当所述孔类型为钻孔且所述孔径为约400 μm 至约600 μm 时,基于孔类型和孔径选择浓度为约3.5g/L至约4.1g/L的泊洛沙姆-188。在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,所述方法包括当所述孔类型为钻孔且所述孔径为1 μm 至约250 μm (例如,约1 μm 至约200 μm ,约160 μm 至约190 μm ,或约170 μm 至约180 μm)时,基于孔类型和孔径选择浓度高于4.3g/L(例如,浓度高于5.0g/L,浓度高于6.0g/L,浓度高于8.0g/L,或浓度高于10.0g/L)的泊洛沙姆-188。

[0015] 在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,所述方法包括当所述孔类型为烧结孔且所述孔径为大于150 μm 时,基于孔类型和孔径选择浓度为约1.8g/L至约3.3g/L的泊洛沙姆-188。在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,所述方法包括当所述孔类型为烧结孔且所述孔径为约80 μm 至约150 μm 时,基于孔类型和孔径选择浓度为约3.3g/L至约4.3g/L的泊洛沙姆-188,或当所述孔类型为烧结孔且所述孔径为约90 μm 至约110 μm 时,基于孔类型和孔径选择浓度为约3.5g/L至约4.1g/L的泊洛沙姆-188。在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,所述方法包括当所述孔类型为烧结孔且所述孔径为约1 μm 至约80 μm 时,基于孔类型和孔径选择浓度高于4.5g/L(例如,浓度高于5.0g/L,浓度高于6.0g/L,浓度高于8.0g/L,或浓度高于10.0g/L)的泊洛沙姆-188。

[0016] 在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,所述灌注培养包括:在搅拌下温育包含第一液体培养基的培养系统且在约32 $^{\circ}\text{C}$ 至约40 $^{\circ}\text{C}$ 的温度进行至少约7天的培养期;并在培养期的首个48至96小时之后,连续地或周期地移出第一体积的第一液体培养基并向第一液体培养基添加第二体积的第二液体培养基。在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,第二液体培养基以高于第一液体培养基中泊洛沙姆-188的浓度包含泊洛沙姆-188。在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,所述第二培养基包含选择的泊洛沙姆-188浓度。

[0017] 本申请所述的任何方法的一些实施方案还包括:从哺乳动物细胞的内部、从第一液体培养基或第二液体培养基,或其任何组合收集重组蛋白。本申请所述的任何方法的一些实施方案还包括将所述收集的重组蛋白配制成药物组合物。

[0018] 在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,所述容器是灌注生物反应器。在本

申请所述的任何方法的一些实施方案中,所述灌注生物反应器具有约1.5L至约25,000L的体积。在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,所述培养期是大于10天。在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,(c)中移出第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是连续进行的。在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,(c)中移出第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是周期进行的。在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,(c)中移出的第一体积的第一液体培养基添加的第二体积的第二液体培养基和随时间增加。在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,第一液体培养基和/或第二液体培养基选自下组:化学成分确定的液体培养基、无血清液体培养基、含有血清的液体培养基、无动物衍生组分的液体培养基、和无蛋白的培养基。在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,在时间期的约首个48至96小时后,在每24-小时时间中,(c)中移出的第一体积的第一液体培养基和添加的第二体积的第二液体培养基为第一液体培养基体积或容器体积的约0.3x至约10x。

[0019] 在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,所述哺乳动物细胞为中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、人胚胎肾(HEK)细胞、NSO细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、PerC6细胞、Vero细胞、或HT-1080细胞系。在本申请所述的任何方法的一些实施方案中,重组蛋白为免疫球蛋白、酶、生长因子、蛋白片段、或工程化的蛋白。

[0020] 如本申请中使用的,名词之前的“a”字代表一个或多个特定的名词。例如,短语“哺乳动物细胞”代表“一个或多个哺乳动物细胞”。

[0021] 术语“哺乳动物细胞”意指来自或源自任何哺乳动物(例如,人、仓鼠、小鼠、绿猴、大鼠、猪、牛、或兔)的任何细胞。例如,哺乳动物细胞可为无限增殖化细胞(imortalized cell)。在一些实施方案中,哺乳动物细胞是分化的或未分化的细胞。哺乳动物细胞的非限制性实例在本申请中描述。哺乳动物细胞的其他实例是本领域已知的。

[0022] 术语“培养”或“细胞培养”意指哺乳动物细胞在受控的物理条件组下的维持或增殖。

[0023] 术语“哺乳动物细胞的培养物”、“培养物”或“细胞培养物”意指含有多种哺乳动物细胞的液体培养基,所述哺乳动物细胞在受控的物理条件组下维持或增殖。

[0024] 术语“液体培养基(liquid culture medium)”或“液体培养基(liquid medium)”意指包含足够营养物质以允许细胞(例如,哺乳动物细胞)在体外生长或增殖的流体。例如,液体培养基可包含如下的一种或多种:氨基酸(例如,20种氨基酸)、嘌呤(例如,次黄嘌呤)、嘧啶(例如,胸苷)、胆碱、肌醇、硫胺素、叶酸、生物素、钙、烟酰胺、吡哆素、核黄素、胸苷、氰钴胺素、丙酮酸、硫辛酸、镁、葡萄糖、钠、钾、铁、铜、锌和碳酸氢钠。在一些实施方案中,液体培养基可包含来自哺乳动物的血清。在一些实施方案中,液体培养基不包含来自哺乳动物的血清或另外的提取物(成分确定的液体培养基)。在一些实施方案中,液体培养基可包含痕量金属、哺乳动物生长激素、和/或哺乳动物生长因子。液体培养基的另外的实例是基本培养基(例如,仅含有无机盐、碳源和水的培养基)。液体培养基的非限制性实例在本申请中描述。液体培养基的其他实例是本领域已知的且为商业上可得到的。液体培养基可包含任何密度的哺乳动物细胞。例如,如本申请中使用的,从生物反应器移出的一定体积的液体培养基可为基本上无哺乳动物细胞。

[0025] 术语“无动物衍生组分的液体培养基”意指不含有任何源自哺乳动物的组分(例

如,蛋白或血清)的液体培养基。

[0026] 术语“无血清液体培养基”意指不含有哺乳动物血清的液体培养基。

[0027] 术语“含血清液体培养基”意指含有哺乳动物血清的液体培养基。

[0028] 术语“化学成分确定的液体培养基”是本领域的术语并意指液体培养基,其中所有化学组分都是已知的。例如,化学成分确定的液体培养基不含有胎牛血清、牛血清白蛋白、或人血清白蛋白,因为这些制备物通常含有白蛋白和脂质的复杂混合物。

[0029] 术语“无蛋白液体培养基”意指不含有任何蛋白质(例如,任何可检测的蛋白质)的液体培养基。

[0030] 术语“搅拌”意指搅动或以其他方式移动容器中液体培养基的部分。进行此项(操作)从而,例如,增加生物反应器中液体培养基中的溶解O₂浓度。可使用任何本领域已知的方法,例如,工具或螺旋桨(propellor)来进行搅拌。可用于在生物反应器中进行液体培养基的部分的搅拌的例示性装置和方法是本领域已知的。

[0031] 术语“免疫球蛋白”意指多肽,其含有免疫球蛋白蛋白的至少15个氨基酸(例如,至少20、30、40、50、60、70、80、90、或100个氨基酸)的氨基酸序列(例如,可变域序列、框架序列、或恒定域序列)。免疫球蛋白可包含,例如,轻链免疫球蛋白的至少15个氨基酸,例如,重链免疫球蛋白的至少15个氨基酸。免疫球蛋白可为分离的抗体(例如,IgG、IgE、IgD、IgA、或IgM)。免疫球蛋白可为IgG的亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4)。免疫球蛋白可为抗体片段,例如,Fab片段、F(ab')₂片段、或scFv片段。免疫球蛋白亦可为双特异性抗体或三特异性抗体,或二聚体、三聚体、或多聚体抗体,或者双功能抗体(diabody)、**Affibody®**、或**Nanobody®**。免疫球蛋白还可为工程化的蛋白,其含有至少一个免疫球蛋白域(例如,融合蛋白)。免疫球蛋白的非限制性实例在本申请描述且免疫球蛋白的另外的实例是本领域已知的。可使用本申请所述的任何方法产生重组免疫球蛋白。

[0032] 术语“蛋白片段”或“多肽片段”意指多肽序列的一部分,其长度为至少或约4氨基酸,至少或约5氨基酸,至少或约6氨基酸,至少或约7氨基酸,至少或约8氨基酸,至少或约9氨基酸,至少或约10氨基酸,至少或约11氨基酸,至少或约12氨基酸,至少或约13氨基酸,至少或约14氨基酸,至少或约15氨基酸,至少或约16氨基酸,至少或约17氨基酸,至少或约18氨基酸,至少或约19氨基酸,或至少或约20氨基酸,或长度多于20个氨基酸。可使用本申请所述的任何方法产生重组蛋白片段。

[0033] 术语“工程化的蛋白”意指多肽,其天然情况下不由生物体(例如,哺乳动物)内存在的内源核酸编码。工程化的蛋白的实例包括酶(例如,具有一个或多个氨基酸取代、缺失、插入、或添加,其导致工程化的酶的稳定性和/或催化活性增加)、融合蛋白、抗体(例如,二价抗体、三价抗体、或双功能抗体)、和抗原结合蛋白,其含有至少一个重组的支架序列(scaffolding sequence)。可使用本申请所述的任何方法产生重组的工程化的蛋白。

[0034] 术语“分泌的蛋白”或“分泌的重组蛋白”意指蛋白(例如,重组蛋白),当其在哺乳动物细胞中被翻译时原始含有至少一个分泌信号序列,并且通过(至少部分地通过)哺乳动物细胞中分泌信号序列的酶切被至少部分地分泌入细胞外空间(例如,液体培养基)。本领域的技术人员会理解“分泌的”蛋白不需要完全与细胞分离才被认为是分泌的蛋白。

[0035] 术语“灌注生物反应器”意指在第一液体培养基中含有多种细胞(例如,哺乳动物细胞)的生物反应器,其中培养生物反应器中存在的细胞包括周期地或连续地移出第一液

体培养基并在同时或稍后向生物反应器添加基本上相同体积的第二液体培养基。在一些实例中,移出的第一液体培养基的体积和添加的体积在培养期过程中随增加的时间(例如,约24-小时时间,约1分钟-约24-小时的时间,或大于24小时的时间)存在增量变化(例如,增加或减少)(例如,以天为基础的液体培养基再补料速率)。每天移出的和替代的培养基的部分可取决于被培养的特定细胞、初始的接种密度、和特定时间的细胞密度而变化。“RV”或“反应器体积”意指培养过程开始时存在的液体培养基的体积(例如,接种后存在的液体培养基的总体积)。

[0036] 术语“补料分批生物反应器”是本领域的术语并意指在第一液体培养基中含有多种细胞(例如,哺乳动物细胞)的生物反应器,其中培养生物反应器中存在的细胞包括周期地或连续地将第二液体培养基添加至第一液体培养基而不大量或显著地从细胞培养物移出第一液体培养基或第二液体培养基。第二液体培养基可与第一液体培养基相同。在补料分批培养的一些实例中,第二液体培养基是第一液体培养基的浓缩形式。在补料分批培养的一些实例中,第二液体培养基作为干粉添加。

[0037] 术语“喷雾器”是本领域的术语并意指装置,其具有入口、主体和具有一个或多个孔的表面,其中所述入口、主体和一个或多个孔径设计以允许气体通过入口、通过主体流动,并流出一个或多个孔。当将喷雾器用于细胞培养时,一个或多个孔之一与细胞培养物接触,使得气体流出至少一个孔并流入细胞培养物。喷雾器常常通过它们的孔径和孔类型来描述。具有孔径和孔类型的不同组合的喷雾器的非限制性实例在本申请描述。

[0038] 术语“孔径”是本领域的术语并指具有单孔的喷雾器中的单孔的直径或具有两个或多个孔的喷雾器中两个或多个孔的平均直径。

[0039] 术语“涉及细胞应激的标志物”是本领域的术语并意指生物分子,其由细胞在生理应激下(例如,经受坏死性细胞死亡或凋亡性细胞死亡的细胞)释放入液体培养基,或在受生理应激(例如,经受坏死性细胞死亡或凋亡性细胞死亡的细胞)下的细胞中产生或具有升高水平。由细胞在生理应激下释放的涉及细胞应激的标志物的非限制性实例包括蛋白酶(例如,活化的胱天蛋白酶(caspase))、乳酸脱氢酶、基因组DNA(例如,核小体DNA)、细胞色素c、和活化的PARP。在受生理应激下的细胞中产生或具有升高水平的涉及细胞应激的标志物的非限制性实例包括活化的胱天蛋白酶、细胞色素c、活化的PARP、和外部化磷脂酰丝氨酸(externalized phosphatidylserine)。

[0040] “比生产速率(Specific productivity rate)”或“SPR”是本领域的术语并如在本申请所使用的指每个哺乳动物细胞每天产生的重组蛋白的质量(mass)或酶活性。重组治疗性抗体的SPR通常测量为质量/细胞/天。重组治疗性酶的SPR通常测量为单位/细胞/天或(单位/质量)/细胞/天。

[0041] “体积生产速率(Volume productivity rate)”或“VPR”是本领域的术语并如在本申请所使用的指每体积培养物(例如,每L的生物反应器、容器或管体积)每天产生的重组蛋白的质量(mass)或酶活性。重组治疗性抗体的VPR通常测量为质量/L/天。重组治疗性酶的VPR通常测量为单位/L/天或(单位/质量)/L/天。

[0042] 短语“浓度为...的泊洛沙姆-188”和“泊洛沙姆-188浓度”在本申请中可互换使用。短语“X g/L或更高的泊洛沙姆-188”和“浓度为X g/L或浓度高于X g/L的泊洛沙姆-188”在本申请中可互换使用。

[0043] 除非另外限定,本申请中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员所通常理解的相同的含义。本申请所述的方法和材料用于本发明;本领域已知的其他合适的方法和材料也可使用。所述材料、方法和实例仅仅是说明性的而非意欲为限制性的。本申请提及的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目和其他参考文件通过提述以它们整体并入。在冲突的情况中,以包含定义的本说明书(specification)为准。

[0044] 本发明的其他特征和优势会由如下详细的描述和附图以及从权利要求中显而易见。

[0045] 附图简述

[0046] 图1是在使用不含另外的泊洛沙姆-188的液体培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(在培养期的长度中稳定浓度的1.8g/L泊洛沙姆-188)(灰色数据)和使用含有增加量的泊洛沙姆-188的液体培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(在培养期的长度中从1.8g/L增加至6.8g/L的泊洛沙姆-188)(黑色数据)中活细胞密度随时间的图。

[0047] 图2是在使用含有增加量的泊洛沙姆-188的液体培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(在培养期的长度中从1.8g/L增加至6.8g/L的泊洛沙姆-188)中比生长速率随时间的图。

[0048] 图3是使用不含另外的泊洛沙姆-188的液体培养基在培养期长度中进行的两个灌注细胞培养操作(在培养期的长度中稳定浓度的1.8g/L泊洛沙姆-188)(灰色数据)和使用含有增加量的泊洛沙姆-188的液体培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(在培养期的长度中从1.8g/L增加至6.8g/L的泊洛沙姆-188)(黑色数据)中活细胞的百分数的图。

[0049] 图4是使用含有增加量的泊洛沙姆-188的液体培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(在培养期的长度中从1.8g/L增加至6.8g/L的泊洛沙姆-188)中体积生产率(volumetric productivity)随时间的图。

[0050] 图5是使用含有增加量的泊洛沙姆-188的液体培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(在培养期的长度中从1.8g/L增加至6.8g/L的泊洛沙姆-188)中比生产率(specific productivity)随时间的图。

[0051] 图6是Bis-Tris凝胶,其显示存在于如下中的重组抗体的降解产物:收获自含有6.8g/L泊洛沙姆-188的灌注细胞培养物的澄清的液体培养基(泳道1);收获自含有6.8g/L泊洛沙姆-188的灌注细胞培养物的澄清的液体培养基,其已在室温温育7天(泳道1a);收获自含有3.95g/L泊洛沙姆-188的灌注细胞培养物的澄清的液体培养基(泳道2);收获自含有3.95g/L泊洛沙姆-188的灌注细胞培养物并在室温温育7天的澄清的液体培养基(泳道2a);收获自含有3.95g/L泊洛沙姆-188的灌注细胞培养物的澄清的液体培养基,其补充poloxmer-188以达到6.8g/L泊洛沙姆-188的浓度并在室温温育9天(泳道2b);收获自含有3.0g/L泊洛沙姆-188的灌注细胞培养物的澄清的液体培养基(泳道3);收获自含有3.0g/L泊洛沙姆-188的灌注细胞培养物并在室温温育7天的澄清的液体培养基(泳道3a);和收获自含有3.0g/L泊洛沙姆-188的灌注细胞培养物的澄清的液体培养基,其补充poloxmer-188以达到6.8g/L泊洛沙姆-188的浓度并在室温温育9天(泳道3b)。

[0052] 图7是使用具有孔径为20 μ m的烧结孔的喷雾器和含有增加量的泊洛沙姆-188的培

培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(在培养期的长度中从1.8g/L增加至5.8g/L的泊洛沙姆-188)(方形);使用具有孔径为200 μm 的钻孔的喷雾器和含有增加量的泊洛沙姆-188的培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(在培养期的长度中从1.8g/L增加至4.8g/L的泊洛沙姆-188)(三角);使用具有孔径为500 μm 的钻孔的喷雾器和含有增加量的泊洛沙姆-188的培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(从1.8g/L增加至3.8g/L的泊洛沙姆-188)(圆圈)的活细胞密度随时间的图。

[0053] 图8是使用具有孔径为20 μm 的烧结孔的喷雾器和含有增加量的泊洛沙姆-188的培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(在培养期的长度中从1.8g/L增加至5.8g/L的泊洛沙姆-188)(方形);使用具有孔径为200 μm 的钻孔的喷雾器和含有增加量的泊洛沙姆-188的培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(在培养期的长度中从1.8g/L增加至4.8g/L的泊洛沙姆-188)(三角);使用具有孔径为500 μm 的钻孔的喷雾器和含有增加量的泊洛沙姆-188的培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(从1.8g/L增加至3.8g/L的泊洛沙姆-188)(圆圈)的比生长速率随时间的图。

[0054] 图9是使用具有孔径为20 μm 的烧结孔的喷雾器和含有增加量的泊洛沙姆-188的培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(在培养期的长度中从1.8g/L增加至5.8g/L的泊洛沙姆-188)(方形);使用具有孔径为200 μm 的钻孔的喷雾器和含有增加量的泊洛沙姆-188的培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(在培养期的长度中从1.8g/L增加至4.8g/L的泊洛沙姆-188)(三角);使用具有孔径为500 μm 的钻孔的喷雾器和含有增加量的泊洛沙姆-188的培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(从1.8g/L增加至3.8g/L的泊洛沙姆-188)(圆圈)的比乳糖脱氢酶产生随时间的图。

[0055] 图10是使用具有孔径为20 μm 的烧结孔的喷雾器和含有增加量的泊洛沙姆-188的培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(在培养期的长度中从1.8g/L增加至5.8g/L的泊洛沙姆-188)(方形);使用具有孔径为200 μm 的钻孔的喷雾器和含有增加量的泊洛沙姆-188的培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(在培养期的长度中从1.8g/L增加至4.8g/L的泊洛沙姆-188)(三角);使用具有孔径为500 μm 的钻孔的喷雾器和含有增加量的泊洛沙姆-188的培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(从1.8g/L增加至3.8g/L的泊洛沙姆-188)(圆圈)的百分数活细胞随时间的图。

[0056] 图11是使用具有孔径为20 μm 的烧结孔的喷雾器和含有1.8g/L泊洛沙姆-188的培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(空心圆圈);使用具有孔径为20 μm 的烧结孔的喷雾器和含有增加量的泊洛沙姆-188的培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(在培养期的长度中从1.8g/L增加至5.8g/L的泊洛沙姆-188)(方形);使用具有孔径为200 μm 的钻孔的喷雾器和含有增加量的泊洛沙姆-188的培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(在培养期的长度中从1.8g/L增加至4.8g/L的泊洛沙姆-188)(三角);使用具有孔径为500 μm 的钻孔的喷雾器和含有增加量的泊洛沙姆-188的培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(从1.8g/L增加至3.8g/L的泊洛沙姆-188)(实心圆圈)的比乳糖脱氢酶产生随时间的图。

[0057] 图12是使用具有孔径为20 μm 的烧结孔的喷雾器和含有增加量的泊洛沙姆-188的培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(在培养期的长度中从1.8g/L增加至5.8g/L的泊洛沙姆-188)(方形);使用具有孔径为200 μm 的钻孔的喷雾器和含有增加量的泊

洛沙姆-188的培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(在培养期的长度中从1.8g/L增加至4.8g/L的泊洛沙姆-188)(三角);使用具有孔径为500 μm 的钻孔的喷雾器和含有增加量的泊洛沙姆-188的培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(从1.8g/L增加至3.8g/L的泊洛沙姆-188)(圆圈)的体积生产率随时间的图。

[0058] 图13是使用具有孔径为20 μm 的烧结孔的喷雾器和含有增加量的泊洛沙姆-188的培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(在培养期的长度中从1.8g/L增加至5.8g/L的泊洛沙姆-188)(方形);使用具有孔径为200 μm 的钻孔的喷雾器和含有增加量的泊洛沙姆-188的培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(在培养期的长度中从1.8g/L增加至4.8g/L的泊洛沙姆-188)(三角);使用具有孔径为500 μm 的钻孔的喷雾器和含有增加量的泊洛沙姆-188的培养基在培养期长度中进行的灌注细胞培养操作(从1.8g/L增加至3.8g/L的泊洛沙姆-188)(圆圈)的有氧葡萄糖消耗随时间的图。

[0059] 图14是使用含有0%消泡剂-c对泊洛沙姆-188比例(实心圆圈)、5.6%消泡剂-c对泊洛沙姆-188比例(空心圆圈)、11.1%消泡剂-c对泊洛沙姆-188比例(实心方形)、27.8%消泡剂-c对泊洛沙姆-188比例(空心方形),或55.6%消泡剂-c对泊洛沙姆-188比例(实心三角)的CD-CHO液体培养基进行的不同分批摇瓶细胞培养操作的活细胞密度随时间的图。

[0060] 图15是使用含有0%消泡剂-c对泊洛沙姆-188比例(实心圆圈)、5.6%消泡剂-c对泊洛沙姆-188比例(空心圆圈)、11.1%消泡剂-c对泊洛沙姆-188比例(实心方形)、27.8%消泡剂-c对泊洛沙姆-188比例(空心方形),或a 55.6%消泡剂-c对泊洛沙姆-188比例(实心三角)的CD-CHO液体培养基进行的不同分批摇瓶细胞培养操作的比乳糖脱氢酶产生速率随时间的图。

[0061] 发明详述

[0062] 本申请中提供的是培养哺乳动物细胞的方法,其包括:在足够产生重组蛋白的条件下培养包含编码所述重组蛋白的核酸的哺乳动物细胞,其中所述培养包括在包含浓度为1.8g/L或浓度高于1.8g/L的泊洛沙姆-188的液体培养基中培养,且其中所述泊洛沙姆-188在培养步骤前存在于所述培养基中和/或添加至所述培养基和/或在培养步骤过程中添加至所述培养基。还提供的是培养哺乳动物细胞的方法,其包括:提供培养系统,其包含容器、配置于所述容器内的液体培养基和配置在所述容器内的喷雾器,所述喷雾器包含多个孔,所述孔径配置以将气体通过所述喷雾器分配入所述液体培养基;和在所述培养系统中在足够在该系统中产生重组蛋白的条件和气体流速下培养包含编码所述重组蛋白的核酸的哺乳动物细胞,其中所述培养基包含的泊洛沙姆-188浓度基于选自下组的一个或多个因素选择:孔径、孔类型、气体流速、培养基中的活细胞密度和涉及细胞应激的标志物。这些方法的例示性非限制性方面在下面描述。

[0063] 在一些实施方案中,本申请提供的方法能实现细胞培养物,其具有大于 20×10^6 细胞/mL,大于 25×10^6 细胞/mL,大于 30×10^6 细胞/mL,大于 35×10^6 细胞/mL,大于 40×10^6 细胞/mL,大于 45×10^6 细胞/mL,大于 50×10^6 细胞/mL,大于 55×10^6 细胞/mL,大于 60×10^6 细胞/mL,大于 65×10^6 细胞/mL,大于 70×10^6 细胞/mL,大于 75×10^6 细胞/mL,大于 80×10^6 细胞/mL,大于 85×10^6 细胞/mL,大于 90×10^6 细胞/mL,大于 95×10^6 细胞/mL,大于 100×10^6 细胞/mL,大于 105×10^6 细胞/mL,大于 110×10^6 细胞/mL,大于 115×10^6 细胞/mL,大于 120×10^6 细胞/mL,大于 125×10^6 细胞/mL,大于 130×10^6 细胞/mL,大于 135×10^6 细胞/mL,大于 140×10^6 细胞/mL。

10^6 细胞/mL,大于 145×10^6 细胞/mL,大于 150×10^6 细胞/mL,大于 155×10^6 细胞/mL,大于 160×10^6 细胞/mL,大于 165×10^6 细胞/mL,大于 170×10^6 细胞/mL,大于 175×10^6 细胞/mL,大于 180×10^6 细胞/mL,大于 185×10^6 细胞/mL,大于 190×10^6 细胞/mL,大于 195×10^6 细胞/mL,大于 200×10^6 细胞/mL,大于 205×10^6 细胞/mL,大于 210×10^6 细胞/mL,大于 215×10^6 细胞/mL,大于 220×10^6 细胞/mL,大于 225×10^6 细胞/mL,大于 230×10^6 细胞/mL,大于 235×10^6 细胞/mL,大于 240×10^6 细胞/mL,大于 245×10^6 细胞/mL,或大于 250×10^6 细胞/mL的活细胞密度。用于确定细胞培养物的活细胞密度的方法是本领域已知的。

[0064] 在一些实施方案中,本申请提供的方法提供细胞培养物,其在至少5天(例如,至少10天,至少15天,至少20天,至少25天,至少30天,至少35天,至少40天,至少45天,至少50天,至少55天,至少60天,至少65天,或至少70天)的培养期具有大于75%(例如,大于80%,大于85%,或大于90%)的百分数细胞存活率。

[0065] 在一些实施方案中,本申请提供的方法能实现培养,其在培养期过程中的任何时间开始的至少5天(例如,至少10天,至少15天,至少20天,至少25天,至少30天,至少35天,至少40天,至少45天,至少50天,至少55天,至少60天,至少65天,或至少70天)中具有至少1.5g/L/d(例如,至少1.6g/L/d,至少1.7g/L/d,至少1.8g/L/d,至少1.9g/L/d,至少2.0g/L/d,至少2.1g/L/d,至少2.2g/L/d,至少2.3g/L/d,至少2.4g/L/d,至少2.5g/L/d,至少2.6g/L/d,至少2.7g/L/d,至少2.8g/L/d,至少2.9g/L/d,至少3.0g/L/d,至少3.1g/L/d,至少3.2g/L/d,至少3.3g/L/d,至少3.4g/L/d,至少3.5g/L/d,至少3.6g/L/d,至少3.7g/L/d,至少3.8g/L/d,至少3.9g/L/d,至少4.0g/L/d,至少4.1g/L/d,至少4.2g/L/d,至少4.3g/L/d,至少4.4g/L/d,或至少4.5g/L/d)的体积生产率(VPR)。

[0066] 在一些实施方案中,本申请提供的方法得到重组蛋白的产生当收集时具有降低水平(例如,约或小于5%的降低,约或小于10%的降低,约或小于15%的降低,约或小于20%的降低,约或小于25%的降低,约或小于30%的降低,约或小于35%的降低,约或小于40%的降低,约或小于45%的降低,约或小于50%的降低,约或小于55%的降低,约或小于60%的降低,约或小于65%的降低,约或小于70%,约或小于75%的降低,约或小于80%的降低,约或小于80%的降低,约或小于85%的降低,或者约或小于90%的降低)的降解(相比于在不包括在包含1.8g/L或更高的泊洛沙姆-188的液体培养基中培养的相似方法中产生的重组蛋白)。从细胞培养物收集的重组蛋白的降解的水平可检测,例如,使用凝胶电泳和/或免疫印迹检测。

[0067] 在一些实施方案中,所述方法得到细胞培养物,其在培养期内的任何时间开始的至少约5(例如,至少10,至少15,至少20,至少25,至少30,至少35,至少40,至少45,至少50,至少55,至少60,至少65,或至少70)连续天中具有小于60nU/细胞/天(例如,小于55nU/细胞/天,小于50nU/细胞/天,小于45nU/细胞/天,小于40nU/细胞/天,小于35nU/细胞/天,小于30nU/细胞/天,小于25nU/细胞/天,或小于20nU/细胞/天)的比乳酸脱氢酶生产。

[0068] 在一些实施方案中,所述方法得到细胞在稳态(稳定期)中维持至少5天(例如,至少10天,至少15天,至少20天,至少25天,至少30天,至少35天,至少40天,至少45天,或至少50天),例如,以约或大于 30×10^6 细胞/mL,约或大于 35×10^6 细胞/mL,约或大于 40×10^6 细胞/mL,约或大于 45×10^6 细胞/mL,约或大于 50×10^6 细胞/mL,约或大于 55×10^6 细胞/mL,约或大于 60×10^6 细胞/mL,约或大于 65×10^6 细胞/mL,约或大于 70×10^6 细胞/mL,约或大于 $75 \times$

10^6 细胞/mL,约或大于 80×10^6 细胞/mL,约或大于 85×10^6 细胞/mL,约或大于 90×10^6 细胞/mL,约或大于 95×10^6 细胞/mL,约或大于 100×10^6 细胞/mL,约或大于 105×10^6 细胞/mL,约或大于 110×10^6 细胞/mL,约或大于 115×10^6 细胞/mL,约或大于 120×10^6 细胞/mL,约或大于 125×10^6 细胞/mL,约或大于 130×10^6 细胞/mL,约或大于 135×10^6 细胞/mL,约或大于 140×10^6 细胞/mL,约或大于 145×10^6 细胞/mL,约或大于 150×10^6 细胞/mL,约或大于 155×10^6 细胞/mL,约或大于 160×10^6 细胞/mL,约或大于 165×10^6 细胞/mL,约或大于 170×10^6 细胞/mL,约或大于 175×10^6 细胞/mL,约或大于 180×10^6 细胞/mL,约或大于 185×10^6 细胞/mL,约或大于 190×10^6 细胞/mL,约或大于 195×10^6 细胞/mL,或者约或大于 200×10^6 细胞/mL的活细胞密度。

[0069] 培养体积

[0070] 所述任何方法中的培养步骤(例如,灌注培养步骤)可包括在允许细胞在培养中维持和增殖的条件下温育具有20L-约8,000L(例如,约20L-约7,000L,约20L-约6,000L,约20L-约5,000L,约20L-约4,000L,约20L-约3,000L,约20L-约2,500L,约20L-约2,000L,约20L-约1,500L,约20L-约1,000L,约20L-约500L,约20L-约200L,约20L-约100L,约100L-约8,000L,约100L-约7,000L,约100L-约6,000L,约100L-约5,000L,约100L-约4,000L,约100L-约3,000L,约100L-约2,000L,约100L-约1,500L,约100L-约1,000L,约100L-约800L,约100L-约700L,约100L-约600L,约100L-约500L,约100L-约400L,约100L-约300L,约100L-约200L,约500L-约8,000L,约500L-约7,000L,约500L-约6,000L,约500L-约5,000L,约500L-约4,000L,约500L-约3,000L,约500L-约2,000L,约500L-约1,500L,约500L-约1,000L,约500L-约750L,约1,000L-约8,000L,约1,000L-约7,000L,约1,000L-约6,000L,约1,000L-约5,000L,约1,000L-约4,000L,约1,000L-约3,000L,约1,000L-约2,000L,约1,000L-约1,500L,约2,000L-约8,000L,约2,000L-约7,000L,约2,000L-约6,000L,约2,000L-约5,000L,约2,000L-约4,000L,约2,000L-约3,000L,约3,000L-约8,000L,约3,000L-约7,000L,约3,000L-约6,000L,约3,000L-约5,000L,约3,000L-约4,000L,约4,000L-约8,000L,约4,000L-约7,000L,约4,000L-约6,000L,约4,000L-约5,000L,约5,000L-约8,000L,约5,000L-约7,000L,约5,000L-约6,000L,约6,000L-约8,000L,约6,000L-约7,000L,或约7,000L或约8,000L)的体积的细胞培养物。

[0071] 如本领域中已知的,细胞培养物的体积在培养期(例如,如下所述)过程中可保持基本上相同或可随时间增加。

[0072] 培养期

[0073] 本申请所述任何方法中的培养(例如,灌注培养)可在约3天至约100天(例如,约3天-约95天,约3天-约90天,约3天-约85天,约3天-约80天,约3天-约75天,约3天-约70天,约3天-约65天,约3天-约60天,约3天-约55天,约3天-约50天,约3天-约45天,约3天-约40天,约3天-约35天,约3天-约30天,约3天-约25天,约3天-约20天,约3天-约15天,约3天-约10天,约5天-约100天,约5天-约95天,约5天-约90天,约5天-约85天,约5天-约80天,约5天-约75天,约5天-约70天,约5天-约65天,约5天-约60天,约5天-约55天,约5天-约50天,约5天-约45天,约5天-约40天,约5天-约35天,约5天-约30天,约5天-约25天,约5天-约20天,约5天-约15天,约5天-约10天,约10天-约100天,约10天-约95天,约10天-约90天,约10天-约85天,约10天-约80天,约10天-约75天,约10天-约70天,约10天-约65天,约10天-约60天,约10

天-约55天,约10天-约50天,约10天-约45天,约10天-约40天,约10天-约35天,约10天-约30天,约10天-约25天,约10天-约20天,约10天-约15天,约15天-约100天,约15天-约95天,约15天-约90天,约15天-约85天,约15天-约80天,约15天-约75天,约15天-约70天,约15天-约65天,约15天-约60天,约15天-约55天,约15天-约50天,约15天-约45天,约15天-约40天,约15天-约35天,约15天-约30天,约15天-约25天,约15天-约20天,约20天-约100天,约20天-约95天,约20天-约90天,约20天-约85天,约20天-约80天,约20天-约75天,约20天-约70天,约20天-约65天,约20天-约60天,约20天-约55天,约20天-约50天,约20天-约45天,约20天-约40天,约20天-约35天,约20天-约30天,约20天-约25天,约25天-约100天,约25天-约95天,约25天-约90天,约25天-约85天,约25天-约80天,约25天-约75天,约25天-约70天,约25天-约65天,约25天-约60天,约25天-约55天,约25天-约50天,约25天-约45天,约25天-约40天,约25天-约35天,约25天-约30天,约30天-约100天,约30天-约90天,约30天-约80天,约30天-约70天,约30天-约60天,约30天-约50天,约30天-约40天,约40天-约100天,约40天-约90天,约40天-约80天,约40天-约70天,约40天-约60天,约40天-约50天,约50天-约100天,约50天-约90天,约50天-约80天,约50天-约70天,约50天-约60天,约60天-约100天,约60天-约90天,约60天-约80天,约60天-约70天,约70天-约100天,约70天-约90天,约70天-约80天,约80天-约100天,约80天-约90天,或约90天-约100天)的时间段中进行。

[0074] 哺乳动物细胞

[0075] 本申请提供的方法中培养的(例如,灌注培养的)哺乳动物细胞可为在悬液中生长的细胞或贴壁细胞(adherent cell)。可在本申请所述的任何方法中培养的哺乳动物细胞的非限制性实例包括:中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(例如,CHO DG44细胞或CHO-K1s细胞)、Sp2.0、骨髓瘤细胞(例如,NS/O)、B-细胞、杂交瘤细胞、T-细胞、人胚胎肾(HEK)细胞(例如,HEK 293E和HEK 293F)、非洲绿猴肾上皮细胞(Vero)细胞、NSO细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、PerC6细胞、Vero细胞、或HT-1080细胞和Madin-Darby Canine(Cocker Spaniel)肾上皮细胞(MDCK)细胞。在培养贴壁细胞的一些实施例中,培养物还可包含多种微载体(例如,含有一个或多个孔的微载体)。可在本申请所述的任何方法中培养的另外的哺乳动物细胞是本领域已知的。

