(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 112136045 B
(45)授权公告日 2024.12.13

(21)申请号 201980031298.3
(22)申请日 2019.03.15
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112136045 A
(43)申请公布日 2020.12.25
(30)优先权数据
62/644,339 2018.03.16 US
62/645,755 2018.03.20 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.11.09
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/022530 2019.03.15
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/178508 EN 2019.09.19

(73)专利权人 建新公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 J·王 N·沙 J·沃尔特 陆久怡 T·约翰逊 任玉坤 J·麦卡蒂
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

(51)Int.Cl.
C12N 5/00(2006.01)
G01N 33/50(2006.01)
C12M 1/34(2006.01)
(56)对比文件
US 2016177361 A1,2016.06.23
审查员 郑晓莉

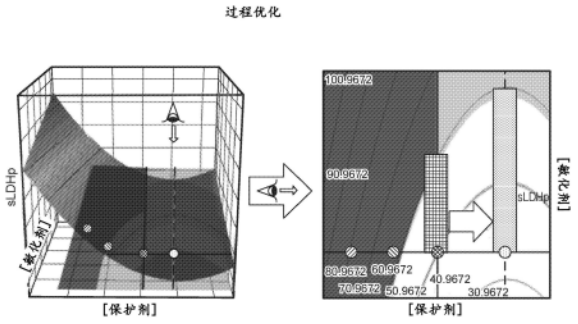
权利要求书5页 说明书65页 附图12页

(54)发明名称

提高生产生物反应器中的细胞活力的方法

(57)摘要

本文提供了预测敏化剂浓度对生产生物反应器中的细胞活力的影响的方法、提高生产生物反应器中的细胞活力的方法、预测生产生物反应器中的细胞活力的方法以及用于在生产生物反应器中培养细胞的方法。



CN 112136045 B

1.一种预测消泡剂浓度对生产生物反应器中的细胞活力的影响的方法,所述方法包括:

(a) 在测试培养容器中测定多个测试条件下的细胞活力,其中所述多个测试条件由一组参数定义,其中所述的一组参数包括剪切应力、消泡剂的浓度和保护剂的浓度,其中所述保护剂是泊洛沙姆或泊洛沙胺,并且其中基于全因子设计和/或内切中心复合设计选择所述多个测试条件;

(b) 基于所述多个测试条件下所述测试培养容器中的细胞活力,预测所述消泡剂的浓度对生产生物反应器中的细胞活力的影响;以及

(c) 使用一定浓度的消泡剂在所述生产生物反应器中培养细胞,其中步骤(c)中所述消泡剂的浓度被预测为导致:

在所述生产生物反应器中培养所述细胞的过程中低于每天40%的比细胞死亡率,其中所述比细胞死亡率为比LDH产量与每个细胞的LDH含量的比值;

在所述生产生物反应器中培养所述细胞的过程中低于150 nU/细胞/天的细胞比LDH产量,其中所述细胞比LDH产量为每个细胞每天生产的LDH的酶量;或

在所述生产生物反应器中培养所述细胞的过程中大于每天1%的表观生长率,其中所述表观生长率为计算的死亡率加上生长率的总和。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述消泡剂是基于二甲基硅油的消泡剂或二甲基硅油。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述测试培养容器的体积为5 mL至5 L。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述测试培养容器的体积为10 mL至500 mL。

5.根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述测试培养容器是带挡板的摇瓶。

6. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述生产生物反应器的体积为5 L至20000 L。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述生产生物反应器的体积为50 L至10000 L。

8.根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述生产生物反应器是灌注生物反应器。

9.根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述生产生物反应器是补料分批生物反应器。

10.根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述浓度的消泡剂被预测在所述生产生物反应器中培养所述细胞的过程中具有低于每天40%的比细胞死亡率。

11.根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述浓度的消泡剂被预测在所述生产生物反应器中培养所述细胞的过程中具有低于每天20%的比细胞死亡率。

12. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述浓度的消泡剂被预测在所述生产生物反应器中培养所述细胞的过程中导致低于150 nU/细胞/天的细胞比LDH产量。

13. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述浓度的消泡剂被预测在所述生产生物反应器中培养所述细胞的过程中导致低于100 nU/细胞/天的细胞比LDH产量。

14.根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述浓度的消泡剂被预测在所述生产生物反应器中培养所述细胞的过程中导致大于每天1%的表观生长率。

15.根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述浓度的消泡剂被预测在所述生产生物反应器中培养所述细胞的过程中导致大于每天5%的表观生长率。

16.根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述细胞含有编码重组治疗性蛋白的核酸。

17.根据权利要求16所述的方法,其还包括收集所述重组治疗性蛋白。

18.根据权利要求17所述的方法,其还包括纯化所述重组治疗性蛋白。

19.根据权利要求18所述的方法,其还包括配制所述纯化的重组治疗性蛋白。

20.根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述细胞是细菌、酵母或哺乳动物细胞。

21.根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中通过测量所述测试培养容器中的乳酸脱氢酶浓度来测定细胞活力。

22.根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述测试培养容器是带挡板的摇瓶并且所述多个测试条件包括以下中的一个或多个:

(a) 125 RPM至400 RPM的旋转搅拌;

(b) 0 ppm至120 ppm的消泡剂浓度;和

(c) 1 g/L至10 g/L的保护剂浓度。

23.根据权利要求1或2所述的方法,其中所述泊洛沙姆是泊洛沙姆-188、泊洛沙姆-401、泊洛沙姆-402、泊洛沙姆-407或普朗尼克多元醇。

24.根据权利要求1或2所述的方法,其中所述泊洛沙胺是泊洛沙胺-904或泊洛沙胺-908。

25.一种选择参数以提高生产生物反应器中的细胞活力的方法,所述方法包括:

(a) 在测试培养容器中测定多个测试条件下的细胞活力,其中所述多个条件由一组参数定义,其中所述的一组参数包括剪切应力、消泡剂的浓度和保护剂的浓度,其中所述保护剂是泊洛沙姆或泊洛沙胺,并且其中基于全因子设计和/或内切中心复合设计选择所述多个测试条件;

(b) 基于所述多个测试条件下所述测试培养容器中的细胞活力,选择对于生产生物反应器中的细胞活力最佳的条件;以及

(c) 在所选择的条件下在所述生产生物反应器中培养细胞以导致:

在所述生产生物反应器中培养所述细胞的过程中低于每天40%的比细胞死亡率,其中所述比细胞死亡率为比LDH产量与每个细胞的LDH含量的比值;

在所述生产生物反应器中培养所述细胞的过程中低于150 nU/细胞/天的细胞比LDH产量,其中所述细胞比LDH产量为每个细胞每天生产的LDH的酶量;或

在所述生产生物反应器中培养所述细胞的过程中大于每天1%的表观生长率,其中所述表观生长率为计算的死亡率加上生长率的总和。

26.根据权利要求25所述的方法,其中所述消泡剂是基于二甲基硅油的消泡剂或二甲基硅油。

27. 根据权利要求25或权利要求26所述的方法,其中所述测试培养容器的体积为5 mL至5 L。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中所述测试培养容器的体积为10 mL至500 mL。

29.根据权利要求25或权利要求26所述的方法,其中所述测试培养容器是带挡板的摇瓶。

30. 根据权利要求25或权利要求26所述的方法,其中所述生产生物反应器的体积为5 L至20000 L。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中所述生产生物反应器的体积为50 L至10000 L。

32.根据权利要求25或权利要求26所述的方法,其中所述生产生物反应器是灌注生物反应器。

33.根据权利要求25或权利要求26所述的方法,其中所述生产生物反应器是补料分批生物反应器。

34.根据权利要求25所述的方法,其中步骤(c)在所述生产生物反应器中培养所述细胞的过程中导致低于每天40%的比细胞死亡率。

35.根据权利要求25所述的方法,其中步骤(c)在所述生产生物反应器中培养所述细胞的过程中导致低于每天20%的比细胞死亡率。

36. 根据权利要求25所述的方法,其中步骤(c)在所述生产生物反应器中培养所述细胞的过程中导致低于150 nU/细胞/天的细胞比LDH产量。

37. 根据权利要求25所述的方法,其中步骤(c)在所述生产生物反应器中培养所述细胞的过程中导致低于100 nU/细胞/天的细胞比LDH产量。

38.根据权利要求25所述的方法,其中步骤(c)在所述生产生物反应器中培养所述细胞的过程中导致大于每天1%的表观生长率。

39.根据权利要求25所述的方法,其中步骤(c)在所述生产生物反应器中培养所述细胞的过程中导致大于每天5%的表观生长率。

40.根据权利要求34-39中任一项所述的方法,其中所述细胞含有编码重组治疗性蛋白的核酸。

41.根据权利要求40所述的方法,其还包括收集所述重组治疗性蛋白。

42.根据权利要求41所述的方法,其还包括纯化所述重组治疗性蛋白。

43.根据权利要求42所述的方法,其还包括配制所述纯化的重组治疗性蛋白。

44.根据权利要求25-26和34-39中任一项所述的方法,其中所述细胞是细菌、酵母或哺乳动物细胞。

45.根据权利要求25-26和34-39中任一项所述的方法,其中通过测量所述测试培养容器中的乳酸脱氢酶浓度来测定细胞活力。

46.根据权利要求25-26和34-39中任一项所述的方法,其中所述测试培养容器是带挡板的摇瓶并且所述多个测试条件包括以下中的一个或多个:

(a) 125 RPM至400 RPM的旋转搅拌;

(b) 0 ppm至120 ppm的消泡剂浓度;和

(c) 1 g/L至10 g/L的保护剂浓度。

47.根据权利要求25或26所述的方法,其中所述泊洛沙姆是泊洛沙姆-188、泊洛沙姆-401、泊洛沙姆-402、泊洛沙姆-407或普朗尼克多元醇。

48.根据权利要求25或26所述的方法,其中所述泊洛沙胺是泊洛沙胺-904或泊洛沙胺-908。

49.一种用于预测生产生物反应器中的细胞活力的方法,所述方法包括:

(a) 选择包括至少两个参数的一组参数;

(b) 在测试培养容器中测定通过所述的一组参数所定义的多个测试条件下的细胞活力,其中所述的一组参数包括剪切应力、消泡剂的浓度和保护剂的浓度,其中所述保护剂是泊洛沙姆或泊洛沙胺,并且其中基于全因子设计和/或内切中心复合设计选择所述多个测试条件;

(c) 基于所述多个测试条件下所述测试培养容器中的细胞活力,预测所述生产生物反应器中的细胞活力;以及

(d) 使用条件在所述生产生物反应器中培养细胞,其中步骤(d)中的所述条件被预测为导致:

在所述生产生物反应器中培养所述细胞的过程中低于每天40%的比细胞死亡率,其中所述比细胞死亡率为比LDH产量与每个细胞的LDH含量的比值;

在所述生产生物反应器中培养所述细胞的过程中低于150 nU/细胞/天的细胞比LDH产量,其中所述细胞比LDH产量为每个细胞每天生产的LDH的酶量;或

在所述生产生物反应器中培养所述细胞的过程中大于每天1%的表观生长率,其中所述表观生长率为计算的死亡率加上生长率的总和。

50.根据权利要求49所述的方法,其中所述消泡剂是基于二甲基硅油的消泡剂或二甲基硅油。

51. 根据权利要求49或权利要求50所述的方法,其中所述测试培养容器的体积为5 mL至5 L。

52. 根据权利要求51所述的方法,其中所述测试培养容器的体积为10 mL至500 mL。

53.根据权利要求49或权利要求50所述的方法,其中所述测试培养容器是带挡板的摇瓶。

54. 根据权利要求49或权利要求50所述的方法,其中所述生产生物反应器的体积为5 L至20000 L。

55. 根据权利要求54所述的方法,其中所述生产生物反应器的体积为50 L至10000 L。

56.根据权利要求49或权利要求50所述的方法,其中所述生产生物反应器是灌注生物反应器。

57.根据权利要求49或权利要求50所述的方法,其中所述生产生物反应器是补料分批生物反应器。

58.根据权利要求49所述的方法,其中所述条件被预测在所述生产生物反应器中培养所述细胞的过程中导致低于每天40%的比细胞死亡率。

59.根据权利要求49所述的方法,其中所述条件被预测在所述生产生物反应器中培养所述细胞的过程中导致低于每天20%的比细胞死亡率。

60. 根据权利要求49所述的方法,其中所述条件被预测在所述生产生物反应器中培养所述细胞的过程中导致低于150 nU/细胞/天的细胞比LDH产量。

61. 根据权利要求49所述的方法,其中所述条件被预测在所述生产生物反应器中培养所述细胞的过程中导致低于100 nU/细胞/天的细胞比LDH产量。

62.根据权利要求49所述的方法,其中所述条件被预测在所述生产生物反应器中培养

所述细胞的过程中导致大于每天1%的表观生长率。

63.根据权利要求49所述的方法,其中所述条件被预测在所述生产生物反应器中培养所述细胞的过程中导致大于每天5%的表观生长率。

64.根据权利要求58-63中任一项所述的方法,其中所述细胞含有编码重组治疗性蛋白的核酸。

65.根据权利要求64所述的方法,其还包括收集所述重组治疗性蛋白。

66.根据权利要求65所述的方法,其还包括纯化所述重组治疗性蛋白。

67.根据权利要求66所述的方法,其还包括配制所述纯化的重组治疗性蛋白。

68.根据权利要求49-50和58-63中任一项所述的方法,其中所述细胞是细菌、酵母或哺乳动物细胞。

69.根据权利要求49-50和58-63中任一项所述的方法,其中通过测量所述测试培养容器中的乳酸脱氢酶浓度来测定细胞活力。

70.根据权利要求49-50和58-63中任一项所述的方法,其中所述测试培养容器是带挡板的摇瓶并且所述多个测试条件包括以下中的一个或多个:

(a) 125 RPM至400 RPM的旋转搅拌;

(b) 0 ppm至120 ppm的消泡剂浓度;和

(c) 1 g/L至10 g/L的保护剂浓度。

71.根据权利要求70所述的方法,其中所述泊洛沙姆是泊洛沙姆-188、泊洛沙姆-401、泊洛沙姆-402、泊洛沙姆-407或普朗尼克多元醇。

72.根据权利要求70所述的方法,其中所述泊洛沙胺是泊洛沙胺-904或泊洛沙胺-908。

提高生产生物反应器中的细胞活力的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年3月16日提交的美国临时专利申请序列号62/644,339和2018年3月20日提交的美国临时专利申请序列号62/645,755的优先权;将这些申请中的每一个的全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本公开文本涉及提高生产生物反应器中的细胞活力的方法以及生物技术和细胞生物学领域。

背景技术

[0004] 过程强化为重组治疗性蛋白的生产提供了许多优势。过程强化的策略之一是维持高细胞密度以改善重组蛋白生产,这还需要高需氧量。生产生物反应器中的氧气喷射导致在生产生物反应器中发泡。发泡通常发生在强化补料分批和灌注过程中。因此,在这些过程中通常添加消泡剂。然而,消泡剂的添加和积累可能使细胞变得对剪切敏感,从而导致细胞死亡增加。

[0005] 因此,需要开发一种模型以表征在生产生物反应器中各种细胞培养参数(例如,剪切、培养基组分和添加剂以及消泡剂浓度)之间可接受的细胞培养条件。

发明内容

[0006] 本发明基于例如以下发现:利用在测试培养容器(例如,带挡板的摇瓶)中获得的数据的当前要求保护的方法可以用于准确地预测敏化剂浓度对生产生物反应器中的细胞活力的影响,准确地选择对于生产生物反应器中的细胞活力最佳的条件,预测生产生物反应器中的细胞活力,以及准确地鉴定可用于在生产生物反应器中培养细胞的一组条件。

[0007] 在一个方面,本公开文本涉及预测敏化剂浓度对生产生物反应器中的细胞活力的影响的方法。所述方法涉及(a)在测试培养容器中测定多个测试条件下的细胞活力,其中所述多个测试条件由一组参数定义;以及(b)基于所述多个条件下所述测试培养容器中的细胞活力,预测敏化剂浓度对生产生物反应器中的细胞活力的影响。

[0008] 在一些实施方案中,所述参数组包括剪切应力、敏化剂的浓度和保护剂的浓度。

[0009] 在一些实施方案中,基于全因子筛选和/或内切中心复合设计选择所述多个测试条件。

[0010] 在一些实施方案中,所述敏化剂是消泡剂。

[0011] 在一些实施方案中,所述消泡剂是基于聚二甲基硅氧烷的消泡剂或二甲基硅油。

[0012] 在一些实施方案中,所述测试培养容器具有约5mL至约5L的体积,或具有约10mL至约500mL的体积。在一些实施方案中,所述测试培养容器是带挡板的摇瓶。

[0013] 在一些实施方案中,所述生产生物反应器具有约5L至约20,000L的体积,或具有约50L至约10,000L的体积。在一些实施方案中,所述生产生物反应器是灌注生物反应器或补

料分批生物反应器。

[0014] 在一些实施方案中,所述方法还包括使用一定浓度的敏化剂在所述生产生物反应器中培养细胞,所述浓度的敏化剂被预测在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中具有低于每天40%的比细胞死亡率。

[0015] 在一些实施方案中,所述方法还包括使用一定浓度的敏化剂在所述生产生物反应器中培养细胞,所述浓度的敏化剂被预测在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中具有低于每天20%的比细胞死亡率。

[0016] 在一些实施方案中,所述方法还包括使用一定浓度的敏化剂在所述生产生物反应器中培养细胞,所述浓度的敏化剂被预测在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致低于150nU/细胞/天的细胞比LDH产量。

[0017] 在一些实施方案中,所述方法还包括使用一定浓度的敏化剂在所述生产生物反应器中培养细胞,所述浓度的敏化剂被预测在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致低于100nU/细胞/天的细胞比LDH产量。

[0018] 在一些实施方案中,所述方法还包括使用一定浓度的敏化剂在所述生产生物反应器中培养细胞,所述浓度的敏化剂被预测在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致大于每天1%的表观生长率。

[0019] 在一些实施方案中,所述方法还包括使用一定浓度的敏化剂在所述生产生物反应器中培养细胞,所述浓度的敏化剂被预测在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致大于每天5%的表观生长率。

[0020] 在一些实施方案中,所述细胞含有编码重组治疗性蛋白的核酸。

[0021] 在一些实施方案中,所述方法还包括收集所述重组治疗性蛋白。在一些实施方案中,所述方法还包括纯化所述重组治疗性蛋白。在一些实施方案中,所述方法还包括配制经纯化的重组治疗性蛋白。

[0022] 在一些实施方案中,所述细胞是细菌、酵母或哺乳动物细胞。

[0023] 在一些实施方案中,通过测量所述测试培养容器中的乳酸脱氢酶(LDH)浓度来测定细胞活力。

[0024] 在一些实施方案中,所述测试培养容器是带挡板的摇瓶并且所述多个测试条件包括以下中的一个或多个:

[0025] (a)约125RPM至约400RPM的旋转搅拌;

[0026] (b)约0ppm至约5000ppm的敏化剂浓度;和

[0027] (c)约1g/L至约10g/L的保护剂浓度。

[0028] 在一些实施方案中,所述保护剂是泊洛沙姆(poloxamer)、泊洛沙胺(poloxamine)或普朗尼克(pluronic)多元醇。

[0029] 在一些实施方案中,所述泊洛沙姆是泊洛沙姆-188、泊洛沙姆-401、泊洛沙姆-402或泊洛沙姆-407。

[0030] 在一些实施方案中,所述泊洛沙胺是泊洛沙胺-904或泊洛沙胺-908。

[0031] 在另一个方面,本公开文本涉及提高生产生物反应器中的细胞活力的方法。所述方法涉及

[0032] (a)在测试培养容器中测定多个测试条件下的细胞活力,其中所述多个条件由一

组参数定义;

[0033] (b)基于所述多个条件下所述测试培养容器中的细胞活力,选择对于生产生物反应器中的细胞活力最佳的条件;以及

[0034] (c)在所选择的条件下在所述生产生物反应器中培养细胞。

[0035] 在一些实施方案中,所述参数组包括剪切应力、敏化剂的浓度和保护剂的浓度。

[0036] 在一些实施方案中,基于全因子筛选和/或内切中心复合设计选择所述多个测试条件。

[0037] 在一些实施方案中,所述敏化剂是消泡剂。在一些实施方案中,所述消泡剂是基于聚二甲基硅氧烷的消泡剂或二甲基硅油。

[0038] 在一些实施方案中,所述测试培养容器的体积为约5mL至约5L。

[0039] 在一些实施方案中,所述测试培养容器的体积为约10mL至约500mL。在一些实施方案中,所述测试培养容器是带挡板的摇瓶。

[0040] 在一些实施方案中,所述生产生物反应器的体积为约5L至约20,000L。在一些实施方案中,所述生产生物反应器的体积为约50L至约10,000L。在一些实施方案中,所述生产生物反应器是灌注生物反应器或补料分批生物反应器。

[0041] 在一些实施方案中,步骤(c)在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致低于每天40%的比细胞死亡率。在一些实施方案中,步骤(c)在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致低于每天20%的比细胞死亡率。在一些实施方案中,步骤(c)在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致低于150nU/细胞/天的细胞比LDH产量。在一些实施方案中,步骤(c)在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致低于100nU/细胞/天的细胞比LDH产量。在一些实施方案中,步骤(c)在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致大于每天1%的表观生长率。在一些实施方案中,步骤(c)在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致大于每天5%的表观生长率。

[0042] 在一些实施方案中,所述细胞含有编码重组治疗性蛋白的核酸。

[0043] 在一些实施方案中,所述方法还包括收集所述重组治疗性蛋白。在一些实施方案中,所述方法还包括纯化所述重组治疗性蛋白。在一些实施方案中,所述方法还包括配制经纯化的重组治疗性蛋白。

[0044] 在一些实施方案中,所述细胞是细菌、酵母或哺乳动物细胞。在一些实施方案中,通过测量所述测试培养容器中的乳酸脱氢酶(LDH)浓度来测定细胞活力。

[0045] 在一些实施方案中,所述测试培养容器是带挡板的摇瓶并且所述多个测试条件包括以下中的一个或多个:

[0046] (a)约125RPM至约400RPM的旋转搅拌;

[0047] (b)约0ppm至约5000ppm的敏化剂浓度;和

[0048] (c)约1g/L至约10g/L的保护剂浓度。

[0049] 在一些实施方案中,所述保护剂是泊洛沙姆、泊洛沙胺或普朗尼克多元醇。在一些实施方案中,所述泊洛沙姆是泊洛沙姆-188、泊洛沙姆-401、泊洛沙姆-402或泊洛沙姆-407。在一些实施方案中,所述泊洛沙胺是泊洛沙胺-904或泊洛沙胺-908。

[0050] 在另一个方面,本公开文本涉及用于预测生产生物反应器中的细胞活力的方法。所述方法涉及

[0051] (a)选择包括至少两个参数的一组参数;

[0052] (b)在测试培养容器中测定如通过所述参数组所定义的多个测试条件下的细胞活力;以及

[0053] (c)基于所述多个条件下所述测试培养容器中的细胞活力,预测所述生产生物反应器中的细胞活力。

[0054] 在一些实施方案中,所述参数组包括剪切应力、敏化剂的浓度和保护剂的浓度。

[0055] 在一些实施方案中,基于全因子筛选和/或内切中心复合设计选择所述多个测试条件。

[0056] 在一些实施方案中,所述敏化剂是消泡剂。

[0057] 在一些实施方案中,所述消泡剂是基于聚二甲基硅氧烷的消泡剂。在一些实施方案中,所述消泡剂是二甲基硅油。

[0058] 在一些实施方案中,所述测试培养容器的体积为约5mL至约5L。

[0059] 在一些实施方案中,所述测试培养容器的体积为约10mL至约500mL。

[0060] 在一些实施方案中,所述测试培养容器是带挡板的摇瓶。

[0061] 在一些实施方案中,所述生产生物反应器具有约5L至约20,000L的体积,或具有约50L至约10,000L的体积。

[0062] 在一些实施方案中,所述生产生物反应器是灌注生物反应器或补料分批生物反应器。

[0063] 在一些实施方案中,所述方法还包括使用一定条件在所述生产生物反应器中培养细胞,所述条件被预测在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致低于每天40%的比细胞死亡率。

[0064] 在一些实施方案中,所述方法还包括使用一定条件在所述生产生物反应器中培养细胞,所述条件被预测在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致低于每天20%的比细胞死亡率。

[0065] 在一些实施方案中,所述方法还包括使用一定条件在所述生产生物反应器中培养细胞,所述条件被预测在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致低于150nU/细胞/天的细胞比LDH产量。

[0066] 在一些实施方案中,所述方法还包括使用一定条件在所述生产生物反应器中培养细胞,所述条件被预测在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致低于100nU/细胞/天的细胞比LDH产量。

[0067] 在一些实施方案中,所述方法还包括使用一定条件在所述生产生物反应器中培养细胞,所述条件被预测在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致大于每天1%的表观生长率。

[0068] 在一些实施方案中,所述方法还包括使用一定条件在所述生产生物反应器中培养细胞,所述条件被预测在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致大于每天5%的表观生长率。

[0069] 在一些实施方案中,所述细胞含有编码重组治疗性蛋白的核酸。

[0070] 在一些实施方案中,所述方法还包括收集所述重组治疗性蛋白。在一些实施方案中,所述方法还包括纯化所述重组治疗性蛋白。在一些实施方案中,所述方法还包括配制经

纯化的重组治疗性蛋白。

[0071] 在一些实施方案中,所述细胞是细菌、酵母或哺乳动物细胞。

[0072] 在一些实施方案中,通过测量所述测试培养容器中的乳酸脱氢酶(LDH)浓度来测定细胞活力。

[0073] 在一些实施方案中,所述测试培养容器是带挡板的摇瓶并且所述多个测试条件包括以下中的一个或多个:

[0074] (a)约125RPM至约400RPM的旋转搅拌;

[0075] (b)约0ppm至约5000ppm的敏化剂浓度;和

[0076] (c)约1g/L至约10g/L的保护剂浓度。

[0077] 在一些实施方案中,所述保护剂是泊洛沙姆、泊洛沙胺或普朗尼克多元醇。在一些实施方案中,所述泊洛沙姆是泊洛沙姆-188、泊洛沙姆-401、泊洛沙姆-402或泊洛沙姆-407。在一些实施方案中,所述泊洛沙胺是泊洛沙胺-904或泊洛沙胺-908。

[0078] 在另一个方面,本公开文本还提供了用于在生产生物反应器中培养细胞的方法,所述方法包括在一个或多个以下条件下在液体培养基中培养细胞:

[0079] a)所述生产生物反应器的P/V(W/m^3)为约1.0至约110.0(例如,约10.0至约100.0、约20.0至约80.0、约40.0至约60.0或约6.0);

[0080] b)所述生产生物反应器的每分钟每液体体积的空气体积(VVM)(min^{-1})为约0.01至约0.10(例如,约0.02至约0.08、约0.04至约0.06或约0.06);

[0081] c)所述培养基包含浓度为约0ppm至约5000ppm(例如,约50ppm至约4000ppm、约1000ppm至约2000ppm或约100ppm)的敏化剂;以及

[0082] d)所述液体培养基包含浓度为约1g/L至约15g/L(例如,约2g/L至约10g/L、约3g/L至约7g/L、约4g/L至约6g/L或约5g/L)的保护剂。

[0083] 在一些实施方案中,所述敏化剂是消泡剂。

[0084] 在一些实施方案中,所述消泡剂是基于聚二甲基硅氧烷的消泡剂。在一些实施方案中,所述消泡剂是二甲基硅油。

[0085] 在一些实施方案中,所述保护剂是泊洛沙姆、泊洛沙胺或普朗尼克多元醇。

[0086] 在一些实施方案中,所述泊洛沙姆是泊洛沙姆-188、泊洛沙姆-401、泊洛沙姆-402或泊洛沙姆-407。在一些实施方案中,所述泊洛沙胺是泊洛沙胺-904或泊洛沙胺-908。

[0087] 在一些实施方案中,所述生产生物反应器的体积为约5L至约20,000L。在一些实施方案中,所述生产生物反应器的体积为约50L至约10,000L。在一些实施方案中,所述生产生物反应器是灌注生物反应器或补料分批生物反应器。

[0088] 在一些实施方案中,所述方法在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致低于每天40%的比细胞死亡率。在一些实施方案中,所述方法在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致低于每天20%的比细胞死亡率。在一些实施方案中,所述方法在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致低于150nU/细胞/天的细胞比LDH产量。在一些实施方案中,所述方法在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致低于100nU/细胞/天的细胞比LDH产量。在一些实施方案中,所述方法在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致大于每天1%的表观生长率。在一些实施方案中,所述方法在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致大于每天5%的表观生长率。

[0089] 在一些实施方案中,所述细胞含有编码重组治疗性蛋白的核酸。

[0090] 在一些实施方案中,所述方法还包括收集所述重组治疗性蛋白。在一些实施方案中,所述方法还包括纯化所述重组治疗性蛋白。在一些实施方案中,所述方法还包括配制经纯化的重组治疗性蛋白。

[0091] 在一些实施方案中,所述细胞是细菌、酵母或哺乳动物细胞。在一些实施方案中,通过测量所述测试培养容器中的乳酸脱氢酶(LDH)浓度来测定细胞活力。

[0092] 如本文所用,名词前的词语“一个”表示一个或多个所述特定名词。例如,短语“一个细胞”表示“一个或多个细胞”。

[0093] 术语“保护剂”意指降低在容器(例如,测试培养容器或生产生物反应器)中培养的过程中细胞对剪切应力的敏感性(例如,哺乳动物细胞的敏感性)的试剂。保护剂的非限制性例子包括例如泊洛沙姆(例如,泊洛沙姆-188、泊洛沙姆-401、泊洛沙姆-402和泊洛沙姆-407)、泊洛沙胺(例如,泊洛沙胺-904或泊洛沙胺-908)和普朗尼克多元醇。保护剂的另外的例子描述于本文中并且是本领域已知的。

[0094] 术语“敏化剂”意指添加至和/或存在于细胞的培养物(例如,哺乳动物细胞培养物)的液体培养基中的试剂,其提高在容器中(例如,测试培养容器或生产生物反应器)培养的过程中细胞对剪切应力的敏感性。敏化剂的非限制性例子包括消泡剂(例如,基于聚二甲基硅氧烷的消泡剂或二甲基硅油)。敏化剂的另外的例子描述于本文中并且是本领域已知的。

[0095] 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、母牛或兔)的任何细胞。例如,哺乳动物细胞可以是永生化细胞。在一些实施方案中,所述哺乳动物细胞是分化细胞。在一些实施方案中,所述哺乳动物细胞是未分化细胞。本文描述了哺乳动物细胞的非限制性例子。哺乳动物细胞的其他例子是本领域中已知的。

[0096] 术语“培养”或“细胞培养”意指哺乳动物细胞在受控的一组物理条件下维持或增殖。

[0097] 术语“细胞的培养物”或“细胞培养物”意指含有多个细胞的液体培养基,所述多个细胞在受控制的一组物理条件下维持或增殖。

[0098] 术语“液体培养基”意指含有足够营养物以允许细胞(例如,哺乳动物细胞)在体外生长或增殖的流体。例如,液体培养基可以含有以下中的一种或多种: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、吡哆醇、核黄素、胸苷、氰钴胺、丙酮酸盐、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,液体培养基可以含有来自哺乳动物的血清。在一些实施方案中,液体培养基不含来自哺乳动物的血清或其他提取物(确定成分的液体培养基)。在一些实施方案中,液体培养基可以含有痕量金属、哺乳动物生长激素和/或哺乳动物生长因子。液体培养基的另一个例子是基本培养基(例如,仅含有无机盐、碳源和水的培养基)。本文描述了液体培养基的非限制性例子。液体培养基的其他例子是本领域已知的并且是可商购的。液体培养基可以含有任何密度的哺乳动物细胞。例如,如本文所用,从生物反应器取出的一定体积的液体培养基可以基本上不含哺乳动物细胞。

[0099] 术语“无动物源性组分的液体培养基”意指不含任何源自哺乳动物的组分(例如,蛋白质或血清)的液体培养基。

[0100] 术语“无血清液体培养基”意指不含哺乳动物血清的液体培养基。

[0101] 术语“含血清的液体培养基”意指含有哺乳动物血清的液体培养基。

[0102] 术语“化学成分确定的液体培养基”是本领域的术语,并且意指其中所有化学组分都是已知的液体培养基。例如,化学成分确定的液体培养基不含胎牛血清、牛血清白蛋白或人血清白蛋白,因为这些制剂通常含有白蛋白和脂质的复杂混合物。

[0103] 术语“无蛋白质液体培养基”意指不含任何蛋白质(例如,任何可检测的蛋白质)的液体培养基。

[0104] 术语“灌注生物反应器”意指在第一液体培养基中含有多个细胞(例如,哺乳动物细胞)的生物反应器,其中存在于所述生物反应器中的细胞的培养包括定期或连续去除所述第一液体培养基并且同时或此后不久将基本上相同体积的第二液体培养基添加至所述生物反应器中。在一些例子中,所述第二液体培养基可以与所述第一液体培养基相同。在一些例子中,在培养时间段内经递增的时间段(例如,约24小时的时间段、在约1分钟与约24小时之间的时间段或大于24小时的时间段)去除和添加的第一液体培养基的体积存在递增变化(例如,增加或减少)(例如,培养基每天重新进料速率)。每天去除和更换的培养基分数可以根据培养的特定细胞、初始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培养基的体积(例如,接种后存在的培养基的总体积)。

[0105] 术语“补料分批生物反应器”是本领域的术语,并且意指在第一液体培养基中含有多个细胞(例如,哺乳动物细胞)的生物反应器,其中存在于所述生物反应器中的细胞的培养包括在不从所述细胞培养物大量或显著地去除所述第一液体培养基或第二液体培养基的情况下将第二液体培养基定期或连续添加至所述第一液体培养基中。所述第二液体培养基可以与所述第一液体培养基相同。在补料分批培养的一些例子中,所述第二液体培养基是所述第一液体培养基的浓缩形式。在补料分批培养的一些例子中,将所述第二液体培养基作为干粉添加。在补料分批培养的一些例子中,所述第二液体培养基是与所述第一液体培养基相比完全不同的配制品。

[0106] 术语“浓缩补料分批生物反应器”是本领域的术语,并且意指在第一液体培养基中含有多个细胞(例如,哺乳动物细胞)的生物反应器,其中存在于所述生物反应器中的细胞的培养包括在从所述细胞培养物大量或显著地去除所述第一液体培养基或第二液体培养基而不从所述生物反应器去除产物的情况下将第二液体培养基定期或连续添加至所述第一液体培养基中。所述第二液体培养基可以与所述第一液体培养基相同。在浓缩补料分批培养的一些例子中,所述第二液体培养基是所述第一液体培养基的浓缩形式。在浓缩补料分批培养的一些例子中,将所述第二液体培养基作为干粉添加。在浓缩补料分批培养的一些例子中,所述第二液体培养基是所述第一液体培养基的完全不同的配制品。