[0076] 所述哺乳动物细胞可含有编码重组蛋白的重组核酸(例如,稳定整合在所述哺乳动物细胞的基因组中的核酸)。编码例示性重组蛋白的重组核酸的非限制性实例在下面描述,作为可使用本申请所述的方法产生的重组蛋白。在一些实例中,所述在生物反应器(例如,本申请所述的任何生物反应器)中培养的哺乳动物细胞源自更大的培养(larger culture)。

[0077] 可使用分子生物学和分子遗传学中已知的多种方法将编码重组蛋白的核酸导入哺乳动物细胞。非限制性实例包括转染(例如,脂(质)转染)、转导(例如,慢病毒、腺病毒或反转录病毒感染)和电穿孔。在一些情况中,编码重组蛋白的核酸未稳定地整合入哺乳动物细胞的染色体(瞬时转染),而在其他实例中核酸是整合的。可替换地或此外,编码重组蛋白的核酸可存在于质粒中和/或哺乳动物人工染色体(例如,人的人工染色体)中。可替换地或此外,可使用病毒载体(例如,慢病毒、反转录病毒或腺病毒载体)将核酸导入所述细胞。可将所述核酸可操作地连接于启动子序列(例如,强启动子,如 β -肌动蛋白启动子和CMV启动子,或诱导型启动子)。如果需要,含有核酸的载体可亦含有选择标记(例如,赋予哺乳动物

细胞潮霉素 (hygromycin)、嘌呤霉素 (puromycin) 或新霉素 (neomycin) 抗性的基因)。

[0078] 在一些情况中,重组蛋白是分泌的蛋白并由哺乳动物细胞释放入胞外培养基(例如,灌注培养中的第一和/或第二液体培养基或补料分批培养中的第一液体培养基和/或补料液体培养基)。例如,编码可溶性重组蛋白的核酸序列可含有编码在重组蛋白的N-或C-末端的分泌信号肽的序列,其由所述哺乳动物细胞中存在的酶切割,并随后释放入胞外培养基(例如,第一和/或第二液体培养基)。

[0079] 生物反应器

[0080] 本申请所述的任何方法中的培养步骤可使用生物反应器(例如,灌注生物反应器或补料分批生物反应器)进行。用于进行培养步骤的生物反应器(例如,灌注生物反应器或补料分批生物反应器)可具有约24L至约25,000L(例如,约24L-约20,000L,约24L-约15,000L,约24L-约10,000L,约24L-约9,500L,约24L-约9,000L,约24L-约8,500L,约24L-约8,000L,约24L-约7,500L,约24L-约7,000L,约24L-约6,500L,约24L-约6,000L,约24L-约5,500L,约24L-约5,000L,约24L-约4,500L,约24L-约4,000L,约24L-约3,500L,约24L-约3,000L,约24L-约2,500L,约24L-约2,000L,约24L-约1,500L,约24L-约1,000L,约24L-约900L,约24L-约800L,约24L-约700L,约24L-约600L,约24L-约500L,约24L-约400L,约24L-约300L,约24L-约200L,约24L-约100L,约100L-约25,000L,约100L-约20,000L,约100L-约15,000,约100L-约10,000L,约100L-约9,500L,约100L-约9,000L,约100L-约8,500L,约100L-约8,000L,约100L-约7,500L,约100L-约7,000L,约100L-约6,500L,约100L-约6,000L,约100L-约5,500L,约100L-约5,000L,约100L-约4,500L,约100L-约4,000L,约100L-约3,500L,约100L-约3,000L,约100L-约2,500L,约100L-约2,000L,约100L-约1,500L,约100L-约1,000L,约100L-约900L,约100L-约800L,约100L-约700L,约100L-约600L,约100L-约500L,约100L-约400L,约100L-约300L,约100L-约200L,约200L-约25,000L,约200L-约20,000L,约200L-约15,000L,约200L-约10,000L,约200L-约9,500L,约200L-约9,000L,约200L-约8,500L,约200L-约8,000L,约200L-约7,500L,约200L-约7,000L,约200L-约6,500L,约200L-约6,000L,约200L-约5,500L,约200L-约5,000L,约200L-约4,500L,约200L-约4,000L,约200L-约3,500L,约200L-约3,000L,约200L-约2,500L,约200L-约2,000L,约200L-约1,500L,约200L-约1,000L,约200L-约900L,约200L-约800L,约200L-约700L,约200L-约600L,约200L-约500L,约200L-约400L,约200L-约300L,约500L-约25,000L,约500L-约20,000L,约500L-约15,000L,约500L-约10,000L,约500L-约9,500L,约500L-约9,000L,约500L-约8,500L,约500L-约8,000L,约500L-约7,500L,约500L-约7,000L,约500L-约6,500L,约500L-约6,000L,约500L-约5,500L,约500L-约5,000L,约500L-约4,500L,约500L-约4,000L,约500L-约3,500L,约500L-约3,000L,约500L-约2,500L,约500L-约2,000L,约500L-约1,500L,约500L-约1,000L,约500L-约900L,约500L-约800L,约500L-约700L,约500L-约600L,约1,000L-约25,000L,约1,000L-约20,000L,约1,000L-约15,000L,约1,000L-约10,000L,约1,000L-约9,500L,约1,000L-约9,000L,约1,000L-约8,500L,约1,000L-约8,000L,约1,000L-约7,500L,约1,000L-约7,000L,约1,000L-约6,500L,约1,000L-约6,000L,约1,000L-约5,500L,约1,000L-约5,000L,约1,000L-约4,500L,约1,000L-约4,000L,约1,000L-约3,500L,约1,000L-约3,000L,约1,000L-约2,500L,约1,000L-约2,000L,约1,000L-约1,500L,约2,000L-约25,000L,约2,000L-约20,000L,约2,000L-约15,000L,约

2,000L-约10,000L,约2,000L-约9,500L,约2,000L-约9,000L,约2,000L-约8,500L,约2,000L-约8,000L,约2,000L-约7,500L,约2,000L-约7,000L,约2,000L-约6,500L,约2,000L-约6,000L,约2,000L-约5,500L,约2,000L-约5,000L,约2,000L-约4,500L,约2,000L-约4,000L,约2,000L-约3,500L,约2,000L-约3,000L,约2,000L-约2,500L,约3,000L-约25,000L,约3,000L-约20,000L,约3,000L-约15,000L,约3,000L-约10,000L,约3,000L-约9,500L,约3,000L-约9,000L,约3,000L-约8,500L,约3,000L-约8,000L,约3,000L-约7,500L,约3,000L-约7,000L,约3,000L-约6,500L,约3,000L-约6,000L,约3,000L-约5,500L,约3,000L-约5,000L,约3,000L-约4,500L,约3,000L-约4,000L,约3,000L-约3,500L,约4,000L-约9,000L,约4,000L-约25,000L,约4,000L-约20,000L,约4,000L-约15,000L,约4,000L-约10,000L,约4,000L-约9,500L,约4,000L-约9,000L,约4,000L-约8,500L,约4,000L-约8,000L,约4,000L-约7,500L,约4,000L-约7,000L,约4,000L-约6,500L,约4,000L-约6,000L,约4,000L-约5,500L,约4,000L-约5,000L,约4,000L-约4,500L,约5,000L-约25,000L,约5,000L-约20,000L,约5,000L-约15,000L,约5,000L-约10,000L,约5,000L-约9,500L,约5,000L-约9,000L,约5,000L-约8,500L,约5,000L-约8,000L,约5,000L-约7,500L,约5,000L-约7,000L,约5,000L-约6,500L,约5,000L-约6,000L,约5,000L-约5,500L,约6,000L-约25,000L,约6,000L-约20,000L,约6,000L-约15,000L,约6,000L-约10,000L,约6,000L-约9,500L,约6,000L-约9,000L,约6,000L-约8,500L,约6,000L-约8,000L,约6,000L-约7,500L,约6,000L-约7,000L,约6,000L-约6,500L,7,000L-约25,000L,约7,000L-约20,000L,约7,000L-约15,000L,约7,000L-约10,000L,约7,000L-约9,500L,约7,000L-约9,000L,约7,000L-约8,500L,约7,000L-约8,000L,约7,000L-约7,500L,约8,000L-约25,000L,约8,000L-约20,000L,约8,000L-约15,000L,约8,000L-约10,000L,约8,000L-约9,500L,约8,000L-约9,000L,约8,000L-约8,500L,约9,000L-约25,000L,约9,000L-约20,000L,约9,000L-约15,000L,约9,000L-约10,000L,约9,000L-约9,500L,约10,000L-约25,000L,约10,000L-约20,000L,约10,000L-约15,000L,约15,000L-约25,000L,约15,000L-约20,000L,或约20,000L-约25,000L)的内部体积(容积)。

[0081] 培养系统

[0082] 本申请所述的一些方法使用培养系统(例如,灌注培养系统),其包含容器、配置于所述容器内的液体培养基(例如,本申请所述的任何培养基)和配置在所述容器内的喷雾器,所述喷雾器包含多个孔,所述孔径配置以将气体通过所述喷雾器分配入所述液体培养基。容器可具有约24L至约20,000L(例如,约24L-约15,000L,约24L-约10,000L,约24L-约9,500L,约24L-约9,000L,约24L-约8,500L,约24L-约8,000L,约24L-约7,500L,约24L-约7,000L,约24L-约6,500L,约24L-约6,000L,约24L-约5,500L,约24L-约5,000L,约24L-约4,500L,约24L-约4,000L,约24L-约3,500L,约24L-约3,000L,约24L-约2,500L,约24L-约2,000L,约24L-约1,500L,约24L-约1,000L,约24L-约900L,约24L-约800L,约24L-约700L,约24L-约600L,约24L-约500L,约24L-约400L,约24L-约300L,约24L-约200L,约24L-约100L,约100L-约20,000L,约100L-约15,000L,约100L-约10,000L,约100L-约9,500L,约100L-约9,000L,约100L-约8,500L,约100L-约8,000L,约100L-约7,500L,约100L-约7,000L,约100L-约6,500L,约100L-约6,000L,约100L-约5,500L,约100L-约5,000L,约100L-约4,500L,约100L-约4,000L,约100L-约3,500L,约100L-约3,000L,约100L-约2,500L,约100L-

约2,000L,约100L-约1,500L,约100L-约1,000L,约100L-约900L,约100L-约800L,约100L-约700L,约100L-约600L,约100L-约500L,约100L-约400L,约100L-约300L,约100L-约200L,约200L-约20,000L,约200L-约15,000L,约200L-约10,000L,约200L-约9,500L,约200L-约9,000L,约200L-约8,500L,约200L-约8,000L,约200L-约7,500L,约200L-约7,000L,约200L-约6,500L,约200L-约6,000L,约200L-约5,500L,约200L-约5,000L,约200L-约4,500L,约200L-约4,000L,约200L-约3,500L,约200L-约3,000L,约200L-约2,500L,约200L-约2,000L,约200L-约1,500L,约200L-约1,000L,约200L-约900L,约200L-约800L,约200L-约700L,约200L-约600L,约200L-约500L,约200L-约400L,约200L-约300L,约500L-约20,000L,约500L-约15,000L,约500L-约10,000L,约500L-约9,500L,约500L-约9,000L,约500L-约8,500L,约500L-约8,000L,约500L-约7,500L,约500L-约7,000L,约500L-约6,500L,约500L-约6,000L,约500L-约5,500L,约500L-约5,000L,约500L-约4,500L,约500L-约4,000L,约500L-约3,500L,约500L-约3,000L,约500L-约2,500L,约500L-约2,000L,约500L-约1,500L,约500L-约1,000L,约500L-约900L,约500L-约800L,约500L-约700L,约500L-约600L,约1,000L-约25,000L,约1,000L-约20,000L,约1,000L-约15,000L,约1,000L-约10,000L,约1,000L-约9,500L,约1,000L-约9,000L,约1,000L-约8,500L,约1,000L-约8,000L,约1,000L-约7,500L,约1,000L-约7,000L,约1,000L-约6,500L,约1,000L-约6,000L,约1,000L-约5,500L,约1,000L-约5,000L,约1,000L-约4,500L,约1,000L-约4,000L,约1,000L-约3,500L,约1,000L-约3,000L,约1,000L-约2,500L,约1,000L-约2,000L,约1,000L-约1,500L,约2,000L-约20,000L,约2,000L-约15,000L,约2,000L-约10,000L,约2,000L-约9,500L,约2,000L-约9,000L,约2,000L-约8,500L,约2,000L-约8,000L,约2,000L-约7,500L,约2,000L-约7,000L,约2,000L-约6,500L,约2,000L-约6,000L,约2,000L-约5,500L,约2,000L-约5,000L,约2,000L-约4,500L,约2,000L-约4,000L,约2,000L-约3,500L,约2,000L-约3,000L,约2,000L-约2,500L,约3,000L-约20,000L,约3,000L-约15,000L,约3,000L-约10,000L,约3,000L-约9,500L,约3,000L-约9,000L,约3,000L-约8,500L,约3,000L-约8,000L,约3,000L-约7,500L,约3,000L-约7,000L,约3,000L-约6,500L,约3,000L-约6,000L,约3,000L-约5,500L,约3,000L-约5,000L,约3,000L-约4,500L,约3,000L-约4,000L,约3,000L-约3,500L,约4,000L-约20,000L,约4,000L-约15,000L,约4,000L-约10,000L,约4,000L-约9,500L,约4,000L-约9,000L,约4,000L-约8,500L,约4,000L-约8,000L,约4,000L-约7,500L,约4,000L-约7,000L,约4,000L-约6,500L,约4,000L-约6,000L,约4,000L-约5,500L,约4,000L-约5,000L,约4,000L-约4,500L,约5,000L-约20,000L,约5,000L-约15,000L,约5,000L-约10,000L,约5,000L-约9,500L,约5,000L-约9,000L,约5,000L-约8,500L,约5,000L-约8,000L,约5,000L-约7,500L,约5,000L-约7,000L,约5,000L-约6,500L,约5,000L-约6,000L,约5,000L-约5,500L,约6,000L-约20,000L,约6,000L-约10,000L,约6,000L-约9,500L,约6,000L-约9,000L,约6,000L-约8,500L,约6,000L-约8,000L,约6,000L-约7,500L,约6,000L-约7,000L,约6,000L-约6,500L,约7,000L-约20,000L,约7,000L-约15,000L,约7,000L-约10,000L,约7,000L-约9,500L,约7,000L-约9,000L,约7,000L-约8,500L,约7,000L-约8,000L,约7,000L-约7,500L,约8,000L-约20,000L,约8,000L-约15,000L,约8,000L-约10,000L,约8,000L-约9,500L,约8,000L-约9,000L,约8,000L-约8,500L,约9,000L-约20,000L,约9,000L-约15,000L,约9,000L-约10,

000L,约9,000L-约9,500L,约10,000L-约20,000L,约10,000L-约15,000L,或者约15,000L-约20,000L)的内部体积(容积)。容器可由金属(例如,不锈钢)、塑料、或玻璃,或其任何组合制成。

[0083] 在一些实施方案中,喷雾器的一个或多个孔可具有约750 μm -约1.5mm(例如,约750 μm -约1.45mm,约750 μm -约1.4mm,约750 μm -约1.35mm,约750 μm -约1.3mm,约750 μm -约1.25mm,约750 μm -约1.2mm,约750 μm -约1.15mm,约750 μm -约1.1mm,约750 μm -约1.05mm,约750 μm -约1.0mm,约750 μm -约950 μm ,约750 μm -约900 μm ,约750 μm -约850 μm ,约750 μm -约800 μm ,约800 μm -约1.5mm,约800 μm -约1.45mm,约800 μm -约1.4mm,约800 μm -约1.35mm,约800 μm -约1.3mm,约800 μm -约1.25mm,约800 μm -约1.2mm,约800 μm -约1.15mm,约800 μm -约1.1mm,约800 μm -约1.05mm,约800 μm -约1.0mm,约800 μm -约950 μm ,约800 μm -约900 μm ,约800 μm -约850 μm ,约850 μm -约1.5mm,约850 μm -约1.45mm,约850 μm -约1.4mm,约850 μm -约1.35mm,约850 μm -约1.3mm,约850 μm -约1.25mm,约850 μm -约1.2mm,约850 μm -约1.15mm,约850 μm -约1.1mm,约850 μm -约1.05mm,约850 μm -约1.0mm,约850 μm -约950 μm ,约850 μm -约900 μm ,约900 μm -约1.5mm,约900 μm -约1.45mm,约900 μm -约1.4mm,约900 μm -约1.35mm,约900 μm -约1.3mm,约900 μm -约1.25mm,约900 μm -约1.2mm,约900 μm -约1.15mm,约900 μm -约1.1mm,约900 μm -约1.05mm,约900 μm -约1.0mm,约900 μm -约950 μm ,约950 μm -约1.5mm,约950 μm -约1.45mm,约950 μm -约1.4mm,约950 μm -约1.35mm,约950 μm -约1.3mm,约950 μm -约1.25mm,约950 μm -约1.2mm,约950 μm -约1.15mm,约950 μm -约1.1mm,约950 μm -约1.05mm,约950 μm -约1.0mm,约1.0mm-约1.5mm,约1.0mm-约1.45mm,约1.0mm-约1.4mm,约1.0mm-约1.35mm,约1.0mm-约1.3mm,约1.0mm-约1.25mm,约1.0mm-约1.2mm,约1.0mm-约1.15mm,约1.0mm-约1.1mm,约1.0mm-约1.05mm,约1.05mm-约1.5mm,约1.05mm-约1.45mm,约1.05mm-约1.4mm,约1.05mm-约1.35mm,约1.05mm-约1.3mm,约1.05mm-约1.25mm,约1.05mm-约1.2mm,约1.05mm-约1.15mm,约1.05mm-约1.1mm,约1.1mm-约1.5mm,约1.1mm-约1.45mm,约1.1mm-约1.4mm,约1.1mm-约1.35mm,约1.1mm-约1.3mm,约1.1mm-约1.25mm,约1.1mm-约1.2mm,约1.1mm-约1.15mm,约1.15mm-约1.5mm,约1.15mm-约1.45mm,约1.15mm-约1.4mm,约1.15mm-约1.35mm,约1.15mm-约1.3mm,约1.15mm-约1.25mm,约1.15mm-约1.2mm,约1.2mm-约1.5mm,约1.2mm-约1.45mm,约1.2mm-约1.4mm,约1.2mm-约1.35mm,约1.2mm-约1.3mm,约1.2mm-约1.25mm,约1.25mm-约1.5mm,约1.25mm-约1.45mm,约1.25mm-约1.4mm,约1.25mm-约1.35mm,约1.25mm-约1.3mm,约1.3mm-约1.5mm,约1.3mm-约1.45mm,约1.3mm-约1.4mm,约1.3mm-约1.35mm,约1.35mm-约1.5mm,约1.35mm-约1.45mm,约1.35mm-约1.4mm,约1.4mm-约1.5mm,约1.4mm-约1.45mm,或约1.45mm-约1.5mm)的孔径。

[0084] 在一些实施方案中,喷雾器的一个或多个孔可具有约250 μm -约750 μm (例如,约250 μm -约700 μm ,约250 μm -约650 μm ,约250 μm -约600 μm ,约250 μm -约550 μm ,约250 μm -约500 μm ,约250 μm -约450 μm ,约250 μm -约400 μm ,约250 μm -约350 μm ,约250 μm -约300 μm ,约300 μm -约750 μm ,约300 μm -约650 μm ,约300 μm -约600 μm ,约300 μm -约550 μm ,约300 μm -约500 μm ,约300 μm -约450 μm ,约300 μm -约400 μm ,约300 μm -约350 μm ,约350 μm -约750 μm ,约350 μm -约700 μm ,约350 μm -约650 μm ,约350 μm -约600 μm ,约350 μm -约550 μm ,约350 μm -约500 μm ,约350 μm -约450 μm ,约350 μm -约400 μm ,约400 μm -约750 μm ,约400 μm -约700 μm ,约400 μm -约650 μm ,约400 μm -约600 μm ,约400 μm -约550 μm ,约400 μm -约500 μm ,约400 μm -约450 μm ,约450 μm -约750 μm ,约450 μm -约

轮的马达)。所述容器可包括一个或多个端口(和任选的泵),其允许添加材料(例如,液体培养基、泊洛沙姆-188、碱或酸(根据需要调节pH)、和/或消泡剂)至配置于所述容器中的液体培养基和/或移出液体培养基(例如,澄清的液体培养基或细胞培养的样品)。培养系统还可包括一个或多个传感器,用于在培养期过程中监测液体培养基中的pH、 dO_2 、温度和 dCO_2 。培养系统可包括过滤装置(例如,进行交替切向过滤或切向流过滤的装置),其处理一定体积的细胞培养物以提供基本上无细胞的澄清的液体培养基。培养系统可包括加热/冷却装置,其允许调节配置于所述容器中的液体培养基的温度。细胞培养系统的另外的特征是本领域中已知的。

[0087] 灌注培养

[0088] 在本申请所述的任何方法中,培养步骤可为灌注培养。如本领域中已知的,灌注培养包括从生物反应器移出第一体积的第一液体培养基,并向所述生物反应器添加第二体积的第二液体培养基,其中第一体积和第二体积是大约相等的。通过一些细胞保留装置或通过一些技术如沉降锥中的细胞沉降将哺乳动物细胞保留在生物反应器中。

[0089] 如本领域中已知的,灌注培养不同于补料分批培养,且灌注培养中使用的培养基和/或培养条件常常不同于补料分批培养中使用的那些。

[0090] 灌注培养中培养基的移出和添加可同时或顺序,或两者的一些组合来进行。此外,移出和添加可连续地,如以移出并替代生物反应器体积的0.1%至800%,1%-700%,1%-600%,1%-500%,1%-400%,1%-350%,1%-300%,1%-250%,1%-100%,100%-200%,5%-150%,10%-50%,15%-40%,8%-80%,或4%-30%的体积的比例进行。

[0091] 移出的第一体积的第一液体培养基和添加的第二体积的第二液体培养基在一些实例中可在每24-小时时间中被保持大约相同。如本领域中已知的,移出第一体积的第一液体培养基的速率(体积/时间单位)和添加第二体积的第二液体培养基的速率(体积/时间单位)可变化并取决于特定细胞培养系统的条件。移出第一体积的第一液体培养基的速率(体积/时间单位)和添加第二体积的第二液体培养基的速率(体积/时间单位)可为大约相同或可不同。

[0092] 可替换地,移出和添加的体积可通过在每24-小时时间中逐渐增加而变化。例如,每24-小时时间内移出的第一体积的第一液体培养基的体积和添加的第二体积的第二液体培养基的体积可在培养期中增加。所述体积可在培养期中从生物反应器体积的0.5%至约20%的体积增加。所述体积可在培养期中增加至生物反应器容积或培养期开始时细胞培养物体积的约25%至约150%。

[0093] 在本申请所述的方法的一些实例中,在培养期的首个48至96小时后,在(培养期内)每24-小时时间中,移出的第一体积的第一液体培养基和添加的第二体积的第二液体培养基为培养期开始时细胞培养物体积的约10%至约95%,约10%至约20%,约20%至约30%,约30%至约40%,约40%至约50%,约50%至约60%,约60%至约70%,约70%至约80%,约80%至约90%,约85%至约95%,约60%至约80%,或约70%。

[0094] 本领域的技术人员会理解的是,第一液体培养基和第二液体培养基可为相同类型的培养基。在其他实例中,第一液体培养基和第二液体培养基可不同。就一种或多种培养基组分而言,第二液体培养基可为更浓缩的。

[0095] 可通过使用任何自动系统来移出第一体积的第一液体培养基。例如,可使用交替

切向流过滤。可替换地,可通过使第一体积的第一液体培养基渗过或重力流过具有排除哺乳动物细胞的截留分子量的无菌膜来移出第一体积的第一液体培养基。可替换地,可通过使搅拌速率停止或显著降低至少1分钟,至少2分钟,3分钟,4分钟,5分钟,10分钟,15分钟,20分钟,25分钟,30分钟,40分钟,50分钟,或1小时的时间,并从生物反应器的顶部移出或抽取第一体积的第一液体培养基来移出第一体积的第一液体培养基。

[0096] 可通过泵将第二体积的第二液体培养基添加至第一液体培养基。可人工地,如通过将第二体积的第二液体培养基直接移液或注射入第一液体培养基或以自动的方式来将第二液体培养基添加至第一液体培养基。

[0097] 在本申请所述的方法的一些实施方案中,包括(任选地提供含有配置于第一液体培养基中的哺乳动物细胞的容器)搅拌温育所述容器并在约32°C至约40°C的温度进行至少约7天的培养期;和在培养期的首个48至96小时后连续地或周期地移出第一体积的第一液体培养基和向第一液体培养基添加第二体积的第二液体培养基,其中第一和第二体积是大约相等的。在一些实施方案中,在培养期的约首个48至96小时后在每24-小时时间中,移出的第一体积的第一液体培养基和添加的第二体积的第二液体培养基为第一液体培养基体积或所述容器体积的约0.3x至约10x。

[0098] 灌注培养的一些实例包括搅拌温育含有第一液体培养基的培养系统并在约32°C至约40°C的温度进行至少约7天的培养期;和在培养期的首个48至96小时后连续地或周期地移出第一体积的第一液体培养基和向第一液体培养基添加第二体积的第二液体培养基。

[0099] 补料分批培养

[0100] 本申请所述的方法中培养步骤可包括补料分批培养。如本领域中已知的,补料分批培养包括增量的或连续的将补料液体培养基添加至初始细胞培养物,而不大量地或显著地从所述细胞培养物中移出第一液体培养基。在一些实例中,补料液体培养基与第一液体培养基相同。补料培养基可为液体形式(补料液体培养基)或干粉。在其他实例中,补料液体培养基是第一液体培养基的浓缩形式和/或作为干粉添加。

[0101] 可在培养期过程中的特定时间点或多个时间点将补料液体培养基添加至初始细胞培养物。例如,可在培养期开始后其为6小时-7天,约6小时-约6天,约6小时-约5天,约6小时-约4天,约6小时-约3天,约6小时-约2天,约6小时-约1天,约12小时-约7天,约12小时-约6天,约12小时-约5天,约12小时-约4天,约12小时-约3天,约12小时-约2天,约1天-约7天,约1天-约6天,约1天-约5天,约1天-约4天,约1天-约3天,约1天-约2天,约2天-约7天,约2天-约6天,约2天-约5天,约2天-约4天,约2天-约3天,约3天-约7天,约3天-约6天,约3天-约5天,约3天-约4天,约4天-约7天,约4天-约6天,约4天-约5天,约5天-约7天,或者约5天-约6天的时间点将补料液体培养基添加至初始细胞培养物。

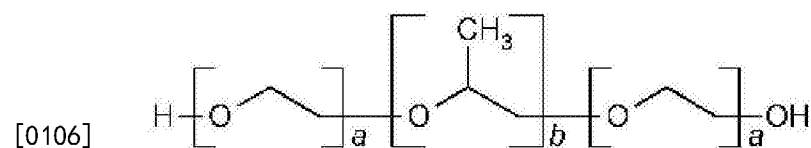
[0102] 在培养基过程中,可将补料液体培养基连续地添加至初始细胞培养物,或可周期地(例如,每天)添加至初始细胞培养物。在一些实例中,将补料液体培养基周期地添加至初始细胞培养物时,可添加补料液体培养基一次、两次、三次、四次或五次。添加至初始细胞培养物的补料液体培养基的体积或补料固体培养基的量在培养期过程中可变化(例如,增加)。在培养期过程中在任何24小时时间中添加至初始细胞培养物的补料液体培养基的体积可为生物反应器的容积的一些部分。在培养期过程中在任何24小时时间中添加至初始细胞培养物的补料液体培养基的体积可为含有培养物的生物反应器容积的0.01x-约0.3x(例

如,约0.01X-约0.28X,约0.01X-约0.26X,约0.01X-约0.24X,约0.01X-约0.22X,约0.01X-约0.20X,约0.01X-约0.18X,约0.01X-约0.16X,约0.01X-约0.14X,约0.01X-约0.12X,约0.01X-约0.10X,约0.01X-约0.08X,约0.01X-约0.06X,约0.01X-约0.04X,约0.025X-约0.3X,约0.025X-约0.28X,约0.025X-约0.26X,约0.025X-约0.24X,约0.025X-约0.22X,约0.025X-约0.20X,约0.025X-约0.18X,约0.025X-约0.16X,约0.025X-约0.14X,约0.025X-约0.12X,约0.025X-约0.10X,约0.025X-约0.08X,约0.025X-约0.06X,约0.025X-约0.04X,约0.05X-约0.3X,约0.05X-约0.28X,约0.05X-约0.26X,约0.05X-约0.24X,约0.05X-约0.22X,约0.05X-约0.20X,约0.05X-约0.18X,约0.05X-约0.16X,约0.05X-约0.14X,约0.05X-约0.12X,约0.05X-约0.10X,约0.1X-约0.3X,约0.1X-约0.28X,约0.1X-约0.26X,约0.1X-约0.24X,约0.1X-约0.22X,约0.1X-约0.20X,约0.1X-约0.18X,约0.1X-约0.16X,约0.1X-约0.14X,约0.1X,约0.15X-约0.3X,约0.15X-约0.2X,约0.2X-约0.3X,或约0.25X-约0.3X)。

[0103] 在其他实施方案中,在培养期中在任何24小时时间中添加至初始细胞培养物的补料液体培养基的体积可为培养期开始时细胞培养物体积的0.02X-约1.0X(例如,约0.02X-约0.9X,约0.02X-约0.8X,约0.02X-约0.7X,约0.02X-约0.6X,约0.02X-约0.5X,约0.02X-约0.4X,约0.02X-约0.3X,约0.02X-约0.2X,约0.02X-约0.1X,约0.05X-约1.0X,约0.05X-约0.8X,约0.05X-约0.7X,约0.05X-约0.6X,约0.05X-约0.5X,约0.05X-约0.4X,约0.05X-约0.3X,约0.05X-约0.2X,约0.05X-约0.1X,约0.1X-约1.0X,约0.1X-约0.9X,约0.1X-约0.8X,约0.1X-约0.7X,约0.1X-约0.6X,约0.1X-约0.5X,约0.1X-约0.4X,约0.1X-约0.3X,约0.1X-约0.2X,约0.2X-约1.0X,约0.2X-约0.9X,约0.2X-约0.8X,约0.2X-约0.7X,约0.2X-约0.6X,约0.2X-约0.5X,或约0.2X-约0.4X)。

[0104] 泊洛沙姆-188

[0105] 泊洛沙姆-188是本领域中已知的分子。泊洛沙姆-188是非离子型合成的环氧乙烷(ethylene oxide)和环氧丙烷(propylene oxide)的嵌段共聚物。泊洛沙姆-188具有约7680至约9510的平均分子量,且按重量计其组成的-约81.8%±1.9%由氧乙烯(oxyethylene)代表。例如,泊洛沙姆-188具有下式I中所示的结构,其中a为80和b为27。泊洛沙姆-188具有9003-11-6的CAS编号。



(式 I)

[0107] 泊洛沙姆-188在商业上可从多个不同的销售商得到,所述销售商包括,例如, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)、Mediatech, Inc. (Manassas, VA)、MAST Therapeutics, Inc. (San Diego, CA)、EMD Millipore (Billerica, MA)、BASF (Ludwigshafen, Germany)、Pluronic® F-68 Life Technologies (Carlsbad, CA) 和 PhytoTechnology Laboratories, LLC (Shawnee Mission, KS)。

[0108] 本申请提供的方法包括在液体培养基中培养哺乳动物细胞(例如,包含编码重组蛋白的核酸的哺乳动物细胞),所述液体培养基包含浓度为约1.8g/L或浓度高于1.8g/L(例

度高于11.3g/L,浓度为约11.4g/L或浓度高于11.4g/L,浓度为约11.5g/L或浓度高于11.5g/L,浓度为约11.6g/L或浓度高于11.6g/L,浓度为约11.7g/L或浓度高于11.7g/L,浓度为约11.8g/L或浓度高于11.8g/L,浓度为约11.9g/L或浓度高于11.9g/L,浓度为约12.0g/L或浓度高于12.0g/L,浓度为约12.1g/L或浓度高于12.1g/L,浓度为约12.2g/L或浓度高于12.2g/L,浓度为约12.3g/L或浓度高于12.3g/L,浓度为约12.4g/L或浓度高于12.4g/L,浓度为约12.5g/L或浓度高于12.5g/L,浓度为约12.6g/L或浓度高于12.6g/L,浓度为约12.7g/L或浓度高于12.7g/L,浓度为约12.8g/L或浓度高于12.8g/L,浓度为约12.9g/L或浓度高于12.9g/L,浓度为约13.0g/L或浓度高于13.0g/L,浓度为约13.1g/L或浓度高于13.1g/L,浓度为约13.2g/L或浓度高于13.2g/L,浓度为约13.3g/L或浓度高于13.3g/L,浓度为约13.4g/L或浓度高于13.4g/L,浓度为约13.5g/L或浓度高于13.5g/L,浓度为约13.6g/L或浓度高于13.6g/L,浓度为约13.7g/L或浓度高于13.7g/L,浓度为约13.8g/L或浓度高于13.8g/L,浓度为约13.9g/L或浓度高于13.9g/L,浓度为约14.0g/L或浓度高于14.0g/L,浓度为约14.1g/L或浓度高于14.1g/L,浓度为约14.2g/L或浓度高于14.2g/L,浓度为约14.3g/L或浓度高于14.3g/L,浓度为约14.4g/L或浓度高于14.4g/L,浓度为约14.5g/L或浓度高于14.5g/L,浓度为约14.6g/L或浓度高于14.6g/L,浓度为约14.7g/L或浓度高于14.7g/L,浓度为约14.8g/L或浓度高于14.8g/L,浓度为约14.9g/L或浓度高于14.9g/L,或浓度为约15.0g/L或浓度高于15.0g/L)的泊洛沙姆-188。

[0109] 在一些实施方案中,本申请提供的方法包括在液体培养基中培养哺乳动物细胞(例如,包含编码重组蛋白的核酸的哺乳动物细胞),所述液体培养基包含浓度为约1.8g/L-约16.0g/L(例如,约1.8g/L-约15.8g/L,约1.8g/L-约15.6g/L,约1.8g/L-约15.4g/L,约1.8g/L-约15.2g/L,约1.8g/L-约15.0g/L,约1.8g/L-约14.8g/L,约1.8g/L-约14.6g/L,约1.8g/L-约14.4g/L,约1.8g/L-约14.2g/L,约1.8g/L-约14.0g/L,约1.8g/L-约13.8g/L,约1.8g/L-约13.6g/L,约1.8g/L-约13.4g/L,约1.8g/L-约13.2g/L,约1.8g/L-约13.0g/L,约1.8g/L-约12.8g/L,约1.8g/L-约12.6g/L,约1.8g/L-约12.4g/L,约1.8g/L-约12.2g/L,约1.8g/L-约12.0g/L,约1.8g/L-约11.8g/L,约1.8g/L-约11.6g/L,约1.8g/L-约11.4g/L,约1.8g/L-约11.2g/L,约1.8g/L-约11.0g/L,约1.8g/L-约10.8g/L,约1.8g/L-约10.6g/L,约1.8g/L-约10.4g/L,约1.8g/L-约10.2g/L,约1.8g/L-约10.0g/L,约1.8g/L-约9.8g/L,约1.8g/L-约9.6g/L,约1.8g/L-约9.4g/L,约1.8g/L-约9.2g/L,约1.8g/L-约9.0g/L,约1.8g/L-约8.8g/L,约1.8g/L-约8.6g/L,约1.8g/L-约8.4g/L,约1.8g/L-约8.2g/L,约1.8g/L-约8.0g/L,约1.8g/L-约7.8g/L,约1.8g/L-约7.6g/L,约1.8g/L-约7.4g/L,约1.8g/L-约7.2g/L,约1.8g/L-约7.0g/L,约1.8g/L-约6.8g/L,约1.8g/L-约6.6g/L,约1.8g/L-约6.4g/L,约1.8g/L-约6.2g/L,约1.8g/L-约6.0g/L,约1.8g/L-约5.8g/L,约1.8g/L-约5.6g/L,约1.8g/L-约5.4g/L,约1.8g/L-约5.2g/L,约1.8g/L-约5.0g/L,约1.8g/L-约4.8g/L,约1.8g/L-约4.6g/L,约1.8g/L-约4.4g/L,约1.8g/L-约4.2g/L,约1.8g/L-约4.0g/L,约1.8g/L-约3.8g/L,约1.8g/L-约3.6g/L,约1.8g/L-约3.4g/L,约1.8g/L-约3.2g/L,约1.8g/L-约3.0g/L,约1.8g/L-约2.8g/L,约2.0g/L-约16.0g/L,约2.0g/L-约15.8g/L,约2.0g/L-约15.6g/L,约2.0g/L-约15.4g/L,约2.0g/L-约15.2g/L,约2.0g/L-约15.0g/L,约2.0g/L-约14.8g/L,约2.0g/L-约14.6g/L,约2.0g/L-约14.4g/L,约2.0g/L-约14.2g/L,约2.0g/L-约14.0g/L,约2.0g/L-约13.8g/L,约2.0g/L-约13.6g/L,约2.0g/L-约13.4g/L,约2.0g/L-约13.2g/L,约