[0107] “旋转搅拌”是本领域公知的术语,并且是指摇瓶以大致圆形的方式(例如,顺时针或逆时针)运动,以便例如增加其中包含的液体培养基中溶解的02浓度。搅拌可以使用任何本领域已知的方法(例如,使摇瓶以圆形或椭圆形动作运动的仪器,如旋转摇床)进行。本文描述了可用于进行旋转搅拌的示例性装置。此类装置的另外的例子也是本领域已知的并且是可商购的。

[0108] 术语“摇瓶”意指这样的容器(例如,无菌容器),其可以容纳一定体积的液体培养基,具有至少一个透气表面(例如,具有透气元件例如膜的一端,所述膜也可以用作无菌屏

障)和/或至少一个通气盖,并且其形状的至少一部分近似为截头圆锥形。例如,摇瓶可以是带挡板的摇瓶或锥形瓶,或者其任何本领域公认的改进形式。

[0109] 术语“生产生物反应器”是本领域的术语,并且意指大规模生物反应器(例如,具有超过5L、1,000L、5,000L、10,000L、20,000L、50,000L或100,000L的内部体积)。例如,生产生物反应器可以是灌注生物反应器。

[0110] 术语“测试培养容器”是本领域的术语,并且意指体积为约2mL至约500mL的小规模生物反应器(例如,相对于生产生物反应器)。在一些例子中,所述测试培养容器的高宽比大约对应于本文所述方法中生产生物反应器的高宽比。在一些实施方案中,所述测试培养容器是摇瓶(例如,带挡板的摇瓶)。测试培养容器的另外的例子描述于本文中并且是本领域已知的。

[0111] 术语“分批培养”是本领域的术语,并且意指在液体培养基中含有多个细胞(例如,哺乳动物细胞)的容器(例如,生物反应器),其中存在于所述容器(例如,生物反应器)中的细胞的培养不包括向所述细胞培养物中添加大量或显著量的新鲜液体培养基,并且不包括在培养过程中从所述细胞培养物去除大量或显著量的液体培养基。

[0112] 术语“补料分批培养”是本领域的术语,并且意指在液体培养基中包含多个细胞(例如,哺乳动物细胞)的容器(例如,生产生物反应器),其中存在于所述容器(例如,生产生物反应器)中的细胞的培养包括在培养过程中在不从所述容器大量或显著地去除液体培养基的情况下将新鲜液体培养基定期或连续添加至所述容器中。所述新鲜液体培养基可以与培养开始时存在于所述容器中的液体培养基相同。在补料分批培养的一些例子中,所述新鲜液体培养基是在培养开始时存在于所述容器中的浓缩形式的液体培养基。在补料分批培养的一些例子中,将所述新鲜培养基作为干粉添加。在补料分批培养的一些例子中,所述新鲜培养基是与培养开始时存在于所述容器中的液体培养基相比完全不同的配制品。

[0113] 本文所述的方法提供了若干优点。例如,它可以匹配不同的规模,预测Δ参数,并优化现有的设计空间。它还可以提高跨规模的性能的可预测性/匹配性,创建更具代表性的小规模模型,提高工艺稳健性,改善过程强化的剪切耐受性,并提供关于跨不同剪切分布的敏化剂和保护剂添加的指导(图12)。

[0114] 除非另外定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。本文描述了用于本发明的方法和材料;也可以使用本领域已知的其他合适的方法和材料。所述材料、方法和例子仅是说明性的而非旨在是限制性的。本文提及的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据条目和其他参考文献均通过引用以其整体并入。在矛盾的情况下,将以包括定义在内的本说明书为准。

[0115] 从以下具体实施方式和附图以及权利要求书中,本发明的其他特征和优点将变得清楚。

附图说明

[0116] 图1是显示细胞培养基中的气泡如何可以导致细胞死亡的图。

[0117] 图2是说明添加消泡剂(示例性敏化剂)可以将操作条件移出可接受的操作空间的图。

[0118] 图3是显示比乳酸脱氢酶(LDH)产量与细胞死亡率之间的关系的图。

[0119] 图4是显示保护剂、敏化剂和旋转搅拌之间的关系以及保护剂、敏化剂和搅拌对细胞培养物中比LDH产量的影响的图。

[0120] 图5是显示比LDH产量是敏化剂浓度、保护剂浓度和旋转搅拌(剪切应力)的结果的图。

[0121] 图6显示了针对以下三个所选择的参数的全因子设计:敏化剂浓度、保护剂浓度和旋转搅拌(剪切应力)。上图显示了全因子设计(2^3),其中响应是比LDH产量(死亡率),并且因子是剪切、保护剂浓度和敏化剂浓度。中间的图显示故障导致极值,故障点与其余数据之间存在一个大的范围,所述故障点难以建模,并且极值被排除(不可操作区域)。下图显示中心点预测不良(指示曲率,响应可能是非线性的,并且增加的RPM没有线性增长)。

[0122] 图7是显示针对所选择的敏化剂浓度、保护剂浓度和旋转搅拌(剪切应力)参数的全因子设计与内切中心复合设计相组合的图。

[0123] 图8是显示全因子设计与内切中心复合设计相组合的优点的图。

[0124] 图9是说明本文所述的方法可以用于鉴定性能不良区域(淡阴影)和操作故障区域(浓阴影)的图。

[0125] 图10是说明经由比LDH产量将跨规模的剪切应力归一化的方法和预测参数变化(Δ参数)的影响的方法的图。

[0126] 图11是说明本文所述的模型可以如何用于优化生产生物反应器的操作条件的图。数据显示,操作条件(填充空心方块的矩形)目前有效,但可以进一步优化(大箭头右侧的淡阴影矩形)(例如,增加过程中敏化剂耐受性的浓度范围,并提高对容器泡沫出来的回弹性)。

[0127] 图12列出了本文所述的模型的能力和实用。所述模型能够匹配不同的规模,预测参数的变化,并优化现有的设计空间。所述模型还提供了跨规模的性能的可预测性/匹配性的增加(例如,在传统方法的基础上创建更具代表性的小规模模型并且增强对跨规模的剪切的理解)。所述模型还提供了增加的过程稳健性(例如,改善的对于过程强化的剪切耐受性以及改善的对跨不同剪切分布的敏化剂浓度和保护剂添加浓度的指导)。

[0128] 图13A是将测试的台式容器中观察到的比LDH产量值与预测的比LDH产量值进行比较的图。

[0129] 图13B描绘了来自实施例2中描述的实验的数据。

[0130] 图13C列出了观察到的比LDH产量值与预测值。

[0131] 图14比较了观察到的消泡剂对比LDH产量的影响以及预测的消泡剂对比LDH产量的影响。

[0132] 图15A是将测试的生产生物反应器中观察到的比LDH产量值与预测值进行比较的图。

[0133] 图15B列出了在测试的生产生物反应器中观察到的比LDH产量值与预测值。

具体实施方式

[0134] 本公开文本涉及优化用于产生蛋白质或多肽的过程强化的方法。在一个方面,本公开文本涉及小规模测试培养容器(例如,带挡板的摇瓶)模型,所述模型可以表征由各种操作参数(例如,保护剂(例如,泊洛沙姆-188)浓度、敏化剂(例如,消泡剂)、剪切应力(例

如,搅拌速率或氧气喷射速率)、培养基组分和添加剂、pH和时间等)定义的操作空间。特别地,本文所述的方法可以用于预测这些操作参数对生产生物反应器中的细胞培养物生长和活力的影响。已经使用正交方法来关联小规模与较大规模模型之间的剪切应力,并且已经通过台式规模和生产规模下的数据验证了预测的操作空间。

[0135] 因此,本文提供了预测敏化剂浓度对生产生物反应器中的细胞活力的影响的方法、提高生产生物反应器中的细胞活力的方法、用于预测生产生物反应器中的细胞活力的方法以及用于在生产生物反应器中培养细胞的方法。本文描述了这些方法的非限制性方面,并且所述方法可以不受限制地组合。

[0136] 过程强化

[0137] 过程强化是指通过优化现有的操作方案来改善制造和加工,使得制造过程可以更精确且更有效。这些改善可以带来多种优点,例如增加生物量、提高容积生产率、优化设施产能利用率、降低商品成本、维持或改善产品质量一致性、减少设施占地面积和/或减少单元操作。在分子水平上,过程强化还可以涉及增强混合、改善反应动力学和/或增加产率和特异性。

[0138] 本公开文本涉及用于产生蛋白质或多肽(例如,重组治疗性蛋白、重组蛋白或重组多肽)的过程强化。增加重组治疗性蛋白或多肽产生的一种策略是增加细胞密度。高细胞密度通常需要高耗氧量,并且所需的氧气喷射经常导致发泡问题(即,气泡)。如图1所示,气泡可以例如通过细胞气泡接触、细胞气泡附着或来自气泡破裂的致死力导致细胞死亡。式1显示了细胞死亡率、体积曝气和气泡大小之间的关系。

[0139] $$\text{死亡率} \propto \frac{(\text{体积曝气})}{(\text{气泡大小})^3} \qquad (\text{式}1)$$

[0140] 因此,通常将消泡剂添加至细胞培养过程中。然而,消泡剂的添加和/或积累可能导致对细胞培养性能(例如,哺乳动物细胞培养性能)的负面影响。在一些情况下,消泡剂的添加和积累可能导致细胞死亡率增加,特别是在生产规模(生产生物反应器规模)下。因此,重要的是在生产规模(生产生物反应器规模)下评估操作参数或这些操作参数(例如,消泡剂或一些其他参数)的变化的影响。

[0141] 敏化剂、搅拌和保护剂

[0142] 因为在生产规模(生产生物反应器规模)下测试各种操作参数的影响是极其昂贵的,所以通常首先在测试培养容器(例如,摇瓶、实验室发酵罐或中试发酵罐)中进行中试实验。可以操作这些测试培养容器以测试在小规模下各种参数(例如,搅拌、敏化剂浓度、保护剂浓度、温度、pH、营养物组成、生物量负载和进料策略)的影响,并将观察到的影响与生产规模(生产生物反应器规模)下的影响相关联。在许多传统方法中,功率/体积(P/V)、体积传质系数(kLa)、尖端速度、混合时间、计算流体动力学(CFD)建模通常用于将测试培养容器中的结果与生产规模(生产生物反应器规模)下的影响相关联。

[0143] 在这些多种参数中,敏化剂参数(例如,敏化剂的浓度)尤其难以放大。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,敏化剂可以是消泡剂(例如,二甲基硅油、二甲基硅油乳液或基于聚二甲基硅氧烷(PDMS)的油)。消泡剂的描述可见于例如Brečević等,"Mechanism of antifoaming action of simethicone,"J.Appl.Toxicol.14(3):207-211,1994;和Bergeron等,"Polydimethylsiloxane(PDMS)-based antifoams,"Colloids and Surfaces

A:Physicochemical and Engineering Aspects 122(1-3):103-120,1997;两者均通过引用以其整体并入本文。

[0144] 敏化剂的另外的例子包括例如基于有机油的敏化剂、基于硅油的敏化剂和混合的液-固混合物/乳化的敏化剂(例如,气相二氧化硅、油组合消泡剂)。敏化剂可以是硅酮泡沫控制剂,例如XIAMETER®ACP-0100消泡剂化合物、XIAMETER®ACP-1500消泡剂化合物、XIAMETER®AFE-1510消泡剂乳液、XIAMETER®AFE-1520消泡剂乳液、XIAMETER®AFE-1530消泡剂乳液、XIAMETER®ACP-1400消泡剂化合物、XIAMETER®AFE-0700消泡剂乳液、XIAMETER®ACP-1920粉末消泡剂和XIAMETER®PMX-200硅酮流体。敏化剂的另外的例子包括Dow Corning®消泡剂C乳液、消泡剂204(Sigma Aldrich)、消泡剂A(Sigma Aldrich)、消泡剂B乳液(Sigma Aldrich)、消泡剂C乳液(Sigma Aldrich)、消泡剂Y-30乳液(Sigma Aldrich)、消泡剂O-30(Sigma Aldrich)和消泡剂SE-15(Sigma Aldrich)。有机、非硅酮的基于聚丙烯的聚醚敏化剂的非限制性例子是消泡剂204。二甲基硅油乳液的非限制性例子是消泡剂EX-Cell。混合的固-液消泡剂的非限制性例子包括Marinova等,Langmuir 17:2426-2436,2001中描述的硅油(PDMS)、化合物A、改性CA(MCA)、乳液A(EA)和EA类似物(AEA)。基于聚二甲基硅氧烷(PMSA)的消泡剂的非限制性例子描述于Bergeron等,Colloids and Surfaces A:Physiochemical and Engineering Aspects 122:103-120,1997中。

[0145] 敏化剂的其他例子是本领域中已知的。参见,例如,Rashmika等,Biotechnol.Prog.34(1):262-270,2018。

[0146] 一些其他参数(例如,挡板、烧瓶大小、搅拌)也会对细胞对于剪切的敏感性产生影响。由于与其他参数的相互作用,这些敏化剂参数(例如,消泡剂的浓度)在放大过程中通常具有非线性关系,并且跨不同规模是几何上无关的。因此,传统模型在预测在生产规模下敏化剂参数的影响方面往往是无能为力的。

[0147] 使预测更具挑战性的是敏化剂参数可以在整个生产时间段内变化。例如,在生产过程中(例如,在生产生物反应器中培养细胞),细胞密度增加并且需要更高的氧气喷射。因此,需要更多的消泡剂并将其添加至所述生产生物反应器中。增加的消泡剂浓度使细胞对剪切应力更加敏感,并使操作条件快速移出可接受的操作空间(图2)。

[0148] 此外,保护剂可以保护细胞免受增加的剪切应力,并且通常将其添加至液体培养基中。增加的保护剂浓度可能是减轻敏化剂负面影响所必需的,但保护剂与其他参数的相互作用使得难以确定所需保护剂的确切量。一些常见的保护剂包括例如泊洛沙姆、泊洛沙胺和/或普朗尼克多元醇。在一些实施方案中,所述保护剂是泊洛沙姆(例如,泊洛沙姆-188、泊洛沙姆-401、泊洛沙姆-402或泊洛沙姆-407)。在一些其他实施方案中,所述保护剂是泊洛沙胺(例如,泊洛沙胺-904或泊洛沙胺-908)。在一些另外的实施方案中,所述保护剂是普朗尼克多元醇(例如,L-61、L-121、P-103、P-123、P-84、P-104、P-65、P-105、L-35、F-127、F-38、F-68或F-108)或反向普朗尼克多元醇(例如,25R-2、25R-4、25R-5、25R-8、10R-5或10R-8)。示例性保护剂的详细描述可见于例如Moghimi等,“Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine,”Trends in Biotechnology 18(10):412-420,2000;Murhammer等,“Structural features of

nonionic polyglycol polymer molecules responsible for the protective effect in sparged animal cell bioreactors,"Biotechnology Progress 6(2):142-148,1990;Murhammer,"Pluronic polyols,cell protection,"Encyclopedia of Bioprocess Technology(1999);将其中每一篇文献均通过引用以其整体并入本文。

[0149] 基于因子设计和中心复合设计的建模

[0150] 本公开文本提供了捕获多种操作参数(例如,保护剂(培养基组分/添加剂,例如普朗尼克)、敏化剂(例如,消泡剂)和剪切应力(搅拌))的影响(例如,细胞活力、细胞死亡率、重组治疗性蛋白产生或产率)的建模方法,其目的是基于来自测试培养容器模型的结果优化在任何规模下的反应器。

[0151] 在一个方面,本文所述的方法可以用于预测生产生物反应器中的细胞活力。所述方法涉及选择包括至少两个(例如,三个、四个、五个或六个)参数的一组参数;在测试培养容器(例如,本文所述的任何测试培养容器)中测定如通过所述参数组定义的多个测试条件下的细胞活力;以及基于所述多个条件下所述测试培养容器中的细胞活力,预测所述生产生物反应器中的细胞活力。基于所述预测,可以鉴定具有提高的细胞活力的条件。本文还提供了预测敏化剂浓度对生产生物反应器中的细胞活力的影响的方法。所述方法涉及在测试培养容器中测定多个测试条件下的细胞活力,其中所述多个测试条件由一组参数定义;以及基于所述多个条件下所述测试培养容器中的细胞活力,预测敏化剂浓度对生产生物反应器中的细胞活力的影响。

[0152] 所述测试培养容器可以是旋转管(例如,带挡板的旋转管)、烧瓶(例如,具有约3L体积的摇瓶)(例如,带挡板的摇瓶)、自动化实验室发酵罐(来自Sartorius的Ambr 15和Amber 250)、实验室发酵罐或中试发酵罐。在一些实施方案中,所述测试培养容器的体积可以小于5L、小于3L、小于1L、小于500ml或小于100ml(例如,小于1L或50ml至500ml)。在一些实施方案中,所述测试培养容器的体积(内部体积)为约5mL至约5L(例如,约10mL至约500mL或约2.5L至约3.5L)。例如,测试培养容器的体积(内部体积)可以为约5mL至约5L、约5mL至约4.5L、约5mL至约4.0L、约5mL至约3.5L、约5mL至约3.0L、约5mL至约2.5L、约5mL至约2L、约5mL至约1.5L、约5mL至约1L、约5mL至约900mL、约5mL至约800mL、约5mL至约700mL、约5mL至约600mL、约5mL至约500mL、约5mL至约450mL、约5mL至约400mL、约5mL至约350mL、约5mL至约300mL、约5mL至约250mL、约5mL至约200mL、约5mL至约150mL、约5mL至约100mL、约5mL至约80mL、约5mL至约60mL、约5mL至约50mL、约5mL至约40mL、约5mL至约30mL、约5mL至约25mL、约5mL至约20mL、约5mL至约15mL、约5mL至约10mL、约10mL至约5L、约10mL至约4.5L、约10mL至约4.0L、约10mL至约3.5L、约10mL至约3.0L、约10mL至约2.5L、约10mL至约2L、约10mL至约1.5L、约10mL至约1L、约10mL至约900mL、约10mL至约800mL、约10mL至约700mL、约10mL至约600mL、约10mL至约500mL、约10mL至约450mL、约10mL至约400mL、约10mL至约350mL、约10mL至约300mL、约10mL至约250mL、约10mL至约200mL、约10mL至约150mL、约10mL至约100mL、约10mL至约80mL、约10mL至约60mL、约10mL至约50mL、约10mL至约40mL、约10mL至约30mL、约10mL至约25mL、约10mL至约20mL、约10mL至约15mL、约15mL至约5L、约15mL至约4.5L、约15mL至约4.0L、约15mL至约3.5L、约15mL至约3.0L、约15mL至约2.5L、约15mL至约2L、约15mL至约1.5L、约15mL至约1L、约15mL至约900mL、约15mL至约800mL、约15mL至约700mL、约15mL至约600mL、约15mL至约500mL、约15mL至约450mL、约15mL至约400mL、约15mL至约350mL、约15mL

至约300mL、约15mL至约250mL、约15mL至约200mL、约15mL至约150mL、约15mL至约100mL、约15mL至约80mL、约15mL至约60mL、约15mL至约50mL、约15mL至约40mL、约15mL至约30mL、约15mL至约25mL、约15mL至约20mL、约20mL至约5L、约20mL至约4.5L、约20mL至约4.0L、约20mL至约3.5L、约20mL至约3.0L、约20mL至约2.5L、约20mL至约2L、约20mL至约1.5L、约20mL至约1L、约20mL至约900mL、约20mL至约800mL、约20mL至约700mL、约20mL至约600mL、约20mL至约500mL、约20mL至约450mL、约20mL至约400mL、约20mL至约350mL、约20mL至约300mL、约20mL至约250mL、约20mL至约200mL、约20mL至约150mL、约20mL至约100mL、约20mL至约80mL、约20mL至约60mL、约20mL至约50mL、约20mL至约40mL、约20mL至约30mL、约20mL至约25mL、约25mL至约5L、约25mL至约4.5L、约25mL至约4.0L、约25mL至约3.5L、约25mL至约3.0L、约25mL至约2.5L、约25mL至约2L、约25mL至约1.5L、约25mL至约1L、约25mL至约900mL、约25mL至约800mL、约25mL至约700mL、约25mL至约600mL、约25mL至约500mL、约25mL至约450mL、约25mL至约400mL、约25mL至约350mL、约25mL至约300mL、约25mL至约250mL、约25mL至约200mL、约25mL至约150mL、约25mL至约100mL、约25mL至约80mL、约25mL至约60mL、约25mL至约50mL、约25mL至约40mL、约25mL至约30mL、约30mL至约5L、约30mL至约4.5L、约30mL至约4.0L、约30mL至约3.5L、约30mL至约3.0L、约30mL至约2.5L、约30mL至约2L、约30mL至约1.5L、约30mL至约1L、约30mL至约900mL、约30mL至约800mL、约30mL至约700mL、约30mL至约600mL、约30mL至约500mL、约30mL至约450mL、约30mL至约400mL、约30mL至约350mL、约30mL至约300mL、约30mL至约250mL、约30mL至约200mL、约30mL至约150mL、约30mL至约100mL、约30mL至约80mL、约30mL至约60mL、约30mL至约50mL、约30mL至约40mL、约40mL至约5L、约40mL至约4.5L、约40mL至约4.0L、约40mL至约3.5L、约40mL至约3.0L、约40mL至约2.5L、约40mL至约2L、约40mL至约1.5L、约40mL至约1L、约40mL至约900mL、约40mL至约800mL、约40mL至约700mL、约40mL至约600mL、约40mL至约500mL、约40mL至约450mL、约40mL至约400mL、约40mL至约350mL、约40mL至约300mL、约40mL至约250mL、约40mL至约200mL、约40mL至约150mL、约40mL至约100mL、约40mL至约80mL、约40mL至约60mL、约40mL至约50mL、约50mL至约5L、约50mL至约4.5L、约50mL至约4.0L、约50mL至约3.5L、约50mL至约3.0L、约50mL至约2.5L、约50mL至约2L、约50mL至约1.5L、约50mL至约1L、约50mL至约900mL、约50mL至约800mL、约50mL至约700mL、约50mL至约600mL、约50mL至约500mL、约50mL至约450mL、约50mL至约400mL、约50mL至约350mL、约50mL至约300mL、约50mL至约250mL、约50mL至约200mL、约50mL至约150mL、约50mL至约100mL、约50mL至约80mL、约50mL至约60mL、约60mL至约5L、约60mL至约4.5L、约60mL至约4.0L、约60mL至约3.5L、约60mL至约3.0L、约60mL至约2.5L、约60mL至约2L、约60mL至约1.5L、约60mL至约1L、约60mL至约900mL、约60mL至约800mL、约60mL至约700mL、约60mL至约600mL、约60mL至约500mL、约60mL至约450mL、约60mL至约400mL、约60mL至约350mL、约60mL至约300mL、约60mL至约250mL、约60mL至约200mL、约60mL至约150mL、约60mL至约100mL、约60mL至约80mL、约80mL至约5L、约80mL至约4.5L、约80mL至约4.0L、约80mL至约3.5L、约80mL至约3.0L、约80mL至约2.5L、约80mL至约2L、约80mL至约1.5L、约80mL至约1L、约80mL至约900mL、约80mL至约800mL、约80mL至约700mL、约80mL至约600mL、约80mL至约500mL、约80mL至约450mL、约80mL至约400mL、约80mL至约350mL、约80mL至约300mL、约80mL至约250mL、约80mL至约200mL、约80mL至约150mL、约80mL至约100mL、约100mL至约5L、约100mL至约4.5L、约100mL至约4.0L、约100mL至约3.5L、约100mL至约3.0L、约100mL至约2.5L、约100mL至约2L、约100mL至约

1.5L、约100mL至约1L、约100mL至约900mL、约100mL至约800mL、约100mL至约700mL、约100mL至约600mL、约100mL至约500mL、约100mL至约450mL、约100mL至约400mL、约100mL至约350mL、约100mL至约300mL、约100mL至约250mL、约100mL至约200mL、约100mL至约150mL、约150mL至约5L、约150mL至约4.5L、约150mL至约4.0L、约150mL至约3.5L、约150mL至约3.0L、约150mL至约2.5L、约150mL至约2L、约150mL至约1.5L、约150mL至约1L、约150mL至约900mL、约150mL至约800mL、约150mL至约700mL、约150mL至约600mL、约150mL至约500mL、约150mL至约450mL、约150mL至约400mL、约150mL至约350mL、约150mL至约300mL、约150mL至约250mL、约150mL至约200mL、约200mL至约5L、约200mL至约4.5L、约200mL至约4.0L、约200mL至约3.5L、约200mL至约3.0L、约200mL至约2.5L、约200mL至约2L、约200mL至约1.5L、约200mL至约1L、约200mL至约900mL、约200mL至约800mL、约200mL至约700mL、约200mL至约600mL、约200mL至约500mL、约200mL至约450mL、约200mL至约400mL、约200mL至约350mL、约200mL至约300mL、约200mL至约250mL、约250mL至约5L、约250mL至约4.5L、约250mL至约4.0L、约250mL至约3.5L、约250mL至约3.0L、约250mL至约2.5L、约250mL至约2L、约250mL至约1.5L、约250mL至约1L、约250mL至约900mL、约250mL至约800mL、约250mL至约700mL、约250mL至约600mL、约250mL至约500mL、约250mL至约450mL、约250mL至约400mL、约250mL至约350mL、约250mL至约300mL、约300mL至约5L、约300mL至约4.5L、约300mL至约4.0L、约300mL至约3.5L、约300mL至约3.0L、约300mL至约2.5L、约300mL至约2L、约300mL至约1.5L、约300mL至约1L、约300mL至约900mL、约300mL至约800mL、约300mL至约700mL、约300mL至约600mL、约300mL至约500mL、约300mL至约450mL、约300mL至约400mL、约300mL至约350mL、约350mL至约5L、约350mL至约4.5L、约350mL至约4.0L、约350mL至约3.5L、约350mL至约3.0L、约350mL至约2.5L、约350mL至约2L、约350mL至约1.5L、约350mL至约1L、约350mL至约900mL、约350mL至约800mL、约350mL至约700mL、约350mL至约600mL、约350mL至约500mL、约350mL至约450mL、约350mL至约400mL、约400mL至约5L、约400mL至约4.5L、约400mL至约4.0L、约400mL至约3.5L、约400mL至约3.0L、约400mL至约2.5L、约400mL至约2L、约400mL至约1.5L、约400mL至约1L、约400mL至约900mL、约400mL至约800mL、约400mL至约700mL、约400mL至约600mL、约400mL至约500mL、约400mL至约450mL、约450mL至约5L、约450mL至约4.5L、约450mL至约4.0L、约450mL至约3.5L、约450mL至约3.0L、约450mL至约2.5L、约450mL至约2L、约450mL至约1.5L、约450mL至约1L、约450mL至约900mL、约450mL至约800mL、约450mL至约700mL、约450mL至约600mL、约450mL至约500mL、约500mL至约5L、约500mL至约4.5L、约500mL至约4.0L、约500mL至约3.5L、约500mL至约3.0L、约500mL至约2.5L、约500mL至约2L、约500mL至约1.5L、约500mL至约1L、约500mL至约900mL、约500mL至约800mL、约500mL至约700mL、约500mL至约600mL、约600mL至约5L、约600mL至约4.5L、约600mL至约4.0L、约600mL至约3.5L、约600mL至约3.0L、约600mL至约2.5L、约600mL至约2L、约600mL至约1.5L、约600mL至约1L、约600mL至约900mL、约600mL至约800mL、约600mL至约700mL、约700mL至约5L、约700mL至约4.5L、约700mL至约4.0L、约700mL至约3.5L、约700mL至约3.0L、约700mL至约2.5L、约700mL至约2L、约700mL至约1.5L、约700mL至约1L、约700mL至约900mL、约700mL至约800mL、约800mL至约5L、约800mL至约4.5L、约800mL至约4.0L、约800mL至约3.5L、约800mL至约3.0L、约800mL至约2.5L、约800mL至约2L、约800mL至约1.5L、约800mL至约1L、约800mL至约900mL、约900mL至约5L、约900mL至约4.5L、约900mL至约4.0L、约900mL至约3.5L、约900mL至约3.0L、约900mL

至约2.5L、约900mL至约2L、约900mL至约1.5L、约900mL至约1L、约1L至约5L、约1L至约4.5L、约1L至约4.0L、约1L至约3.5L、约1L至约3.0L、约1L至约2.5L、约1L至约2L、约1L至约1.5L、约1.5L至约5L、约1.5L至约4.5L、约1.5L至约4.0L、约1.5L至约3.5L、约1.5L至约3.0L、约1.5L至约2.5L、约1.5L至约2L、约2L至约5L、约2L至约4.5L、约2L至约4.0L、约2L至约3.5L、约2L至约3.0L、约2L至约2.5L、约2.5L至约5L、约2.5L至约4.5L、约2.5L至约4.0L、约2.5L至约3.5L、约2.5L至约3.0L、约3.0L至约5L、约3.0L至约4.5L、约3.0L至约4.0L、约3.0L至约3.5L、约3.5L至约5L、约3.5L至约4.5L、约3.5L至约4.0L、约4.0L至约5L、约4.0L至约4.5L或约4.5L至约5.0L。在一些实施方案中,测试培养容器的高度与宽度的比与生产生物反应器的高度与宽度的比大致相同。

[0153] 在一些实施方案中,置于测试培养容器中(在培养期间)的液体培养基的体积可以在如下范围内:约0.5mL至约1.5L、约0.5mL至约1.4L、约0.5mL至约1.3L、约0.5mL至约1.2L、约0.5mL至约1.1L、约0.5mL至约1.0L、约0.5mL至约900mL、约0.5mL至约800mL、约0.5mL至约700mL、约0.5mL至约600mL、约0.5mL至约500mL、约0.5mL至约400mL、约0.5mL至约300mL、约0.5mL至约250mL、约0.5mL至约200mL、约0.5mL至约150mL、约0.5mL至约100mL、约0.5mL至约80mL、约0.5mL至约60mL、约0.5mL至约50mL、约0.5mL至约40mL、约0.5mL至约30mL、约0.5mL至约25mL、约0.5mL至约20mL、约0.5mL至约10mL、约0.5mL至约5mL、约0.5mL至约2.5mL、约2.5mL至约1.5L、约2.5mL至约1.4L、约2.5mL至约1.3L、约0.5mL至约1.2L、约0.5mL至约1.1L、约0.5mL至约1.0L、约2.5mL至约900mL、约2.5mL至约800mL、约2.5mL至约700mL、约2.5mL至约600mL、约2.5mL至约500mL、约2.5mL至约400mL、约2.5mL至约300mL、约2.5mL至约250mL、约2.5mL至约200mL、约2.5mL至约150mL、约2.5mL至约100mL、约2.5mL至约80mL、约2.5mL至约60mL、约2.5mL至约50mL、约2.5mL至约40mL、约2.5mL至约30mL、约2.5mL至约25mL、约2.5mL至约20mL、约2.5mL至约10mL、约2.5mL至约5mL、约5mL至约1.5L、约5mL至约1.4L、约5mL至约1.3L、约5mL至约1.2L、约5mL至约1.1L、约5mL至约1.0L、约5mL至约900mL、约5mL至约800mL、约5mL至约700mL、约5mL至约600mL、约5mL至约500mL、约5mL至约400mL、约5mL至约300mL、约5mL至约250mL、约5mL至约200mL、约5mL至约150mL、约5mL至约100mL、约5mL至约80mL、约5mL至约60mL、约5mL至约50mL、约5mL至约40mL、约5mL至约30mL、约5mL至约25mL、约5mL至约20mL、约5mL至约10mL、约10mL至约1.5L、约10mL至约1.4L、约10mL至约1.3L、约10mL至约1.2L、约10mL至约1.1L、约10mL至约1.0L、约10mL至约900mL、约10mL至约800mL、约10mL至约700mL、约10mL至约600mL、约10mL至约500mL、约10mL至约400mL、约10mL至约300mL、约10mL至约250mL、约10mL至约200mL、约10mL至约150mL、约10mL至约100mL、约10mL至约80mL、约10mL至约60mL、约10mL至约50mL、约10mL至约40mL、约10mL至约30mL、约10mL至约25mL、约10mL至约20mL、约20mL至约1.5L、约20mL至约1.4L、约20mL至约1.3L、约20mL至约1.2L、约20mL至约1.1L、约20mL至约1.0L、约20mL至约900mL、约20mL至约800mL、约20mL至约700mL、约20mL至约600mL、约20mL至约500mL、约20mL至约400mL、约20mL至约300mL、约20mL至约250mL、约20mL至约200mL、约20mL至约150mL、约20mL至约100mL、约20mL至约80mL、约20mL至约60mL、约20mL至约50mL、约20mL至约40mL、约20mL至约30mL、约20mL至约25mL、约25mL至约1.5L、约25mL至约1.4L、约25mL至约1.3L、约25mL至约1.2L、约25mL至约1.1L、约25mL至约1.0L、约25mL至约900mL、约25mL至约800mL、约25mL至约700mL、约25mL至约600mL、约25mL至约500mL、约25mL至约400mL、约25mL至约300mL、约25mL至约250mL、约