2.0g/L-约13.0g/L,约2.0g/L-约12.8g/L,约2.0g/L-约12.6g/L,约2.0g/L-约12.4g/L,约2.0g/L-约12.2g/L,约2.0g/L-约12.0g/L,约2.0g/L-约11.8g/L,约2.0g/L-约11.6g/L,约2.0g/L-约11.4g/L,约2.0g/L-约11.2g/L,约2.0g/L-约11.0g/L,约2.0g/L-约10.8g/L,约2.0g/L-约10.6g/L,约2.0g/L-约10.4g/L,约2.0g/L-约10.2g/L,约2.0g/L-约10.0g/L,约2.0g/L-约9.8g/L,约2.0g/L-约9.6g/L,约2.0g/L-约9.4g/L,约2.0g/L-约9.2g/L,约2.0g/L-约9.0g/L,约2.0g/L-约8.8g/L,约2.0g/L-约8.6g/L,约2.0g/L-约8.4g/L,约2.0g/L-约8.2g/L,约2.0g/L-约8.0g/L,约2.0g/L-约7.8g/L,约2.0g/L-约7.6g/L,约2.0g/L-约7.4g/L,约2.0g/L-约7.2g/L,约2.0g/L-约7.0g/L,约2.0g/L-约6.8g/L,约2.0g/L-约6.6g/L,约2.0g/L-约6.4g/L,约2.0g/L-约6.2g/L,约2.0g/L-约6.0g/L,约2.0g/L-约5.8g/L,约2.0g/L-约5.6g/L,约2.0g/L-约5.4g/L,约2.0g/L-约5.2g/L,约2.0g/L-约5.0g/L,约2.0g/L-约4.8g/L,约2.0g/L-约4.6g/L,约2.0g/L-约4.4g/L,约2.0g/L-约4.2g/L,约2.0g/L-约4.0g/L,约2.0g/L-约3.8g/L,约2.0g/L-约3.6g/L,约2.0g/L-约3.4g/L,约2.0g/L-约3.2g/L,约2.0g/L-约3.0g/L,约2.2g/L-约16.0g/L,约2.2g/L-约15.8g/L,约2.2g/L-约15.6g/L,约2.2g/L-约15.4g/L,约2.2g/L-约15.2g/L,约2.2g/L-约15.0g/L,约2.2g/L-约14.8g/L,约2.2g/L-约14.6g/L,约2.2g/L-约14.4g/L,约2.2g/L-约14.2g/L,约2.2g/L-约14.0g/L,约2.2g/L-约13.8g/L,约2.2g/L-约13.6g/L,约2.2g/L-约13.4g/L,约2.2g/L-约13.2g/L,约2.2g/L-约13.0g/L,约2.2g/L-约12.8g/L,约2.2g/L-约12.6g/L,约2.2g/L-约12.4g/L,约2.2g/L-约12.2g/L,约2.2g/L-约12.0g/L,约2.2g/L-约11.8g/L,约2.2g/L-约11.6g/L,约2.2g/L-约11.4g/L,约2.2g/L-约11.2g/L,约2.2g/L-约11.0g/L,约2.2g/L-约10.8g/L,约2.2g/L-约10.6g/L,约2.2g/L-约10.4g/L,约2.2g/L-约10.2g/L,约2.2g/L-约10.0g/L,约2.2g/L-约9.8g/L,约2.2g/L-约9.6g/L,约2.2g/L-约9.4g/L,约2.2g/L-约9.2g/L,约2.2g/L-约9.0g/L,约2.2g/L-约8.8g/L,约2.2g/L-约8.6g/L,约2.2g/L-约8.4g/L,约2.2g/L-约8.2g/L,约2.2g/L-约8.0g/L,约2.2g/L-约7.8g/L,约2.2g/L-约7.6g/L,约2.2g/L-约7.4g/L,约2.2g/L-约7.2g/L,约2.2g/L-约7.0g/L,约2.2g/L-约6.9g/L,约2.2g/L-约6.8g/L,约2.2g/L-约6.6g/L,约2.2g/L-约6.4g/L,约2.2g/L-约6.2g/L,约2.2g/L-约6.0g/L,约2.2g/L-约5.8g/L,约2.2g/L-约5.6g/L,约2.2g/L-约5.4g/L,约2.2g/L-约5.2g/L,约2.2g/L-约5.0g/L,约2.2g/L-约4.8g/L,约2.2g/L-约4.6g/L,约2.2g/L-约4.4g/L,约2.2g/L-约4.2g/L,约2.2g/L-约4.0g/L,约2.2g/L-约3.8g/L,约2.2g/L-约3.6g/L,约2.2g/L-约3.4g/L,约2.2g/L-约3.2g/L,约2.4g/L-约16.0g/L,约2.4g/L-约15.8g/L,约2.4g/L-约15.6g/L,约2.4g/L-约15.4g/L,约2.4g/L-约15.2g/L,约2.4g/L-约15.0g/L,约2.4g/L-约14.8g/L,约2.4g/L-约14.6g/L,约2.4g/L-约14.4g/L,约2.4g/L-约14.2g/L,约2.4g/L-约14.0g/L,约2.4g/L-约13.8g/L,约2.4g/L-约13.6g/L,约2.4g/L-约13.4g/L,约2.4g/L-约13.2g/L,约2.4g/L-约13.0g/L,约2.4g/L-约12.8g/L,约2.4g/L-约12.6g/L,约2.4g/L-约12.4g/L,约2.4g/L-约12.2g/L,约2.4g/L-约12.0g/L,约2.4g/L-约11.8g/L,约2.4g/L-约11.6g/L,约2.4g/L-约11.4g/L,约2.4g/L-约11.2g/L,约2.4g/L-约11.0g/L,约2.4g/L-约10.8g/L,约2.4g/L-约10.6g/L,约2.4g/L-约10.4g/L,约2.4g/L-约10.2g/L,约2.4g/L-约10.0g/L,约2.4g/L-约9.8g/L,约2.4g/L-约9.6g/L,约2.4g/L-约9.4g/L,约2.4g/L-约9.2g/L,约2.4g/L-约9.0g/L,约2.4g/L-约8.8g/L,约2.4g/L-约8.6g/L,约2.4g/L-约8.4g/L,约2.4g/L-约8.2g/L,约2.4g/L-约8.0g/L,约2.4g/L-约7.8g/L,约2.4g/L-约7.6g/L,约2.4g/L-约7.4g/L

L,约2.4g/L-约7.2g/L,约2.4g/L-约7.0g/L,约2.4g/L-约6.9g/L,约2.4g/L-约6.8g/L,约2.4g/L-约6.6g/L,约2.4g/L-约6.4g/L,约2.4g/L-约6.2g/L,约2.4g/L-约6.0g/L,约2.4g/L-约5.8g/L,约2.4g/L-约5.6g/L,约2.4g/L-约5.4g/L,约2.4g/L-约5.2g/L,约2.4g/L-约5.0g/L,约2.4g/L-约4.8g/L,约2.4g/L-约4.6g/L,约2.4g/L-约4.4g/L,约2.4g/L-约4.2g/L,约2.4g/L-约4.0g/L,约2.4g/L-约3.8g/L,约2.4g/L-约3.6g/L,约2.4g/L-约3.4g/L,约2.6g/L-约16.0g/L,约2.6g/L-约15.8g/L,约2.6g/L-约15.6g/L,约2.6g/L-约15.4g/L,约2.6g/L-约15.2g/L,约2.6g/L-约15.0g/L,约2.6g/L-约14.8g/L,约2.6g/L-约14.6g/L,约2.6g/L-约14.4g/L,约2.6g/L-约14.2g/L,约2.6g/L-约14.0g/L,约2.6g/L-约13.8g/L,约2.6g/L-约13.6g/L,约2.6g/L-约13.4g/L,约2.6g/L-约13.2g/L,约2.6g/L-约13.0g/L,约2.6g/L-约12.8g/L,约2.6g/L-约12.6g/L,约2.6g/L-约12.4g/L,约2.6g/L-约12.2g/L,约2.6g/L-约12.0g/L,约2.6g/L-约11.8g/L,约2.6g/L-约11.6g/L,约2.6g/L-约11.4g/L,约2.6g/L-约11.2g/L,约2.6g/L-约11.0g/L,约2.6g/L-约10.8g/L,约2.6g/L-约10.6g/L,约2.6g/L-约10.4g/L,约2.6g/L-约10.2g/L,约2.6g/L-约10.0g/L,约2.6g/L-约9.8g/L,约2.6g/L-约9.6g/L,约2.6g/L-约9.4g/L,约2.6g/L-约9.2g/L,约2.6g/L-约9.0g/L,约2.6g/L-约8.8g/L,约2.6g/L-约8.6g/L,约2.6g/L-约8.4g/L,约2.6g/L-约8.2g/L,约2.6g/L-约8.0g/L,约2.6g/L-约7.8g/L,约2.6g/L-约7.6g/L,约2.6g/L-约7.4g/L,约2.6g/L-约7.2g/L,约2.6g/L-约7.0g/L,约2.6g/L-约6.9g/L,约2.6g/L-约6.8g/L,约2.6g/L-约6.6g/L,约2.6g/L-约6.4g/L,约2.6g/L-约6.2g/L,约2.6g/L-约6.0g/L,约2.6g/L-约5.8g/L,约2.6g/L-约5.6g/L,约2.6g/L-约5.4g/L,约2.6g/L-约5.2g/L,约2.6g/L-约5.0g/L,约2.6g/L-约4.8g/L,约2.6g/L-约4.6g/L,约2.6g/L-约4.4g/L,约2.6g/L-约4.2g/L,约2.6g/L-约4.0g/L,约2.6g/L-约3.8g/L,约2.6g/L-约3.6g/L,约2.8g/L-约16.0g/L,约2.8g/L-约15.8g/L,约2.8g/L-约15.6g/L,约2.8g/L-约15.4g/L,约2.8g/L-约15.2g/L,约2.8g/L-约15.0g/L,约2.8g/L-约14.8g/L,约2.8g/L-约14.6g/L,约2.8g/L-约14.4g/L,约2.8g/L-约14.2g/L,约2.8g/L-约14.0g/L,约2.8g/L-约13.8g/L,约2.8g/L-约13.6g/L,约2.8g/L-约13.4g/L,约2.8g/L-约13.2g/L,约2.8g/L-约13.0g/L,约2.8g/L-约12.8g/L,约2.8g/L-约12.6g/L,约2.8g/L-约12.4g/L,约2.8g/L-约12.2g/L,约2.8g/L-约12.0g/L,约2.8g/L-约11.8g/L,约2.8g/L-约11.6g/L,约2.8g/L-约11.4g/L,约2.8g/L-约11.2g/L,约2.8g/L-约11.0g/L,约2.8g/L-约10.8g/L,约2.8g/L-约10.6g/L,约2.8g/L-约10.4g/L,约2.8g/L-约10.2g/L,约2.8g/L-约10.0g/L,约2.8g/L-约9.8g/L,约2.8g/L-约9.6g/L,约2.8g/L-约9.4g/L,约2.8g/L-约9.2g/L,约2.8g/L-约9.0g/L,约2.8g/L-约8.8g/L,约2.8g/L-约8.6g/L,约2.8g/L-约8.4g/L,约2.8g/L-约8.2g/L,约2.8g/L-约8.0g/L,约2.8g/L-约7.8g/L,约2.8g/L-约7.6g/L,约2.8g/L-约7.4g/L,约2.8g/L-约7.2g/L,约2.8g/L-约7.0g/L,约2.8g/L-约6.9g/L,约2.8g/L-约6.8g/L,约2.8g/L-约6.6g/L,约2.8g/L-约6.4g/L,约2.8g/L-约6.2g/L,约2.8g/L-约6.0g/L,约2.8g/L-约5.8g/L,约2.8g/L-约5.6g/L,约2.8g/L-约5.4g/L,约2.8g/L-约5.2g/L,约2.8g/L-约5.0g/L,约2.8g/L-约4.8g/L,约2.8g/L-约4.6g/L,约2.8g/L-约4.4g/L,约2.8g/L-约4.2g/L,约2.8g/L-约4.0g/L,约2.8g/L-约3.8g/L,约3.0g/L-约16.0g/L,约3.0g/L-约15.8g/L,约3.0g/L-约15.6g/L,约3.0g/L-约15.4g/L,约3.0g/L-约15.2g/L,约3.0g/L-约15.0g/L,约3.0g/L-约14.8g/L,约3.0g/L-约14.6g/L,约3.0g/L-约14.4g/L,约3.0g/L-约14.2g/L,约3.0g/L-约14.0g/L,约3.0g/L-约13.8g/L,约3.0g/L-约

13.6g/L,约3.0g/L-约13.4g/L,约3.0g/L-约13.2g/L,约3.0g/L-约13.0g/L,约3.0g/L-约12.8g/L,约3.0g/L-约12.6g/L,约3.0g/L-约12.4g/L,约3.0g/L-约12.2g/L,约3.0g/L-约12.0g/L,约3.0g/L-约11.8g/L,约3.0g/L-约11.6g/L,约3.0g/L-约11.4g/L,约3.0g/L-约11.2g/L,约3.0g/L-约11.0g/L,约3.0g/L-约10.8g/L,约3.0g/L-约10.6g/L.约3.0g/L-约10.4g/L,约3.0g/L-约10.2g/L,约3.0g/L-约10.0g/L,约3.0g/L-约9.8g/L,约3.0g/L-约9.6g/L,约3.0g/L-约9.4g/L,约3.0g/L-约9.2g/L,约3.0g/L-约9.0g/L,约3.0g/L-约8.8g/L,约3.0g/L-约8.6g/L,约3.0g/L-约8.4g/L,约3.0g/L-约8.2g/L,约3.0g/L-约8.0g/L,约3.0g/L-约7.8g/L,约3.0g/L-约7.6g/L,约3.0g/L-约7.4g/L,约3.0g/L-约7.2g/L,约3.0g/L-约7.0g/L,约3.0g/L-约6.9g/L,约3.0g/L-约6.8g/L,约3.0g/L-约6.6g/L,约3.0g/L-约6.4g/L,约3.0g/L-约6.2g/L,约3.0g/L-约6.0g/L,约3.0g/L-约5.8g/L,约3.0g/L-约5.6g/L,约3.0g/L-约5.4g/L,约3.0g/L-约5.2g/L,约3.0g/L-约5.0g/L,约3.0g/L-约4.8g/L,约3.0g/L-约4.6g/L,约3.0g/L-约4.4g/L,约3.0g/L-约4.2g/L,约3.0g/L-约4.0g/L,约3.2g/L-约16.0g/L,约3.2g/L-约15.8g/L,约3.2g/L-约15.6g/L,约3.2g/L-约15.4g/L,约3.2g/L-约15.2g/L,约3.2g/L-约15.0g/L,约3.2g/L-约14.8g/L,约3.2g/L-约14.6g/L,约3.2g/L-约14.4g/L,约3.2g/L-约14.2g/L,约3.2g/L-约14.0g/L,约3.2g/L-约13.8g/L,约3.2g/L-约13.6g/L,约3.2g/L-约13.4g/L,约3.2g/L-约13.2g/L,约3.2g/L-约13.0g/L,约3.2g/L-约12.8g/L,约3.2g/L-约12.6g/L,约3.2g/L-约12.4g/L,约3.2g/L-约12.2g/L,约3.2g/L-约12.0g/L,约3.2g/L-约11.8g/L,约3.2g/L-约11.6g/L,约3.2g/L-约11.4g/L,约3.2g/L-约11.2g/L,约3.2g/L-约11.0g/L,约3.2g/L-约10.8g/L,约3.2g/L-约10.6g/L.约3.2g/L-约10.4g/L,约3.2g/L-约10.2g/L,约3.2g/L-约10.0g/L,约3.2g/L-约9.8g/L,约3.2g/L-约9.6g/L,约3.2g/L-约9.4g/L,约3.2g/L-约9.2g/L,约3.2g/L-约9.0g/L,约3.2g/L-约8.8g/L,约3.2g/L-约8.6g/L,约3.2g/L-约8.4g/L,约3.2g/L-约8.2g/L,约3.2g/L-约8.0g/L,约3.2g/L-约7.8g/L,约3.2g/L-约7.6g/L,约3.2g/L-约7.4g/L,约3.2g/L-约7.2g/L,约3.2g/L-约7.0g/L,约3.2g/L-约6.9g/L,约3.2g/L-约6.8g/L,约3.2g/L-约6.6g/L,约3.2g/L-约6.4g/L,约3.2g/L-约6.2g/L,约3.2g/L-约6.0g/L,约3.2g/L-约5.8g/L,约3.2g/L-约5.6g/L,约3.2g/L-约5.4g/L,约3.2g/L-约5.2g/L,约3.2g/L-约5.0g/L,约3.2g/L-约4.8g/L,约3.2g/L-约4.6g/L,约3.2g/L-约4.4g/L,约3.2g/L-约4.2g/L,约3.4g/L-约16.0g/L,约3.4g/L-约15.8g/L,约3.4g/L-约15.6g/L,约3.4g/L-约15.4g/L,约3.4g/L-约15.2g/L,约3.4g/L-约15.0g/L,约3.4g/L-约14.8g/L,约3.4g/L-约14.6g/L,约3.4g/L-约14.4g/L,约3.4g/L-约14.2g/L,约3.4g/L-约14.0g/L,约3.4g/L-约13.8g/L,约3.4g/L-约13.6g/L,约3.4g/L-约13.4g/L,约3.4g/L-约13.2g/L,约3.4g/L-约13.0g/L,约3.4g/L-约12.8g/L,约3.4g/L-约12.6g/L,约3.4g/L-约12.4g/L,约3.4g/L-约12.2g/L,约3.4g/L-约12.0g/L,约3.4g/L-约11.8g/L,约3.4g/L-约11.6g/L,约3.4g/L-约11.4g/L,约3.4g/L-约11.2g/L,约3.4g/L-约11.0g/L,约3.4g/L-约10.8g/L,约3.4g/L-约10.6g/L.约3.4g/L-约10.4g/L,约3.4g/L-约10.2g/L,约3.4g/L-约10.0g/L,约3.4g/L-约9.8g/L,约3.4g/L-约9.6g/L,约3.4g/L-约9.4g/L,约3.4g/L-约9.2g/L,约3.4g/L-约9.0g/L,约3.4g/L-约8.8g/L,约3.4g/L-约8.6g/L,约3.4g/L-约8.4g/L,约3.4g/L-约8.2g/L,约3.4g/L-约8.0g/L,约3.4g/L-约7.8g/L,约3.4g/L-约7.6g/L,约3.4g/L-约7.4g/L,约3.4g/L-约7.2g/L,约3.4g/L-约7.0g/L,约3.4g/L-约6.9g/L,约3.4g/L-约6.8g/L,约3.4g/L-约6.6g/L,约3.4g/L-约6.4g/L,约

3.4g/L-约6.2g/L,约3.4g/L-约6.0g/L,约3.4g/L-约5.8g/L,约3.4g/L-约5.6g/L,约3.4g/L-约5.4g/L,约3.4g/L-约5.2g/L,约3.4g/L-约5.0g/L,约3.4g/L-约4.8g/L,约3.4g/L-约4.6g/L,约3.4g/L-约4.4g/L,约3.6g/L-约16.0g/L,约3.6g/L-约15.8g/L,约3.6g/L-约15.6g/L,约3.6g/L-约15.4g/L,约3.6g/L-约15.2g/L,约3.6g/L-约15.0g/L,约3.6g/L-约14.8g/L,约3.6g/L-约14.6g/L,约3.6g/L-约14.4g/L,约3.6g/L-约14.2g/L,约3.6g/L-约14.0g/L,约3.6g/L-约13.8g/L,约3.6g/L-约13.6g/L,约3.6g/L-约13.4g/L,约3.6g/L-约13.2g/L,约3.6g/L-约13.0g/L,约3.6g/L-约12.8g/L,约3.6g/L-约12.6g/L,约3.6g/L-约12.4g/L,约3.6g/L-约12.2g/L,约3.6g/L-约12.0g/L,约3.6g/L-约11.8g/L,约3.6g/L-约11.6g/L,约3.6g/L-约11.4g/L,约3.6g/L-约11.2g/L,约3.6g/L-约11.0g/L,约3.6g/L-约10.8g/L,约3.6g/L-约10.6g/L,约3.6g/L-约10.4g/L,约3.6g/L-约10.2g/L,约3.6g/L-约10.0g/L,约3.6g/L-约9.8g/L,约3.6g/L-约9.6g/L,约3.6g/L-约9.4g/L,约3.6g/L-约9.2g/L,约3.6g/L-约9.0g/L,约3.6g/L-约8.8g/L,约3.6g/L-约8.6g/L,约3.6g/L-约8.4g/L,约3.6g/L-约8.2g/L,约3.6g/L-约8.0g/L,约3.6g/L-约7.8g/L,约3.6g/L-约7.6g/L,约3.6g/L-约7.4g/L,约3.6g/L-约7.2g/L,约3.6g/L-约7.0g/L,约3.6g/L-约6.9g/L,约3.6g/L-约6.8g/L,约3.6g/L-约6.6g/L,约3.6g/L-约6.4g/L,约3.6g/L-约6.2g/L,约3.6g/L-约6.0g/L,约3.6g/L-约5.8g/L,约3.6g/L-约5.6g/L,约3.6g/L-约5.4g/L,约3.6g/L-约5.2g/L,约3.6g/L-约5.0g/L,约3.6g/L-约4.8g/L,约3.6g/L-约4.6g/L,约3.8g/L-约16.0g/L,约3.8g/L-约15.8g/L,约3.8g/L-约15.6g/L,约3.8g/L-约15.4g/L,约3.8g/L-约15.2g/L,约3.8g/L-约15.0g/L,约3.8g/L-约14.8g/L,约3.8g/L-约14.6g/L,约3.8g/L-约14.4g/L,约3.8g/L-约14.2g/L,约3.8g/L-约14.0g/L,约3.8g/L-约13.8g/L,约3.8g/L-约13.6g/L,约3.8g/L-约13.4g/L,约3.8g/L-约13.2g/L,约3.8g/L-约13.0g/L,约3.8g/L-约12.8g/L,约3.8g/L-约12.6g/L,约3.8g/L-约12.4g/L,约3.8g/L-约12.2g/L,约3.8g/L-约12.0g/L,约3.8g/L-约11.8g/L,约3.8g/L-约11.6g/L,约3.8g/L-约11.4g/L,约3.8g/L-约11.2g/L,约3.8g/L-约11.0g/L,约3.8g/L-约10.8g/L,约3.8g/L-约10.6g/L,约3.8g/L-约10.4g/L,约3.8g/L-约10.2g/L,约3.8g/L-约10.0g/L,约3.8g/L-约9.8g/L,约3.8g/L-约9.6g/L,约3.8g/L-约9.4g/L,约3.8g/L-约9.2g/L,约3.8g/L-约9.0g/L,约3.8g/L-约8.8g/L,约3.8g/L-约8.6g/L,约3.8g/L-约8.4g/L,约3.8g/L-约8.2g/L,约3.8g/L-约8.0g/L,约3.8g/L-约7.8g/L,约3.8g/L-约7.6g/L,约3.8g/L-约7.4g/L,约3.8g/L-约7.2g/L,约3.8g/L-约7.0g/L,约3.8g/L-约6.9g/L,约3.8g/L-约6.8g/L,约3.8g/L-约6.6g/L,约3.8g/L-约6.4g/L,约3.8g/L-约6.2g/L,约3.8g/L-约6.0g/L,约3.8g/L-约5.8g/L,约3.8g/L-约5.6g/L,约3.8g/L-约5.4g/L,约3.8g/L-约5.2g/L,约3.8g/L-约5.0g/L,约3.8g/L-约4.8g/L,约4.0g/L-约16.0g/L,约4.0g/L-约15.8g/L,约4.0g/L-约15.6g/L,约4.0g/L-约15.4g/L,约4.0g/L-约15.2g/L,约4.0g/L-约15.0g/L,约4.0g/L-约14.8g/L,约4.0g/L-约14.6g/L,约4.0g/L-约14.4g/L,约4.0g/L-约14.2g/L,约4.0g/L-约14.0g/L,约4.0g/L-约13.8g/L,约4.0g/L-约13.6g/L,约4.0g/L-约13.4g/L,约4.0g/L-约13.2g/L,约4.0g/L-约13.0g/L,约4.0g/L-约12.8g/L,约4.0g/L-约12.6g/L,约4.0g/L-约12.4g/L,约4.0g/L-约12.2g/L,约4.0g/L-约12.0g/L,约4.0g/L-约11.8g/L,约4.0g/L-约11.6g/L,约4.0g/L-约11.4g/L,约4.0g/L-约11.2g/L,约4.0g/L-约11.0g/L,约4.0g/L-约10.8g/L,约4.0g/L-约10.6g/L,约4.0g/L-约10.4g/L,约4.0g/L-约10.2g/L,约4.0g/L-约10.0g/L,约4.0g/L-约9.8g/L,约4.0g/L-约

9.6g/L,约4.0g/L-约9.4g/L,约4.0g/L-约9.2g/L,约4.0g/L-约9.0g/L,约4.0g/L-约8.8g/L,约4.0g/L-约8.6g/L,约4.0g/L-约8.4g/L,约4.0g/L-约8.2g/L,约4.0g/L-约8.0g/L,约4.0g/L-约7.8g/L,约4.0g/L-约7.6g/L,约4.0g/L-约7.4g/L,约4.0g/L-约7.2g/L,约4.0g/L-约7.0g/L,约4.0g/L-约6.9g/L,约4.0g/L-约6.8g/L,约4.0g/L-约6.6g/L,约4.0g/L-约6.4g/L,约4.0g/L-约6.2g/L,约4.0g/L-约6.0g/L,约4.0g/L-约5.8g/L,约4.0g/L-约5.6g/L,约4.0g/L-约5.4g/L,约4.0g/L-约5.2g/L,约4.0g/L-约5.0g/L,约4.2g/L-约16.0g/L,约4.2g/L-约15.8g/L,约4.2g/L-约15.6g/L,约4.2g/L-约15.4g/L,约4.2g/L-约15.2g/L,约4.2g/L-约15.0g/L,约4.2g/L-约14.8g/L,约4.2g/L-约14.6g/L,约4.2g/L-约14.4g/L,约4.2g/L-约14.2g/L,约4.2g/L-约14.0g/L,约4.2g/L-约13.8g/L,约4.2g/L-约13.6g/L,约4.2g/L-约13.4g/L,约4.2g/L-约13.2g/L,约4.2g/L-约13.0g/L,约4.2g/L-约12.8g/L,约4.2g/L-约12.6g/L,约4.2g/L-约12.4g/L,约4.2g/L-约12.2g/L,约4.2g/L-约12.0g/L,约4.2g/L-约11.8g/L,约4.2g/L-约11.6g/L,约4.2g/L-约11.4g/L,约4.2g/L-约11.2g/L,约4.2g/L-约11.0g/L,约4.2g/L-约10.8g/L,约4.2g/L-约10.6g/L,约4.2g/L-约10.4g/L,约4.2g/L-约10.2g/L,约4.2g/L-约10.0g/L,约4.2g/L-约9.8g/L,约4.2g/L-约9.6g/L,约4.2g/L-约9.4g/L,约4.2g/L-约9.2g/L,约4.2g/L-约9.0g/L,约4.2g/L-约8.8g/L,约4.2g/L-约8.6g/L,约4.2g/L-约8.4g/L,约4.2g/L-约8.2g/L,约4.2g/L-约8.0g/L,约4.2g/L-约7.8g/L,约4.2g/L-约7.6g/L,约4.2g/L-约7.4g/L,约4.2g/L-约7.2g/L,约4.2g/L-约7.0g/L,约4.2g/L-约6.9g/L,约4.2g/L-约6.8g/L,约4.2g/L-约6.6g/L,约4.2g/L-约6.4g/L,约4.2g/L-约6.2g/L,约4.2g/L-约6.0g/L,约4.2g/L-约5.8g/L,约4.2g/L-约5.6g/L,约4.2g/L-约5.4g/L,约4.2g/L-约5.2g/L,约4.4g/L-约16.0g/L,约4.4g/L-约15.8g/L,约4.4g/L-约15.6g/L,约4.4g/L-约15.4g/L,约4.4g/L-约15.2g/L,约4.4g/L-约15.0g/L,约4.4g/L-约14.8g/L,约4.4g/L-约14.6g/L,约4.4g/L-约14.4g/L,约4.4g/L-约14.2g/L,约4.4g/L-约14.0g/L,约4.4g/L-约13.8g/L,约4.4g/L-约13.6g/L,约4.4g/L-约13.4g/L,约4.4g/L-约13.2g/L,约4.4g/L-约13.0g/L,约4.4g/L-约12.8g/L,约4.4g/L-约12.6g/L,约4.4g/L-约12.4g/L,约4.4g/L-约12.2g/L,约4.4g/L-约12.0g/L,约4.4g/L-约11.8g/L,约4.4g/L-约11.6g/L,约4.4g/L-约11.4g/L,约4.4g/L-约11.2g/L,约4.4g/L-约11.0g/L,约4.4g/L-约10.8g/L,约4.4g/L-约10.6g/L,约4.4g/L-约10.4g/L,约4.4g/L-约10.2g/L,约4.4g/L-约10.0g/L,约4.4g/L-约9.8g/L,约4.4g/L-约9.6g/L,约4.4g/L-约9.4g/L,约4.4g/L-约9.2g/L,约4.4g/L-约9.0g/L,约4.4g/L-约8.8g/L,约4.4g/L-约8.6g/L,约4.4g/L-约8.4g/L,约4.4g/L-约8.2g/L,约4.4g/L-约8.0g/L,约4.4g/L-约7.8g/L,约4.4g/L-约7.6g/L,约4.4g/L-约7.4g/L,约4.4g/L-约7.2g/L,约4.4g/L-约7.0g/L,约4.4g/L-约6.9g/L,约4.4g/L-约6.8g/L,约4.4g/L-约6.6g/L,约4.4g/L-约6.4g/L,约4.4g/L-约6.2g/L,约4.4g/L-约6.0g/L,约4.4g/L-约5.8g/L,约4.4g/L-约5.6g/L,约4.4g/L-约5.4g/L,约4.6g/L-约16.0g/L,约4.6g/L-约15.8g/L,约4.6g/L-约15.6g/L,约4.6g/L-约15.4g/L,约4.6g/L-约15.2g/L,约4.6g/L-约15.0g/L,约4.6g/L-约14.8g/L,约4.6g/L-约14.6g/L,约4.6g/L-约14.4g/L,约4.6g/L-约14.2g/L,约4.6g/L-约14.0g/L,约4.6g/L-约13.8g/L,约4.6g/L-约13.6g/L,约4.6g/L-约13.4g/L,约4.6g/L-约13.2g/L,约4.6g/L-约13.0g/L,约4.6g/L-约12.8g/L,约4.6g/L-约12.6g/L,约4.6g/L-约12.4g/L,约4.6g/L-约12.2g/L,约4.6g/L-约12.0g/L,约4.6g/L-约11.8g/L,约4.6g/L-约11.6g/L,约4.6g/L-约11.4g/L,约4.6g/L-约

11.2g/L,约4.6g/L-约11.0g/L,约4.6g/L-约10.8g/L,约4.6g/L-约10.6g/L,约4.6g/L-约10.4g/L,约4.6g/L-约10.2g/L,约4.6g/L-约10.0g/L,约4.6g/L-约9.8g/L,约4.6g/L-约9.6g/L,约4.6g/L-约9.4g/L,约4.6g/L-约9.2g/L,约4.6g/L-约9.0g/L,约4.6g/L-约8.8g/L,约4.6g/L-约8.6g/L,约4.6g/L-约8.4g/L,约4.6g/L-约8.2g/L,约4.6g/L-约8.0g/L,约4.6g/L-约7.8g/L,约4.6g/L-约7.6g/L,约4.6g/L-约7.4g/L,约4.6g/L-约7.2g/L,约4.6g/L-约7.0g/L,约4.6g/L-约6.9g/L,约4.6g/L-约6.8g/L,约4.6g/L-约6.6g/L,约4.6g/L-约6.4g/L,约4.6g/L-约6.2g/L,约4.6g/L-约6.0g/L,约4.6g/L-约5.8g/L,约4.6g/L-约5.6g/L,约4.8g/L-约16.0g/L,约4.8g/L-约15.8g/L,约4.8g/L-约15.6g/L,约4.8g/L-约15.4g/L,约4.8g/L-约15.2g/L,约4.8g/L-约15.0g/L,约4.8g/L-约14.8g/L,约4.8g/L-约14.6g/L,约4.8g/L-约14.4g/L,约4.8g/L-约14.2g/L,约4.8g/L-约14.0g/L,约4.8g/L-约13.8g/L,约4.8g/L-约13.6g/L,约4.8g/L-约13.4g/L,约4.8g/L-约13.2g/L,约4.8g/L-约13.0g/L,约4.8g/L-约12.8g/L,约4.8g/L-约12.6g/L,约4.8g/L-约12.4g/L,约4.8g/L-约12.2g/L,约4.8g/L-约12.0g/L,约4.8g/L-约11.8g/L,约4.8g/L-约11.6g/L,约4.8g/L-约11.4g/L,约4.8g/L-约11.2g/L,约4.8g/L-约11.0g/L,约4.8g/L-约10.8g/L,约4.8g/L-约10.6g/L,约4.8g/L-约10.4g/L,约4.8g/L-约10.2g/L,约4.8g/L-约10.0g/L,约4.8g/L-约9.8g/L,约4.8g/L-约9.6g/L,约4.8g/L-约9.4g/L,约4.8g/L-约9.2g/L,约4.8g/L-约9.0g/L,约4.8g/L-约8.8g/L,约4.8g/L-约8.6g/L,约4.8g/L-约8.4g/L,约4.8g/L-约8.2g/L,约4.8g/L-约8.0g/L,约4.8g/L-约7.8g/L,约4.8g/L-约7.6g/L,约4.8g/L-约7.4g/L,约4.8g/L-约7.2g/L,约4.8g/L-约7.0g/L,约4.8g/L-约6.9g/L,约4.8g/L-约6.8g/L,约4.8g/L-约6.6g/L,约4.8g/L-约6.4g/L,约4.8g/L-约6.2g/L,约4.8g/L-约6.0g/L,约4.8g/L-约5.8g/L,约5.0g/L-约16.0g/L,约5.0g/L-约15.8g/L,约5.0g/L-约15.6g/L,约5.0g/L-约15.4g/L,约5.0g/L-约15.2g/L,约5.0g/L-约15.0g/L,约5.0g/L-约14.8g/L,约5.0g/L-约14.6g/L,约5.0g/L-约14.4g/L,约5.0g/L-约14.2g/L,约5.0g/L-约14.0g/L,约5.0g/L-约13.8g/L,约5.0g/L-约13.6g/L,约5.0g/L-约13.4g/L,约5.0g/L-约13.2g/L,约5.0g/L-约13.0g/L,约5.0g/L-约12.8g/L,约5.0g/L-约12.6g/L,约5.0g/L-约12.4g/L,约5.0g/L-约12.2g/L,约5.0g/L-约12.0g/L,约5.0g/L-约11.8g/L,约5.0g/L-约11.6g/L,约5.0g/L-约11.4g/L,约5.0g/L-约11.2g/L,约5.0g/L-约11.0g/L,约5.0g/L-约10.8g/L,约5.0g/L-约10.6g/L,约5.0g/L-约10.4g/L,约5.0g/L-约10.2g/L,约5.0g/L-约10.0g/L,约5.0g/L-约9.8g/L,约5.0g/L-约9.6g/L,约5.0g/L-约9.4g/L,约5.0g/L-约9.2g/L,约5.0g/L-约9.0g/L,约5.0g/L-约8.8g/L,约5.0g/L-约8.6g/L,约5.0g/L-约8.4g/L,约5.0g/L-约8.2g/L,约5.0g/L-约8.0g/L,约5.0g/L-约7.8g/L,约5.0g/L-约7.6g/L,约5.0g/L-约7.4g/L,约5.0g/L-约7.2g/L,约5.0g/L-约7.0g/L,约5.0g/L-约6.9g/L,约5.0g/L-约6.8g/L,约5.0g/L-约6.6g/L,约5.0g/L-约6.4g/L,约5.0g/L-约6.2g/L,约5.0g/L-约6.0g/L,约5.1g/L-约16.0g/L,约5.1g/L-约15.8g/L,约5.1g/L-约15.6g/L,约5.1g/L-约15.4g/L,约5.1g/L-约15.2g/L,约5.1g/L-约15.0g/L,约5.1g/L-约14.8g/L,约5.1g/L-约14.6g/L,约5.1g/L-约14.4g/L,约5.1g/L-约14.2g/L,约5.1g/L-约14.0g/L,约5.1g/L-约13.8g/L,约5.1g/L-约13.6g/L,约5.1g/L-约13.4g/L,约5.1g/L-约13.2g/L,约5.1g/L-约13.0g/L,约5.1g/L-约12.8g/L,约5.1g/L-约12.6g/L,约5.1g/L-约12.4g/L,约5.1g/L-约12.2g/L,约5.1g/L-约12.0g/L,约5.1g/L-约11.8g/L,约5.1g/L-约11.6g/L,约5.1g/L-约11.4g/L,约5.1g/L-约11.2g/L,约