25mL至约200mL、约25mL至约150mL、约25mL至约100mL、约25mL至约80mL、约25mL至约60mL、约25mL至约50mL、约25mL至约40mL、约25mL至约30mL、约30mL至约1.5L、约30mL至约1.4L、约30mL至约1.3L、约30mL至约1.2L、约30mL至约1.1L、约30mL至约1.0L、约30mL至约900mL、约30mL至约800mL、约30mL至约700mL、约30mL至约600mL、约30mL至约500mL、约30mL至约400mL、约30mL至约300mL、约30mL至约250mL、约30mL至约200mL、约30mL至约150mL、约30mL至约100mL、约30mL至约80mL、约30mL至约60mL、约30mL至约50mL、约30mL至约40mL、约40mL至约1.5L、约40mL至约1.4L、约40mL至约1.3L、约40mL至约1.2L、约40mL至约1.1L、约40mL至约1.0L、约40mL至约900mL、约40mL至约800mL、约40mL至约700mL、约40mL至约600mL、约40mL至约500mL、约40mL至约400mL、约40mL至约300mL、约40mL至约250mL、约40mL至约200mL、约40mL至约150mL、约40mL至约100mL、约40mL至约80mL、约40mL至约60mL、约40mL至约50mL、约50mL至约1.5L、约50mL至约1.4L、约50mL至约1.3L、约50mL至约1.2L、约50mL至约1.1L、约50mL至约1.0L、约50mL至约900mL、约50mL至约800mL、约50mL至约700mL、约50mL至约600mL、约50mL至约500mL、约50mL至约400mL、约50mL至约300mL、约50mL至约250mL、约50mL至约200mL、约50mL至约150mL、约50mL至约100mL、约50mL至约80mL、约50mL至约60mL、约60mL至约1.5L、约60mL至约1.4L、约60mL至约1.3L、约60mL至约1.2L、约60mL至约1.1L、约60mL至约1.0L、约60mL至约900mL、约60mL至约800mL、约60mL至约700mL、约60mL至约600mL、约60mL至约500mL、约60mL至约400mL、约60mL至约300mL、约60mL至约250mL、约60mL至约200mL、约60mL至约150mL、约60mL至约100mL、约60mL至约80mL、约80mL至约1.5L、约80mL至约1.4L、约80mL至约1.3L、约80mL至约1.2L、约80mL至约1.1L、约80mL至约1.0L、约80mL至约900mL、约80mL至约800mL、约80mL至约700mL、约80mL至约600mL、约80mL至约500mL、约80mL至约400mL、约80mL至约300mL、约80mL至约250mL、约80mL至约200mL、约80mL至约150mL、约80mL至约100mL、约100mL至约1.5L、约100mL至约1.4L、约100mL至约1.3L、约100mL至约1.2L、约100mL至约1.1L、约100mL至约1.0L、约100mL至约900mL、约100mL至约800mL、约100mL至约700mL、约100mL至约600mL、约100mL至约500mL、约100mL至约400mL、约100mL至约300mL、约100mL至约250mL、约100mL至约200mL、约100mL至约150mL、约150mL至约1.5L、约150mL至约1.4L、约150mL至约1.3L、约150mL至约1.2L、约150mL至约1.1L、约150mL至约1.0L、约150mL至约900mL、约150mL至约800mL、约150mL至约700mL、约150mL至约600mL、约150mL至约500mL、约150mL至约400mL、约150mL至约300mL、约150mL至约250mL、约150mL至约200mL、约200mL至约1.5L、约200mL至约1.4L、约200mL至约1.3L、约200mL至约1.2L、约200mL至约1.1L、约200mL至约1.0L、约200mL至约900mL、约200mL至约800mL、约200mL至约700mL、约200mL至约600mL、约200mL至约500mL、约200mL至约400mL、约200mL至约300mL、约200mL至约250mL、约250mL至约1.5L、约250mL至约1.4L、约250mL至约1.3L、约250mL至约1.2L、约250mL至约1.1L、约250mL至约1.0L、约250mL至约900mL、约250mL至约800mL、约250mL至约700mL、约250mL至约600mL、约250mL至约500mL、约250mL至约400mL、约250mL至约300mL、约300mL至约1.5L、约300mL至约1.4L、约300mL至约1.3L、约300mL至约1.2L、约300mL至约1.1L、约300mL至约1.0L、约300mL至约900mL、约300mL至约800mL、约300mL至约700mL、约300mL至约600mL、约300mL至约500mL、约300mL至约400mL、约400mL至约1.5L、约400mL至约1.4L、约400mL至约1.3L、约400mL至约1.2L、约400mL至约1.1L、约400mL至约1.0L、约400mL至约900mL、约400mL至约800mL、约400mL至约700mL、约400mL至约600mL、约400mL至约500mL、约

500mL至约1.5L、约500mL至约1.4L、约500mL至约1.3L、约500mL至约1.2L、约500mL至约1.1L、约500mL至约1.0L、约500mL至约900mL、约500mL至约800mL、约500mL至约700mL、约500mL至约600mL、约600mL至约1.5L、约600mL至约1.4L、约600mL至约1.3L、约600mL至约1.2L、约600mL至约1.1L、约600mL至约1.0L、约600mL至约900mL、约600mL至约800mL、约600mL至约700mL、约700mL至约1.5L、约700mL至约1.4L、约700mL至约1.3L、约700mL至约1.2L、约700mL至约1.1L、约700mL至约1.0L、约700mL至约900mL、约700mL至约800mL、约800mL至约1.5L、约800mL至约1.4L、约800mL至约1.3L、约800mL至约1.2L、约800mL至约1.1L、约800mL至约1.0L、约800mL至约900mL、约900mL至约1.5L、约900mL至约1.4L、约900mL至约1.3L、约900mL至约1.2L、约900mL至约1.1L、约900mL至约1.0L、约1.0L至约1.5L、约1.0L至约1.4L、约1.0L至约1.3L、约1.0L至约1.2L、约1.0L至约1.1L、约1.1L至约1.5L、约1.1L至约1.4L、约1.1L至约1.3L、约1.1L至约1.2L、约1.2L至约1.5L、约1.2L至约1.4L、约1.2L至约1.3L、约1.3L至约1.5L、约1.3L至约1.4L或约1.4L至约1.5L。

[0154] 在一些实施方案中,所述测试培养容器是摇瓶,例如带挡板的摇瓶。摇瓶的体积可以为例如约250mL至约300mL、约300mL至约400mL或约400mL至约500mL。所述摇瓶可以包括至少一个透气表面(例如,至少一个具有透气膜的表面,所述透气膜也可以用作无菌屏障)和/或至少一个通气盖。摇瓶可以在其外表面上具有允许摇瓶稳定地放置在组织培养箱(例如,旋转培养箱)中的结构。

[0155] 摇瓶的内表面可以具有至少一个涂层(例如,至少一个明胶、胶原蛋白、聚-L-鸟氨酸、聚苯乙烯和层粘连蛋白涂层)。可用于本文所述的任何方法的示例性摇瓶可购自Corning Inc.(图克斯伯里,马萨诸塞州)、Presens(布隆德比,丹麦)、Nalge-Nunc International(罗契斯特,纽约州)。示例性摇瓶包括带挡板的摇瓶或锥形瓶,或者其任何本领域公认的改进形式。摇瓶的另外的例子(例如,摇瓶的不同形状和尺寸)和摇瓶的内表面涂层是本领域已知的并且可以用于本发明方法中。

[0156] 在一些实施方案中,所述测试培养容器的旋转搅拌可以为约125RPM至约400RPM(例如,约150RPM至约350RPM或约200RPM至约300RPM)。例如,所述测试培养容器的旋转搅拌可以为约125RPM至约400RPM、约125RPM至约380RPM、约125RPM至约360RPM、约125RPM至约340RPM、约125RPM至约320RPM、约125RPM至约300RPM、约125RPM至约280RPM、约125RPM至约260RPM、约125RPM至约240RPM、约125RPM至约220RPM、约125RPM至约200RPM、约125RPM至约180RPM、约125RPM至约160RPM、约125RPM至约140RPM、约140RPM至约400RPM、约140RPM至约380RPM、约140RPM至约360RPM、约140RPM至约340RPM、约140RPM至约320RPM、约140RPM至约300RPM、约140RPM至约280RPM、约140RPM至约260RPM、约140RPM至约240RPM、约140RPM至约220RPM、约140RPM至约200RPM、约140RPM至约180RPM、约140RPM至约160RPM、约160RPM至约400RPM、约160RPM至约380RPM、约160RPM至约360RPM、约160RPM至约340RPM、约160RPM至约320RPM、约160RPM至约300RPM、约160RPM至约280RPM、约160RPM至约260RPM、约160RPM至约240RPM、约160RPM至约220RPM、约160RPM至约200RPM、约160RPM至约180RPM、约180RPM至约400RPM、约180RPM至约380RPM、约180RPM至约360RPM、约180RPM至约340RPM、约180RPM至约320RPM、约180RPM至约300RPM、约180RPM至约280RPM、约180RPM至约260RPM、约180RPM至约240RPM、约180RPM至约220RPM、约180RPM至约200RPM、约200RPM至约400RPM、约200RPM至约380RPM、约200RPM至约360RPM、约200RPM至约340RPM、约200RPM至约320RPM、约200RPM至约

300RPM、约200RPM至约280RPM、约200RPM至约260RPM、约200RPM至约240RPM、约200RPM至约220RPM、约220RPM至约400RPM、约220RPM至约380RPM、约220RPM至约360RPM、约220RPM至约340RPM、约220RPM至约320RPM、约220RPM至约300RPM、约220RPM至约280RPM、约220RPM至约260RPM、约220RPM至约240RPM、约240RPM至约400RPM、约240RPM至约380RPM、约240RPM至约360RPM、约240RPM至约340RPM、约240RPM至约320RPM、约240RPM至约300RPM、约240RPM至约280RPM、约240RPM至约260RPM、约260RPM至约400RPM、约260RPM至约380RPM、约260RPM至约360RPM、约260RPM至约340RPM、约260RPM至约320RPM、约260RPM至约300RPM、约260RPM至约280RPM、约280RPM至约400RPM、约280RPM至约380RPM、约280RPM至约360RPM、约280RPM至约340RPM、约280RPM至约320RPM、约280RPM至约300RPM、约300RPM至约400RPM、约300RPM至约380RPM、约300RPM至约360RPM、约300RPM至约340RPM、约300RPM至约320RPM、约320RPM至约400RPM、约320RPM至约380RPM、约320RPM至约360RPM、约320RPM至约340RPM、约340RPM至约400RPM、约340RPM至约380RPM、约340RPM至约360RPM、约360RPM至约400RPM、约360RPM至约380RPM或约380RPM至约400RPM。

[0157] 在一些实施方案中,所述测试培养容器的旋转搅拌可以使用投掷(轨道)直径在约25mm至约50mm之间的旋转培养箱进行。在一些实施方案中,所述测试培养容器的敏化剂浓度可以为约0ppm至约5,000ppm(例如,约0ppm至约120ppm、约30ppm至约120ppm或约50ppm至约100ppm)。在一些实施方案中,测试培养容器的敏化剂(例如,消泡剂,例如本文所述的任何消泡剂)浓度可以为0ppm至约200ppm、0ppm至约190ppm、0ppm至约180ppm、0ppm至约170ppm、0ppm至约160ppm、0ppm至约150ppm、0ppm至约140ppm、0ppm至约130ppm、0ppm至约120ppm、0ppm至约110ppm、0ppm至约100ppm、0ppm至约90ppm、0ppm至约80ppm、0ppm至约70ppm、0ppm至约60ppm、0ppm至约50ppm、0ppm至约40ppm、0ppm至约30ppm、0ppm至约20ppm、0ppm至约10ppm、约10ppm至约200ppm、约10ppm至约190ppm、约10ppm至约180ppm、约10ppm至约170ppm、约10ppm至约160ppm、约10ppm至约150ppm、约10ppm至约140ppm、约10ppm至约130ppm、约10ppm至约120ppm、约10ppm至约110ppm、约10ppm至约100ppm、约10ppm至约90ppm、约10ppm至约80ppm、约10ppm至约70ppm、约10ppm至约60ppm、约10ppm至约50ppm、约10ppm至约40ppm、约10ppm至约30ppm、约10ppm至约20ppm、约20ppm至约200ppm、约20ppm至约190ppm、约20ppm至约180ppm、约20ppm至约170ppm、约20ppm至约160ppm、约20ppm至约150ppm、约20ppm至约140ppm、约20ppm至约130ppm、约20ppm至约120ppm、约20ppm至约110ppm、约20ppm至约100ppm、约20ppm至约90ppm、约20ppm至约80ppm、约20ppm至约70ppm、约20ppm至约60ppm、约20ppm至约50ppm、约20ppm至约40ppm、约20ppm至约30ppm、约30ppm至约200ppm、约30ppm至约190ppm、约30ppm至约180ppm、约30ppm至约170ppm、约30ppm至约160ppm、约30ppm至约150ppm、约30ppm至约140ppm、约30ppm至约130ppm、约30ppm至约120ppm、约30ppm至约110ppm、约30ppm至约100ppm、约30ppm至约90ppm、约30ppm至约80ppm、约30ppm至约70ppm、约30ppm至约60ppm、约30ppm至约50ppm、约30ppm至约40ppm、约40ppm至约200ppm、约40ppm至约190ppm、约40ppm至约180ppm、约40ppm至约170ppm、约40ppm至约160ppm、约40ppm至约150ppm、约40ppm至约140ppm、约40ppm至约130ppm、约40ppm至约120ppm、约40ppm至约110ppm、约40ppm至约100ppm、约40ppm至约90ppm、约40ppm至约80ppm、约40ppm至约70ppm、约40ppm至约60ppm、约40ppm至约50ppm、约50ppm至约200ppm、约50ppm至约190ppm、约50ppm至约180ppm、约50ppm至约170ppm、约50ppm至约160ppm、约50ppm至约

150ppm、约50ppm至约140ppm、约50ppm至约130ppm、约50ppm至约120ppm、约50ppm至约110ppm、约50ppm至约100ppm、约50ppm至约90ppm、约50ppm至约80ppm、约50ppm至约70ppm、约50ppm至约60ppm、约60ppm至约200ppm、约60ppm至约190ppm、约60ppm至约180ppm、约60ppm至约170ppm、约60ppm至约160ppm、约60ppm至约150ppm、约60ppm至约140ppm、约60ppm至约130ppm、约60ppm至约120ppm、约60ppm至约110ppm、约60ppm至约100ppm、约60ppm至约90ppm、约60ppm至约80ppm、约60ppm至约70ppm、约70ppm至约200ppm、约70ppm至约190ppm、约70ppm至约180ppm、约70ppm至约170ppm、约70ppm至约160ppm、约70ppm至约150ppm、约70ppm至约140ppm、约70ppm至约130ppm、约70ppm至约120ppm、约70ppm至约110ppm、约70ppm至约100ppm、约70ppm至约90ppm、约70ppm至约80ppm、约80ppm至约200ppm、约80ppm至约190ppm、约80ppm至约180ppm、约80ppm至约170ppm、约80ppm至约160ppm、约80ppm至约150ppm、约80ppm至约140ppm、约80ppm至约130ppm、约80ppm至约120ppm、约80ppm至约110ppm、约80ppm至约100ppm、约80ppm至约90ppm、约90ppm至约200ppm、约90ppm至约190ppm、约90ppm至约180ppm、约90ppm至约170ppm、约90ppm至约160ppm、约90ppm至约150ppm、约90ppm至约140ppm、约90ppm至约130ppm、约90ppm至约120ppm、约90ppm至约110ppm、约90ppm至约100ppm、约100ppm至约200ppm、约100ppm至约190ppm、约100ppm至约180ppm、约100ppm至约170ppm、约100ppm至约160ppm、约100ppm至约150ppm、约100ppm至约140ppm、约100ppm至约130ppm、约100ppm至约120ppm、约100ppm至约110ppm、约110ppm至约200ppm、约110ppm至约190ppm、约110ppm至约180ppm、约110ppm至约170ppm、约110ppm至约160ppm、约110ppm至约150ppm、约110ppm至约140ppm、约110ppm至约130ppm、约110ppm至约120ppm、约120ppm至约200ppm、约120ppm至约190ppm、约120ppm至约180ppm、约120ppm至约170ppm、约120ppm至约160ppm、约120ppm至约150ppm、约120ppm至约140ppm、约120ppm至约130ppm、约130ppm至约200ppm、约130ppm至约190ppm、约130ppm至约180ppm、约130ppm至约170ppm、约130ppm至约160ppm、约130ppm至约150ppm、约130ppm至约140ppm、约140ppm至约200ppm、约140ppm至约190ppm、约140ppm至约180ppm、约140ppm至约170ppm、约140ppm至约160ppm、约140ppm至约150ppm、约150ppm至约200ppm、约150ppm至约190ppm、约150ppm至约180ppm、约150ppm至约170ppm、约150ppm至约160ppm、约160ppm至约200ppm、约160ppm至约190ppm、约160ppm至约180ppm、约160ppm至约170ppm、约170ppm至约200ppm、约170ppm至约190ppm、约170ppm至约180ppm、约180ppm至约200ppm、约180ppm至约190ppm或约190ppm至约200ppm(其中敏化剂存在于置于测试培养容器中的液体培养基中,例如培养期间的一段时间)。

[0158] 在一些实施方案中,测试培养容器的敏化剂(例如,消泡剂,例如本文所述的任何消泡剂)浓度可以为0ppm至约5,000ppm、0ppm至约4,500ppm、0ppm至约4,000ppm、0ppm至约3,500ppm、0ppm至约3,000ppm、0ppm至约2,500ppm、0ppm至约2,000ppm、0ppm至约1,500ppm、0ppm至约1,000ppm、0ppm至约800ppm、0ppm至约600ppm、0ppm至约500ppm、0ppm至约450ppm、0ppm至约400ppm、0ppm至约350ppm、0ppm至约300ppm、0ppm至约250ppm、0ppm至约200ppm、0ppm至约150ppm、0ppm至约140ppm、0ppm至约120ppm、0ppm至约100ppm、0ppm至约80ppm、0ppm至约60ppm、0ppm至约50ppm、0ppm至约40ppm、0ppm至约30ppm、0ppm至约20ppm、0ppm至约10ppm、约10ppm至约5,000ppm、约10ppm至约4,500ppm、约10ppm至约4,000ppm、约10ppm至约3,500ppm、约10ppm至约3,000ppm、约10ppm至约2,500ppm、约10ppm至约2,000ppm、约

10ppm至约1,500ppm、约10ppm至约1,000ppm、约10ppm至约800ppm、约10ppm至约600ppm、约10ppm至约500ppm、约10ppm至约450ppm、约10ppm至约400ppm、约10ppm至约350ppm、约10ppm至约300ppm、约10ppm至约250ppm、约10ppm至约200ppm、约10ppm至约150ppm、约10ppm至约140ppm、约10ppm至约120ppm、约10ppm至约100ppm、约10ppm至约80ppm、约10ppm至约60ppm、约10ppm至约50ppm、约10ppm至约40ppm、约10ppm至约30ppm、约10ppm至约20ppm、约20ppm至约5,000ppm、约20ppm至约4,500ppm、约20ppm至约4,000ppm、约20ppm至约3,500ppm、约20ppm至约3,000ppm、约20ppm至约2,500ppm、约20ppm至约2,000ppm、约20ppm至约1,500ppm、约20ppm至约1,000ppm、约20ppm至约800ppm、约20ppm至约600ppm、约20ppm至约500ppm、约20ppm至约450ppm、约20ppm至约400ppm、约20ppm至约350ppm、约20ppm至约300ppm、约20ppm至约250ppm、约20ppm至约200ppm、约20ppm至约150ppm、约20ppm至约140ppm、约20ppm至约120ppm、约20ppm至约100ppm、约20ppm至约80ppm、约20ppm至约60ppm、约20ppm至约50ppm、约20ppm至约40ppm、约20ppm至约30ppm、约30ppm至约5,000ppm、约30ppm至约4,500ppm、约30ppm至约4,000ppm、约30ppm至约3,500ppm、约30ppm至约3,000ppm、约30ppm至约2,500ppm、约30ppm至约2,000ppm、约30ppm至约1,500ppm、约30ppm至约1,000ppm、约30ppm至约800ppm、约30ppm至约600ppm、约30ppm至约500ppm、约30ppm至约450ppm、约30ppm至约400ppm、约30ppm至约350ppm、约30ppm至约300ppm、约30ppm至约250ppm、约30ppm至约200ppm、约30ppm至约150ppm、约30ppm至约140ppm、约30ppm至约120ppm、约30ppm至约100ppm、约30ppm至约80ppm、约30ppm至约60ppm、约30ppm至约50ppm、约30ppm至约40ppm、约40ppm至约5,000ppm、约40ppm至约4,500ppm、约40ppm至约4,000ppm、约40ppm至约3,500ppm、约40ppm至约3,000ppm、约40ppm至约2,500ppm、约40ppm至约2,000ppm、约40ppm至约1,500ppm、约40ppm至约1,000ppm、约40ppm至约800ppm、约40ppm至约600ppm、约40ppm至约500ppm、约40ppm至约450ppm、约40ppm至约400ppm、约40ppm至约350ppm、约40ppm至约300ppm、约40ppm至约250ppm、约40ppm至约200ppm、约40ppm至约150ppm、约40ppm至约140ppm、约40ppm至约120ppm、约40ppm至约100ppm、约40ppm至约80ppm、约40ppm至约60ppm、约40ppm至约50ppm、约50ppm至约5,000ppm、约50ppm至约4,500ppm、约50ppm至约4,000ppm、约50ppm至约3,500ppm、约50ppm至约3,000ppm、约50ppm至约2,500ppm、约50ppm至约2,000ppm、约50ppm至约1,500ppm、约50ppm至约1,000ppm、约50ppm至约800ppm、约50ppm至约600ppm、约50ppm至约500ppm、约50ppm至约450ppm、约50ppm至约400ppm、约50ppm至约350ppm、约50ppm至约300ppm、约50ppm至约250ppm、约50ppm至约200ppm、约50ppm至约150ppm、约50ppm至约140ppm、约50ppm至约120ppm、约50ppm至约100ppm、约50ppm至约80ppm、约50ppm至约60ppm、约60ppm至约5,000ppm、约60ppm至约4,500ppm、约60ppm至约4,000ppm、约60ppm至约3,500ppm、约60ppm至约3,000ppm、约60ppm至约2,500ppm、约60ppm至约2,000ppm、约60ppm至约1,500ppm、约60ppm至约1,000ppm、约60ppm至约800ppm、约60ppm至约600ppm、约60ppm至约500ppm、约60ppm至约450ppm、约60ppm至约400ppm、约60ppm至约350ppm、约60ppm至约300ppm、约60ppm至约250ppm、约60ppm至约200ppm、约60ppm至约150ppm、约60ppm至约140ppm、约60ppm至约120ppm、约60ppm至约100ppm、约60ppm至约80ppm、约80ppm至约5,000ppm、约80ppm至约4,500ppm、约80ppm至约4,000ppm、约80ppm至约3,500ppm、约80ppm至约3,000ppm、约80ppm至约2,500ppm、约80ppm至约2,000ppm、约80ppm至约1,500ppm、约80ppm至约1,000ppm、约80ppm至约800ppm、约80ppm

至约600ppm、约80ppm至约500ppm、约80ppm至约450ppm、约80ppm至约400ppm、约80ppm至约350ppm、约80ppm至约300ppm、约80ppm至约250ppm、约80ppm至约200ppm、约80ppm至约150ppm、约80ppm至约140ppm、约80ppm至约120ppm、约80ppm至约100ppm、约100ppm至约5,000ppm、约100ppm至约4,500ppm、约100ppm至约4,000ppm、约100ppm至约3,500ppm、约100ppm至约3,000ppm、约100ppm至约2,500ppm、约100ppm至约2,000ppm、约100ppm至约1,500ppm、约100ppm至约1,000ppm、约100ppm至约800ppm、约100ppm至约600ppm、约100ppm至约500ppm、约100ppm至约450ppm、约100ppm至约400ppm、约100ppm至约350ppm、约100ppm至约300ppm、约100ppm至约250ppm、约100ppm至约200ppm、约100ppm至约150ppm、约100ppm至约140ppm、约100ppm至约120ppm、约120ppm至约5,000ppm、约120ppm至约4,500ppm、约120ppm至约4,000ppm、约120ppm至约3,500ppm、约120ppm至约3,000ppm、约120ppm至约2,500ppm、约120ppm至约2,000ppm、约120ppm至约1,500ppm、约120ppm至约1,000ppm、约120ppm至约800ppm、约120ppm至约600ppm、约120ppm至约500ppm、约120ppm至约450ppm、约120ppm至约400ppm、约120ppm至约350ppm、约120ppm至约300ppm、约120ppm至约250ppm、约120ppm至约200ppm、约120ppm至约150ppm、约120ppm至约140ppm、约140ppm至约5,000ppm、约140ppm至约4,500ppm、约140ppm至约4,000ppm、约140ppm至约3,500ppm、约140ppm至约3,000ppm、约140ppm至约2,500ppm、约140ppm至约2,000ppm、约140ppm至约1,500ppm、约140ppm至约1,000ppm、约140ppm至约800ppm、约140ppm至约600ppm、约140ppm至约500ppm、约140ppm至约450ppm、约140ppm至约400ppm、约140ppm至约350ppm、约140ppm至约300ppm、约140ppm至约250ppm、约140ppm至约200ppm、约140ppm至约150ppm、约150ppm至约5,000ppm、约150ppm至约4,500ppm、约150ppm至约4,000ppm、约150ppm至约3,500ppm、约150ppm至约3,000ppm、约150ppm至约2,500ppm、约150ppm至约2,000ppm、约150ppm至约1,500ppm、约150ppm至约1,000ppm、约150ppm至约800ppm、约150ppm至约600ppm、约150ppm至约500ppm、约150ppm至约450ppm、约150ppm至约400ppm、约150ppm至约350ppm、约150ppm至约300ppm、约150ppm至约250ppm、约150ppm至约200ppm、约200ppm至约5,000ppm、约200ppm至约4,500ppm、约200ppm至约4,000ppm、约200ppm至约3,500ppm、约200ppm至约3,000ppm、约200ppm至约2,500ppm、约200ppm至约2,000ppm、约200ppm至约1,500ppm、约200ppm至约1,000ppm、约200ppm至约800ppm、约200ppm至约600ppm、约200ppm至约500ppm、约200ppm至约450ppm、约200ppm至约400ppm、约200ppm至约350ppm、约200ppm至约300ppm、约200ppm至约250ppm、约250ppm至约5,000ppm、约250ppm至约4,500ppm、约250ppm至约4,000ppm、约250ppm至约3,500ppm、约250ppm至约3,000ppm、约250ppm至约2,500ppm、约250ppm至约2,000ppm、约250ppm至约1,500ppm、约250ppm至约1,000ppm、约250ppm至约800ppm、约250ppm至约600ppm、约250ppm至约500ppm、约250ppm至约450ppm、约250ppm至约400ppm、约250ppm至约350ppm、约250ppm至约300ppm、约300ppm至约5,000ppm、约300ppm至约4,500ppm、约300ppm至约4,000ppm、约300ppm至约3,500ppm、约300ppm至约3,000ppm、约300ppm至约2,500ppm、约300ppm至约2,000ppm、约300ppm至约1,500ppm、约300ppm至约1,000ppm、约300ppm至约800ppm、约300ppm至约600ppm、约300ppm至约500ppm、约300ppm至约450ppm、约300ppm至约400ppm、约300ppm至约350ppm、约350ppm至约5,000ppm、约350ppm至约4,500ppm、约350ppm至约4,000ppm、约350ppm至约3,500ppm、约350ppm至约3,000ppm、约350ppm至约2,500ppm、约350ppm至约2,000ppm、约350ppm至约1,500ppm、约350ppm至约1,

000ppm、约350ppm至约800ppm、约350ppm至约600ppm、约350ppm至约500ppm、约350ppm至约450ppm、约350ppm至约400ppm、约400ppm至约5,000ppm、约400ppm至约4,500ppm、约400ppm至约4,000ppm、约400ppm至约3,500ppm、约400ppm至约3,000ppm、约400ppm至约2,500ppm、约400ppm至约2,000ppm、约400ppm至约1,500ppm、约400ppm至约1,000ppm、约400ppm至约800ppm、约400ppm至约600ppm、约400ppm至约500ppm、约400ppm至约450ppm、约450ppm至约5,000ppm、约450ppm至约4,500ppm、约450ppm至约4,000ppm、约450ppm至约3,500ppm、约450ppm至约3,000ppm、约450ppm至约2,500ppm、约450ppm至约2,000ppm、约450ppm至约1,500ppm、约450ppm至约1,000ppm、约450ppm至约800ppm、约450ppm至约600ppm、约450ppm至约500ppm、约500ppm至约5,000ppm、约500ppm至约4,500ppm、约500ppm至约4,000ppm、约500ppm至约3,500ppm、约500ppm至约3,000ppm、约500ppm至约2,500ppm、约500ppm至约2,000ppm、约500ppm至约1,500ppm、约500ppm至约1,000ppm、约500ppm至约800ppm、约500ppm至约600ppm、约600ppm至约5,000ppm、约600ppm至约4,500ppm、约600ppm至约4,000ppm、约600ppm至约3,500ppm、约600ppm至约3,000ppm、约600ppm至约2,500ppm、约600ppm至约2,000ppm、约600ppm至约1,500ppm、约600ppm至约1,000ppm、约600ppm至约800ppm、约800ppm至约5,000ppm、约800ppm至约4,500ppm、约800ppm至约4,000ppm、约800ppm至约3,500ppm、约800ppm至约3,000ppm、约800ppm至约2,500ppm、约800ppm至约2,000ppm、约800ppm至约1,500ppm、约800ppm至约1,000ppm、约1,000ppm至约5,000ppm、约1,000ppm至约4,500ppm、约1,000ppm至约4,000ppm、约1,000ppm至约3,500ppm、约1,000ppm至约3,000ppm、约1,000ppm至约2,500ppm、约1,000ppm至约2,000ppm、约1,000ppm至约1,500ppm、约1,500ppm至约5,000ppm、约1,500ppm至约4,500ppm、约1,500ppm至约4,000ppm、约1,500ppm至约3,500ppm、约1,500ppm至约3,000ppm、约1,500ppm至约2,500ppm、约1,500ppm至约2,000ppm、约2,000ppm至约5,000ppm、约2,000ppm至约4,500ppm、约2,000ppm至约4,000ppm、约2,000ppm至约3,500ppm、约2,000ppm至约3,000ppm、约2,000ppm至约2,500ppm、约2,500ppm至约5,000ppm、约2,500ppm至约4,500ppm、约2,500ppm至约4,000ppm、约2,500ppm至约3,500ppm、约2,500ppm至约3,000ppm、约3,000ppm至约5,000ppm、约3,000ppm至约4,500ppm、约3,000ppm至约4,000ppm、约3,000ppm至约3,500ppm、约3,500ppm至约5,000ppm、约3,500ppm至约4,500ppm、约3,500ppm至约4,000ppm、约4,000ppm至约5,000ppm、约4,000ppm至约4,500ppm或约4,500ppm至约5,000ppm(其中敏化剂存在于置于测试培养容器中的液体培养基中,例如培养期间的一段时间)。

[0159] 在一些实施方案中,所述测试培养容器的保护剂浓度可以为约1g/L至约10g/L(例如,约2g/L至约8g/L、约3g/L至约7g/L、约4g/L至约6g/L或约5g/L)。在一些实施方案中,测试培养容器的保护剂(例如,本文所述或本领域已知的任何保护剂)浓度可以为约1.0g/L至约10.0g/L、约1.0g/L至约9.5g/L、约1.0g/L至约9.0g/L、约1.0g/L至约8.5g/L、约1.0g/L至约8.0g/L、约1.0g/L至约7.5g/L、约1.0g/L至约7.0g/L、约1.0g/L至约6.5g/L、约1.0g/L至约6.0g/L、约1.0g/L至约5.5g/L、约1.0g/L至约5.0g/L、约1.0g/L至约4.5g/L、约1.0g/L至约4.0g/L、约1.0g/L至约3.5g/L、约1.0g/L至约3.0g/L、约1.0g/L至约2.5g/L、约1.0g/L至约2.0g/L、约1.0g/L至约1.5g/L、约1.5g/L至约10.0g/L、约1.5g/L至约9.5g/L、约1.5g/L至约9.0g/L、约1.5g/L至约8.5g/L、约1.5g/L至约8.0g/L、约1.5g/L至约7.5g/L、约1.5g/L至约7.0g/L、约1.5g/L至约6.5g/L、约1.5g/L至约6.0g/L、约1.5g/L至约5.5g/L、约1.5g/L至

约5.0g/L、约1.5g/L至约4.5g/L、约1.5g/L至约4.0g/L、约1.5g/L至约3.5g/L、约1.5g/L至约3.0g/L、约1.5g/L至约2.5g/L、约1.5g/L至约2.0g/L、约2.0g/L至约10.0g/L、约2.0g/L至约9.5g/L、约2.0g/L至约9.0g/L、约2.0g/L至约8.5g/L、约2.0g/L至约8.0g/L、约2.0g/L至约7.5g/L、约2.0g/L至约7.0g/L、约2.0g/L至约6.5g/L、约2.0g/L至约6.0g/L、约2.0g/L至约5.5g/L、约2.0g/L至约5.0g/L、约2.0g/L至约4.5g/L、约2.0g/L至约4.0g/L、约2.0g/L至约3.5g/L、约2.0g/L至约3.0g/L、约2.0g/L至约2.5g/L、约2.5g/L至约10.0g/L、约2.5g/L至约9.5g/L、约2.5g/L至约9.0g/L、约2.5g/L至约8.5g/L、约2.5g/L至约8.0g/L、约2.5g/L至约7.5g/L、约2.5g/L至约7.0g/L、约2.5g/L至约6.5g/L、约2.5g/L至约6.0g/L、约2.5g/L至约5.5g/L、约2.5g/L至约5.0g/L、约2.5g/L至约4.5g/L、约2.5g/L至约4.0g/L、约2.5g/L至约3.5g/L、约2.5g/L至约3.0g/L、约3.0g/L至约10.0g/L、约3.0g/L至约9.5g/L、约3.0g/L至约9.0g/L、约3.0g/L至约8.5g/L、约3.0g/L至约8.0g/L、约3.0g/L至约7.5g/L、约3.0g/L至约7.0g/L、约3.0g/L至约6.5g/L、约3.0g/L至约6.0g/L、约3.0g/L至约5.5g/L、约3.0g/L至约5.0g/L、约3.0g/L至约4.5g/L、约3.0g/L至约4.0g/L、约3.0g/L至约3.5g/L、约3.5g/L至约10.0g/L、约3.5g/L至约9.5g/L、约3.5g/L至约9.0g/L、约3.5g/L至约8.5g/L、约3.5g/L至约8.0g/L、约3.5g/L至约7.5g/L、约3.5g/L至约7.0g/L、约3.5g/L至约6.5g/L、约3.5g/L至约6.0g/L、约3.5g/L至约5.5g/L、约3.5g/L至约5.0g/L、约3.5g/L至约4.5g/L、约3.5g/L至约4.0g/L、约4.0g/L至约10.0g/L、约4.0g/L至约9.5g/L、约4.0g/L至约9.0g/L、约4.0g/L至约8.5g/L、约4.0g/L至约8.0g/L、约4.0g/L至约7.5g/L、约4.0g/L至约7.0g/L、约4.0g/L至约6.5g/L、约4.0g/L至约6.0g/L、约4.0g/L至约5.5g/L、约4.0g/L至约5.0g/L、约4.0g/L至约4.5g/L、约4.5g/L至约10.0g/L、约4.5g/L至约9.5g/L、约4.5g/L至约9.0g/L、约4.5g/L至约8.5g/L、约4.5g/L至约8.0g/L、约4.5g/L至约7.5g/L、约4.5g/L至约7.0g/L、约4.5g/L至约6.5g/L、约4.5g/L至约6.0g/L、约4.5g/L至约5.5g/L、约4.5g/L至约5.0g/L、约5.0g/L至约10.0g/L、约5.0g/L至约9.5g/L、约5.0g/L至约9.0g/L、约5.0g/L至约8.5g/L、约5.0g/L至约8.0g/L、约5.0g/L至约7.5g/L、约5.0g/L至约7.0g/L、约5.0g/L至约6.5g/L、约5.0g/L至约6.0g/L、约5.0g/L至约5.5g/L、约5.5g/L至约10.0g/L、约5.5g/L至约9.5g/L、约5.5g/L至约9.0g/L、约5.5g/L至约8.5g/L、约5.5g/L至约8.0g/L、约5.5g/L至约7.5g/L、约5.5g/L至约7.0g/L、约5.5g/L至约6.5g/L、约5.5g/L至约6.0g/L、约6.0g/L至约10.0g/L、约6.0g/L至约9.5g/L、约6.0g/L至约9.0g/L、约6.0g/L至约8.5g/L、约6.0g/L至约8.0g/L、约6.0g/L至约7.5g/L、约6.0g/L至约7.0g/L、约6.0g/L至约6.5g/L、约6.5g/L至约10.0g/L、约6.5g/L至约9.5g/L、约6.5g/L至约9.0g/L、约6.5g/L至约8.5g/L、约6.5g/L至约8.0g/L、约6.5g/L至约7.5g/L、约6.5g/L至约7.0g/L、约7.0g/L至约10.0g/L、约7.0g/L至约9.5g/L、约7.0g/L至约9.0g/L、约7.0g/L至约8.5g/L、约7.0g/L至约8.0g/L、约7.0g/L至约7.5g/L、约7.5g/L至约10.0g/L、约7.5g/L至约9.5g/L、约7.5g/L至约9.0g/L、约7.5g/L至约8.5g/L、约7.5g/L至约8.0g/L、约8.0g/L至约10.0g/L、约8.0g/L至约9.5g/L、约8.0g/L至约9.0g/L、约8.0g/L至约8.5g/L、约8.5g/L至约10.0g/L、约8.5g/L至约9.5g/L、约8.5g/L至约9.0g/L、约9.0g/L至约10.0g/L、约9.0g/L至约9.5g/L或约9.5g/L至约10.0g/L(其中保护剂存在于置于测试培养容器中的液体培养基中,例如培养期间的一段时间)。