5.1g/L-约11.0g/L,约5.1g/L-约10.8g/L,约5.1g/L-约10.6g/L,约5.1g/L-约10.4g/L,约5.1g/L-约10.2g/L,约5.1g/L-约10.0g/L,约5.1g/L-约9.8g/L,约5.1g/L-约9.6g/L,约5.1g/L-约9.4g/L,约5.1g/L-约9.2g/L,约5.1g/L-约9.0g/L,约5.1g/L-约8.8g/L,约5.1g/L-约8.6g/L,约5.1g/L-约8.4g/L,约5.1g/L-约8.2g/L,约5.1g/L-约8.0g/L,约5.1g/L-约7.8g/L,约5.1g/L-约7.6g/L,约5.1g/L-约7.4g/L,约5.1g/L-约7.2g/L,约5.1g/L-约7.0g/L,约5.1g/L-约6.9g/L,约5.1g/L-约6.8g/L,约5.1g/L-约6.6g/L,约5.1g/L-约6.4g/L,约5.1g/L-约6.2g/L,约5.1g/L-约6.1g/L,约5.2g/L-约16.0g/L,约5.2g/L-约15.8g/L,约5.2g/L-约15.6g/L,约5.2g/L-约15.4g/L,约5.2g/L-约15.2g/L,约5.2g/L-约15.0g/L,约5.2g/L-约14.8g/L,约5.2g/L-约14.6g/L,约5.2g/L-约14.4g/L,约5.2g/L-约14.2g/L,约5.2g/L-约14.0g/L,约5.2g/L-约13.8g/L,约5.2g/L-约13.6g/L,约5.2g/L-约13.4g/L,约5.2g/L-约13.2g/L,约5.2g/L-约13.0g/L,约5.2g/L-约12.8g/L,约5.2g/L-约12.6g/L,约5.2g/L-约12.4g/L,约5.2g/L-约12.2g/L,约5.2g/L-约12.0g/L,约5.2g/L-约11.8g/L,约5.2g/L-约11.6g/L,约5.2g/L-约11.4g/L,约5.2g/L-约11.2g/L,约5.2g/L-约11.0g/L,约5.2g/L-约10.8g/L,约5.2g/L-约10.6g/L,约5.2g/L-约10.4g/L,约5.2g/L-约10.2g/L,约5.2g/L-约10.0g/L,约5.2g/L-约9.8g/L,约5.2g/L-约9.6g/L,约5.2g/L-约9.4g/L,约5.2g/L-约9.2g/L,约5.2g/L-约9.0g/L,约5.2g/L-约8.8g/L,约5.2g/L-约8.6g/L,约5.2g/L-约8.4g/L,约5.2g/L-约8.2g/L,约5.2g/L-约8.0g/L,约5.2g/L-约7.8g/L,约5.2g/L-约7.6g/L,约5.2g/L-约7.4g/L,约5.2g/L-约7.2g/L,约5.2g/L-约7.0g/L,约5.2g/L-约6.9g/L,约5.2g/L-约6.8g/L,约5.2g/L-约6.6g/L,约5.2g/L-约6.4g/L,约5.2g/L-约6.2g/L,约5.4g/L-约16.0g/L,约5.4g/L-约15.8g/L,约5.4g/L-约15.6g/L,约5.4g/L-约15.4g/L,约5.4g/L-约15.2g/L,约5.4g/L-约15.0g/L,约5.4g/L-约14.8g/L,约5.4g/L-约14.6g/L,约5.4g/L-约14.4g/L,约5.4g/L-约14.2g/L,约5.4g/L-约14.0g/L,约5.4g/L-约13.8g/L,约5.4g/L-约13.6g/L,约5.4g/L-约13.4g/L,约5.4g/L-约13.2g/L,约5.4g/L-约13.0g/L,约5.4g/L-约12.8g/L,约5.4g/L-约12.6g/L,约5.4g/L-约12.4g/L,约5.4g/L-约12.2g/L,约5.4g/L-约12.0g/L,约5.4g/L-约11.8g/L,约5.4g/L-约11.6g/L,约5.4g/L-约11.4g/L,约5.4g/L-约11.2g/L,约5.4g/L-约11.0g/L,约5.4g/L-约10.8g/L,约5.4g/L-约10.6g/L,约5.4g/L-约10.4g/L,约5.4g/L-约10.2g/L,约5.4g/L-约10.0g/L,约5.4g/L-约9.8g/L,约5.4g/L-约9.6g/L,约5.4g/L-约9.4g/L,约5.4g/L-约9.2g/L,约5.4g/L-约9.0g/L,约5.4g/L-约8.8g/L,约5.4g/L-约8.6g/L,约5.4g/L-约8.4g/L,约5.4g/L-约8.2g/L,约5.4g/L-约8.0g/L,约5.4g/L-约7.8g/L,约5.4g/L-约7.6g/L,约5.4g/L-约7.4g/L,约5.4g/L-约7.2g/L,约5.4g/L-约7.0g/L,约5.4g/L-约6.9g/L,约5.4g/L-约6.8g/L,约5.4g/L-约6.6g/L,约5.4g/L-约6.4g/L,约5.6g/L-约16.0g/L,约5.6g/L-约15.8g/L,约5.6g/L-约15.6g/L,约5.6g/L-约15.4g/L,约5.6g/L-约15.2g/L,约5.6g/L-约15.0g/L,约5.6g/L-约14.8g/L,约5.6g/L-约14.6g/L,约5.6g/L-约14.4g/L,约5.6g/L-约14.2g/L,约5.6g/L-约14.0g/L,约5.6g/L-约13.8g/L,约5.6g/L-约13.6g/L,约5.6g/L-约13.4g/L,约5.6g/L-约13.2g/L,约5.6g/L-约13.0g/L,约5.6g/L-约12.8g/L,约5.6g/L-约12.6g/L,约5.6g/L-约12.4g/L,约5.6g/L-约12.2g/L,约5.6g/L-约12.0g/L,约5.6g/L-约11.8g/L,约5.6g/L-约11.6g/L,约5.6g/L-约11.4g/L,约5.6g/L-约11.2g/L,约5.6g/L-约11.0g/L,约5.6g/L-约10.8g/L,约5.6g/L-约10.6g/L,约5.6g/L-约10.4g/L,约5.6g/L-约10.2g/L,约5.6g/L-约10.0g/L,约

15.6g/L,约6.4g/L-约15.4g/L,约6.4g/L-约15.2g/L,约6.4g/L-约15.0g/L,约6.4g/L-约14.8g/L,约6.4g/L-约14.6g/L,约6.4g/L-约14.4g/L,约6.4g/L-约14.2g/L,约6.4g/L-约14.0g/L,约6.4g/L-约13.8g/L,约6.4g/L-约13.6g/L,约6.4g/L-约13.4g/L,约6.4g/L-约13.2g/L,约6.4g/L-约13.0g/L,约6.4g/L-约12.8g/L,约6.4g/L-约12.6g/L,约6.4g/L-约12.4g/L,约6.4g/L-约12.2g/L,约6.4g/L-约12.0g/L,约6.4g/L-约11.8g/L,约6.4g/L-约11.6g/L,约6.4g/L-约11.4g/L,约6.4g/L-约11.2g/L,约6.4g/L-约11.0g/L,约6.4g/L-约10.8g/L,约6.4g/L-约10.6g/L.约6.4g/L-约10.4g/L,约6.4g/L-约10.2g/L,约6.4g/L-约10.0g/L,约6.4g/L-约9.8g/L,约6.4g/L-约9.6g/L,约6.4g/L-约9.4g/L,约6.4g/L-约9.2g/L,约6.4g/L-约9.0g/L,约6.4g/L-约8.8g/L,约6.4g/L-约8.6g/L,约6.4g/L-约8.4g/L,约6.4g/L-约8.2g/L,约6.4g/L-约8.0g/L,约6.4g/L-约7.8g/L,约6.4g/L-约7.6g/L,约6.4g/L-约7.4g/L,约6.6g/L-约16.0g/L,约6.6g/L-约15.8g/L,约6.6g/L-约15.6g/L,约6.6g/L-约15.4g/L,约6.6g/L-约15.2g/L,约6.6g/L-约15.0g/L,约6.6g/L-约14.8g/L,约6.6g/L-约14.6g/L,约6.6g/L-约14.4g/L,约6.6g/L-约14.2g/L,约6.6g/L-约14.0g/L,约6.6g/L-约13.8g/L,约6.6g/L-约13.6g/L,约6.6g/L-约13.4g/L,约6.6g/L-约13.2g/L,约6.6g/L-约13.0g/L,约6.6g/L-约12.8g/L,约6.6g/L-约12.6g/L,约6.6g/L-约12.4g/L,约6.6g/L-约12.2g/L,约6.6g/L-约12.0g/L,约6.6g/L-约11.8g/L,约6.6g/L-约11.6g/L,约6.6g/L-约11.4g/L,约6.6g/L-约11.2g/L,约6.6g/L-约11.0g/L,约6.6g/L-约10.8g/L,约6.6g/L-约10.6g/L.约6.6g/L-约10.4g/L,约6.6g/L-约10.2g/L,约6.6g/L-约10.0g/L,约6.6g/L-约9.8g/L,约6.6g/L-约9.6g/L,约6.6g/L-约9.4g/L,约6.6g/L-约9.2g/L,约6.6g/L-约9.0g/L,约6.6g/L-约8.8g/L,约6.6g/L-约8.6g/L,约6.6g/L-约8.4g/L,约6.6g/L-约8.2g/L,约6.6g/L-约8.0g/L,约6.6g/L-约7.8g/L,约6.6g/L-约7.6g/L,约6.8g/L-约16.0g/L,约6.8g/L-约15.8g/L,约6.8g/L-约15.6g/L,约6.8g/L-约15.4g/L,约6.8g/L-约15.2g/L,约6.8g/L-约15.0g/L,约6.8g/L-约14.8g/L,约6.8g/L-约14.6g/L,约6.8g/L-约14.4g/L,约6.8g/L-约14.2g/L,约6.8g/L-约14.0g/L,约6.8g/L-约13.8g/L,约6.8g/L-约13.6g/L,约6.8g/L-约13.4g/L,约6.8g/L-约13.2g/L,约6.8g/L-约13.0g/L,约6.8g/L-约12.8g/L,约6.8g/L-约12.6g/L,约6.8g/L-约12.4g/L,约6.8g/L-约12.2g/L,约6.8g/L-约12.0g/L,约6.8g/L-约11.8g/L,约6.8g/L-约11.6g/L,约6.8g/L-约11.4g/L,约6.8g/L-约11.2g/L,约6.8g/L-约11.0g/L,约6.8g/L-约10.8g/L,约6.8g/L-约10.6g/L.约6.8g/L-约10.4g/L,约6.8g/L-约10.2g/L,约6.8g/L-约10.0g/L,约6.8g/L-约9.8g/L,约6.8g/L-约9.6g/L,约6.8g/L-约9.4g/L,约6.8g/L-约9.2g/L,约6.8g/L-约9.0g/L,约6.8g/L-约8.8g/L,约6.8g/L-约8.6g/L,约6.8g/L-约8.4g/L,约6.8g/L-约8.2g/L,约6.8g/L-约8.0g/L,约6.8g/L-约7.8g/L,约7.0g/L-约16.0g/L,约7.0g/L-约15.8g/L,约7.0g/L-约15.6g/L,约7.0g/L-约15.4g/L,约7.0g/L-约15.2g/L,约7.0g/L-约15.0g/L,约7.0g/L-约14.8g/L,约7.0g/L-约14.6g/L,约7.0g/L-约14.4g/L,约7.0g/L-约14.2g/L,约7.0g/L-约14.0g/L,约7.0g/L-约13.8g/L,约7.0g/L-约13.6g/L,约7.0g/L-约13.4g/L,约7.0g/L-约13.2g/L,约7.0g/L-约13.0g/L,约7.0g/L-约12.8g/L,约7.0g/L-约12.6g/L,约7.0g/L-约12.4g/L,约7.0g/L-约12.2g/L,约7.0g/L-约12.0g/L,约7.0g/L-约11.8g/L,约7.0g/L-约11.6g/L,约7.0g/L-约11.4g/L,约7.0g/L-约11.2g/L,约7.0g/L-约11.0g/L,约7.0g/L-约10.8g/L,约7.0g/L-约10.6g/L.约7.0g/L-约10.4g/L,约7.0g/L-约10.2g/L,约7.0g/L-约10.0g/L,约

10.0g/L,约7.8g/L-约9.8g/L,约7.8g/L-约9.6g/L,约7.8g/L-约9.4g/L,约7.8g/L-约9.2g/L,约7.8g/L-约9.0g/L,约7.8g/L-约8.8g/L,约8.0g/L-约16.0g/L,约8.0g/L-约15.8g/L,约8.0g/L-约15.6g/L,约8.0g/L-约15.4g/L,约8.0g/L-约15.2g/L,约8.0g/L-约15.0g/L,约8.0g/L-约14.8g/L,约8.0g/L-约14.6g/L,约8.0g/L-约14.4g/L,约8.0g/L-约14.2g/L,约8.0g/L-约14.0g/L,约8.0g/L-约13.8g/L,约8.0g/L-约13.6g/L,约8.0g/L-约13.4g/L,约8.0g/L-约13.2g/L,约8.0g/L-约13.0g/L,约8.0g/L-约12.8g/L,约8.0g/L-约12.6g/L,约8.0g/L-约12.4g/L,约8.0g/L-约12.2g/L,约8.0g/L-约12.0g/L,约8.0g/L-约11.8g/L,约8.0g/L-约11.6g/L,约8.0g/L-约11.4g/L,约8.0g/L-约11.2g/L,约8.0g/L-约11.0g/L,约8.0g/L-约10.8g/L,约8.0g/L-约10.6g/L,约8.0g/L-约10.4g/L,约8.0g/L-约10.2g/L,约8.0g/L-约10.0g/L,约8.0g/L-约9.8g/L,约8.0g/L-约9.6g/L,约8.0g/L-约9.4g/L,约8.0g/L-约9.2g/L,约8.0g/L-约9.0g/L,约8.5g/L-约16.0g/L,约8.5g/L-约15.5g/L,约8.5g/L-约15.0g/L,约8.5g/L-约14.5g/L,约8.5g/L-约14.0g/L,约8.5g/L-约13.5g/L,约8.5g/L-约13.0g/L,约8.5g/L-约12.5g/L,约8.5g/L-约12.0g/L,约8.5g/L-约11.5g/L,约8.5g/L-约11.0g/L,约8.5g/L-约10.5g/L,约8.5g/L-约10.0g/L,约8.5g/L-约9.5g/L,约9.0g/L-约16.0g/L,约9.0g/L-约15.5g/L,约9.0g/L-约15.0g/L,约9.0g/L-约14.5g/L,约9.0g/L-约14.0g/L,约9.0g/L-约13.5g/L,约9.0g/L-约13.0g/L,约9.0g/L-约12.5g/L,约9.0g/L-约12.0g/L,约9.0g/L-约11.5g/L,约9.0g/L-约11.0g/L,约9.0g/L-约10.5g/L,约9.0g/L-约10.0g/L,约9.5g/L-约16.0g/L,约9.5g/L-约15.5g/L,约9.5g/L-约15.0g/L,约9.5g/L-约14.5g/L,约9.5g/L-约14.0g/L,约9.5g/L-约13.5g/L,约9.5g/L-约13.0g/L,约9.5g/L-约12.5g/L,约9.5g/L-约12.0g/L,约9.5g/L-约11.5g/L,约9.5g/L-约11.0g/L,约9.5g/L-约10.5g/L,约10.0g/L-约16.0g/L,约10.0g/L-约15.5g/L,约10.0g/L-约15.0g/L,约10.0g/L-约14.5g/L,约10.0g/L-约14.0g/L,约10.0g/L-约13.5g/L,约10.0g/L-约13.0g/L,约10.0g/L-约12.5g/L,约10.0g/L-约12.0g/L,约10.0g/L-约11.5g/L,约10.0g/L-约11.0g/L,约10.5g/L-约16.0g/L,约10.5g/L-约15.5g/L,约10.5g/L-约15.0g/L,约10.5g/L-约14.5g/L,约10.5g/L-约14.0g/L,约10.5g/L-约13.5g/L,约10.5g/L-约13.0g/L,约10.5g/L-约12.5g/L,约10.5g/L-约12.0g/L,约10.5g/L-约11.5g/L,约11.0g/L-约16.0g/L,约11.0g/L-约15.5g/L,约11.0g/L-约15.0g/L,约11.0g/L-约14.5g/L,约11.0g/L-约14.0g/L,约11.0g/L-约13.5g/L,约11.0g/L-约13.0g/L,约11.0g/L-约12.5g/L,约11.0g/L-约12.0g/L,约11.5g/L-约16.0g/L,约11.5g/L-约15.5g/L,约11.5g/L-约15.0g/L,约11.5g/L-约14.5g/L,约11.5g/L-约14.0g/L,约11.5g/L-约13.5g/L,约11.5g/L-约13.0g/L,约11.5g/L-约12.5g/L,约12.0g/L-约16.0g/L,约12.0g/L-约15.5g/L,约12.0g/L-约15.0g/L,约12.0g/L-约14.5g/L,约12.0g/L-约14.0g/L,约12.0g/L-约13.5g/L,约12.0g/L-约13.0g/L,约12.5g/L-约16.0g/L,约12.5g/L-约15.5g/L,约12.5g/L-约15.0g/L,约12.5g/L-约14.5g/L,约12.5g/L-约14.0g/L,约12.5g/L-约13.5g/L,约13.0g/L-约16.0g/L,约13.0g/L-约15.5g/L,约13.0g/L-约15.0g/L,约13.0g/L-约14.5g/L,约13.0g/L-约14.0g/L,约13.5g/L-约16.0g/L,约13.5g/L-约15.5g/L,约13.5g/L-约15.0g/L,约13.5g/L-约14.5g/L,约14.0g/L-约16.0g/L,约14.0g/L-约15.5g/L,约14.0g/L-约15.0g/L,约14.5g/L-约16.0g/L,约14.5g/L-约15.5g/L,或约15.0g/L-约16.0g/L)的泊洛沙姆-188。

[0110] 在一些实施方案中,在培养步骤前使泊洛沙姆-188存在于培养基中和/或将泊洛沙姆-188添加至所述培养基和/或在培养步骤过程中将泊洛沙姆-188添加至所述培养基。例如,本申请提供的方法可进一步包括在培养步骤前和/或在培养步骤过程中添加泊洛沙姆-188以在所述培养基中提供1.8g/L或更高的浓度(例如,本申请所述的任何例示的泊洛沙姆-188浓度或泊洛沙姆-188的范围)。在一些实例中,将另外的泊洛沙姆-188添加至包含一些泊洛沙姆-188的液体培养基以提供1.8g/L或更高泊洛沙姆-188的浓度(例如,本申请所述的任何例示的泊洛沙姆-188浓度或泊洛沙姆-188的范围)。例如,在培养步骤前和/或在培养步骤过程中可将泊洛沙姆-188添加至第一液体培养基、第二液体培养基、和/或补料液体培养基。

[0111] 在一些实例中,在培养步骤过程中将泊洛沙姆-188以一个或多个(例如,两个、三个、四个或五个)等分试样添加至培养基。可以连续的方式将泊洛沙姆-188添加至培养基。在一些实例中,第一液体培养基可含有泊洛沙姆-188,并且在培养期过程中将另外的泊洛沙姆-188添加至培养基。在一些实施方案中,泊洛沙姆-188存在于培养基中。

[0112] 当培养步骤包括灌注培养时,第二液体培养基可以高于第一液体培养基中的浓度包含泊洛沙姆-188。例如,第一液体培养基可包含浓度为1.8g/L或浓度小于1.8g/L的泊洛沙姆-188,而第二液体培养基包含浓度高于1.8g/L的泊洛沙姆-188(例如,本申请所述的任何泊洛沙姆-188的浓度或范围,例如,浓度高于1.9g/L,浓度高于2.0g/L,浓度高于2.1g/L,浓度高于2.2g/L,浓度高于2.3g/L,浓度高于2.4g/L,浓度高于2.5g/L,浓度高于2.6g/L,浓度高于2.7g/L,浓度高于2.8g/L,浓度高于2.9g/L,浓度高于3.0g/L,浓度高于3.1g/L,浓度高于3.2g/L,浓度高于3.3g/L,浓度高于3.4g/L,浓度高于3.5g/L,浓度高于3.6g/L,浓度高于3.7g/L,浓度高于3.8g/L,浓度高于3.9g/L,浓度高于4.0g/L,浓度高于4.1g/L,浓度高于4.2g/L,浓度高于4.3g/L,浓度高于4.4g/L,浓度高于4.5g/L,浓度高于4.6g/L,浓度高于4.7g/L,浓度高于4.8g/L,浓度高于4.9g/L,浓度高于5.0g/L,浓度高于5.1g/L,浓度高于5.2g/L,浓度高于5.3g/L,浓度高于5.4g/L,浓度高于5.5g/L,浓度高于5.6g/L,浓度高于5.7g/L,浓度高于5.8g/L,浓度高于5.9g/L,浓度高于6.0g/L,浓度高于6.1g/L,浓度高于6.2g/L,浓度高于6.3g/L,浓度高于6.4g/L,浓度高于6.5g/L,浓度高于6.6g/L,浓度高于6.7g/L,浓度高于6.8g/L,浓度高于6.9g/L,浓度高于7.0g/L,浓度高于7.1g/L,浓度高于7.2g/L,浓度高于7.3g/L,浓度高于7.4g/L,浓度高于7.5g/L,浓度高于7.6g/L,浓度高于7.7g/L,浓度高于7.8g/L,浓度高于7.9g/L,浓度高于8.0g/L,浓度高于8.1g/L,浓度高于8.2g/L,浓度高于8.3g/L,浓度高于8.4g/L,浓度高于8.5g/L,浓度高于8.6g/L,浓度高于8.7g/L,浓度高于8.8g/L,浓度高于8.9g/L,浓度高于9.0g/L,浓度高于9.1g/L,浓度高于9.2g/L,浓度高于9.3g/L,浓度高于9.4g/L,浓度高于9.5g/L,浓度高于9.6g/L,浓度高于9.7g/L,浓度高于9.8g/L,浓度高于9.9g/L,浓度高于10.0g/L,浓度高于10.1g/L,浓度高于10.2g/L,浓度高于10.3g/L,浓度高于10.4g/L,浓度高于10.5g/L,浓度高于10.6g/L,浓度高于10.7g/L,浓度高于10.8g/L,浓度高于10.9g/L,浓度高于11.0g/L,浓度高于11.1g/L,浓度高于11.2g/L,浓度高于11.3g/L,浓度高于11.4g/L,浓度高于11.5g/L,浓度高于11.6g/L,浓度高于11.7g/L,浓度高于11.8g/L,浓度高于11.9g/L,浓度高于12.0g/L,浓度高于12.1g/L,浓度高于12.2g/L,浓度高于12.3g/L,浓度高于12.4g/L,浓度高于12.5g/L,浓度高于12.6g/L,浓度高于12.7g/L,浓度高于12.8g/L,浓度高于12.9g/L,浓度高于

13.0g/L,浓度高于13.1g/L,浓度高于13.2g/L,浓度高于13.3g/L,浓度高于13.4g/L,浓度高于13.5g/L,浓度高于13.6g/L,浓度高于13.7g/L,浓度高于13.8g/L,浓度高于13.9g/L,浓度高于14.0g/L,浓度高于14.1g/L,浓度高于14.2g/L,浓度高于14.3g/L,浓度高于14.4g/L,浓度高于14.5g/L,浓度高于14.6g/L,浓度高于14.7g/L,浓度高于14.8g/L,浓度高于14.9g/L,浓度高于15.0g/L,浓度高于15.1g/L,浓度高于15.2g/L,浓度高于15.3g/L,浓度高于15.4g/L,浓度高于15.5g/L,浓度高于15.6g/L,浓度高于15.7g/L,浓度高于15.8g/L,浓度高于15.9g/L,或浓度高于16.0g/L泊洛沙姆-188)。

[0113] 当培养步骤包括补料分批培养时,补料液体培养基可以高于第一液体培养基中的浓度包含泊洛沙姆-188。例如,第一液体培养基可包括浓度为1.8g/L或浓度小于1.8g/L的泊洛沙姆-188,而补料液体培养基包含浓度高于1.8g/L(例如,浓度高于2.0g/L,浓度高于2.5g/L,浓度高于3.0g/L,浓度高于3.5g/L,浓度高于4.0g/L,浓度高于4.5g/L,浓度高于5.0g/L,浓度高于5.5g/L,浓度高于6.0g/L,浓度高于6.5g/L,浓度高于7.0g/L,浓度高于7.5g/L,浓度高于8.0g/L,浓度高于8.5g/L,浓度高于9.0g/L,浓度高于9.5g/L,浓度高于10g/L,浓度高于10.5g/L,浓度高于11.0g/L,浓度高于11.5g/L,浓度高于12.0g/L,浓度高于12.5g/L,浓度高于13.0g/L,浓度高于13.5g/L,浓度高于14.0g/L,浓度高于14.5g/L,浓度高于15.0g/L,浓度高于15.5g/L,浓度高于16.0g/L,浓度高于16.5g/L,浓度高于17.0g/L,浓度高于17.5g/L,浓度高于18.0g/L,浓度高于18.5g/L,浓度高于19.0g/L,浓度高于19.5g/L,浓度高于20.0g/L,浓度高于20.5g/L,浓度高于21.0g/L,浓度高于21.5g/L,浓度高于22.0g/L,浓度高于22.5g/L,浓度高于23.0g/L,浓度高于23.5g/L,浓度高于24.0g/L,浓度高于24.5g/L,浓度高于25.0g/L,浓度高于25.5g/L,浓度高于26.0g/L,浓度高于26.5g/L,浓度高于27.0g/L,浓度高于28.0g/L,浓度高于28.5g/L,浓度高于29.0g/L,浓度高于29.5g/L,浓度高于30.0g/L,浓度高于30.5g/L,浓度高于31.0g/L,浓度高于31.5g/L,浓度高于32.0g/L,浓度高于32.5g/L,浓度高于33.0g/L,浓度高于33.5g/L,浓度高于34.0g/L,浓度高于34.5g/L,浓度高于35.0g/L,浓度高于35.5g/L,浓度高于36.0g/L,浓度高于36.5g/L,浓度高于37.0g/L,浓度高于37.5g/L,浓度高于38.0g/L,浓度高于38.5g/L,浓度高于39.0g/L,浓度高于39.5g/L,或浓度高于40.0g/L)的泊洛沙姆-188。

[0114] 本申请提供的任何方法的一些实施方案包括随时间增加培养物中的泊洛沙姆-188浓度。在一些实施方案中,培养基包含泊洛沙姆-188浓度,其基于选自下组的一个或多个因素选择:孔径、孔类型、气体流速、培养基中的活细胞密度和涉及细胞应激的标志物。在这些方法中,培养基中选择的泊洛沙姆-188浓度可通过如下实现:在培养步骤之前将泊洛沙姆-188添加至所述培养基和/或在培养步骤过程中将泊洛沙姆-188添加至所述培养基。选择的泊洛沙姆-188浓度可为本申请所述的任何例示的泊洛沙姆-188的浓度或范围。

[0115] 基于一个或多个因素选择泊洛沙姆-188的浓度

[0116] 本申请所述方法的一些实施方案包括在包含泊洛沙姆-188浓度的液体培养基中培养哺乳动物细胞,所述泊洛沙姆-188浓度基于选自下组的一个或多个因素选择:孔径、孔类型、气体流速、培养基中的活细胞密度和涉及细胞应激的标志物。

[0117] 孔类型的不同实例是本领域中已知的。孔类型的非限制性实例是烧结孔和钻孔。

[0118] 适于细胞培养的多种气体流速是本领域中已知的。通常,较高的气体流速指示应选择(相比于使用较低气体流速的培养步骤)更高的泊洛沙姆-188浓度,而较低的气体流速

指示应选择(相比于使用较高气体流速的培养步骤)更低的泊洛沙姆-188浓度。

[0119] 多种非限制性活细胞密度在本申请描述。通常,较高的活细胞密度指示应选择(相比于包含较低活细胞密度的培养基)更高的泊洛沙姆-188浓度,而较低的活细胞密度指示应选择(相比于包含较高活细胞密度的培养基)更低的泊洛沙姆-188浓度。

[0120] 由细胞在生理应激下释放的例示性细胞应激的标志物包括蛋白酶(例如,活化的胱天蛋白酶(caspase))、乳酸脱氢酶、基因组DNA(例如,核小体DNA)、细胞色素c、和活化的PARP。在受生理应激下的细胞中产生或具有升高水平的涉及细胞应激的标志物的非限制性实例包括活化的胱天蛋白酶、细胞色素c、活化的PARP、和外部化磷脂酰丝氨酸(externalized phosphatidylserine)。任何这些细胞应激的标志物中的一种或多种(例如,两种、三种、四种、五种、六种或七种)相比于对照值的水平升高指示应选择更高的泊洛沙姆-188浓度。一种或多种细胞应激的标志物的水平相比于对照值与对照值大约相同或低于对照值指示应选择更低的泊洛沙姆-188浓度。在本申请所述的任何实例中,对照水平可为不经历凋亡或不在会触发坏死的条件下培养的对照细胞中的水平。检测一种或多种细胞应激的标志物的水平的方法是本领域已知的。商业上可得到的试剂盒可用于测量所述一种或多种细胞应激的标志物。

[0121] 在本申请所述的任何实施方案中,选择的泊洛沙姆-188浓度是通过如下实现的:在培养步骤之前将泊洛沙姆-188添加至所述培养基和/或在培养步骤过程中将泊洛沙姆-188添加至所述培养基。在一些实施方案中,所述方法包括当孔类型为钻孔且孔径为约750 μ m-约1.5mm(例如,约750 μ m至约1.45mm,约750 μ m-约1.40mm,约750 μ m-约1.35mm,约750 μ m-约1.30mm,约750 μ m-约1.25mm,约750 μ m-约1.20mm,约750 μ m-约1.15mm,约750 μ m-约1.10mm,约750 μ m-约1.05mm,约750 μ m-约1.00mm,约750 μ m-约950 μ m,约750 μ m-约900 μ m,约750 μ m-约850 μ m,约750 μ m-约800 μ m,约800 μ m-约1.5mm,约800 μ m-约1.45mm,约800 μ m-约1.40mm,约800 μ m-约1.35mm,约800 μ m-约1.30mm,约800 μ m-约1.25mm,约800 μ m-约1.20mm,约800 μ m-约1.15mm,约800 μ m-约1.10mm,约800 μ m-约1.05mm,约800 μ m-约1.00mm,约800 μ m-约950 μ m,约800 μ m-约900 μ m,约800 μ m-约850 μ m,约850 μ m-约1.5mm,约850 μ m-约1.45mm,约850 μ m-约1.40mm,约850 μ m-约1.35mm,约850 μ m-约1.30mm,约850 μ m-约1.25mm,约850 μ m-约1.20mm,约850 μ m-约1.15mm,约850 μ m-约1.10mm,约850 μ m-约1.05mm,约850 μ m-约1.00mm,约850 μ m-约950 μ m,约850 μ m-约900 μ m,约900 μ m-约1.5mm,约900 μ m-约1.45mm,约900 μ m-约1.40mm,约900 μ m-约1.35mm,约900 μ m-约1.30mm,约900 μ m-约1.25mm,约900 μ m-约1.20mm,约900 μ m-约1.15mm,约900 μ m-约1.10mm,约900 μ m-约1.05mm,约900 μ m-约1.00mm,约900 μ m-约950 μ m,约950 μ m-约1.5mm,约950 μ m-约1.45mm,约950 μ m-约1.40mm,约950 μ m-约1.35mm,约950 μ m-约1.30mm,约950 μ m-约1.25mm,约950 μ m-约1.20mm,约950 μ m-约1.15mm,约950 μ m-约1.10mm,约950 μ m-约1.05mm,约950 μ m-约1.00mm,约1.0mm-约1.5mm,约1.0mm-约1.45mm,约1.0mm-约1.40mm,约1.0mm-约1.35mm,约1.0mm-约1.30mm,约1.0mm-约1.25mm,约1.0mm-约1.20mm,约1.0mm-约1.15mm,约1.0mm-约1.10mm,约1.0mm-约1.05mm,约1.05mm-约1.5mm,约1.05mm-约1.45mm,约1.05mm-约1.40mm,约1.05mm-约1.35mm,约1.05mm-约1.30mm,约1.05mm-约1.25mm,约1.05mm-约1.20mm,约1.05mm-约1.15mm,约1.05mm-约1.10mm,约1.10mm-约1.5mm,约1.10mm-约1.45mm,约1.10mm-约1.40mm,约1.10mm-约1.35mm,约1.10mm-约1.30mm,约1.10mm-约1.25mm,约1.10mm-约1.20mm,约1.10mm-约1.15mm,约1.15mm-约1.5mm,约