[0160] 所述生产生物反应器可以是灌注生物反应器、补料分批生物反应器或浓缩补料分批生物反应器。在一些实施方案中,所述生产生物反应器的体积可以为约5L至约20,000L

(例如,约50L至约10,000L)。在一些实施方案中,所述生产生物反应器的体积可以大于5L、大于10L、大于50L、大于100L、大于1000L、大于2000L、大于5000L、大于20000L、大于100000L或大于150000L(例如,大于1000L)。在一些实施方案中,生产生物反应器的体积可以为约5L至约20,000L、约5L至约18,000L、约5L至约16,000L、约5L至约14,000L、约5L至约12,000L、约5L至约10,000L、约5L至约9,500L、约5L至约9,000L、约5L至约8,500L、约5L至约8,000L、约5L至约7,500L、约5L至约7,000L、约5L至约6,500L、约5L至约6,000L、约5L至约5,500L、约5L至约5,000L、约5L至约4,500L、约5L至约4,000L、约5L至约3,500L、约5L至约3,000L、约5L至约2,500L、约5L至约2,000L、约5L至约1,500L、约5L至约1,000L、约5L至约900L、约5L至约800L、约5L至约700L、约5L至约600L、约5L至约500L、约5L至约400L、约5L至约300L、约5L至约250L、约5L至约200L、约5L至约150L、约5L至约100L、约5L至约80L、约5L至约60L、约5L至约50L、约5L至约25L、约5L至约10L、约10L至约20,000L、约10L至约18,000L、约10L至约16,000L、约10L至约14,000L、约10L至约12,000L、约10L至约10,000L、约10L至约9,500L、约10L至约9,000L、约10L至约8,500L、约10L至约8,000L、约10L至约7,500L、约10L至约7,000L、约10L至约6,500L、约10L至约6,000L、约10L至约5,500L、约10L至约5,000L、约10L至约4,500L、约10L至约4,000L、约10L至约3,500L、约10L至约3,000L、约10L至约2,500L、约10L至约2,000L、约10L至约1,500L、约10L至约1,000L、约10L至约900L、约10L至约800L、约10L至约700L、约10L至约600L、约10L至约500L、约10L至约400L、约10L至约300L、约10L至约250L、约10L至约200L、约10L至约150L、约10L至约100L、约10L至约80L、约10L至约60L、约10L至约50L、约10L至约25L、约25L至约20,000L、约25L至约18,000L、约25L至约16,000L、约25L至约14,000L、约25L至约12,000L、约25L至约10,000L、约25L至约9,500L、约25L至约9,000L、约25L至约8,500L、约25L至约8,000L、约25L至约7,500L、约25L至约7,000L、约25L至约6,500L、约25L至约6,000L、约25L至约5,500L、约25L至约5,000L、约25L至约4,500L、约25L至约4,000L、约25L至约3,500L、约25L至约3,000L、约25L至约2,500L、约25L至约2,000L、约25L至约1,500L、约25L至约1,000L、约25L至约900L、约25L至约800L、约25L至约700L、约25L至约600L、约25L至约500L、约25L至约400L、约25L至约300L、约25L至约250L、约25L至约200L、约25L至约150L、约25L至约100L、约25L至约80L、约25L至约60L、约25L至约50L、约50L至约20,000L、约50L至约18,000L、约50L至约16,000L、约50L至约14,000L、约50L至约12,000L、约50L至约10,000L、约50L至约9,500L、约50L至约9,000L、约50L至约8,500L、约50L至约8,000L、约50L至约7,500L、约50L至约7,000L、约50L至约6,500L、约50L至约6,000L、约50L至约5,500L、约50L至约5,000L、约50L至约4,500L、约50L至约4,000L、约50L至约3,500L、约50L至约3,000L、约50L至约2,500L、约50L至约2,000L、约50L至约1,500L、约50L至约1,000L、约50L至约900L、约50L至约800L、约50L至约700L、约50L至约600L、约50L至约500L、约50L至约400L、约50L至约300L、约50L至约250L、约50L至约200L、约50L至约150L、约50L至约100L、约50L至约80L、约50L至约60L、约60L至约20,000L、约60L至约18,000L、约60L至约16,000L、约60L至约14,000L、约60L至约12,000L、约60L至约10,000L、约60L至约9,500L、约60L至约9,000L、约60L至约8,500L、约60L至约8,000L、约60L至约7,500L、约60L至约7,000L、约60L至约6,500L、约60L至约6,000L、约60L至约5,500L、约60L至约5,000L、约60L至约4,500L、约60L至约4,000L、约60L至约3,500L、约60L至约3,000L、约60L至约2,500L、约60L至约2,000L、约60L至约1,500L、约60L至约1,000L、约60L至约900L、约60L至约

800L、约60L至约700L、约60L至约600L、约60L至约500L、约60L至约400L、约60L至约300L、约60L至约250L、约60L至约200L、约60L至约150L、约60L至约100L、约60L至约80L、约80L至约20,000L、约80L至约18,000L、约80L至约16,000L、约80L至约14,000L、约80L至约12,000L、约80L至约10,000L、约80L至约9,500L、约80L至约9,000L、约80L至约8,500L、约80L至约8,000L、约80L至约7,500L、约80L至约7,000L、约80L至约6,500L、约80L至约6,000L、约80L至约5,500L、约80L至约5,000L、约80L至约4,500L、约80L至约4,000L、约80L至约3,500L、约80L至约3,000L、约80L至约2,500L、约80L至约2,000L、约80L至约1,500L、约80L至约1,000L、约80L至约900L、约80L至约800L、约80L至约700L、约80L至约600L、约80L至约500L、约80L至约400L、约80L至约300L、约80L至约250L、约80L至约200L、约80L至约150L、约80L至约100L、约100L至约20,000L、约100L至约18,000L、约100L至约16,000L、约100L至约14,000L、约100L至约12,000L、约100L至约10,000L、约100L至约9,500L、约100L至约9,000L、约100L至约8,500L、约100L至约8,000L、约100L至约7,500L、约100L至约7,000L、约100L至约6,500L、约100L至约6,000L、约100L至约5,500L、约100L至约5,000L、约100L至约4,500L、约100L至约4,000L、约100L至约3,500L、约100L至约3,000L、约100L至约2,500L、约100L至约2,000L、约100L至约1,500L、约100L至约1,000L、约100L至约900L、约100L至约800L、约100L至约700L、约100L至约600L、约100L至约500L、约100L至约400L、约100L至约300L、约100L至约250L、约100L至约200L、约100L至约150L、约150L至约20,000L、约150L至约18,000L、约150L至约16,000L、约150L至约14,000L、约150L至约12,000L、约150L至约10,000L、约150L至约9,500L、约150L至约9,000L、约150L至约8,500L、约150L至约8,000L、约150L至约7,500L、约150L至约7,000L、约150L至约6,500L、约150L至约6,000L、约150L至约5,500L、约150L至约5,000L、约150L至约4,500L、约150L至约4,000L、约150L至约3,500L、约150L至约3,000L、约150L至约2,500L、约150L至约2,000L、约150L至约1,500L、约150L至约1,000L、约150L至约900L、约150L至约800L、约150L至约700L、约150L至约600L、约150L至约500L、约150L至约400L、约150L至约300L、约150L至约250L、约150L至约200L、约200L至约20,000L、约200L至约18,000L、约200L至约16,000L、约200L至约14,000L、约200L至约12,000L、约200L至约10,000L、约200L至约9,500L、约200L至约9,000L、约200L至约8,500L、约200L至约8,000L、约200L至约7,500L、约200L至约7,000L、约200L至约6,500L、约200L至约6,000L、约200L至约5,500L、约200L至约5,000L、约200L至约4,500L、约200L至约4,000L、约200L至约3,500L、约200L至约3,000L、约200L至约2,500L、约200L至约2,000L、约200L至约1,500L、约200L至约1,000L、约200L至约900L、约200L至约800L、约200L至约700L、约200L至约600L、约200L至约500L、约200L至约400L、约200L至约300L、约200L至约250L、约250L至约20,000L、约250L至约18,000L、约250L至约16,000L、约250L至约14,000L、约250L至约12,000L、约250L至约10,000L、约250L至约9,500L、约250L至约9,000L、约250L至约8,500L、约250L至约8,000L、约250L至约7,500L、约250L至约7,000L、约250L至约6,500L、约250L至约6,000L、约250L至约5,500L、约250L至约5,000L、约250L至约4,500L、约250L至约4,000L、约250L至约3,500L、约250L至约3,000L、约250L至约2,500L、约250L至约2,000L、约250L至约1,500L、约250L至约1,000L、约250L至约900L、约250L至约800L、约250L至约700L、约250L至约600L、约250L至约500L、约250L至约400L、约250L至约300L、约300L至约20,000L、约300L至约18,000L、约300L至约16,000L、约300L至约14,000L、约300L至约12,000L、约300L至约10,000L、

约300L至约9,500L、约300L至约9,000L、约300L至约8,500L、约300L至约8,000L、约300L至约7,500L、约300L至约7,000L、约300L至约6,500L、约300L至约6,000L、约300L至约5,500L、约300L至约5,000L、约300L至约4,500L、约300L至约4,000L、约300L至约3,500L、约300L至约3,000L、约300L至约2,500L、约300L至约2,000L、约300L至约1,500L、约300L至约1,000L、约300L至约900L、约300L至约800L、约300L至约700L、约300L至约600L、约300L至约500L、约300L至约400L、约400L至约20,000L、约400L至约18,000L、约400L至约16,000L、约400L至约14,000L、约400L至约12,000L、约400L至约10,000L、约400L至约9,500L、约400L至约9,000L、约400L至约8,500L、约400L至约8,000L、约400L至约7,500L、约400L至约7,000L、约400L至约6,500L、约400L至约6,000L、约400L至约5,500L、约400L至约5,000L、约400L至约4,500L、约400L至约4,000L、约400L至约3,500L、约400L至约3,000L、约400L至约2,500L、约400L至约2,000L、约400L至约1,500L、约400L至约1,000L、约400L至约900L、约400L至约800L、约400L至约700L、约400L至约600L、约400L至约500L、约500L至约20,000L、约500L至约18,000L、约500L至约16,000L、约500L至约14,000L、约500L至约12,000L、约500L至约10,000L、约500L至约9,500L、约500L至约9,000L、约500L至约8,500L、约500L至约8,000L、约500L至约7,500L、约500L至约7,000L、约500L至约6,500L、约500L至约6,000L、约500L至约5,500L、约500L至约5,000L、约500L至约4,500L、约500L至约4,000L、约500L至约3,500L、约500L至约3,000L、约500L至约2,500L、约500L至约2,000L、约500L至约1,500L、约500L至约1,000L、约500L至约900L、约500L至约800L、约500L至约700L、约500L至约600L、约600L至约20,000L、约600L至约18,000L、约600L至约16,000L、约600L至约14,000L、约600L至约12,000L、约600L至约10,000L、约600L至约9,500L、约600L至约9,000L、约600L至约8,500L、约600L至约8,000L、约600L至约7,500L、约600L至约7,000L、约600L至约6,500L、约600L至约6,000L、约600L至约5,500L、约600L至约5,000L、约600L至约4,500L、约600L至约4,000L、约600L至约3,500L、约600L至约3,000L、约600L至约2,500L、约600L至约2,000L、约600L至约1,500L、约600L至约1,000L、约600L至约900L、约600L至约800L、约600L至约700L、约700L至约20,000L、约700L至约18,000L、约700L至约16,000L、约700L至约14,000L、约700L至约12,000L、约700L至约10,000L、约700L至约9,500L、约700L至约9,000L、约700L至约8,500L、约700L至约8,000L、约700L至约7,500L、约700L至约7,000L、约700L至约6,500L、约700L至约6,000L、约700L至约5,500L、约700L至约5,000L、约700L至约4,500L、约700L至约4,000L、约700L至约3,500L、约700L至约3,000L、约700L至约2,500L、约700L至约2,000L、约700L至约1,500L、约700L至约1,000L、约700L至约900L、约700L至约800L、约800L至约20,000L、约800L至约18,000L、约800L至约16,000L、约800L至约14,000L、约800L至约12,000L、约800L至约10,000L、约800L至约9,500L、约800L至约9,000L、约800L至约8,500L、约800L至约8,000L、约800L至约7,500L、约800L至约7,000L、约800L至约6,500L、约800L至约6,000L、约800L至约5,500L、约800L至约5,000L、约800L至约4,500L、约800L至约4,000L、约800L至约3,500L、约800L至约3,000L、约800L至约2,500L、约800L至约2,000L、约800L至约1,500L、约800L至约1,000L、约800L至约900L、约900L至约20,000L、约900L至约18,000L、约900L至约16,000L、约900L至约14,000L、约900L至约12,000L、约900L至约10,000L、约900L至约9,500L、约900L至约9,000L、约900L至约8,500L、约900L至约8,000L、约900L至约7,500L、约900L至约7,000L、约900L至约6,500L、约900L至约6,000L、约900L至约5,500L、约900L至约

5,000L、约900L至约4,500L、约900L至约4,000L、约900L至约3,500L、约900L至约3,000L、约900L至约2,500L、约900L至约2,000L、约900L至约1,500L、约900L至约1,000L、约1,000L至约20,000L、约1,000L至约18,000L、约1,000L至约16,000L、约1,000L至约14,000L、约1,000L至约12,000L、约1,000L至约10,000L、约1,000L至约9,500L、约1,000L至约9,000L、约1,000L至约8,500L、约1,000L至约8,000L、约1,000L至约7,500L、约1,000L至约7,000L、约1,000L至约6,500L、约1,000L至约6,000L、约1,000L至约5,500L、约1,000L至约5,000L、约1,000L至约4,500L、约1,000L至约4,000L、约1,000L至约3,500L、约1,000L至约3,000L、约1,000L至约2,500L、约1,000L至约2,000L、约1,000L至约1,500L、约1,500L至约20,000L、约1,500L至约18,000L、约1,500L至约16,000L、约1,500L至约14,000L、约1,500L至约12,000L、约1,500L至约10,000L、约1,500L至约9,500L、约1,500L至约9,000L、约1,500L至约8,500L、约1,500L至约8,000L、约1,500L至约7,500L、约1,500L至约7,000L、约1,500L至约6,500L、约1,500L至约6,000L、约1,500L至约5,500L、约1,500L至约5,000L、约1,500L至约4,500L、约1,500L至约4,000L、约1,500L至约3,500L、约1,500L至约3,000L、约1,500L至约2,500L、约1,500L至约2,000L、约2,000L至约20,000L、约2,000L至约18,000L、约2,000L至约16,000L、约2,000L至约14,000L、约2,000L至约12,000L、约2,000L至约10,000L、约2,000L至约9,500L、约2,000L至约9,000L、约2,000L至约8,500L、约2,000L至约8,000L、约2,000L至约7,500L、约2,000L至约7,000L、约2,000L至约6,500L、约2,000L至约6,000L、约2,000L至约5,500L、约2,000L至约5,000L、约2,000L至约4,500L、约2,000L至约4,000L、约2,000L至约3,500L、约2,000L至约3,000L、约2,000L至约2,500L、约2,500L至约20,000L、约2,500L至约18,000L、约2,500L至约16,000L、约2,500L至约14,000L、约2,500L至约12,000L、约2,500L至约10,000L、约2,500L至约9,500L、约2,500L至约9,000L、约2,500L至约8,500L、约2,500L至约8,000L、约2,500L至约7,500L、约2,500L至约7,000L、约2,500L至约6,500L、约2,500L至约6,000L、约2,500L至约5,500L、约2,500L至约5,000L、约2,500L至约4,500L、约2,500L至约4,000L、约2,500L至约3,500L、约2,500L至约3,000L、约3,000L至约20,000L、约3,000L至约18,000L、约3,000L至约16,000L、约3,000L至约14,000L、约3,000L至约12,000L、约3,000L至约10,000L、约3,000L至约9,500L、约3,000L至约9,000L、约3,000L至约8,500L、约3,000L至约8,000L、约3,000L至约7,500L、约3,000L至约7,000L、约3,000L至约6,500L、约3,000L至约6,000L、约3,000L至约5,500L、约3,000L至约5,000L、约3,000L至约4,500L、约3,000L至约4,000L、约3,000L至约3,500L、约3,500L至约20,000L、约3,500L至约18,000L、约3,500L至约16,000L、约3,500L至约14,000L、约3,500L至约12,000L、约3,500L至约10,000L、约3,500L至约9,500L、约3,500L至约9,000L、约3,500L至约8,500L、约3,500L至约8,000L、约3,500L至约7,500L、约3,500L至约7,000L、约3,500L至约6,500L、约3,500L至约6,000L、约3,500L至约5,500L、约3,500L至约5,000L、约3,500L至约4,500L、约3,500L至约4,000L、约4,000L至约20,000L、约4,000L至约18,000L、约4,000L至约16,000L、约4,000L至约14,000L、约4,000L至约12,000L、约4,000L至约10,000L、约4,000L至约9,500L、约4,000L至约9,000L、约4,000L至约8,500L、约4,000L至约8,000L、约4,000L至约7,500L、约4,000L至约7,000L、约4,000L至约6,500L、约4,000L至约6,000L、约4,000L至约5,500L、约4,000L至约5,000L、约4,000L至约4,500L、约4,500L至约20,000L、约4,500L至约18,000L、约4,500L至约16,000L、约4,500L至约14,000L、约4,500L至约12,000L、约4,500L至约10,000L、