1.15mm-约1.45mm, 约1.15mm-约1.40mm, 约1.15mm-约1.35mm, 约1.15mm-约1.30mm, 约1.15mm-约1.25mm, 约1.15mm-约1.20mm, 约1.20mm-约1.5mm, 约1.20mm-约1.45mm, 约1.20mm-约1.40mm, 约1.20mm-约1.35mm, 约1.20mm-约1.30mm, 约1.20mm-约1.25mm, 约1.25mm-约1.5mm, 约1.25mm-约1.45mm, 约1.25mm-约1.40mm, 约1.25mm-约1.35mm, 约1.25mm-约1.30mm, 约1.30mm-约1.5mm, 约1.30mm-约1.45mm, 约1.30mm-约1.40mm, 约1.30mm-约1.35mm, 约1.35mm-约1.5mm, 约1.35mm-约1.45mm, 约1.35mm-约1.40mm, 约1.40mm-约1.5mm, 约1.40mm-约1.45mm, 或约1.45mm-约1.50) 时, 基于孔类型和孔径选择约2.3g/L-约3.3g/L (例如, 约2.3g/L-约3.2g/L, 约2.3g/L-约3.1g/L, 约2.3g/L-约3.0g/L, 约2.3g/L-约2.9g/L, 约2.3g/L-约2.8g/L, 约2.3g/L-约2.7g/L, 约2.3g/L-约2.6g/L, 约2.3g/L-约2.5g/L, 约2.4g/L-约3.3g/L, 约2.4g/L-约3.2g/L, 约2.4g/L-约3.1g/L, 约2.4g/L-约3.0g/L, 约2.4g/L-约2.9g/L, 约2.4g/L-约2.8g/L, 约2.4g/L-约2.7g/L, 约2.4g/L-约2.6g/L, 约2.5g/L-约3.3g/L, 约2.5g/L-约3.2g/L, 约2.5g/L-约3.1g/L, 约2.5g/L-约3.0g/L, 约2.5g/L-约2.9g/L, 约2.5g/L-约2.8g/L, 约2.5g/L-约2.7g/L, 约2.6g/L-约3.3g/L, 约2.6g/L-约3.2g/L, 约2.6g/L-约3.1g/L, 约2.6g/L-约3.0g/L, 约2.6g/L-约2.9g/L, 约2.6g/L-约2.8g/L, 约2.7g/L-约3.3g/L, 约2.7g/L-约3.2g/L, 约2.7g/L-约3.1g/L, 约2.7g/L-约3.0g/L, 约2.7g/L-约2.9g/L, 约2.8g/L-约3.3g/L, 约2.8g/L-约3.2g/L, 约2.8g/L-约3.1g/L, 约2.8g/L-约3.0g/L, 约2.9g/L-约3.3g/L, 约2.9g/L-约3.2g/L, 约2.9g/L-约3.1g/L, 约3.0g/L-约3.3g/L, 约3.0g/L-约3.2g/L, 或约3.1g/L-约3.3g/L) 的泊洛沙姆-188浓度。

[0122] 在一些实施方案中, 所述方法包括当孔类型是钻孔且孔径为约250 μ m-约750 μ m (例如, 约250 μ m-约700 μ m, 约250 μ m-约650 μ m, 约250 μ m-约600 μ m, 约250 μ m-约550 μ m, 约250 μ m-约500 μ m, 约250 μ m-约450 μ m, 约250 μ m-约400 μ m, 约250 μ m-约350 μ m, 约250 μ m-约300 μ m, 约300 μ m-约750 μ m, 约300 μ m-约700 μ m, 约300 μ m-约650 μ m, 约300 μ m-约600 μ m, 约300 μ m-约550 μ m, 约300 μ m-约500 μ m, 约300 μ m-约450 μ m, 约300 μ m-约400 μ m, 约300 μ m-约350 μ m, 约350 μ m-约750 μ m, 约350 μ m-约700 μ m, 约350 μ m-约650 μ m, 约350 μ m-约600 μ m, 约350 μ m-约550 μ m, 约350 μ m-约500 μ m, 约350 μ m-约450 μ m, 约350 μ m-约400 μ m, 约400 μ m-约750 μ m, 约400 μ m-约700 μ m, 约400 μ m-约650 μ m, 约400 μ m-约600 μ m, 约400 μ m-约550 μ m, 约400 μ m-约500 μ m, 约400 μ m-约450 μ m, 约450 μ m-约750 μ m, 约450 μ m-约700 μ m, 约450 μ m-约650 μ m, 约450 μ m-约600 μ m, 约450 μ m-约550 μ m, 约450 μ m-约500 μ m, 约500 μ m-约750 μ m, 约500 μ m-约700 μ m, 约500 μ m-约650 μ m, 约500 μ m-约600 μ m, 约500 μ m-约550 μ m, 约550 μ m-约750 μ m, 约550 μ m-约700 μ m, 约550 μ m-约650 μ m, 约550 μ m-约600 μ m, 约600 μ m-约750 μ m, 约600 μ m-约700 μ m, 约600 μ m-约650 μ m, 约650 μ m-约750 μ m, 约650 μ m-约700 μ m, 或约700 μ m和750 μ m) 时, 基于孔类型和孔径选择约3.3g/L-约4.3g/L (例如, 约3.3g/L-约4.2g/L, 约3.3g/L-约4.1g/L, 约3.3g/L-约4.0g/L, 约3.3g/L-约3.9g/L, 约3.3g/L-约3.8g/L, 约3.3g/L-约3.7g/L, 约3.3g/L-约3.6g/L, 约3.3g/L-约3.5g/L, 约3.4g/L-约4.3g/L, 约3.4g/L-约4.2g/L, 约3.4g/L-约4.1g/L, 约3.4g/L-约4.0g/L, 约3.4g/L-约3.9g/L, 约3.4g/L-约3.8g/L, 约3.4g/L-约3.7g/L, 约3.4g/L-约3.6g/L, 约3.5g/L-约4.3g/L, 约3.5g/L-约4.2g/L, 约3.5g/L-约4.1g/L, 约3.5g/L-约4.0g/L, 约3.5g/L-约3.9g/L, 约3.5g/L-约3.8g/L, 约3.5g/L-约3.7g/L, 约3.6g/L-约4.3g/L, 约3.6g/L-约4.2g/L, 约3.6g/L-约4.1g/L, 约3.6g/L-约4.0g/L, 约3.6g/L-约3.9g/L, 约3.6g/L-约3.8g/L, 约3.7g/L-约4.3g/L, 约3.7g/L-约4.2g/L, 约3.7g/L-约4.1g/L, 约3.7g/L-约4.0g/L, 约3.7g/L-约3.9g/L)

L,约3.8g/L-约4.3g/L,约3.8g/L-约4.2g/L,约3.8g/L-约4.1g/L,约3.8g/L-约4.0g/L,约3.9g/L-约4.3g/L,约3.9g/L-约4.2g/L,约3.9g/L-约4.1g/L,约4.0g/L-约4.3g/L,约4.0g/L-约4.2g/L,或约4.1g/L-约4.3g/L)的泊洛沙姆-188浓度。

[0123] 所述方法可包括,例如,当孔类型是钻孔且孔径为约1 μ m-约250 μ m(例如,约1 μ m-约200 μ m,约1 μ m-约150 μ m,约1 μ m-约100 μ m,约1 μ m-约50 μ m,约1 μ m-约25 μ m,约10 μ m-约250 μ m,约10 μ m-约200 μ m,约10 μ m-约150 μ m,约10 μ m-约100 μ m,约10 μ m-约50 μ m,约10 μ m-约25 μ m,约25 μ m-约250 μ m,约25 μ m-约200 μ m,约25 μ m-约150 μ m,约25 μ m-约100 μ m,约25 μ m-约50 μ m,约50 μ m-约250 μ m,约50 μ m-约200 μ m,约50 μ m-约150 μ m,约50 μ m-约100 μ m,约100 μ m-约250 μ m,约100 μ m-约200 μ m,约100 μ m-约150 μ m,约150 μ m-约250 μ m,约150 μ m-约200 μ m,或者约200 μ m-约250 μ m)时,基于孔类型和孔径选择浓度高于约4.3g/L(例如,浓度高于约4.4g/L,浓度高于约4.5g/L,浓度高于约4.6g/L,浓度高于约4.7g/L,浓度高于约4.8g/L,浓度高于约4.9g/L,浓度高于约5.0g/L,浓度高于约5.1g/L,浓度高于约5.2g/L,浓度高于约5.3g/L,浓度高于约5.4g/L,浓度高于约5.5g/L,浓度高于约5.6g/L,浓度高于约5.7g/L,浓度高于约5.8g/L,浓度高于约5.9g/L,浓度高于约6.0g/L,浓度高于约6.1g/L,浓度高于约6.2g/L,浓度高于约6.3g/L,浓度高于约6.4g/L,浓度高于约6.5g/L,浓度高于约6.6g/L,浓度高于约6.7g/L,浓度高于约6.8g/L,浓度高于约6.9g/L,浓度高于约7.0g/L,浓度高于约7.1g/L,浓度高于约7.2g/L,浓度高于约7.3g/L,浓度高于约7.4g/L,浓度高于约7.5g/L,浓度高于约7.6g/L,浓度高于约7.7g/L,浓度高于约7.8g/L,浓度高于约7.9g/L,浓度高于约8.0g/L,浓度高于约8.1g/L,浓度高于约8.2g/L,浓度高于约8.2g/L,浓度高于约8.3g/L,浓度高于约8.4g/L,浓度高于约8.5g/L,浓度高于约8.6g/L,浓度高于约8.7g/L,浓度高于约8.8g/L,浓度高于约8.9g/L,浓度高于约9.0g/L,浓度高于约9.1g/L,浓度高于约9.2g/L,浓度高于约9.3g/L,浓度高于约9.4g/L,浓度高于约9.5g/L,浓度高于约9.6g/L,浓度高于约9.7g/L,浓度高于约9.8g/L,浓度高于约9.9g/L,或浓度高于约10.0g/L)的泊洛沙姆-188。

[0124] 在一些实例中,所述方法包括当孔类型是钻孔且孔径为约160 μ m-约190 μ m(例如,约160 μ m-约185 μ m,约160 μ m-约180 μ m,约160 μ m-约175 μ m,约160 μ m-约170 μ m,约160 μ m-约165 μ m,约165 μ m-约190 μ m,约165 μ m-约185 μ m,约165 μ m-约180 μ m,约165 μ m-约175 μ m,约165 μ m-约170 μ m,约170 μ m-约190 μ m,约170 μ m-约185 μ m,约170 μ m-约180 μ m,约170 μ m-约175 μ m,约175 μ m-约190 μ m,约175 μ m-约185 μ m,约175 μ m-约180 μ m,约180 μ m-约190 μ m,约180 μ m-约185 μ m,或约185 μ m-约190 μ m)时,基于孔类型和孔径选择浓度高于4.3g/L(例如,浓度高于约4.4g/L,浓度高于约4.5g/L,浓度高于约4.6g/L,浓度高于约4.7g/L,浓度高于约4.8g/L,浓度高于约4.9g/L,浓度高于约5.0g/L,浓度高于约5.1g/L,浓度高于约5.2g/L,浓度高于约5.3g/L,浓度高于约5.4g/L,浓度高于约5.5g/L,浓度高于约5.6g/L,浓度高于约5.7g/L,浓度高于约5.8g/L,浓度高于约5.9g/L,浓度高于约6.0g/L,浓度高于约6.1g/L,浓度高于约6.2g/L,浓度高于约6.3g/L,浓度高于约6.4g/L,浓度高于约6.5g/L,浓度高于约6.6g/L,浓度高于约6.7g/L,浓度高于约6.8g/L,浓度高于约6.9g/L,浓度高于约7.0g/L,浓度高于约7.1g/L,浓度高于约7.2g/L,浓度高于约7.3g/L,浓度高于约7.4g/L,浓度高于约7.5g/L,浓度高于约7.6g/L,浓度高于约7.7g/L,浓度高于约7.8g/L,浓度高于约7.9g/L,浓度高于约8.0g/L,浓度高于约8.1g/L,浓度高于约8.2g/L,浓度高于约8.2g/L,浓度高于约8.3g/L,浓度高于约8.4g/L,浓度高于约8.5g/L,浓度高于约8.6g/L,浓度高于约8.7g/L,浓度高于约8.8g/L,

浓度高于约8.9g/L,浓度高于约9.0g/L,浓度高于约9.1g/L,浓度高于约9.2g/L,浓度高于约9.3g/L,浓度高于约9.4g/L,浓度高于约9.5g/L,浓度高于约9.6g/L,浓度高于约9.7g/L,浓度高于约9.8g/L,浓度高于约9.9g/L,或浓度高于约10.0g/L)的泊洛沙姆-188。

[0125] 在一些实施方案中,所述方法包括当孔类型是烧结孔且孔径为大于150 μm (例如,大于155 μm ,大于160 μm ,大于165 μm ,大于170 μm ,大于175 μm ,大于约180 μm ,大于185 μm ,大于约190 μm ,大于约195 μm ,大于约200 μm ,大于约205 μm ,大于约210 μm ,大于约215 μm ,大于约220 μm ,大于约225 μm ,大于约230 μm ,大于约235 μm ,大于约240 μm ,大于约245 μm ,大于约250 μm ,大于约255 μm ,大于约260 μm ,大于约265 μm ,大于约270 μm ,大于约275 μm ,大于约280 μm ,大于约290 μm ,大于约300 μm ,大于约350 μm ,大于约400 μm ,大于约450 μm ,或大于约500 μm)时,基于孔类型和孔径选择浓度为约1.8g/L-约3.3g/L(例如,约1.8g/L-约3.2g/L,约1.8g/L-约3.1g/L,约1.8g/L-约3.0g/L,约1.8g/L-约2.9g/L,约1.8g/L-约2.8g/L,约1.8g/L-约2.7g/L,约1.8g/L-约2.6g/L,约1.8g/L-约2.5g/L,约1.8g/L-约2.4g/L,约1.8g/L-约2.3g/L,约1.8g/L-约2.2g/L,约1.8g/L-约2.1g/L,约1.8g/L-约2.0g/L,约1.9g/L-约3.3g/L,约1.9g/L-约3.2g/L,约1.9g/L-约3.1g/L,约1.9g/L-约3.0g/L,约1.9g/L-约2.9g/L,约1.9g/L-约2.8g/L,约1.9g/L-约2.7g/L,约1.9g/L-约2.6g/L,约1.9g/L-约2.5g/L,约1.9g/L-约2.4g/L,约1.9g/L-约2.3g/L,约1.9g/L-约2.2g/L,约1.9g/L-约2.1g/L,约2.0g/L-约3.3g/L,约2.0g/L-约3.2g/L,约2.0g/L-约3.1g/L,约2.0g/L-约3.0g/L,约2.0g/L-约2.9g/L,约2.0g/L-约2.8g/L,约2.0g/L-约2.7g/L,约2.0g/L-约2.6g/L,约2.0g/L-约2.5g/L,约2.0g/L-约2.4g/L,约2.0g/L-约2.3g/L,约2.0g/L-约2.2g/L,约2.1g/L-约3.3g/L,约2.1g/L-约3.2g/L,约2.1g/L-约3.1g/L,约2.1g/L-约3.0g/L,约2.1g/L-约2.9g/L,约2.1g/L-约2.8g/L,约2.1g/L-约2.7g/L,约2.1g/L-约2.6g/L,约2.1g/L-约2.5g/L,约2.1g/L-约2.4g/L,约2.1g/L-约2.3g/L,约2.2g/L-约3.3g/L,约2.2g/L-约3.2g/L,约2.2g/L-约3.1g/L,约2.2g/L-约3.0g/L,约2.2g/L-约2.9g/L,约2.2g/L-约2.8g/L,约2.2g/L-约2.7g/L,约2.2g/L-约2.6g/L,约2.2g/L-约2.5g/L,约2.2g/L-约2.4g/L,约2.3g/L-约3.3g/L,约2.3g/L-约3.2g/L,约2.3g/L-约3.1g/L,约2.3g/L-约3.0g/L,约2.3g/L-约2.9g/L,约2.3g/L-约2.8g/L,约2.3g/L-约2.7g/L,约2.3g/L-约2.6g/L,约2.3g/L-约2.5g/L,约2.4g/L-约3.3g/L,约2.4g/L-约3.2g/L,约2.4g/L-约3.1g/L,约2.4g/L-约3.0g/L,约2.4g/L-约2.9g/L,约2.4g/L-约2.8g/L,约2.4g/L-约2.7g/L,约2.4g/L-约2.6g/L,约2.5g/L-约3.3g/L,约2.5g/L-约3.2g/L,约2.5g/L-约3.1g/L,约2.5g/L-约3.0g/L,约2.5g/L-约2.9g/L,约2.5g/L-约2.8g/L,约2.5g/L-约2.7g/L,约2.6g/L-约3.3g/L,约2.6g/L-约3.2g/L,约2.6g/L-约3.1g/L,约2.6g/L-约3.0g/L,约2.6g/L-约2.9g/L,约2.6g/L-约2.8g/L,约2.7g/L-约3.3g/L,约2.7g/L-约3.2g/L,约2.7g/L-约3.1g/L,约2.7g/L-约3.0g/L,约2.7g/L-约2.9g/L,约2.8g/L-约3.3g/L,约2.8g/L-约3.2g/L,约2.8g/L-约3.1g/L,约2.8g/L-约3.0g/L,约2.9g/L-约3.3g/L,约2.9g/L-约3.2g/L,约2.9g/L-约3.1g/L,约3.0g/L-约3.3g/L,约3.0g/L-约3.2g/L,或约3.1g/L-约3.3g/L)的泊洛沙姆-188。

[0126] 所述方法可包括,例如,当孔类型是烧结孔且孔径为约80 μm -约150 μm (例如,约80 μm -约145 μm ,约80 μm -约140 μm ,约80 μm -约135 μm ,约80 μm -约130 μm ,约80 μm -约125 μm ,约80 μm -约120 μm ,约80 μm -约115 μm ,约80 μm -约110 μm ,约80 μm -约105 μm ,约80 μm -约100 μm ,约80 μm -约95 μm ,约80 μm -约90 μm ,约80 μm -约85 μm ,约85 μm -约150 μm ,约85 μm -约145 μm ,约85 μm -约140 μm

m, 约85 μ m-约135 μ m, 约85 μ m-约130 μ m, 约85 μ m-约125 μ m, 约85 μ m-约120 μ m, 约85 μ m-约115 μ m, 约85 μ m-约110 μ m, 约85 μ m-约105 μ m, 约85 μ m-约100 μ m, 约85 μ m-约95 μ m, 约85 μ m-约90 μ m, 约90 μ m-约150 μ m, 约90 μ m-约145 μ m, 约90 μ m-约140 μ m, 约90 μ m-约135 μ m, 约90 μ m-约130 μ m, 约90 μ m-约125 μ m, 约90 μ m-约120 μ m, 约90 μ m-约115 μ m, 约90 μ m-约110 μ m, 约90 μ m-约105 μ m, 约90 μ m-约100 μ m, 约90 μ m-约95 μ m, 约95 μ m-约150 μ m, 约95 μ m-约145 μ m, 约95 μ m-约140 μ m, 约95 μ m-约135 μ m, 约95 μ m-约130 μ m, 约95 μ m-约125 μ m, 约95 μ m-约120 μ m, 约95 μ m-约115 μ m, 约95 μ m-约110 μ m, 约95 μ m-约105 μ m, 约95 μ m-约100 μ m, 约95 μ m-约95 μ m, 约100 μ m-约150 μ m, 约100 μ m-约145 μ m, 约100 μ m-约140 μ m, 约100 μ m-约135 μ m, 约100 μ m-约130 μ m, 约100 μ m-约125 μ m, 约100 μ m-约120 μ m, 约100 μ m-约115 μ m, 约100 μ m-约110 μ m, 约100 μ m-约105 μ m, 约105 μ m-约150 μ m, 约105 μ m-约145 μ m, 约105 μ m-约140 μ m, 约105 μ m-约135 μ m, 约105 μ m-约130 μ m, 约105 μ m-约125 μ m, 约105 μ m-约120 μ m, 约105 μ m-约115 μ m, 约105 μ m-约110 μ m, 约105 μ m-约105 μ m, 约110 μ m-约150 μ m, 约110 μ m-约145 μ m, 约110 μ m-约140 μ m, 约110 μ m-约135 μ m, 约110 μ m-约130 μ m, 约110 μ m-约125 μ m, 约110 μ m-约120 μ m, 约110 μ m-约115 μ m, 约115 μ m-约150 μ m, 约115 μ m-约145 μ m, 约115 μ m-约140 μ m, 约115 μ m-约135 μ m, 约115 μ m-约130 μ m, 约115 μ m-约125 μ m, 约115 μ m-约120 μ m, 约120 μ m-约150 μ m, 约120 μ m-约145 μ m, 约120 μ m-约140 μ m, 约120 μ m-约135 μ m, 约120 μ m-约130 μ m, 约120 μ m-约125 μ m, 约125 μ m-约150 μ m, 约125 μ m-约145 μ m, 约125 μ m-约140 μ m, 约125 μ m-约135 μ m, 约125 μ m-约130 μ m, 约130 μ m-约150 μ m, 约130 μ m-约145 μ m, 约130 μ m-约140 μ m, 约130 μ m-约135 μ m, 约135 μ m-约150 μ m, 约135 μ m-约145 μ m, 约135 μ m-约140 μ m, 约140 μ m-约150 μ m, 约140 μ m-约145 μ m, 或约145 μ m-约150 μ m)时, 基于孔类型和孔径选择浓度为约3.3g/L-约4.3g/L (例如, 约3.3g/L-约4.2g/L, 约3.3g/L-约4.1g/L, 约3.3g/L-约4.0g/L, 约3.3g/L-约3.9g/L, 约3.3g/L-约3.8g/L, 约3.3g/L-约3.7g/L, 约3.3g/L-约3.6g/L, 约3.3g/L-约3.5g/L, 约3.4g/L-约4.3g/L, 约3.4g/L-约4.2g/L, 约3.4g/L-约4.1g/L, 约3.4g/L-约4.0g/L, 约3.4g/L-约3.9g/L, 约3.4g/L-约3.8g/L, 约3.4g/L-约3.7g/L, 约3.4g/L-约3.6g/L, 约3.5g/L-约4.3g/L, 约3.5g/L-约4.2g/L, 约3.5g/L-约4.1g/L, 约3.5g/L-约4.0g/L, 约3.5g/L-约3.9g/L, 约3.5g/L-约3.8g/L, 约3.5g/L-约3.7g/L, 约3.6g/L-约4.3g/L, 约3.6g/L-约4.2g/L, 约3.6g/L-约4.1g/L, 约3.6g/L-约4.0g/L, 约3.6g/L-约3.9g/L, 约3.6g/L-约3.8g/L, 约3.7g/L-约4.3g/L, 约3.7g/L-约4.2g/L, 约3.7g/L-约4.1g/L, 约3.7g/L-约4.0g/L, 约3.7g/L-约3.9g/L, 约3.8g/L-约4.3g/L, 约3.8g/L-约4.2g/L, 约3.8g/L-约4.1g/L, 约3.8g/L-约4.0g/L, 约3.9g/L-约4.3g/L, 约3.9g/L-约4.2g/L, 约3.9g/L-约4.1g/L, 约4.0g/L-约4.3g/L, 约4.0g/L-约4.2g/L, 或约4.1g/L-约4.3g/L)的泊洛沙姆-188。

[0127] 所述方法可包括, 例如, 当孔类型是烧结孔且孔径为约1 μ m-约80 μ m (例如, 约1 μ m-约50 μ m, 约1 μ m-约25 μ m, 约1 μ m-约10 μ m, 约1 μ m-约5 μ m, 约5 μ m-约80 μ m, 约5 μ m-约50 μ m, 约5 μ m-约25 μ m, 约5 μ m-约10 μ m, 约10 μ m-约80 μ m, 约10 μ m-约50 μ m, 约10 μ m-约25 μ m, 约25 μ m-约80 μ m, 约25 μ m-约50 μ m, 或者约50 μ m-约80 μ m)时, 基于孔类型和孔径选择浓度为约4.5g/L或浓度高于约4.5g/L (例如, 浓度为约4.6g/L或浓度为大于4.6g/L, 浓度为约4.7g/L或浓度为大于4.7g/L, 浓度为约4.8g/L或浓度为大于4.8g/L, 浓度为约4.9g/L或浓度为大于4.9g/L, 浓度为约5.0g/L或浓度为大于5.0g/L, 浓度为约5.1g/L或浓度为大于5.1g/L, 浓度为约5.2g/L或浓度为大于5.2g/L, 浓度为约5.3g/L或浓度为大于5.3g/L, 浓度为约5.4g/L或浓度为大于5.4g/L, 浓度为约5.5g/L或浓度为大于5.5g/L, 浓度为约5.6g/L或浓度为大于5.6g/L, 浓

度为约5.7g/L或浓度为大于5.7g/L,浓度为约5.8g/L或浓度为大于5.8g/L,浓度为约6.0g/L或浓度为大于6.0g/L,浓度为约6.1g/L或浓度为大于6.1g/L,浓度为约6.2g/L或浓度为大于6.2g/L,浓度为约6.3g/L或浓度为大于6.3g/L,浓度为约6.4g/L或浓度为大于6.4g/L,浓度为约6.5g/L或浓度为大于6.5g/L,浓度为约6.6g/L或浓度为大于6.6g/L,浓度为约6.7g/L或浓度为大于6.7g/L,浓度为约6.8g/L或浓度为大于6.8g/L,浓度为约6.9g/L或浓度为大于6.9g/L,浓度为约7.0g/L或浓度为大于7.0g/L,浓度为约7.1g/L或浓度为大于7.1g/L,浓度为约7.2g/L或浓度为大于7.2g/L,浓度为约7.3g/L或浓度为大于7.3g/L,浓度为约7.4g/L或浓度为大于7.4g/L,浓度为约7.5g/L或浓度为大于7.5g/L,浓度为约7.6g/L或浓度为大于7.6g/L,浓度为约7.7g/L或浓度为大于7.7g/L,浓度为约7.8g/L或浓度为大于7.8g/L,浓度为约7.9g/L或浓度为大于7.9g/L,浓度为约8.0g/L或浓度为大于8.0g/L,浓度为约8.1g/L或浓度为大于8.1g/L,浓度为约8.2g/L或浓度为大于8.2g/L,浓度为约8.3g/L或浓度为大于8.3g/L,浓度为约8.4g/L或浓度为大于8.4g/L,浓度为约8.5g/L或浓度为大于8.5g/L,浓度为约8.6g/L或浓度为大于8.6g/L,浓度为约8.7g/L或浓度为大于8.7g/L,浓度为约8.8g/L或浓度为大于8.8g/L,浓度为约8.9g/L或浓度为大于8.9g/L,浓度为约9.0g/L或浓度为大于9.0g/L,浓度为约9.1g/L或浓度为大于9.1g/L,浓度为约9.2g/L或浓度为大于9.2g/L,浓度为约9.3g/L或浓度为大于9.3g/L,浓度为约9.4g/L或浓度为大于9.4g/L,浓度为约9.5g/L或浓度为大于9.5g/L,浓度为约9.6g/L或浓度为大于9.6g/L,浓度为约9.7g/L或浓度为大于9.7g/L,浓度为约9.8g/L或浓度为大于9.8g/L,浓度为约9.9g/L或浓度为大于9.9g/L,或浓度为约10.0g/L或浓度为大于10.0g/L)的泊洛沙姆-188。

[0128] 当所述培养为灌注培养时,第二液体培养基可包括选择的泊洛沙姆-188浓度。

[0129] 基于活细胞密度增加泊洛沙姆-188浓度

[0130] 本申请所述的任何方法的一些实施方案包括基于培养基中的活细胞密度随时间增加培养基中的泊洛沙姆-188浓度。例如,本申请所述的任何方法可包括当培养基中的活细胞密度为约 20×10^6 细胞/mL至约 60×10^6 细胞/mL(例如,约 20×10^6 细胞/mL-约 58×10^6 细胞/mL,约 20×10^6 细胞/mL至约 56×10^6 细胞/mL,约 20×10^6 细胞/mL-约 54×10^6 细胞/mL,约 20×10^6 细胞/mL-约 52×10^6 细胞/mL,约 20×10^6 细胞/mL-约 50×10^6 细胞/mL,约 20×10^6 细胞/mL-约 48×10^6 细胞/mL,约 20×10^6 细胞/mL-约 46×10^6 细胞/mL,约 20×10^6 细胞/mL-约 44×10^6 细胞/mL,约 20×10^6 细胞/mL-约 42×10^6 细胞/mL,约 20×10^6 细胞/mL至约 40×10^6 细胞/mL,约 20×10^6 细胞/mL-约 38×10^6 细胞/mL,约 20×10^6 细胞/mL-约 36×10^6 细胞/mL,约 20×10^6 细胞/mL-约 34×10^6 细胞/mL,约 20×10^6 细胞/mL-约 32×10^6 细胞/mL,约 20×10^6 细胞/mL-约 30×10^6 细胞/mL,约 20×10^6 细胞/mL至约 28×10^6 细胞/mL,约 20×10^6 细胞/mL-约 26×10^6 细胞/mL,约 20×10^6 细胞/mL-约 24×10^6 细胞/mL,约 20×10^6 细胞/mL-约 22×10^6 细胞/mL,约 22×10^6 细胞/mL-约 60×10^6 细胞/mL,约 22×10^6 细胞/mL-约 58×10^6 细胞/mL,约 22×10^6 细胞/mL至约 56×10^6 细胞/mL,约 22×10^6 细胞/mL-约 54×10^6 细胞/mL,约 22×10^6 细胞/mL-约 52×10^6 细胞/mL,约 22×10^6 细胞/mL-约 50×10^6 细胞/mL,约 22×10^6 细胞/mL-约 48×10^6 细胞/mL,约 22×10^6 细胞/mL-约 46×10^6 细胞/mL,约 22×10^6 细胞/mL-约 44×10^6 细胞/mL,约 22×10^6 细胞/mL-约 42×10^6 细胞/mL,约 22×10^6 细胞/mL至约 40×10^6 细胞/mL,约 22×10^6 细胞/mL-约 38×10^6 细胞/mL,约 22×10^6 细胞/mL-约 36×10^6 细胞/mL,约 22×10^6 细胞/mL-约 34×10^6 细胞/mL,约 22×10^6 细胞/mL-约 32×10^6 细胞/mL,约 22×10^6 细胞/mL-约 30×10^6 细

50x 10⁶细胞/mL,约34x 10⁶细胞/mL-约48x 10⁶细胞/mL,约34x 10⁶细胞/mL-约46x 10⁶细胞/mL,约34x 10⁶细胞/mL-约44x 10⁶细胞/mL,约34x 10⁶细胞/mL-约42x 10⁶细胞/mL,约34x 10⁶细胞/mL至约40x 10⁶细胞/mL,约34x 10⁶细胞/mL-约38x 10⁶细胞/mL,约34x 10⁶细胞/mL-约36x 10⁶细胞/mL,约36x10⁶细胞/mL-约60x 10⁶细胞/mL,约36x 10⁶细胞/mL-约58x 10⁶细胞/mL,约36x 10⁶细胞/mL至约56x 10⁶细胞/mL,约36x 10⁶细胞/mL-约54x 10⁶细胞/mL,约36x 10⁶细胞/mL-约52x 10⁶细胞/mL,约36x 10⁶细胞/mL-约50x 10⁶细胞/mL,约36x 10⁶细胞/mL-约48x 10⁶细胞/mL,约36x 10⁶细胞/mL-约46x 10⁶细胞/mL,约36x 10⁶细胞/mL-约44x 10⁶细胞/mL,约36x 10⁶细胞/mL-约42x 10⁶细胞/mL,约36x 10⁶细胞/mL至约40x 10⁶细胞/mL,约36x 10⁶细胞/mL-约38x 10⁶细胞/mL,约38x 10⁶细胞/mL-约60x 10⁶细胞/mL,约38x 10⁶细胞/mL-约58x 10⁶细胞/mL,约38x 10⁶细胞/mL至约56x10⁶细胞/mL,约38x 10⁶细胞/mL-约54x 10⁶细胞/mL,约38x 10⁶细胞/mL-约52x 10⁶细胞/mL,约38x 10⁶细胞/mL-约50x 10⁶细胞/mL,约38x 10⁶细胞/mL-约48x 10⁶细胞/mL,约38x 10⁶细胞/mL-约46x 10⁶细胞/mL,约38x10⁶细胞/mL-约44x 10⁶细胞/mL,约38x 10⁶细胞/mL-约42x 10⁶细胞/mL,约38x 10⁶细胞/mL至约40x 10⁶细胞/mL,约40x 10⁶细胞/mL-约60x 10⁶细胞/mL,约40x 10⁶细胞/mL-约58x 10⁶细胞/mL,约40x 10⁶细胞/mL至约56x 10⁶细胞/mL,约40x 10⁶细胞/mL-约54x 10⁶细胞/mL,约40x 10⁶细胞/mL-约52x 10⁶细胞/mL,约40x 10⁶细胞/mL-约50x 10⁶细胞/mL,约40x 10⁶细胞/mL-约48x 10⁶细胞/mL,约40x 10⁶细胞/mL-约46x 10⁶细胞/mL,约40x 10⁶细胞/mL-约44x 10⁶细胞/mL,约40x 10⁶细胞/mL-约42x 10⁶细胞/mL,约42x 10⁶细胞/mL-约60x 10⁶细胞/mL,约42x 10⁶细胞/mL-约58x 10⁶细胞/mL,约42x 10⁶细胞/mL至约56x 10⁶细胞/mL,约42x 10⁶细胞/mL-约54x 10⁶细胞/mL,约42x 10⁶细胞/mL-约52x 10⁶细胞/mL,约42x 10⁶细胞/mL-约50x 10⁶细胞/mL,约42x 10⁶细胞/mL-约48x 10⁶细胞/mL,约42x10⁶细胞/mL-约46x 10⁶细胞/mL,约42x 10⁶细胞/mL-约44x 10⁶细胞/mL,约44x 10⁶细胞/mL-约60x 10⁶细胞/mL,约44x 10⁶细胞/mL-约58x 10⁶细胞/mL,约44x 10⁶细胞/mL至约56x 10⁶细胞/mL,约44x 10⁶细胞/mL-约54x10⁶细胞/mL,约44x 10⁶细胞/mL-约52x 10⁶细胞/mL,约44x 10⁶细胞/mL-约50x 10⁶细胞/mL,约44x 10⁶细胞/mL-约48x 10⁶细胞/mL,约44x 10⁶细胞/mL-约46x 10⁶细胞/mL,约46x 10⁶细胞/mL-约60x 10⁶细胞/mL,约46x10⁶细胞/mL-约58x 10⁶细胞/mL,约46x 10⁶细胞/mL至约56x 10⁶细胞/mL,约46x 10⁶细胞/mL-约54x 10⁶细胞/mL,约46x 10⁶细胞/mL-约52x 10⁶细胞/mL,约46x 10⁶细胞/mL-约50x 10⁶细胞/mL,约46x 10⁶细胞/mL-约48x 10⁶细胞/mL,约48x 10⁶细胞/mL-约60x 10⁶细胞/mL,约48x 10⁶细胞/mL-约58x 10⁶细胞/mL,约48x 10⁶细胞/mL-约58x 10⁶细胞/mL,约48x 10⁶细胞/mL至约56x 10⁶细胞/mL,约48x 10⁶细胞/mL-约54x 10⁶细胞/mL,约48x 10⁶细胞/mL-约52x 10⁶细胞/mL,约48x10⁶细胞/mL-约50x 10⁶细胞/mL,约50x 10⁶细胞/mL-约60x 10⁶细胞/mL,约50x 10⁶细胞/mL-约58x 10⁶细胞/mL,约50x 10⁶细胞/mL至约56x 10⁶细胞/mL,约50x 10⁶细胞/mL-约54x 10⁶细胞/mL,约50x 10⁶细胞/mL-约52x 10⁶细胞/mL,约52x 10⁶细胞/mL-约60x 10⁶细胞/mL,约52x 10⁶细胞/mL-约58x 10⁶细胞/mL,约52x 10⁶细胞/mL至约56x 10⁶细胞/mL,约52x10⁶细胞/mL-约54x 10⁶细胞/mL,约54x 10⁶细胞/mL-约60x 10⁶细胞/mL,约54x 10⁶细胞/mL-约58x 10⁶细胞/mL,约54x 10⁶细胞/mL至约56x 10⁶细胞/mL,约56x 10⁶细胞/mL-约60x 10⁶细胞/mL,约56x 10⁶细胞/mL-约58x 10⁶细胞/mL,或约58x 10⁶细胞/mL-约60x 10⁶细胞/mL)时,将培养基中的泊洛沙姆-188浓度增加到大于1.8g/L(例如,约1.8g/L-约3.0g/L,约1.8g/L-约2.9g/L,约1.8g/L-约2.8g/L,约1.8g/L-约2.7g/L

L,约1.8g/L-约2.5g/L,约1.8g/L-约2.4g/L,约1.8g/L-约2.3g/L,约1.8g/L-约2.2g/L,约1.8g/L-约2.1g/L,约1.8g/L-约2.0g/L,约1.9g/L-约3.0g/L,约1.9g/L-约2.9g/L,约1.9g/L-约2.8g/L,约1.9g/L-约2.7g/L,约1.9g/L-约2.6g/L,约1.9g/L-约2.5g/L,约1.9g/L-约2.4g/L,约1.9g/L-约2.3g/L,约1.9g/L-约2.2g/L,约1.9g/L-约2.1g/L,约2.0g/L-约3.0g/L,约2.0g/L-约2.9g/L,约2.0g/L-约2.8g/L,约2.0g/L-约2.7g/L,约2.0g/L-约2.6g/L,约2.0g/L-约2.5g/L,约2.0g/L-约2.4g/L,约2.0g/L-约2.3g/L,约2.0g/L-约2.2g/L,约2.1g/L-约3.0g/L,约2.1g/L-约2.9g/L,约2.1g/L-约2.8g/L,约2.1g/L-约2.7g/L,约2.1g/L-约2.6g/L,约2.1g/L-约2.5g/L,约2.1g/L-约2.4g/L,约2.1g/L-约2.3g/L,约2.2g/L-约3.0g/L,约2.2g/L-约2.9g/L,约2.2g/L-约2.8g/L,约2.2g/L-约2.7g/L,约2.2g/L-约2.6g/L,约2.2g/L-约2.5g/L,约2.2g/L-约2.4g/L,约2.3g/L-约3.0g/L,约2.3g/L-约2.9g/L,约2.3g/L-约2.8g/L,约2.3g/L-约2.7g/L,约2.3g/L-约2.6g/L,约2.3g/L-约2.5g/L,约2.4g/L-约3.0g/L,约2.4g/L-约2.9g/L,约2.4g/L-约2.8g/L,约2.4g/L-约2.7g/L,约2.4g/L-约2.6g/L,约2.5g/L-约3.0g/L,约2.5g/L-约2.9g/L,约2.5g/L-约2.8g/L,约2.5g/L-约2.7g/L,约2.6g/L-约3.0g/L,约2.6g/L-约2.9g/L,约2.6g/L-约2.8g/L,约2.7g/L-约3.0g/L,约2.7g/L-约2.9g/L,或者约2.8g/L-约3.0g/L)。

[0131] 本申请所述的任何方法可包括当培养基中的活细胞密度为约 60×10^6 细胞/mL至约 90×10^6 细胞/mL(例如,约 60×10^6 细胞/mL-约 88×10^6 细胞/mL,约 60×10^6 细胞/mL至约 86×10^6 细胞/mL,约 60×10^6 细胞/mL-约 84×10^6 细胞/mL,约 60×10^6 细胞/mL-约 82×10^6 细胞/mL,约 60×10^6 细胞/mL-约 80×10^6 细胞/mL,约 60×10^6 细胞/mL-约 78×10^6 细胞/mL,约 60×10^6 细胞/mL-约 76×10^6 细胞/mL,约 60×10^6 细胞/mL-约 74×10^6 细胞/mL,约 60×10^6 细胞/mL-约 72×10^6 细胞/mL,约 60×10^6 细胞/mL至约 70×10^6 细胞/mL,约 60×10^6 细胞/mL-约 68×10^6 细胞/mL,约 60×10^6 细胞/mL-约 66×10^6 细胞/mL,约 60×10^6 细胞/mL-约 64×10^6 细胞/mL,约 60×10^6 细胞/mL-约 62×10^6 细胞/mL,约 62×10^6 细胞/mL-约 90×10^6 细胞/mL,约 62×10^6 细胞/mL-约 88×10^6 细胞/mL,约 62×10^6 细胞/mL至约 86×10^6 细胞/mL,约 62×10^6 细胞/mL-约 84×10^6 细胞/mL,约 62×10^6 细胞/mL-约 82×10^6 细胞/mL,约 62×10^6 细胞/mL-约 80×10^6 细胞/mL,约 62×10^6 细胞/mL-约 78×10^6 细胞/mL,约 62×10^6 细胞/mL-约 76×10^6 细胞/mL,约 62×10^6 细胞/mL-约 74×10^6 细胞/mL,约 62×10^6 细胞/mL-约 72×10^6 细胞/mL,约 62×10^6 细胞/mL至约 70×10^6 细胞/mL,约 62×10^6 细胞/mL-约 68×10^6 细胞/mL,约 62×10^6 细胞/mL-约 66×10^6 细胞/mL,约 62×10^6 细胞/mL-约 64×10^6 细胞/mL,约 64×10^6 细胞/mL-约 90×10^6 细胞/mL,约 64×10^6 细胞/mL-约 88×10^6 细胞/mL,约 64×10^6 细胞/mL至约 86×10^6 细胞/mL,约 64×10^6 细胞/mL-约 84×10^6 细胞/mL,约 64×10^6 细胞/mL-约 82×10^6 细胞/mL,约 64×10^6 细胞/mL-约 80×10^6 细胞/mL,约 64×10^6 细胞/mL-约 78×10^6 细胞/mL,约 64×10^6 细胞/mL-约 76×10^6 细胞/mL,约 64×10^6 细胞/mL-约 74×10^6 细胞/mL,约 64×10^6 细胞/mL-约 72×10^6 细胞/mL,约 64×10^6 细胞/mL至约 70×10^6 细胞/mL,约 64×10^6 细胞/mL-约 68×10^6 细胞/mL,约 64×10^6 细胞/mL-约 66×10^6 细胞/mL,约 66×10^6 细胞/mL-约 90×10^6 细胞/mL,约 66×10^6 细胞/mL-约 88×10^6 细胞/mL,约 66×10^6 细胞/mL至约 86×10^6 细胞/mL,约 66×10^6 细胞/mL-约 84×10^6 细胞/mL,约 66×10^6 细胞/mL-约 82×10^6 细胞/mL,约 66×10^6 细胞/mL-约 80×10^6 细胞/mL,约 66×10^6 细胞/mL-约 78×10^6 细胞/mL,约 66×10^6 细胞/mL-约 76×10^6 细胞/mL,约 66×10^6 细胞/mL-约 74×10^6 细胞/mL,约 66×10^6 细胞/mL-约 72×10^6 细胞/mL,约 66×10^6 细胞/mL至约

70x 10⁶细胞/mL,约66x 10⁶细胞/mL-约68x 10⁶细胞/mL,约68x 10⁶细胞/mL-约90x 10⁶细胞/mL,约68x 10⁶细胞/mL-约88x 10⁶细胞/mL,约68x 10⁶细胞/mL至约86x10⁶细胞/mL,约68x 10⁶细胞/mL-约84x 10⁶细胞/mL,约68x 10⁶细胞/mL-约82x 10⁶细胞/mL,约68x 10⁶细胞/mL-约80x 10⁶细胞/mL,约68x 10⁶细胞/mL-约78x 10⁶细胞/mL,约68x 10⁶细胞/mL-约76x 10⁶细胞/mL,约68x10⁶细胞/mL-约74x 10⁶细胞/mL,约68x 10⁶细胞/mL-约72x 10⁶细胞/mL,约68x 10⁶细胞/mL至约70x 10⁶细胞/mL,约70x 10⁶细胞/mL-约90x 10⁶细胞/mL,约70x 10⁶细胞/mL-约88x 10⁶细胞/mL,约70x 10⁶细胞/mL至约86x 10⁶细胞/mL,约70x 10⁶细胞/mL-约84x 10⁶细胞/mL,约70x 10⁶细胞/mL-约82x 10⁶细胞/mL,约70x 10⁶细胞/mL-约80x 10⁶细胞/mL,约70x 10⁶细胞/mL-约78x 10⁶细胞/mL,约70x 10⁶细胞/mL-约76x 10⁶细胞/mL,约70x 10⁶细胞/mL-约74x 10⁶细胞/mL,约70x 10⁶细胞/mL-约72x 10⁶细胞/mL,约72x 10⁶细胞/mL-约90x 10⁶细胞/mL,约72x 10⁶细胞/mL-约88x 10⁶细胞/mL,约72x 10⁶细胞/mL至约86x 10⁶细胞/mL,约72x 10⁶细胞/mL-约84x 10⁶细胞/mL,约72x 10⁶细胞/mL-约82x 10⁶细胞/mL,约72x 10⁶细胞/mL-约80x 10⁶细胞/mL,约72x 10⁶细胞/mL-约78x 10⁶细胞/mL,约72x10⁶细胞/mL-约76x 10⁶细胞/mL,约72x 10⁶细胞/mL-约74x 10⁶细胞/mL,约74x 10⁶细胞/mL-约90x 10⁶细胞/mL,约74x 10⁶细胞/mL-约88x 10⁶细胞/mL,约74x 10⁶细胞/mL至约86x 10⁶细胞/mL,约74x 10⁶细胞/mL-约84x10⁶细胞/mL,约74x 10⁶细胞/mL-约82x 10⁶细胞/mL,约74x 10⁶细胞/mL-约80x 10⁶细胞/mL,约74x 10⁶细胞/mL-约78x 10⁶细胞/mL,约74x 10⁶细胞/mL-约76x 10⁶细胞/mL,约76x 10⁶细胞/mL-约90x 10⁶细胞/mL,约76x10⁶细胞/mL-约88x 10⁶细胞/mL,约76x 10⁶细胞/mL至约86x 10⁶细胞/mL,约76x 10⁶细胞/mL-约84x 10⁶细胞/mL,约76x 10⁶细胞/mL-约82x 10⁶细胞/mL,约76x 10⁶细胞/mL-约80x 10⁶细胞/mL,约76x 10⁶细胞/mL-约78x 10⁶细胞/mL,约78x 10⁶细胞/mL-约90x 10⁶细胞/mL,约78x 10⁶细胞/mL-约88x 10⁶细胞/mL,约78x 10⁶细胞/mL至约86x 10⁶细胞/mL,约78x 10⁶细胞/mL-约84x 10⁶细胞/mL,约78x 10⁶细胞/mL-约82x 10⁶细胞/mL,约78x10⁶细胞/mL-约80x 10⁶细胞/mL,约80x 10⁶细胞/mL-约90x 10⁶细胞/mL,约80x 10⁶细胞/mL-约88x 10⁶细胞/mL,约80x 10⁶细胞/mL至约86x 10⁶细胞/mL,约80x 10⁶细胞/mL-约84x 10⁶细胞/mL,约80x 10⁶细胞/mL-约82x 10⁶细胞/mL,约82x 10⁶细胞/mL-约90x 10⁶细胞/mL,约82x 10⁶细胞/mL-约88x 10⁶细胞/mL,约82x 10⁶细胞/mL至约86x 10⁶细胞/mL,约82x10⁶细胞/mL-约84x 10⁶细胞/mL,约84x 10⁶细胞/mL-约90x 10⁶细胞/mL,约84x 10⁶细胞/mL-约88x 10⁶细胞/mL,约84x 10⁶细胞/mL至约86x 10⁶细胞/mL,约86x 10⁶细胞/mL-约90x 10⁶细胞/mL,约86x 10⁶细胞/mL-约88x 10⁶细胞/mL,或约88x 10⁶细胞/mL-约90x 10⁶细胞/mL)时,将培养基中的泊洛沙姆-188浓度增加到约3.0g/L-约6.0g/L(例如,约3.0g/L-约5.9g/L,约3.0g/L-约5.8g/L,约3.0g/L-约5.7g/L,约3.0g/L-约5.6g/L,约3.0g/L-约5.5g/L,约3.0g/L-约5.4g/L,约3.0g/L-约5.3g/L,约3.0g/L-约5.2g/L,约3.0g/L-约5.1g/L,约3.0g/L-约5.0g/L,约3.0g/L-约4.9g/L,约3.0g/L-约4.8g/L,约3.0g/L-约4.7g/L,约3.0g/L-约4.6g/L,约3.0g/L-约4.5g/L,约3.0g/L-约4.4g/L,约3.0g/L-约4.3g/L,约3.0g/L-约4.2g/L,约3.0g/L-约4.1g/L,约3.0g/L-约4.0g/L,约3.0g/L-约3.9g/L,约3.0g/L-约3.8g/L,约3.0g/L-约3.7g/L,约3.0g/L-约3.6g/L,约3.0g/L-约3.5g/L,约3.0g/L-约3.4g/L,约3.0g/L-约3.3g/L,约3.0g/L-约3.2g/L,约3.1g/L-约6.0g/L,约3.1g/L-约5.9g/L,约3.1g/L-约5.8g/L,约3.1g/L-约5.7g/L,约3.1g/L-约5.6g/L,约3.1g/L-约5.5g/L,约3.1g/L-约5.4g/L,约3.1g/L-约5.3g/L,约3.1g/L

L-约5.2g/L,约3.1g/L-约5.1g/L,约3.1g/L-约5.0g/L,约3.1g/L-约4.9g/L,约3.1g/L-约4.8g/L,约3.1g/L-约4.7g/L,约3.1g/L-约4.6g/L,约3.1g/L-约4.5g/L,约3.1g/L-约4.4g/L,约3.1g/L-约4.3g/L,约3.1g/L-约4.2g/L,约3.1g/L-约4.1g/L,约3.1g/L-约4.0g/L,约3.1g/L-约3.9g/L,约3.1g/L-约3.8g/L,约3.1g/L-约3.7g/L,约3.1g/L-约3.6g/L,约3.1g/L-约3.5g/L,约3.1g/L-约3.4g/L,约3.1g/L-约3.3g/L,约3.2g/L-约6.0g/L,约3.2g/L-约5.9g/L,约3.2g/L-约5.8g/L,约3.2g/L-约5.7g/L,约3.2g/L-约5.6g/L,约3.2g/L-约5.5g/L,约3.2g/L-约5.4g/L,约3.2g/L-约5.3g/L,约3.2g/L-约5.2g/L,约3.2g/L-约5.1g/L,约3.2g/L-约5.0g/L,约3.2g/L-约4.9g/L,约3.2g/L-约4.8g/L,约3.2g/L-约4.7g/L,约3.2g/L-约4.6g/L,约3.2g/L-约4.5g/L,约3.2g/L-约4.4g/L,约3.2g/L-约4.3g/L,约3.2g/L-约4.2g/L,约3.2g/L-约4.1g/L,约3.2g/L-约4.0g/L,约3.2g/L-约3.9g/L,约3.2g/L-约3.8g/L,约3.2g/L-约3.7g/L,约3.2g/L-约3.6g/L,约3.2g/L-约3.5g/L,约3.2g/L-约3.4g/L,约3.3g/L-约6.0g/L,约3.3g/L-约5.9g/L,约3.3g/L-约5.8g/L,约3.3g/L-约5.7g/L,约3.3g/L-约5.6g/L,约3.3g/L-约5.5g/L,约3.3g/L-约5.4g/L,约3.3g/L-约5.3g/L,约3.3g/L-约5.2g/L,约3.3g/L-约5.1g/L,约3.3g/L-约5.0g/L,约3.3g/L-约4.9g/L,约3.3g/L-约4.8g/L,约3.3g/L-约4.7g/L,约3.3g/L-约4.6g/L,约3.3g/L-约4.5g/L,约3.3g/L-约4.4g/L,约3.3g/L-约4.3g/L,约3.3g/L-约4.2g/L,约3.3g/L-约4.1g/L,约3.3g/L-约4.0g/L,约3.3g/L-约3.9g/L,约3.3g/L-约3.8g/L,约3.3g/L-约3.7g/L,约3.3g/L-约3.6g/L,约3.3g/L-约3.5g/L,约3.4g/L-约6.0g/L,约3.4g/L-约5.9g/L,约3.4g/L-约5.8g/L,约3.4g/L-约5.7g/L,约3.4g/L-约5.6g/L,约3.4g/L-约5.5g/L,约3.4g/L-约5.4g/L,约3.4g/L-约5.3g/L,约3.4g/L-约5.2g/L,约3.4g/L-约5.1g/L,约3.4g/L-约5.0g/L,约3.4g/L-约4.9g/L,约3.4g/L-约4.8g/L,约3.4g/L-约4.7g/L,约3.4g/L-约4.6g/L,约3.4g/L-约4.5g/L,约3.4g/L-约4.4g/L,约3.4g/L-约4.3g/L,约3.4g/L-约4.2g/L,约3.4g/L-约4.1g/L,约3.4g/L-约4.0g/L,约3.4g/L-约3.9g/L,约3.4g/L-约3.8g/L,约3.4g/L-约3.7g/L,约3.4g/L-约3.6g/L,约3.5g/L-约6.0g/L,约3.5g/L-约5.9g/L,约3.5g/L-约5.8g/L,约3.5g/L-约5.7g/L,约3.5g/L-约5.6g/L,约3.5g/L-约5.5g/L,约3.5g/L-约5.4g/L,约3.5g/L-约5.3g/L,约3.5g/L-约5.2g/L,约3.5g/L-约5.1g/L,约3.5g/L-约5.0g/L,约3.5g/L-约4.9g/L,约3.5g/L-约4.8g/L,约3.5g/L-约4.7g/L,约3.5g/L-约4.6g/L,约3.5g/L-约4.5g/L,约3.5g/L-约4.4g/L,约3.5g/L-约4.3g/L,约3.5g/L-约4.2g/L,约3.5g/L-约4.1g/L,约3.5g/L-约4.0g/L,约3.5g/L-约3.9g/L,约3.5g/L-约3.8g/L,约3.5g/L-约3.7g/L,约3.6g/L-约6.0g/L,约3.6g/L-约5.9g/L,约3.6g/L-约5.8g/L,约3.6g/L-约5.7g/L,约3.6g/L-约5.6g/L,约3.6g/L-约5.5g/L,约3.6g/L-约5.4g/L,约3.6g/L-约5.3g/L,约3.6g/L-约5.2g/L,约3.6g/L-约5.1g/L,约3.6g/L-约5.0g/L,约3.6g/L-约4.9g/L,约3.6g/L-约4.8g/L,约3.6g/L-约4.7g/L,约3.6g/L-约4.6g/L,约3.6g/L-约4.5g/L,约3.6g/L-约4.4g/L,约3.6g/L-约4.3g/L,约3.6g/L-约4.2g/L,约3.6g/L-约4.1g/L,约3.6g/L-约4.0g/L,约3.6g/L-约3.9g/L,约3.6g/L-约3.8g/L,约3.7g/L-约6.0g/L,约3.7g/L-约5.9g/L,约3.7g/L-约5.8g/L,约3.7g/L-约5.7g/L,约3.7g/L-约5.6g/L,约3.7g/L-约5.5g/L,约3.7g/L-约5.4g/L,约3.7g/L-约5.3g/L,约3.7g/L-约5.2g/L,约3.7g/L-约5.1g/L,约3.7g/L-约5.0g/L,约3.7g/L-约4.9g/L,约3.7g/L-约4.8g/L,约3.7g/L-约4.7g/L,约3.7g/L-约4.6g/L,约3.7g/L-约4.5g/L,约3.7g/L-约4.4g/L,约3.7g/L-约4.3g/L,约3.7g/L-约4.2g/L,约3.7g/L-约4.1g/L,约3.7g/L-约4.0g/L,约

L,约4.8g/L-约6.0g/L,约4.8g/L-约5.9g/L,约4.8g/L-约5.8g/L,约4.8g/L-约5.7g/L,约4.8g/L-约5.6g/L,约4.8g/L-约5.5g/L,约4.8g/L-约5.4g/L,约4.8g/L-约5.3g/L,约4.8g/L-约5.2g/L,约4.8g/L-约5.1g/L,约4.8g/L-约5.0g/L,约4.9g/L-约6.0g/L,约4.9g/L-约5.9g/L,约4.9g/L-约5.8g/L,约4.9g/L-约5.7g/L,约4.9g/L-约5.6g/L,约4.9g/L-约5.5g/L,约4.9g/L-约5.4g/L,约4.9g/L-约5.3g/L,约4.9g/L-约5.2g/L,约4.9g/L-约5.1g/L,约5.0g/L-约6.0g/L,约5.0g/L-约5.9g/L,约5.0g/L-约5.8g/L,约5.0g/L-约5.7g/L,约5.0g/L-约5.6g/L,约5.0g/L-约5.5g/L,约5.0g/L-约5.4g/L,约5.0g/L-约5.3g/L,约5.0g/L-约5.2g/L,约5.1g/L-约6.0g/L,约5.1g/L-约5.9g/L,约5.1g/L-约5.8g/L,约5.1g/L-约5.7g/L,约5.1g/L-约5.6g/L,约5.1g/L-约5.5g/L,约5.1g/L-约5.4g/L,约5.1g/L-约5.3g/L,约5.2g/L-约6.0g/L,约5.2g/L-约5.9g/L,约5.2g/L-约5.8g/L,约5.2g/L-约5.7g/L,约5.2g/L-约5.6g/L,约5.2g/L-约5.5g/L,约5.2g/L-约5.4g/L,约5.3g/L-约6.0g/L,约5.3g/L-约5.9g/L,约5.3g/L-约5.8g/L,约5.3g/L-约5.7g/L,约5.3g/L-约5.6g/L,约5.3g/L-约5.5g/L,约5.4g/L-约6.0g/L,约5.4g/L-约5.9g/L,约5.4g/L-约5.8g/L,约5.4g/L-约5.7g/L,约5.4g/L-约5.6g/L,约5.5g/L-约6.0g/L,约5.5g/L-约5.9g/L,约5.5g/L-约5.8g/L,约5.5g/L-约5.7g/L,约5.6g/L-约6.0g/L,约5.6g/L-约5.9g/L,约5.6g/L-约5.8g/L,约5.7g/L-约6.0g/L,约5.7g/L-约5.9g/L,或约5.8g/L-约6.0g/L)。

[0132] 本申请所述的任何方法可包括当培养基中的活细胞密度为大于约 90×10^6 细胞/mL (例如,大于约 91×10^6 细胞/mL,大于约 92×10^6 细胞/mL,大于约 93×10^6 细胞/mL,大于约 94×10^6 细胞/mL,大于约 95×10^6 细胞/mL,大于约 96×10^6 细胞/mL,大于约 97×10^6 细胞/mL,大于约 98×10^6 细胞/mL,大于约 99×10^6 细胞/mL,大于约 100×10^6 细胞/mL,大于约 101×10^6 细胞/mL,大于约 102×10^6 细胞/mL,大于约 103×10^6 细胞/mL,大于约 104×10^6 细胞/mL,大于约 105×10^6 细胞/mL,大于约 106×10^6 细胞/mL,大于约 107×10^6 细胞/mL,大于约 108×10^6 细胞/mL,大于约 109×10^6 细胞/mL,大于约 110×10^6 细胞/mL,大于约 111×10^6 细胞/mL,大于约 112×10^6 细胞/mL,大于约 113×10^6 细胞/mL,大于约 114×10^6 细胞/mL,大于约 115×10^6 细胞/mL,大于约 116×10^6 细胞/mL,大于约 117×10^6 细胞/mL,大于约 118×10^6 细胞/mL,大于约 119×10^6 细胞/mL,或大于约 120×10^6 细胞/mL)时,将培养基中的泊洛沙姆-188浓度增加到大于6.0g/L (例如,大于6.1g/L,大于6.2g/L,大于6.3g/L,大于6.4g/L,大于6.5g/L,大于6.6g/L,大于6.7g/L,大于6.8g/L,大于6.9g/L,大于7.0g/L,大于7.1g/L,大于7.2g/L,大于7.3g/L,大于7.4g/L,大于7.5g/L,大于7.6g/L,大于7.7g/L,大于7.8g/L,大于7.9g/L,大于8.0g/L,大于8.1g/L,大于8.2g/L,大于8.3g/L,大于8.4g/L,大于8.5g/L,大于8.6g/L,大于8.7g/L,大于8.8g/L,大于8.9g/L,大于9.0g/L,大于9.1g/L,大于9.2g/L,大于9.3g/L,大于9.4g/L,大于9.5g/L,大于9.6g/L,大于9.7g/L,大于9.8g/L,大于9.9g/L,大于10.0g/L,大于约10.1g/L,大于约10.2g/L,大于约10.3g/L,大于约10.4g/L,大于约10.5g/L,大于约10.6g/L,大于约10.7g/L,大于约10.8g/L,大于约10.9g/L,或大于约11.0g/L) 泊洛沙姆-188。

[0133] 在一些实施方案中,所述方法包括:当培养基中的活细胞密度为约 35×10^6 细胞/mL至约 60×10^6 细胞/mL (例如,或本申请所述的其间任何范围)时,将培养基中的泊洛沙姆-188浓度增加到约1.8g/L至约3.0g/L (例如,本申请所述的其间任何范围);当培养基中的活细胞浓度密度为约 60×10^6 细胞/mL至约 90×10^6 细胞/mL (例如,本申请所述的其间任何范

围)时,将培养基中的泊洛沙姆-188浓度增加到约3.0g/L至约6.0g/L(例如,本申请所述的其间任何范围);和当培养基中的活细胞密度浓度为大于 90×10^6 细胞/mL(例如,本申请所述的大于 90×10^6 细胞/mL的任何活细胞密度)时,将培养基中的泊洛沙姆-188浓度增加到大于6.0g/L(例如,本申请所述的大于6.0g/L的任何浓度)。本申请所述的任何方法的一些实施方案还包括在培养过程中在一个或多个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个或二十个)时间点确定培养基中的活细胞密度。

[0134] 泊洛沙姆-188对消泡剂比例

[0135] 在本申请所述的任何实施方案中,液体培养基包含消泡剂(例如,消泡剂-c)且所述培养基中消泡剂(g/L)与泊洛沙姆-188(g/L)的比例为约0.5%至约6.0%(例如,约0.5%-约5.5%,约0.5%-约5.0%,约0.5%-约4.5%,约0.5%-约4.0%,约0.5%-约3.5%,约0.5%-约3.0%,约0.5%-约2.5%,约0.5%-约2.0%,约0.5%-约1.5%,约0.5%-约1.0%,约1.0%-约6.0%,约1.0%-约5.5%,约1.0%-约5.0%,约1.0%-约4.5%,约1.0%-约4.0%,约1.0%-约3.5%,约1.0%-约3.0%,约1.0%-约2.5%,约1.0%-约2.0%,约1.0%-约1.5%,约2.0%-约6.0%,约2.0%-约5.5%,约2.0%-约5.0%,约2.0%-约4.5%,约2.0%-约4.0%,约2.0%-约3.5%,约2.0%-约3.0%,约2.0%-约2.5%,约2.5%-约6.0%,约2.5%-约5.5%,约2.5%-约5.0%,约2.5%-约4.5%,约2.5%-约4.0%,约2.5%-约3.5%,约2.5%-约3.0%,约3.0%-约6.0%,约3.0%-约5.5%,约3.0%-约5.0%,约3.0%-约4.5%,约3.0%-约4.0%,约3.0%-约3.5%,约3.5%-约6.0%,约3.5%-约5.5%,约3.5%-约5.0%,约3.5%-约4.5%,约3.5%-约4.0%,约4.0%-约6.0%,约4.0%-约5.5%,约4.0%-约5.0%,约4.0%-约4.5%,约4.5%-约6.0%,约4.5%-约5.5%,约4.5%-约5.0%,约5.0%-约6.0%,约5.0%-约5.5%,或约5.5%-约6.0%)。

[0136] 培养基

[0137] 液体培养基是本领域中已知的。所述液体培养基(例如,第一和/或第二液体培养基)可补充哺乳动物血清(例如,胎牛血清(fetal calf serum)和牛血清(bovine serum)),和/或生长激素或生长因子(例如,胰岛素、运铁蛋白和表皮生长因子)。可替换地或此外,所述液体培养基(例如,第一和/或第二液体培养基)可为化学成分确定的液体培养基、无动物衍生组分的液体培养基、无血清液体培养基或含血清液体培养基。化学成分确定的液体培养基、无动物衍生组分的液体培养基、无血清液体培养基或含血清液体培养基的非限制性实例是商业上可得到的。

[0138] 液体培养基通常含有能量源(例如,碳水化合物,如葡萄糖)、必需氨基酸(例如,二十个氨基酸加半胱氨酸的基本组)、维生素和/或以低浓度需要的其他有机化合物、游离脂肪酸和/或微量元素。如果需要,所述液体培养基(例如,第一和/或第二液体培养基)可补充,例如,哺乳动物激素或生长因子(例如,胰岛素、运铁蛋白或表皮生长因子)、盐和缓冲剂(例如,钙、镁和磷酸盐)、核苷和碱基(例如,腺苷、胸苷和次黄嘌呤)、蛋白质和组织水解物,和/或这些添加剂的任何组合。

[0139] 可用于在本申请所述的任何方法中培养细胞(例如,哺乳动物细胞)的多种不同的液体培养基是本领域中已知的。可用于本方法中的培养基组分包括但不限于化学成分确定

的(CD)水解物,例如,CD肽、CD多肽(两种或更多氨基酸)和CD生长因子。液体培养基和培养基组分的另外的实例是本领域中已知的。

[0140] 本领域的技术人员会理解的是本申请所述的第一液体培养基和第二或补料液体培养基可为相同类型的培养基或不同的培养基。

[0141] 可将从细胞培养物获得的液体培养基过滤或澄清以获得基本上无细胞和/或病毒的液体培养基。用于过滤或澄清液体培养基以移出细胞的方法是本领域中已知的(例如,0.2- μm 过滤和使用交替的切线流(ATFTM)系统的过滤)。也可使用离心并移出其为基本上无细胞的液体培养基的上清,或通过允许细胞沉降至含有液体培养基的容器或生物反应器的重力底部并移出远离沉降的重组细胞的液体培养基(所述液体培养基基本上无细胞)而从液体培养基移出哺乳动物细胞。

[0142] 温度

[0143] 可在约31°C至约40°C的温度进行培养哺乳动物细胞的步骤。本领域的技术人员会理解的是可在培养步骤过程中在特定的时间点改变温度,例如,以每小时或每天为基础。例如,可在用细胞(例如,哺乳动物细胞)初始接种生物反应器后约一天、两天、三天、四天、五天、六天、七天、八天、九天、十天、十一天、十二天、十四天、十五天、十六天、十七天、十八天、十九天,或约二十天或更多天改变或变化(例如,增加或降低)温度。例如,可将温度上调(例如,多至或约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19,或多至或约20摄氏度的变化)。例如,可将温度下调(例如,多至或约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19,或多至或约20°C的变化)。

[0144] CO₂

[0145] 本申请所述的培养步骤可进一步包括将生物反应器中的液体培养基暴露于含有至多或约15%CO₂(例如,至多或约14%CO₂、12%CO₂、10%CO₂、8%CO₂、6%CO₂、5%CO₂、4%CO₂、3%CO₂、2%CO₂,或至多或约1%CO₂)的气氛。

[0146] 重组蛋白

[0147] 可通过本申请提供的方法产生的重组蛋白的非限制性实例包括免疫球蛋白(包括轻链和重链免疫球蛋白、抗体、或抗体片段(例如,本申请所述的任何抗体片段)、酶(例如,半乳糖苷酶(例如, α -半乳糖苷酶)、Myozyme或Cerezyme)、蛋白质(例如,人促红细胞生成素(erythropoietin)、肿瘤坏死因子(TNF)、或干扰素 α 或 β)、或免疫原性或抗原性蛋白或蛋白片段(例如,用于疫苗的蛋白)。重组蛋白可为工程化的抗原结合多肽,其含有至少一个多功能重组蛋白支架(参见,例如,Gebauer等,Current Opin.Chem.Biol.13:245-255,2009;和,美国专利申请公开号2012/0164066(通过提述以其整体并入本申请)中描述的重组抗原结合蛋白)。作为抗体的重组蛋白的非限制性实例包括:帕尼单抗(panitumumab)、奥马珠单抗(omalizumab)、阿巴伏单抗(abagovomab)、阿昔单抗(abciximab)、actoxumab、阿达木单抗(adalimumab)、阿德木单抗(adecatumumab)、阿非莫单抗(afelimomab)、afutuzumab、alacizumab、alacizumab、阿仑单抗(alemtuzumab)、alirocumab、阿妥莫单抗(altumomab)、amatuximab、amatuximab、anatumomab、安芦珠单抗(anrukizumab)、阿泊珠单抗(apolizumab)、阿西莫单抗(arcitumomab)、atinumab、托珠单抗(tocilizumab)、

basilizumab、贝妥莫单抗 (bectumomab)、贝利单抗 (belimumab)、贝伐单抗 (bevacizumab)、贝西索单抗 (besilesomab)、bezlotoxumab、比西单抗 (biciromab)、卡那奴单抗 (canakinumab)、赛妥珠单抗 (certolizumab)、西妥昔单抗 (cetuximab)、西妥木单抗 (cixutumumab)、达利珠单抗 (daclizumab)、地诺单抗 (denosumab)、densumab、依库珠单抗 (eculizumab)、依决洛单抗 (edrecolomab)、依法利珠单抗 (efalizumab)、依芬古单抗 (efungumab)、依帕珠单抗 (epratuzumab)、厄妥索单抗 (ertumaxomab)、艾瑞西珠单抗 (etaracizumab)、figitumumab、戈利木单抗 (golimumab)、替伊莫单抗 (ibritumomab tiuxetan)、伊戈伏单抗 (igovomab)、imgatuzumab、英利昔单抗 (infliximab)、伊诺莫单抗 (inolimomab)、伊珠单抗 (inotuzumab)、拉贝珠单抗 (labetuzumab)、来金珠单抗 (lebrikizumab)、moxetumomab、那他珠单抗 (natalizumab)、奥滨尤妥珠单抗 (obinutuzumab)、奥戈伏单抗 (oregovomab)、帕利珠单抗 (palivizumab)、帕尼单抗 (panitumumab)、培妥珠单抗 (pertuzumab)、兰尼单抗 (ranibizumab)、利妥昔单抗 (rituximab)、托珠单抗 (tocilizumab)、托西莫单抗 (tositumomab)、tralokinumab、tucotuzumab、曲妥单抗 (trastuzumab)、维妥珠单抗 (veltuzumab)、扎妥木单抗 (zalutumumab) 和 zatuximab。可通过本申请所述的方法产生的重组抗体的另外的实例是本领域中已知的。可通过本方法产生的重组蛋白的另外的非限制性实例包括：阿葡糖苷酶 α (alglucosidase alfa)、拉罗尼酶 (laronidase)、阿巴西普 (abatacept)、加硫酶 (galsulfase)、促黄体激素 α (lutropin alfa)、抗血友病因子 (antihemophilic factor)、阿加糖苷酶 β (agalsidase beta)、干扰素 β -1A (interferon beta-1a)、达贝泊汀 α (darbepoetin alfa)、替奈普酶 (tenecteplase)、依那西普 (etanercept)、凝血因子 IX、促卵泡激素、干扰素 β -1a、伊米昔酶 (imiglucerase)、Dornase α 、依伯汀 α (epoetin alfa)、胰岛素或胰岛素类似物、美卡舍明 (mecasermin)、因子 VIII、因子 VIIa、抗凝血酶 III、蛋白 C、人白蛋白、促红细胞生成素、粒细胞集落刺激因子、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、白细胞介素-11、拉罗尼酶、idursuphase、galsulphase、 α -1-蛋白酶抑制剂、乳糖酶、腺苷脱氨酶、组织纤维蛋白溶酶原活化剂、促甲状腺素 α (例如, **Thyrogen[®]**) 和阿替普酶。可通过本方法产生的重组蛋白的另外的实例包括酸性 α 葡糖苷酶、阿葡糖苷酶 α (例如, **Myozyme[®]** 和 **Lumizyme[®]**)、 α -L-艾杜糖苷酶 (例如, **Aldurazyme[®]**)、艾杜糖醛酸硫酸酯酶 (iduronate sulfatase)、乙酰肝素 N-硫酸酯酶 (heparan N-sulfatase)、半乳糖 6-硫酸酯酶、酸性 β 半乳糖苷酶、 β 葡糖醛酸酶、N-乙酰葡糖胺-1-磷酸转移酶、 α -N-乙酰半乳糖氨酶 (α -N-acetylgalactosaminidase)、酸性脂肪酶、溶酶体酸性神经酰胺酶 (lysosomal acid ceramidase)、酸性鞘磷脂酶 (acid sphingomyelinase)、 β 葡糖苷酶 (例如, **Cerezyme[®]** 和 **Ceredase[®]**)、半乳糖神经酰胺酶 (galactosylceramidase)、 α -半乳糖苷酶-A (例如, **Fabrazyme[®]**)、酸性 β -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、神经氨酸酶、氨基己糖苷酶 A 和氨基己糖苷酶 B。

[0148] 可通过从细胞 (例如, 哺乳动物细胞) 移出或以其他方式物理地分离液体培养基而从液体培养基 (例如, 第一和/或第二液体培养基) 回收分泌的、可溶的重组蛋白。用于从细胞 (例如, 哺乳动物细胞) 移出液体培养基的多种不同的方法是本领域中已知的, 包括, 例如, 离心、过滤、移液和/或抽吸。然后可使用多种生物化学技术包括多种层析术 (例如, 亲和

层析、分子筛层析、阳离子交换层析或阴离子交换层析)和/或过滤(例如,分子量截留过滤)而从液体培养基回收和进一步纯化分泌的重组蛋白。

[0149] 收集重组蛋白

[0150] 一些实施方案还包括收集重组蛋白(例如,本申请所述的任何重组蛋白)。在一些实例中,收集包括裂解哺乳动物细胞。在其他实例中,收集可包括从培养基中收集重组蛋白(例如,当进行灌注培养时,第一和第二液体培养基之一或两者,或者当进行分批培养时第一液体培养基和补料液体培养基之一或两者)。

[0151] 在培养实现,例如,大于约 30×10^6 细胞/mL,大于约 32×10^6 细胞/mL,大于约 34×10^6 细胞/mL,大于约 36×10^6 细胞/mL,大于约 38×10^6 细胞/mL,大于约 40×10^6 细胞/mL,大于约 42×10^6 细胞/mL,大于约 44×10^6 细胞/mL,大于约 46×10^6 细胞/mL,大于约 48×10^6 细胞/mL,大于约 50×10^6 细胞/mL,大于约 52×10^6 细胞/mL,大于约 54×10^6 细胞/mL,大于约 56×10^6 细胞/mL,大于约 58×10^6 细胞/mL,大于约 60×10^6 细胞/mL,大于约 62×10^6 细胞/mL,大于约 64×10^6 细胞/mL,大于约 66×10^6 细胞/mL,大于约 68×10^6 细胞/mL,大于约 70×10^6 细胞/mL,大于约 72×10^6 细胞/mL,大于约 74×10^6 细胞/mL,大于约 76×10^6 细胞/mL,大于约 78×10^6 细胞/mL,大于约 80×10^6 细胞/mL,大于约 82×10^6 细胞/mL,大于约 84×10^6 细胞/mL,大于约 86×10^6 细胞/mL,大于约 88×10^6 细胞/mL,大于约 90×10^6 细胞/mL,大于约 92×10^6 细胞/mL,大于约 94×10^6 细胞/mL,大于约 96×10^6 细胞/mL,大于约 98×10^6 细胞/mL,大于约 100×10^6 细胞/mL,大于约 102×10^6 细胞/mL,大于约 104×10^6 细胞/mL,大于约 106×10^6 细胞/mL,大于约 108×10^6 细胞/mL,大于约 110×10^6 细胞/mL,大于约 112×10^6 细胞/mL,大于约 114×10^6 细胞/mL,大于约 116×10^6 细胞/mL,大于约 118×10^6 细胞/mL,大于约 120×10^6 细胞/mL,大于约 122×10^6 细胞/mL,大于约 124×10^6 细胞/mL,大于约 126×10^6 细胞/mL,大于约 128×10^6 细胞/mL,大于约 130×10^6 细胞/mL,大于约 132×10^6 细胞/mL,大于约 134×10^6 细胞/mL,大于约 136×10^6 细胞/mL,大于约 138×10^6 细胞/mL,大于约 140×10^6 细胞/mL,大于约 142×10^6 细胞/mL,大于约 144×10^6 细胞/mL,大于约 146×10^6 细胞/mL,大于约 148×10^6 细胞/mL,大于约 150×10^6 细胞/mL,大于约 152×10^6 细胞/mL,大于约 154×10^6 细胞/mL,大于约 156×10^6 细胞/mL,大于约 158×10^6 细胞/mL,大于约 160×10^6 细胞/mL,大于约 162×10^6 细胞/mL,大于约 164×10^6 细胞/mL,大于约 166×10^6 细胞/mL,大于约 168×10^6 细胞/mL,大于约 170×10^6 细胞/mL,大于约 172×10^6 细胞/mL,大于约 174×10^6 细胞/mL,大于约 176×10^6 细胞/mL,大于约 178×10^6 细胞/mL,大于约 180×10^6 细胞/mL,大于约 182×10^6 细胞/mL,大于约 184×10^6 细胞/mL,大于约 186×10^6 细胞/mL,大于约 188×10^6 细胞/mL,大于约 190×10^6 细胞/mL,大于约 192×10^6 细胞/mL,大于约 194×10^6 细胞/mL,大于约 196×10^6 细胞/mL,大于约 198×10^6 细胞/mL,或者大于约 200×10^6 细胞/mL)的活细胞密度后可进行收集。

[0152] 配制重组蛋白

[0153] 本申请所述的任何方法的一些实施方案还包括将重组蛋白(例如,收集的重组蛋白)配制成药物组合物的步骤。例如,配制可包括将药学上可接受的赋形剂添加至重组蛋白(例如,收集的重组蛋白)。配制可包括将药学上可接受的赋形剂与重组蛋白(例如,收集的重组蛋白)混合。药物可接受的赋形剂(例如,非天然存在的药物可接受的赋形剂)的实例是本领域已知的。在一些实施方案中,重组蛋白(例如,收集的重组蛋白)经配制用于静脉内、动脉内、皮下、腹膜内、或肌内施用。

实施例

[0154] 实施例1. 增加的泊洛沙姆-188浓度对于产生分泌的重组抗体的灌注细胞培养的作用

[0155] 进行这组实验以测试增加的泊洛沙姆-188浓度对于包含含有编码重组抗体的核酸的哺乳动物细胞的灌注细胞培养中的细胞生长和重组抗体产生的作用。在这些实验中, 进行第一灌注细胞培养操作, 其使用在整个培养期中含有1.8g/L的CD-CHO培养基, 并进行第二灌注细胞培养操作, 其使用在培养期中含有增加的泊洛沙姆-188浓度的CD-CHO培养基(在培养期中从1.8g/L增加至6.8g/L泊洛沙姆-188)。对于每个细胞培养操作, 在培养的12天到33天以4反应器体积(RV)/天的速率进行灌注, 在培养的33天到63天转换至6RV/天的速率, 并在培养的63天到72天转换至7RV/天的速率。使用CD-CHO培养基进行第二细胞培养操作, 所述CD-CHO培养基在培养的0天到14天含有1.8g/L泊洛沙姆-188, 在培养的15天到34天含有2.8g/L泊洛沙姆-188, 在培养的35天到39天含有3.8g/L泊洛沙姆-188, 在培养的40天到56天含有4.8g/L泊洛沙姆-188, 且在培养的57天到72天含有5.8g/L泊洛沙姆-188。

[0156] 对于第一和第二灌注培养两者使用已知方法每天确定活细胞密度、比生长速率、活细胞的百分数、体积生产率和比生产速率。

[0157] 数据显示通过在培养中建立大于1.8g/L的泊洛沙姆-188浓度实现了超过 100×10^6 细胞/mL的活细胞密度(图1)。相反, 在培养基中仅使用1.8g/L泊洛沙姆-188的第一细胞培养操作仅实现了 50×10^6 细胞/mL的活细胞密度(图1)。第二细胞培养操作的数据还显示: 甚至当细胞培养物具有大于 100×10^6 细胞/mL的活细胞密度时, 在培养中建立大于1.8g/L的泊洛沙姆-188浓度导致稳固的比生长速率(图2)。图3中的数据还显示: 与在整个培养期中使用含有1.8g/L泊洛沙姆-188的培养基的灌注细胞培养操作相比, 在培养中建立大于1.8g/L的泊洛沙姆-188浓度导致高而且稳定的活细胞百分数(在整个培养期中高于80%)(图3)。

[0158] 图4和5中的数据还显示: 以在培养期中含有增加的泊洛沙姆-188浓度(从1.8g/L增加至6.8g/L泊洛沙姆-188)的培养基进行的第二灌注细胞培养操作分别具有高的体积生产速率(大于3g/L/d)和高的比生产速率(15pg/细胞/天至42pg/细胞/天)。

[0159] 实施例2. 增加的泊洛沙姆-188浓度对于液体培养基中重组抗体的稳定性的作用

[0160] 进行一组实验以确定增加的泊洛沙姆-188浓度是否会抑制在从细胞培养物收获后的澄清的液体培养基中存在的重组蛋白的降解。在这些实验中, 进行与实施例1中所述的第二灌注细胞培养操作相似的灌注细胞培养操作, 只是在培养实现6.8g/L的泊洛沙姆-188浓度后, 将培养中的泊洛沙姆-188浓度降低至3.95g/L泊洛沙姆-188, 然后再次降低至3.0g/L泊洛沙姆-188。在这些实验中, 在如下时间点从培养物移出液体培养基的两个或三个样品: 当培养物含有6.8g/L泊洛沙姆-188时的第一时间点, 当培养物含有3.95g/L泊洛沙姆-188时的第二时间点, 和当培养物含有3.0g/L泊洛沙姆-188时的第三时间点。从每个时间点收集的一个样品存储在4°C, 从每个时间点收集的一个样品在存储于4°C之前在室温温育7天, 且对于第二和第三时间点中的每个, 对样品补充泊洛沙姆-188以在各样品中实现6.8g/L的polaxmer-188浓度, 然后将各样品在存储于4°C之前在室温温育9天。所得的未处理的和处理的样品在4-20%Bis-Tris凝胶上跑胶并用考马斯蓝(Coomassie Blue)染色。

[0161] 图6中的数据显示:含有6.8g/L、3.95g/L或3.0g/L泊洛沙姆-188的未处理的样品都显示相似的产物稳定性(泳道1、2和3)。数据还令人惊讶地显示:含有6.8g/L泊洛沙姆-188的样品在于室温温育7天后不显示大量的降解,而含有3.0g/L或3.95g/L泊洛沙姆-188的样品两者在相同的温育后显示可检测的降解(图6;泳道1a、2a和3a)。数据还证明:将泊洛沙姆-188添加至含有低泊洛沙姆-188的样品不改进产物稳定性(图6;泳道2b和3b)。这些数据显示:在培养中使用大于1.8g/L的泊洛沙姆-188浓度可减少或抑制培养物中重组蛋白的降解,并指示:泊洛沙姆-188可通过提供更健康的细胞培养而实现此效果。

[0162] 实施例3. 喷雾器孔类型和孔径对于实现对于细胞培养物生长和产率(Productivity)的有益作用所需的泊洛沙姆-188量的作用

[0163] 进行一组实验以测试喷雾器孔类型和孔径对于在灌注细胞培养中实现有益的生长和产率性质所需的泊洛沙姆-188量的作用。在这些实验中,使用不同的喷雾器进行不同的灌注细胞培养操作:具有20 μ m的孔径的烧结孔的喷雾器(1反应器);具有200 μ m的孔径的钻孔的喷雾器(2反应器);或具有500 μ m的孔径的钻孔的喷雾器(1反应器)。各灌注培养初始使用含有1.8g/L泊洛沙姆-188的CD CHO培养基,并以渐增的增量将泊洛沙姆-188添加至培养物以维持细胞存活率并使细胞裂解根据需要最小化。使用已知方法在培养期过程中的不同时间点进行各细胞培养的活细胞密度、比生长速率、比乳酸脱氢酶产生速率、活细胞百分数、体积生产速率和有氧葡萄糖消耗(的测定)。

[0164] 数据显示:培养物中3.8g/L的泊洛沙姆-188浓度能够在使用具有500 μ m的孔径的钻孔的喷雾器进行的灌注细胞培养操作中维持活细胞密度,培养物中4.8g/L的泊洛沙姆-188浓度能够在使用具有200 μ m的孔径的钻孔的喷雾器进行的灌注细胞培养操作中维持活细胞密度,且培养物中5.8g/L的泊洛沙姆-188浓度能够在使用具有20 μ m的孔径的烧结孔的喷雾器进行的灌注细胞培养操作中维持活细胞密度(图7)。

[0165] 数据还显示:对于使用3.8g/L泊洛沙姆-188和具有500 μ m的孔径的钻孔的喷雾器进行的灌注细胞培养操作,使用4.8g/L泊洛沙姆-188和具有200 μ m的孔径的烧结孔的喷雾器进行的灌注细胞培养操作,和使用5.8g/L泊洛沙姆-188和具有20 μ m的孔径的烧结孔的喷雾器进行的灌注细胞培养操作实现了相似的比生长速率(图8)、比乳糖脱氢酶生产速率(图9和11)、活细胞百分数(图10)、体积生产速率(图12)和有氧葡萄糖消耗速率(图13)。

[0166] 数据显示:当泊洛沙姆-188以大于1.8g/L的浓度存在于培养物中时,所有测试的喷雾器可用于实现 60×10^6 细胞/mL的活细胞密度。例如,在如下中实现了大于 60×10^6 细胞/mL的活细胞密度:通过在培养物中使用2.8g/L泊洛沙姆-188使用具有1mm的孔径的钻孔的喷雾器的灌注细胞培养操作,通过在培养物中使用3.8g/L泊洛沙姆-188使用具有500 μ m的孔径的钻孔的喷雾器的灌注细胞培养操作,通过在培养物中使用4.8g/L泊洛沙姆-188使用具有200 μ m的孔径的钻孔的喷雾器的灌注细胞培养操作,通过在培养物中使用3.8g/L泊洛沙姆-188使用具有100 μ m的孔径的烧结孔的喷雾器的灌注细胞培养操作,和通过在培养物中使用5.8g/L泊洛沙姆-188使用具有20 μ m的孔径的烧结孔的喷雾器的灌注细胞培养操作。数据指示孔径越小,需要越多的泊洛沙姆-188以维持健康的培养。

[0167] 实施例4. 喷雾器孔类型、孔径和消泡剂对泊洛沙姆-188比例对于灌注培养细胞生长的作用

[0168] 进行另外的一组实验以确定在培养中使用具有不同孔类型和孔径的喷雾器和不

同的消泡剂对泊洛沙姆-188比例的灌注培养中的稳态细胞生长(下表1中所示)。

[0169] 表1中的数据显示:较小的孔径要求需要将较多的消泡剂-c添加至培养物以减轻泡沫的生成,随着喷雾速率增加需要另外的消泡剂-c,且消泡剂-c对泊洛沙姆-188的最佳比例可为0-5% (例如,约1%至约3%)。

[0170] 表1. 测试的灌注培养实现的稳态活细胞密度

[0171]

Expt	喷雾器类型	稳态活细胞密度 (10e ⁶ 细胞/mL)	另外的普卢兰尼克 (Pluronic) (g/L) (CD-CHO = 1.8 g/L)	消泡剂添加速率 (ppm/天)	消泡剂添加对总普卢兰尼克比例 (%/天)	喷雾器速率 (气体体积/分钟对反应器的体积)	消泡剂添加对喷雾速率比例 (ppm)	灌注速率 (RV/天)
2	20 μ m 钴孔	60	4	43	0.7	0.03	1	4
1	100 μ m 烧结	110	4	160	2.8	0.43	0.26	6
2	200 μ m 钴孔	60	3	77-116	1.6-2.4	0.16-0.19	0.33-0.42	4
2	500 μ m 钴孔	60	2	69	1.8	0.15	0.32	4
1	1 mm 钴孔	65	1	64	2.3	0.69	0.06	4

[0172] 实施例5. 消泡剂-c对泊洛沙姆-188比例对于分批细胞培养操作中的细胞生长的作用

[0173] 进行了一组实验以测试消泡剂-c对泊洛沙姆-188比例对于使用CD-CHO培养基的分批摇瓶细胞培养操作中的细胞生长的作用,所述CD-CHO培养基含有0%消泡剂-c对泊洛沙姆-188比例、5.6%消泡剂-c对泊洛沙姆-188比例、11.1%消泡剂-c对泊洛沙姆-188比例、27.8%消泡剂-c对泊洛沙姆-188比例或55.6%消泡剂-c对泊洛沙姆-188比例。对摇瓶细胞培养物加挡板以被动地生成气泡以刺激生物反应器。使用已知方法在培养期中每天确定每个细胞培养操作中的活细胞密度和比乳酸脱氢酶生产速率。

[0174] 数据显示:较低的消泡剂-c对泊洛沙姆-188比例显示改进的活细胞密度(图14)和较低的比乳酸脱氢酶生产速率(图15)。这些数据进一步表明培养中消泡剂-c对泊洛沙姆-188的最佳比例为0-小于约5% (例如,约1%-约3%)。

[0175] 其他实施方案

[0176] 可理解的是虽然以结合其详细描述描述了本发明,但上述描述意欲说明而不是限制本发明的范围,所述范围由所附权利要求的范围限定。其他的方面、优势和修饰均在所附权利要求的范围之内。

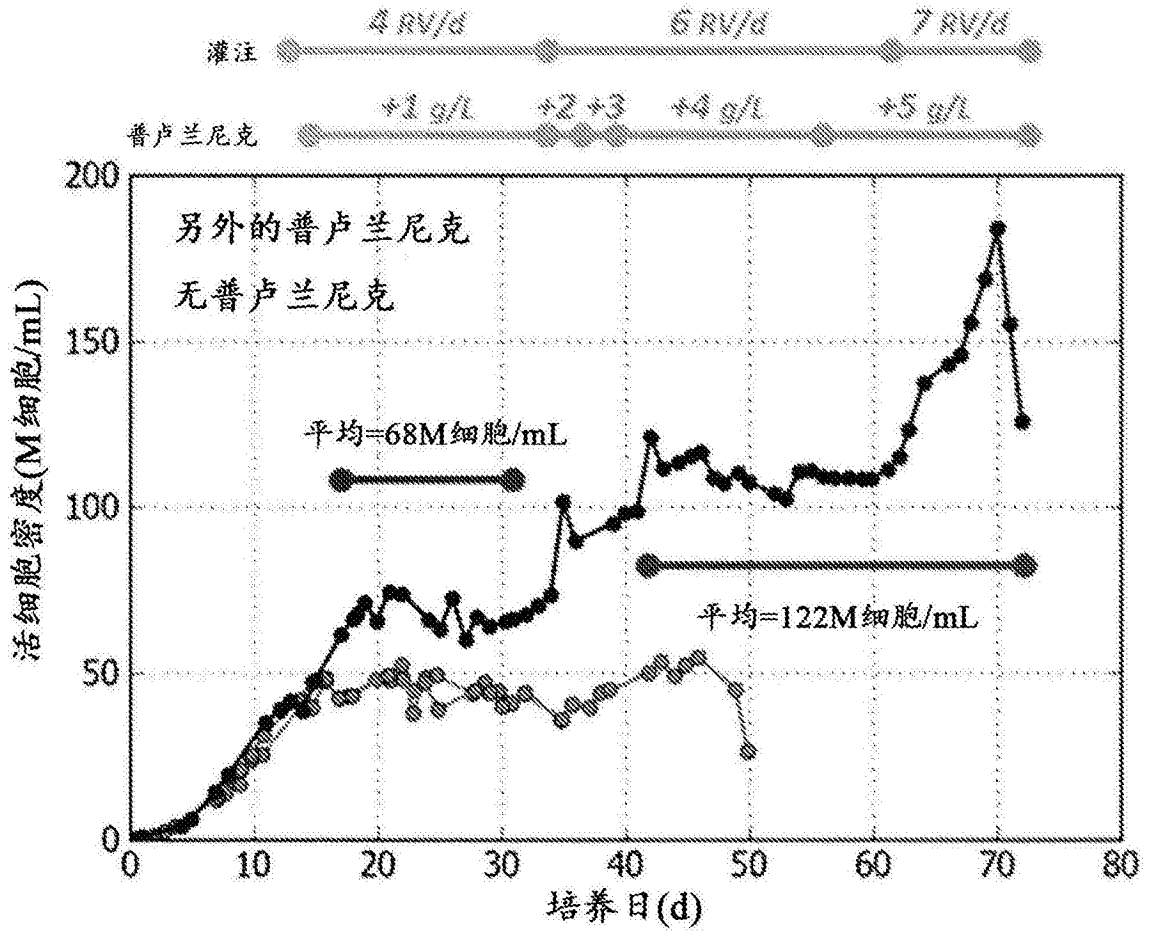


图1

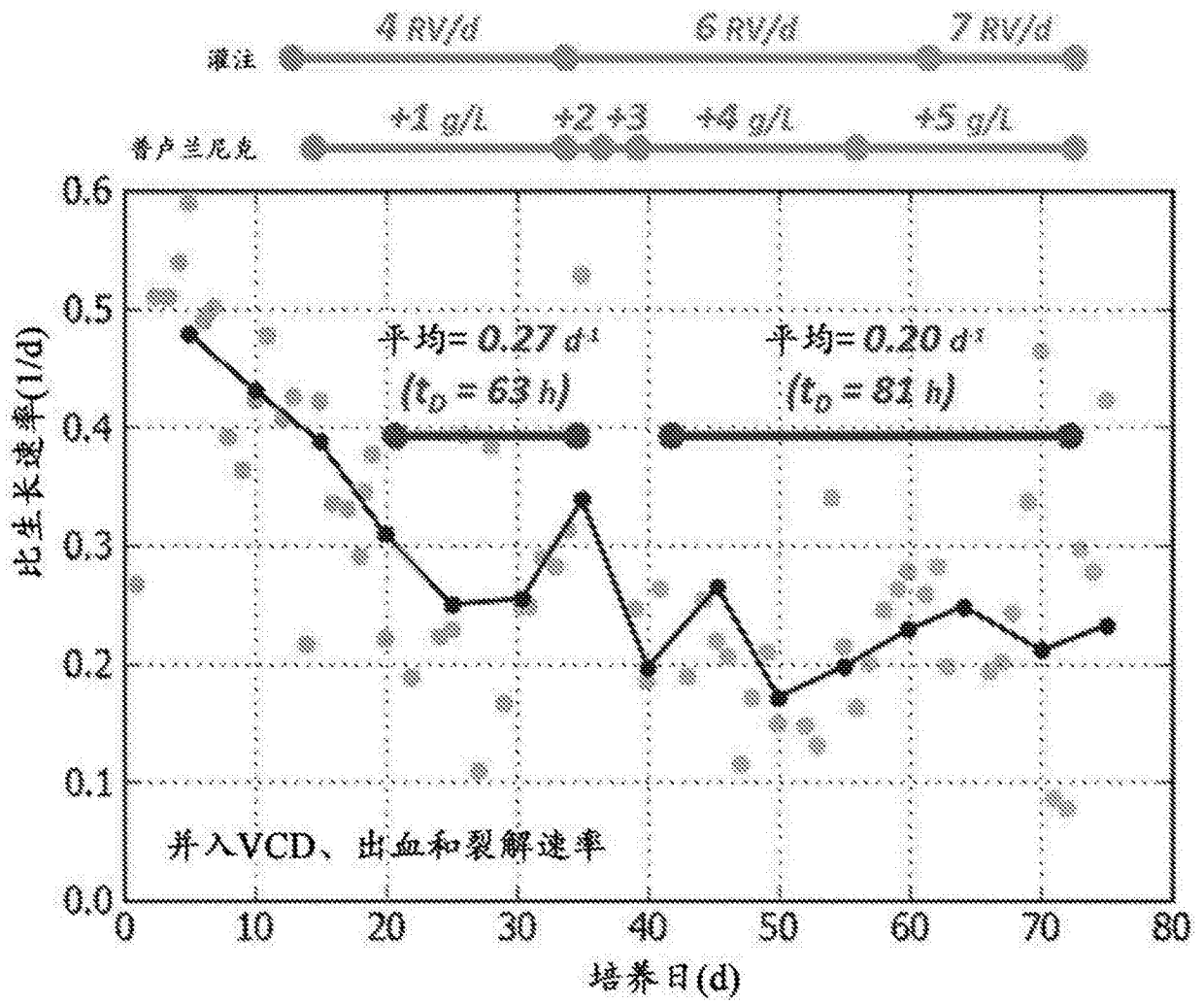


图2

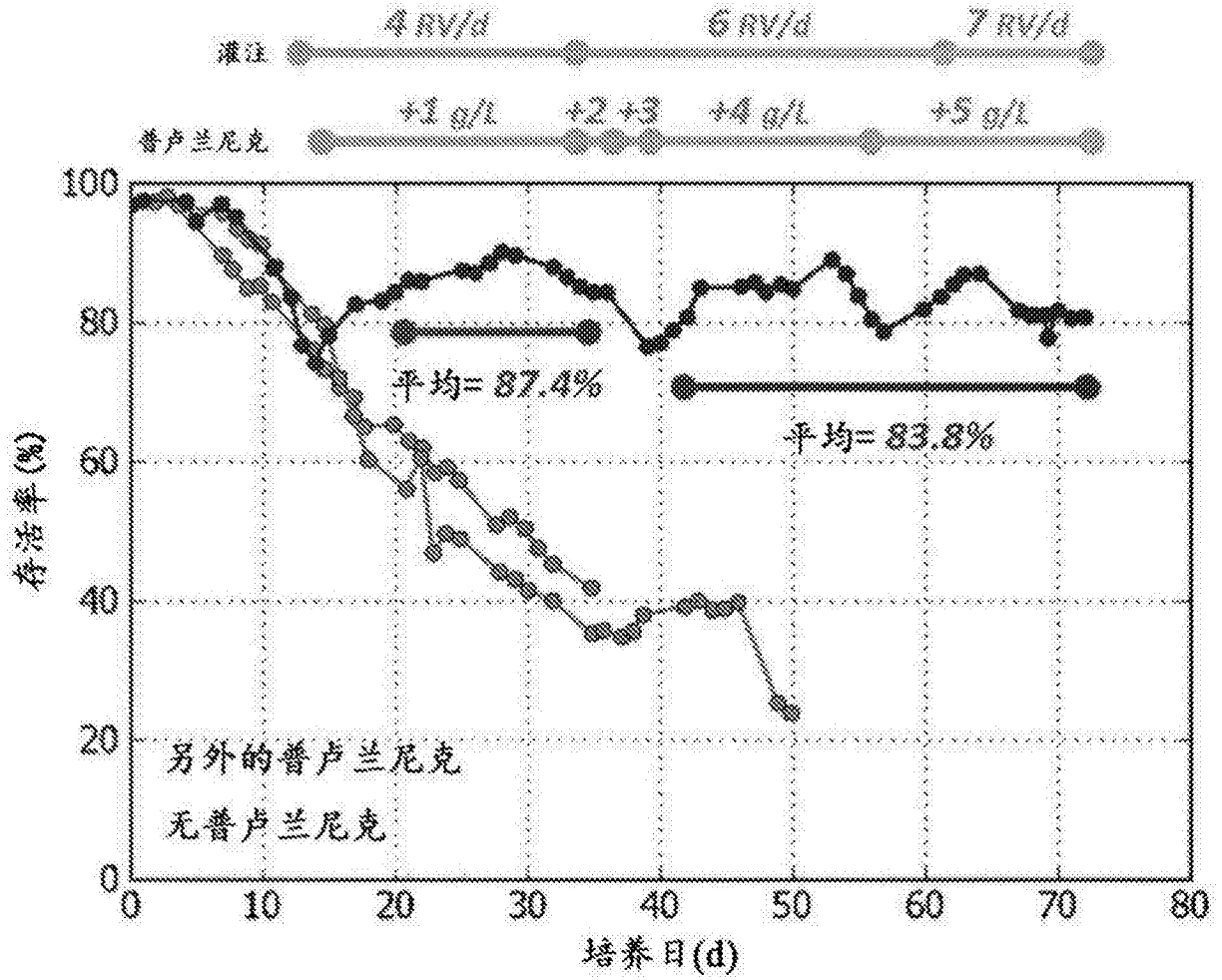


图3

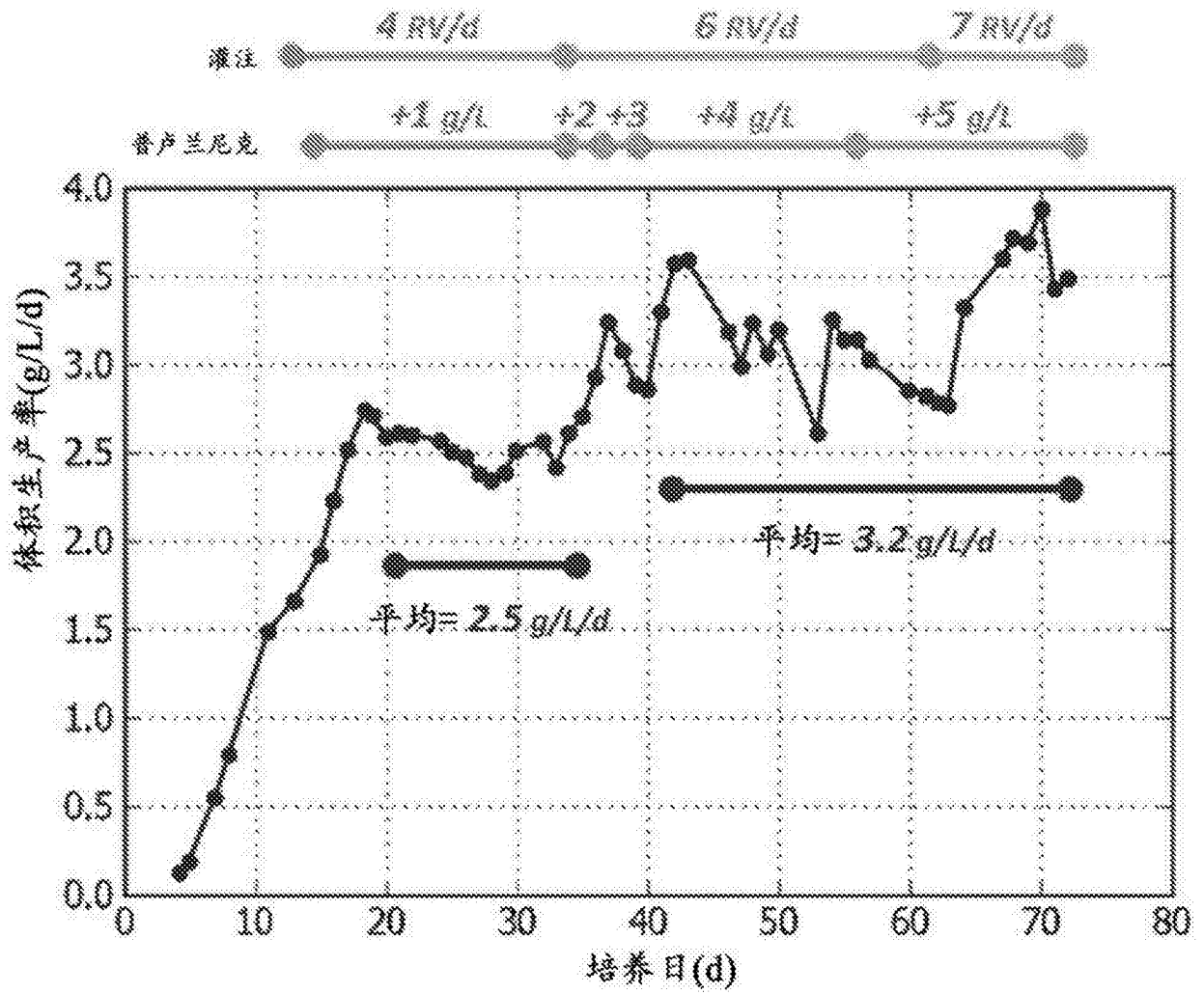


图4

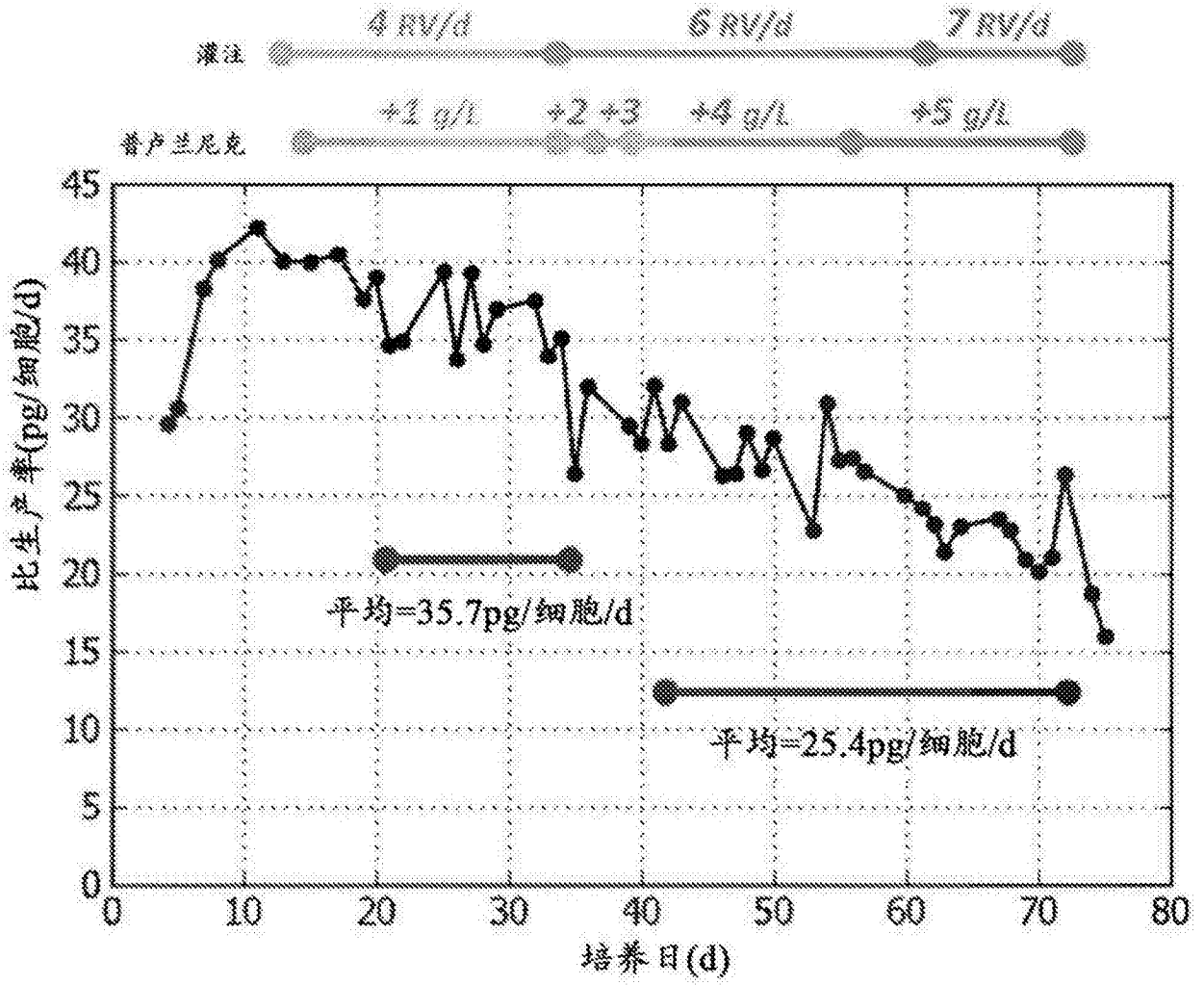


图5

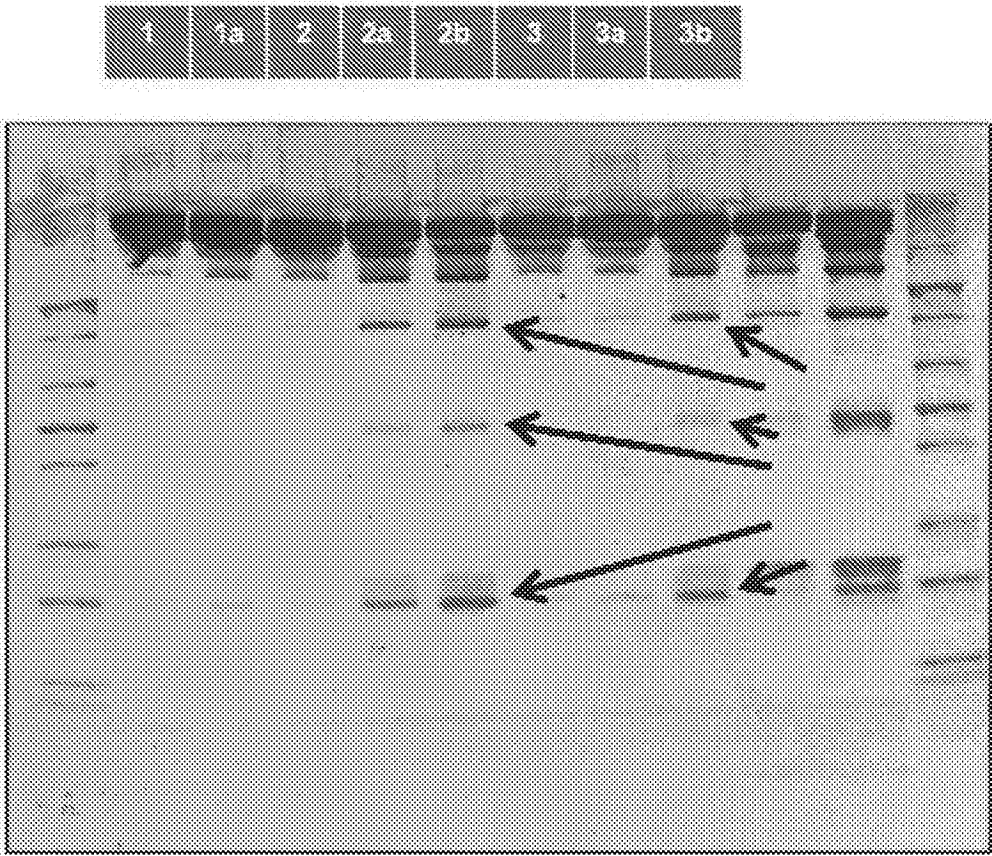


图6

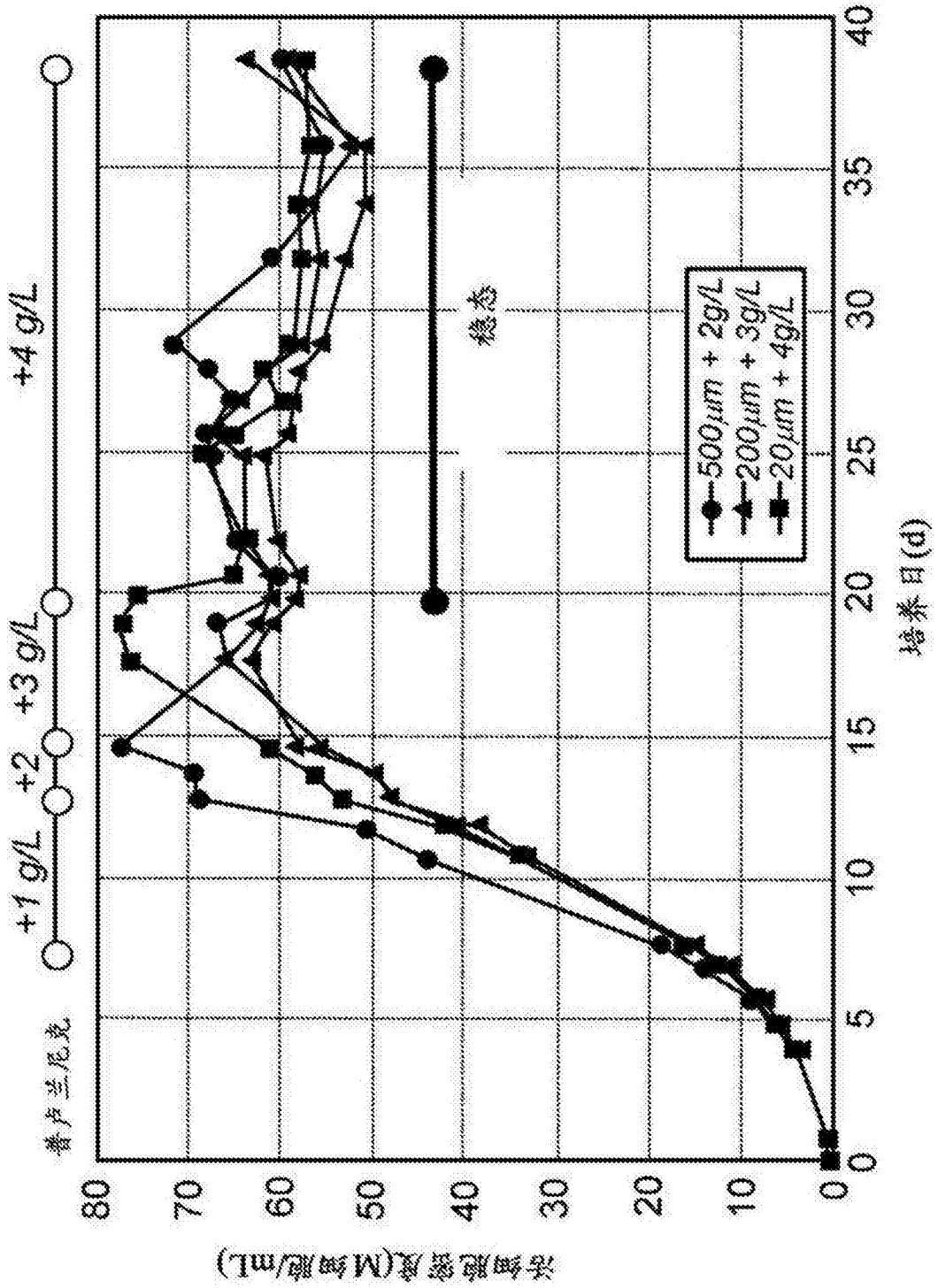


图7

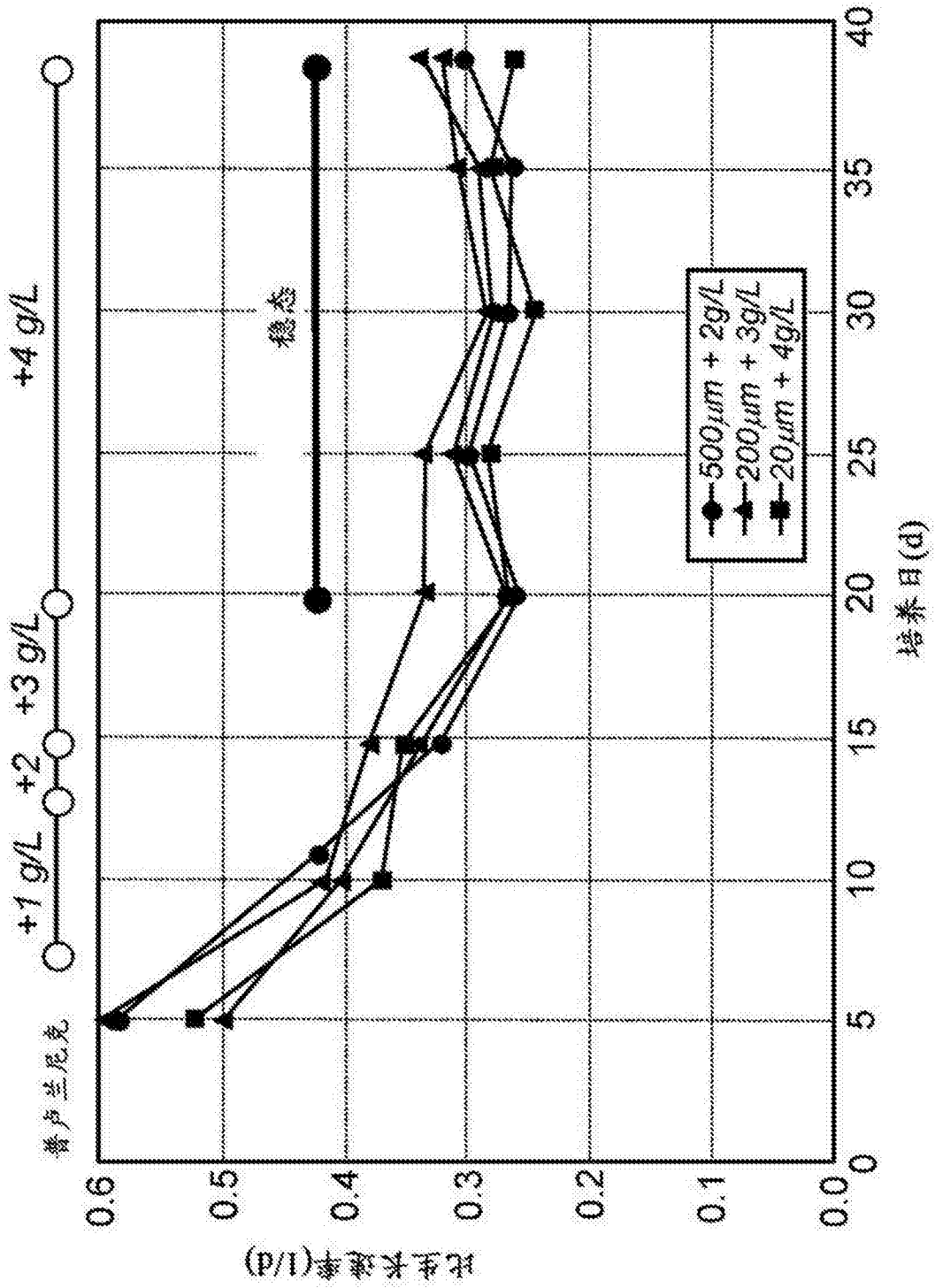


图8

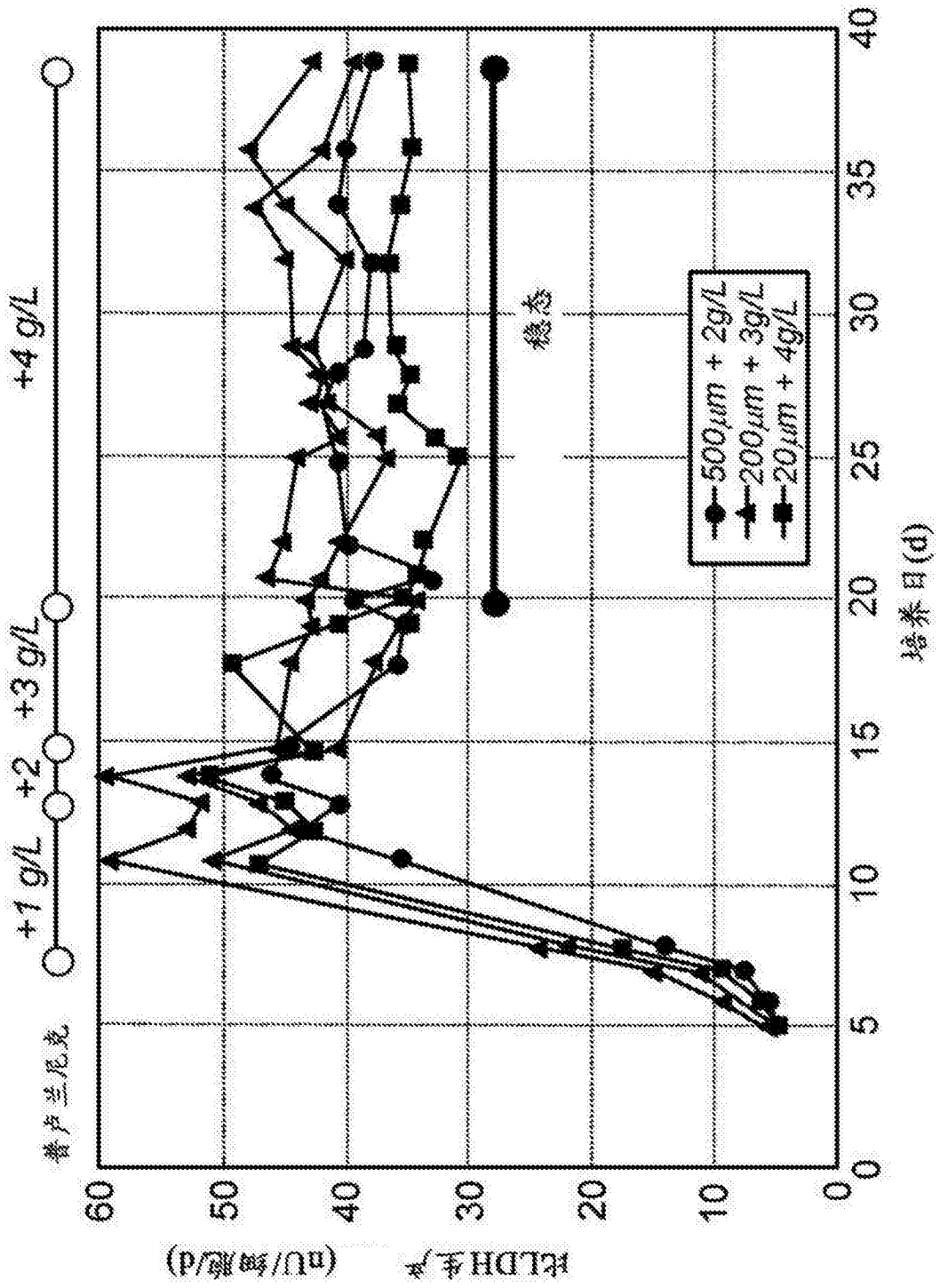


图9

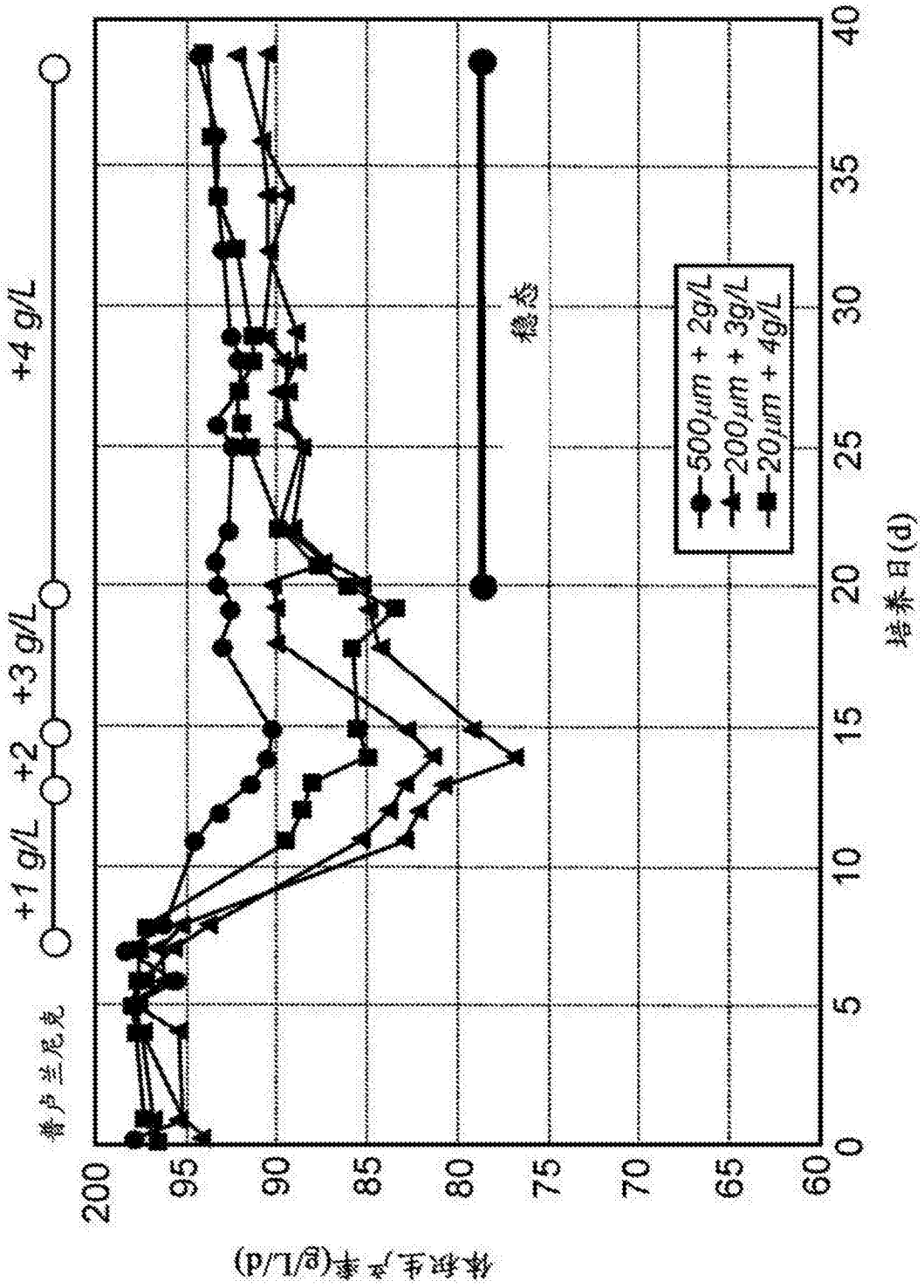


图10

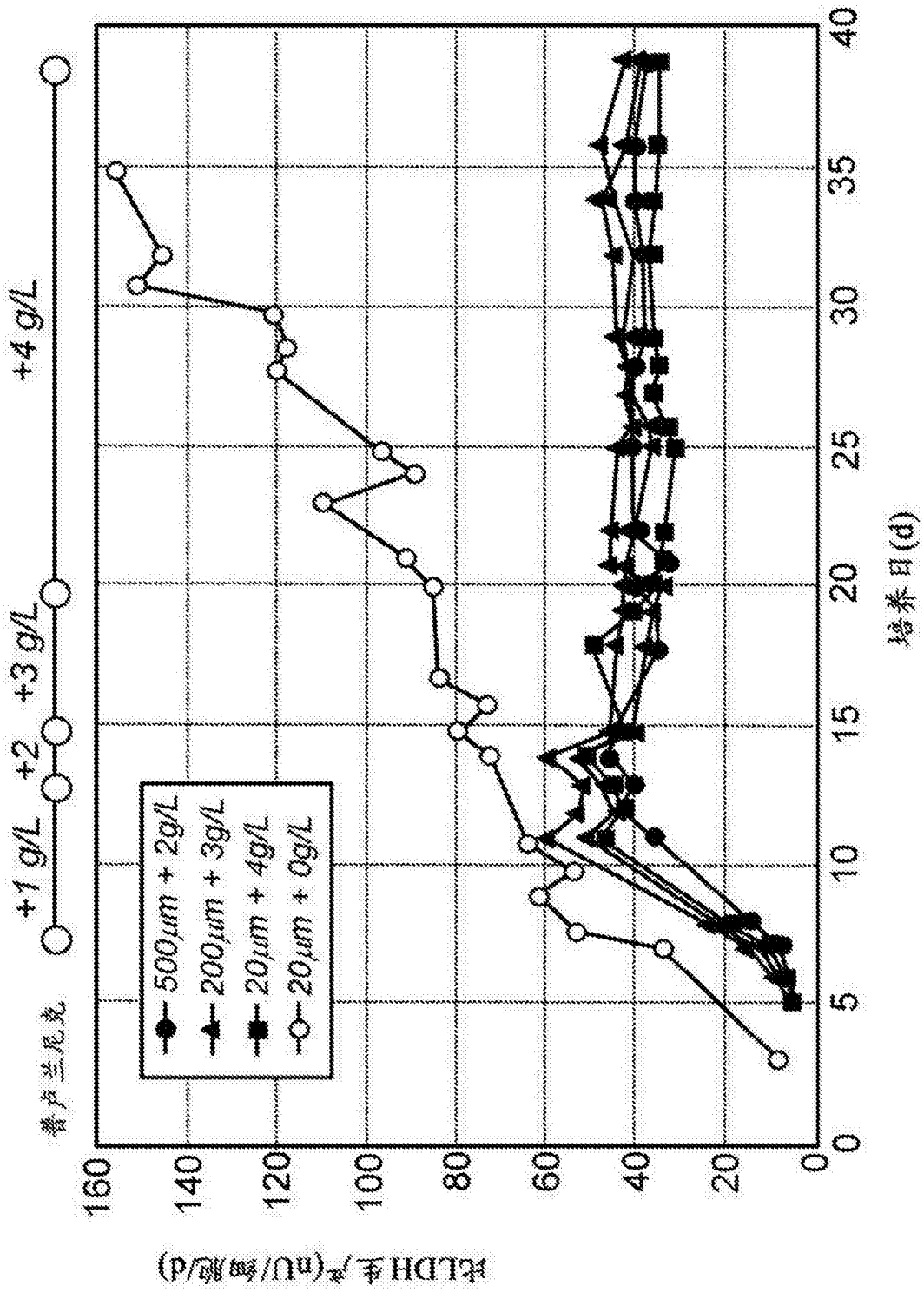


图11

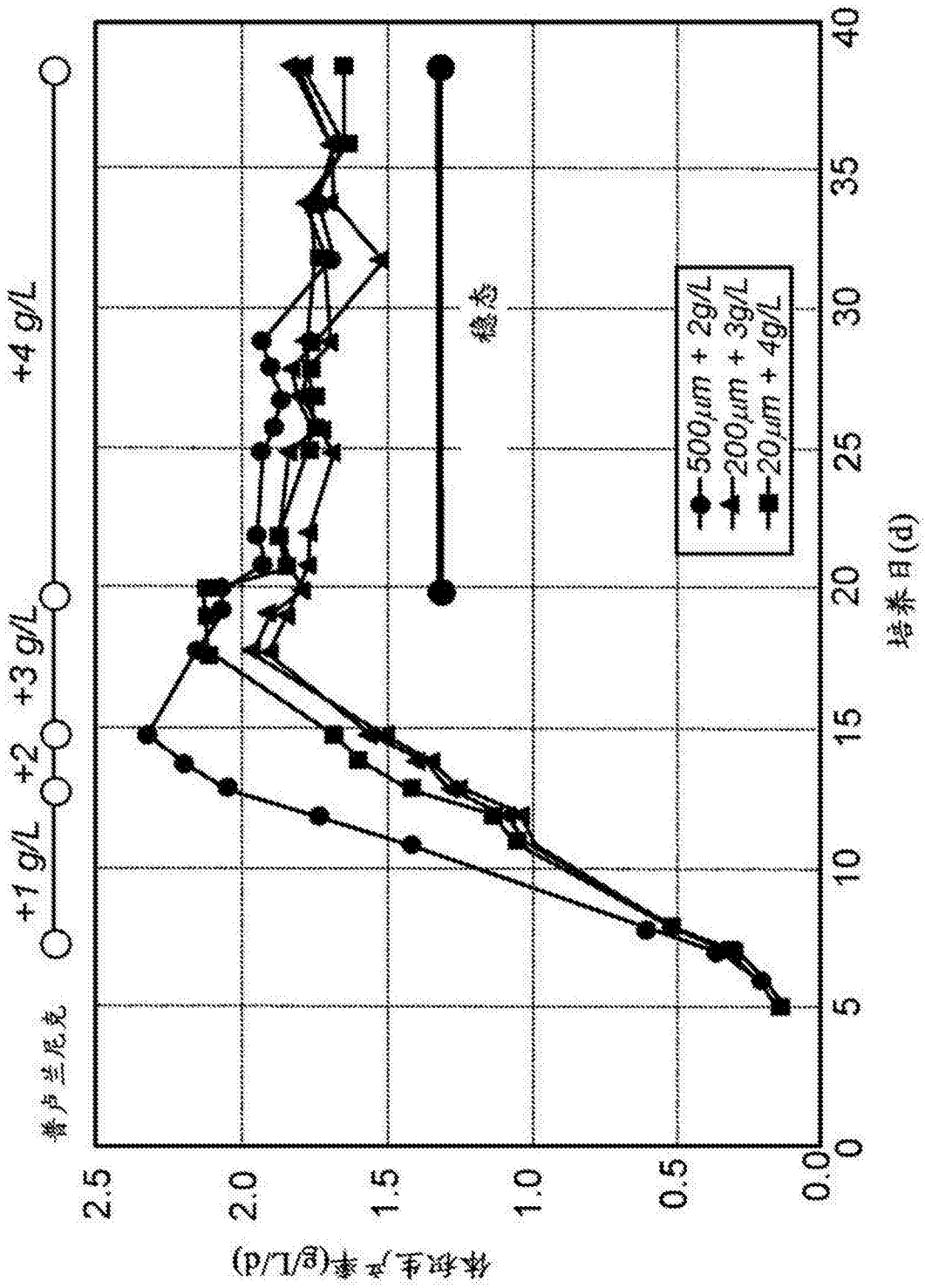


图12

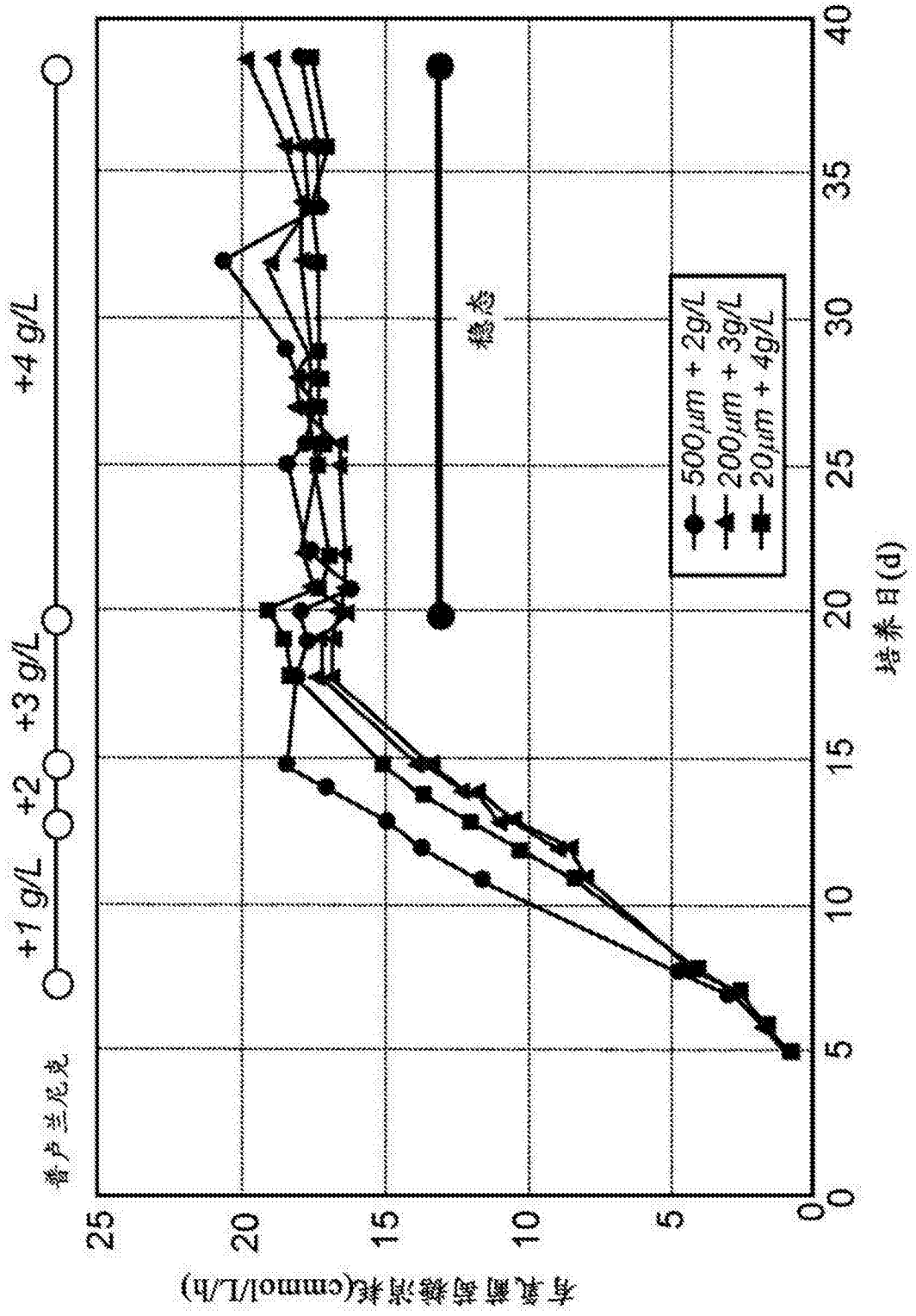


图13

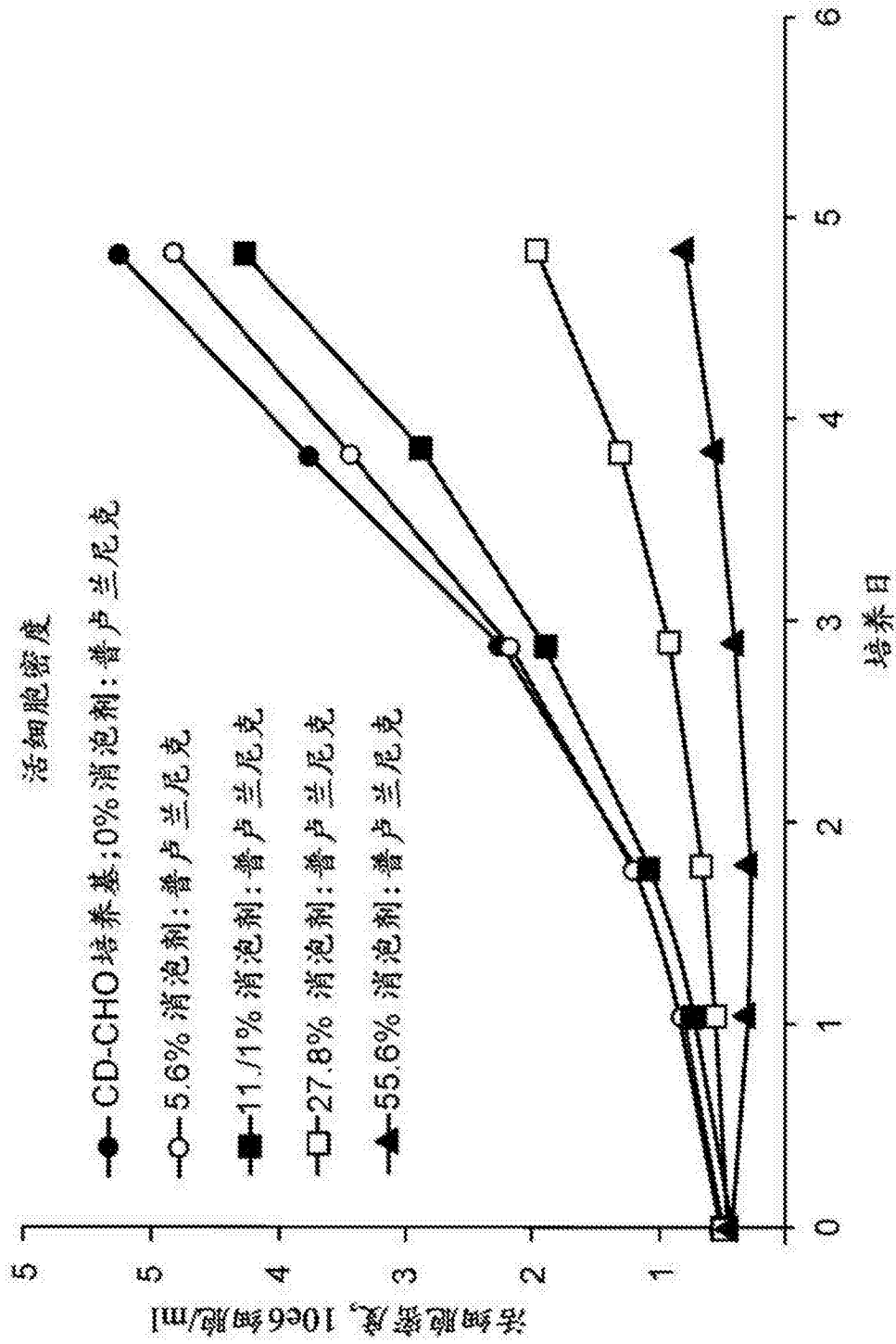


图14

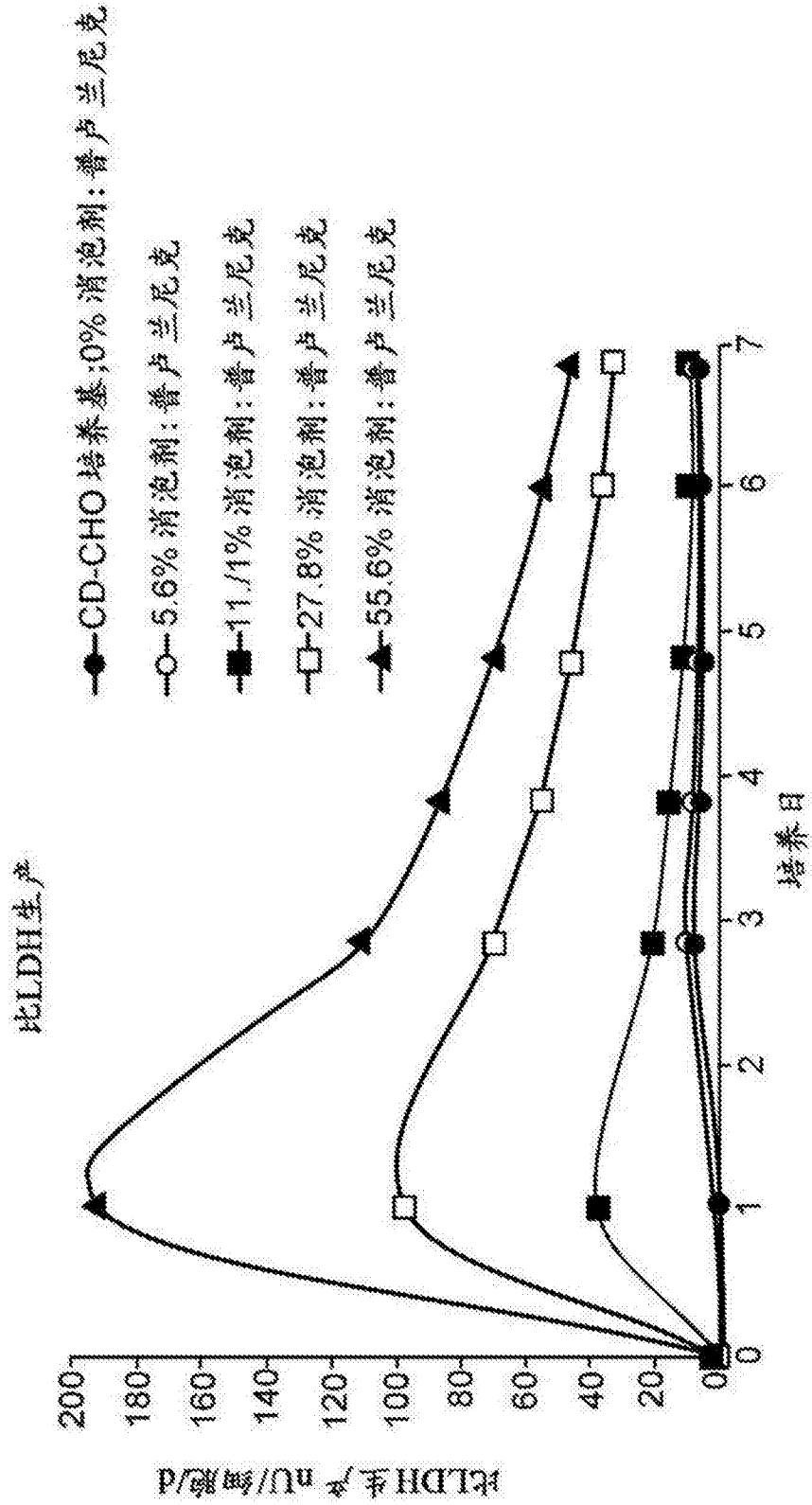


图15