约4,500L至约9,500L、约4,500L至约9,000L、约4,500L至约8,500L、约4,500L至约8,000L、约4,500L至约7,500L、约4,500L至约7,000L、约4,500L至约6,500L、约4,500L至约6,000L、约4,500L至约5,500L、约4,500L至约5,000L、约5,000L至约20,000L、约5,000L至约18,000L、约5,000L至约16,000L、约5,000L至约14,000L、约5,000L至约12,000L、约5,000L至约10,000L、约5,000L至约9,500L、约5,000L至约9,000L、约5,000L至约8,500L、约5,000L至约8,000L、约5,000L至约7,500L、约5,000L至约7,000L、约5,000L至约6,500L、约5,000L至约6,000L、约5,000L至约5,500L、约5,500L至约20,000L、约5,500L至约18,000L、约5,500L至约16,000L、约5,500L至约14,000L、约5,500L至约12,000L、约5,500L至约10,000L、约5,500L至约9,500L、约5,500L至约9,000L、约5,500L至约8,500L、约5,500L至约8,000L、约5,500L至约7,500L、约5,500L至约7,000L、约5,500L至约6,500L、约5,500L至约6,000L、约6,000L至约20,000L、约6,000L至约18,000L、约6,000L至约16,000L、约6,000L至约14,000L、约6,000L至约12,000L、约6,000L至约10,000L、约6,000L至约9,500L、约6,000L至约9,000L、约6,000L至约8,500L、约6,000L至约8,000L、约6,000L至约7,500L、约6,000L至约7,000L、约6,000L至约6,500L、约6,500L至约20,000L、约6,500L至约18,000L、约6,500L至约16,000L、约6,500L至约14,000L、约6,500L至约12,000L、约6,500L至约10,000L、约6,500L至约9,500L、约6,500L至约9,000L、约6,500L至约8,500L、约6,500L至约8,000L、约6,500L至约7,500L、约6,500L至约7,000L、约7,000L至约20,000L、约7,000L至约18,000L、约7,000L至约16,000L、约7,000L至约14,000L、约7,000L至约12,000L、约7,000L至约10,000L、约7,000L至约9,500L、约7,000L至约9,000L、约7,000L至约8,500L、约7,000L至约8,000L、约7,000L至约7,500L、约7,500L至约20,000L、约7,500L至约18,000L、约7,500L至约16,000L、约7,500L至约14,000L、约7,500L至约12,000L、约7,500L至约10,000L、约7,500L至约9,500L、约7,500L至约9,000L、约7,500L至约8,500L、约7,500L至约8,000L、约8,000L至约20,000L、约8,000L至约18,000L、约8,000L至约16,000L、约8,000L至约14,000L、约8,000L至约12,000L、约8,000L至约10,000L、约8,000L至约9,500L、约8,000L至约9,000L、约8,000L至约8,500L、约8,500L至约20,000L、约8,500L至约18,000L、约8,500L至约16,000L、约8,500L至约14,000L、约8,500L至约12,000L、约8,500L至约10,000L、约8,500L至约9,500L、约8,500L至约9,000L、约9,000L至约20,000L、约9,000L至约18,000L、约9,000L至约16,000L、约9,000L至约14,000L、约9,000L至约12,000L、约9,000L至约10,000L、约9,000L至约9,500L、约9,500L至约20,000L、约9,500L至约18,000L、约9,500L至约16,000L、约9,500L至约14,000L、约9,500L至约12,000L、约9,500L至约10,000L、约10,000L至约20,000L、约10,000L至约18,000L、约10,000L至约16,000L、约10,000L至约14,000L、约10,000L至约12,000L、约12,000L至约20,000L、约12,000L至约18,000L、约12,000L至约16,000L、约12,000L至约14,000L、约14,000L至约20,000L、约14,000L至约18,000L、约14,000L至约16,000L、约16,000L至约20,000L、约16,000L至约18,000L或约18,000L至约20,000L。

[0161] 在一些实施方案中,所述操作参数可以是与细胞活力或细胞死亡相关的任何参数(例如,剪切应力、敏化剂浓度、保护剂浓度、温度、pH、营养物组成、生物量负载和进料策略)。可以通过使用可表达乳酸脱氢酶(LDH)的细胞来测量细胞活力或细胞死亡率。当可表达LDH的细胞死亡时,细胞中的LDH被释放至液体培养基中。因此,细胞活力或细胞死亡率可以与LDH正交地测量,并且与比LDH产量(sLDHp)成比例(图3)。

[0162] 图4显示了普朗尼克(例如,保护剂)、敏化剂和剪切(例如,搅拌)可以如何影响比LDH产量。如图4所示,保护剂可以减少细胞气泡附着并增加细胞耐久性,从而保持高细胞活力并保护细胞免于死亡。相比之下,敏化剂可以增加细胞气泡附着并降低细胞耐久性,从而降低细胞活力。由于这些参数彼此相互关联,因此通常很难通过传统模型预测敏化剂、搅拌和/或保护剂的确切影响。

[0163] 图5显示小规模模型中的比LDH产量是敏化剂浓度、保护剂浓度和搅拌的函数。由于这些参数之间的相互作用,比LDH产量通常与这些参数中的任何一个都不具有线性关系。这些参数对比LDH产量的影响可以通过因子设计(例如,全因子设计或部分因子设计)来确定。

[0164] 因子设计涉及在一组条件下进行实验,并且所述条件由一组参数(例如,操作参数)定义。在所述条件组中,每个参数可以具有两个或更多个水平。因子设计的目的是研究不同参数(例如,敏化剂浓度、保护剂浓度和搅拌)之间的主影响和相互作用影响。术语"全因子设计"是指包括跨所有参数的不同水平的所有可能组合的实验设计。例如,对于各采用两个水平的三个参数(即,因子),全因子设计将总共具有8个组合,并且通常称为2^3因子设计(图6)。相比之下,术语"部分因子设计"是指由全因子设计的实验运行的精心选择的子集(部分)组成的实验设计。选择子集以便利用效应稀疏原理(sparsity-of-effects principle)来揭示关于所研究问题的最重要特征的信息,同时在实验运行和资源方面使用全因子设计的部分工作。通过进行因子设计,可以鉴定不可操作区域(例如,使操作失败的参数值的组合)。因子设计是本领域已知的,并且描述于如下文献中,例如:Box,G.E.;Hunter,W.G.;Hunter,J.S.(2005).Statistics for Experimenters:Design,Innovation,and Discovery(第2版).Wiley.ISBN 0-471-71813-0;Vicente,Gemma等,"Application of the factorial design of experiments and response surface methodology to optimize biodiesel production."Industrial crops and products8.1(1998):29-35;Vandervoort,Jo和Annick Ludwig."Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles:a factorial design study."International journal of pharmaceutics 238.1-2(2002):77-92;这些文献中的每一个均通过引用以其整体并入本文。

[0165] 在典型的因子设计中,中心点(例如,目标区域)往往预测不良。因此,在一些实施方案中,因子设计可以与中心复合设计(例如,内切中心复合设计、外切中心复合设计或面心复合设计)组合使用(图7)。中心复合设计是一种这样的实验设计,其由包含中心点的嵌入因子或部分因子设计组成,通过一组轴点进行增强,从而允许估算曲率。复合设计是本领域已知的,并且关于中心复合设计的详细描述可以见于如下文献中,例如:Box,G.E.;Hunter,W.G.;Hunter,J.S.(2005).Statistics for Experimenters:Design,Innovation,and Discovery(第2版).Wiley.ISBN 0-471-71813-0;Ahmadi,M.等,"Application of the central composite design and response surface methodology to the advanced treatment of olive oil processing wastewater using Fenton's peroxidation."Journal of Hazardous Materials 123.1-3(2005):187-195;这些文献中的每一个均通过引用以其整体并入本文。

[0166] 在一些实施方案中,基于全因子筛选和中心复合设计(例如,内切中心复合设计)

来选择所述测试条件。通过组合全因子筛选和中心复合设计,所选择的测试条件可以最大化目标区域并最小化潜在故障区域(图8和图9)。

[0167] 测试培养容器中这些测试条件的实验结果提供了估计的等高线,其说明了所选择的参数之间的关系。一旦已经确定了小规模模型的等高线,就可以使用所述小规模模型来预测缺失值。例如,根据消泡剂浓度或剪切应力的知识,可以预测操作需要多少普朗尼克。通过将跨不同规模(例如,小规模、台式、生产等)的细胞生长率和死亡率相关联来确定这种关系。

[0168] 在一些实施方案中,所估计的小规模模型的等高线可以用于匹配在不同规模(例如,生产规模)下收集的数据点。由于已知敏化剂和保护剂的浓度,因此可以从所述等高线确定小规模模型中的剪切应力,所述剪切应力对应于所述生产生物反应器中的剪切应力(图10)。基于对应于所述生产生物反应器中的剪切应力的剪切应力和敏化剂浓度,可以由所估计的等高线确定保护剂浓度变化(Δ[保护剂])的影响(图11)。例如,如图11所示,最左边的点(圆圈)、左中心点(圆圈)、右中心点(圆圈)和最右边的点(圆圈)都具有相同的剪切应力和敏化剂浓度。阴影区域是不可操作空间。通过增加保护剂浓度(从右中心点(圆圈)到最右边的点(圆圈),在这两个点之间描绘有箭头),可以增加可接受的敏化剂浓度范围,从而导致对敏化剂的更好的回弹性。

[0169] 因此,在一些实施方案中,如本文所述的模型可以用于确定不同参数之间的相互影响。传统模型通常单独地研究每个参数的影响。如本文所述的模型可以一次研究三个参数的影响,而不是单独地研究每个参数的影响。因此,本文所述的这种模型可以预测任何单个参数改变时预期的细胞培养性能。

[0170] 此外,那些传统放大参数通常不提供细胞培养性能的预测。本文所述的模型可以采用更好的指导来预测操作范围,这导致在移至生产规模时失败的可能性更低,并且一旦已经满足其他传统参数(P/V、尖端速度、混合时间、K_La)就提供放大的能力。

[0171] 在一些其他实施方案中,如本文所述的模型可以用于在给定任何单独参数或参数组合(例如,普朗尼克、消泡和剪切)的任何规模下建立反应器的操作设计空间。所述模型可以用于确定对于给定剪切条件在失败之前细胞培养物可以耐受的最大消泡剂的量。

[0172] 在一些实施方案中,所述模型可以用于确定对于给定剪切条件,普朗尼克浓度在其失效之前可以维持的最大消泡剂的量。

[0173] 在一些实施方案中,所述模型可以用于测试针对不同普朗尼克的不同类型的消泡剂(消泡剂C、高压灭菌的消泡剂、辐照的消泡剂等)。

[0174] 在一些实施方案中,所述模型可以是细胞密度范围无关的,并且不必仅适用于强化灌注培养,因为它使用LDH来进行跨规模归一化。

[0175] 在一些实施方案中,所述模型还可以采用完全添加(开始时1次推注)或每日添加来测试消泡剂浓度。

[0176] 在一些实施方案中,所述模型可以用于测试消泡剂失活背后的动力学及其对细胞培养的影响。

[0177] 细胞

[0178] 本文提供的方法可以用于培养多种不同的细胞(例如,哺乳动物细胞、细菌细胞和酵母细胞)。

[0179] 细菌细胞的非限制性例子包括大肠杆菌(E.coli)、艰难梭菌(Clostridium difficile)、生孢梭菌(Clostridium sporogenes)、拜氏梭菌(Clostridium beijerinkii)和丙酮丁醇梭菌(Clostridium acetobutylicum)。可用于本文所述的任何方法的示例性的可商购细菌细胞包括BL21(DE3)(Novagen)、BL21(DE3)-pLysS(Novagen)、BL21 Star-pLysS(Invitrogen)、BL21-SI(Invitrogen)、BL21-AI(Invitrogen)、Tuner(Novagen)、Tuner pLysS(Novagen)、Origami(Novagen)、Origami D(Novagen)、Origami B pLysS(Novagen)、Rosetta(Novagen)、Rosetta pLysS(Novagen)、Rosetta-gami-pLysS(Novagen)、BL21 CodonPlus(Stratagene)、AD494(Novagen)、BL21trxB(Novagen)、HMS174(Novagen)、NovaBlue(DE3)(Novagen)、BLR(Novagen)、C41(DE3)(Lucigen)、C43(DE3)(Lucigen)、Lemo21(DE3)(New England BioLabs)、SHuffle T7(New England BioLabs)、ArticExpress(Agilent Technologies)和Artic Express(DE3)(Agilent Technologies)。

[0180] 酵母细胞的非限制性例子包括:酿酒酵母(S.cerevisiae)、少孢酵母(S.exiguus)和巴斯德毕赤酵母(Pichia pastoris)。可用于本文所述的任何方法的酵母细胞的另外的例子包括来自酵母属(Saccharomyces)、毕赤酵母属(Pichia)、克鲁维酵母属(Kluyveromyces)、汉逊酵母属(Hansenula)和耶氏酵母属(Yarrowia)的那些酵母细胞。可用于本文所述的任何方法的酵母细胞的另外的例子描述于Nielsen,Methods in Enzymology 536:133-147,2014中。

[0181] 可以使用本文所述的任何方法培养的哺乳动物细胞的非限制性例子包括:中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(例如,CHO DG44细胞、CHO-K1s细胞和CHO-DXB11细胞)、Sp2.0、骨髓瘤细胞(例如,NS/0)、B细胞、杂交瘤细胞、T细胞、人胚肾(HEK)细胞(例如,HEK 293E和HEK 293F)、非洲绿猴肾上皮(Vero)细胞和Madin-Darby犬(可卡犬)肾上皮(MDCK)细胞。可以使用本文所述的方法培养的另外的哺乳动物细胞是本领域已知的。在本文所述的任何方法的非限制性例子中,培养开始时测试培养容器和/或生产生物反应器中存在的哺乳动物细胞的浓度为约0.1x 10^6个细胞/毫升至约10x 10^6个细胞/毫升(例如,约0.1x 10^6个细胞/毫升至约9x 10^6个细胞/毫升、约0.1x 10^6个细胞/毫升至约8x 10^6个细胞/毫升、约0.1x 10^6个细胞/毫升至约7x 10^6个细胞/毫升、约0.1x 10^6个细胞/毫升至约6x 10^6个细胞/毫升、约0.1x 10^6个细胞/毫升至约5x 10^6个细胞/毫升、约0.1x 10^6个细胞/毫升至约4x 10^6个细胞/毫升、约0.1x 10^6个细胞/毫升至约3x 10^6个细胞/毫升、约0.1x 10^6个细胞/毫升至约2x 10^6个细胞/毫升、约0.1x 10^6个细胞/毫升至约1.5x 10^6个细胞/毫升、约0.1x 10^6个细胞/毫升至约1.0x 10^6个细胞/毫升、约0.1x 10^6个细胞/毫升至约0.8x 10^6个细胞/毫升、约0.1x 10^6个细胞/毫升至约0.5x 10^6个细胞/毫升、约0.1x 10^6个细胞/毫升至约0.3x 10^6个细胞/毫升、约0.2x 10^6个细胞/毫升至约10x 10^6个细胞/毫升、约0.2x 10^6个细胞/毫升至约9x 10^6个细胞/毫升、约0.2x 10^6个细胞/毫升至约8x 10^6个细胞/毫升、约0.2x 10^6个细胞/毫升至约7x 10^6个细胞/毫升、约0.2x 10^6个细胞/毫升至约6x 10^6个细胞/毫升、约0.2x 10^6个细胞/毫升至约5x 10^6个细胞/毫升、约0.2x 10^6个细胞/毫升至约4x 10^6个细胞/毫升、约0.2x 10^6个细胞/毫升至约3x 10^6个细胞/毫升、约0.2x 10^6个细胞/毫升至约2x 10^6个细胞/毫升、约0.2x 10^6个细胞/毫升至约1.5x 10^6个细胞/毫升、约0.2x 10^6个细胞/毫升至约1.0x 10^6个细胞/毫升、约0.2x 10^6个细胞/毫升至约0.8x 10^6个细胞/毫升、约0.2x 10^6个细胞/毫升至约0.5x 10^6个细胞/毫升、约0.3x 10^6个细胞/毫升至约10x 10^6个细胞/

毫升、约0.3x 10^6个细胞/毫升至约9x 10^6个细胞/毫升、约0.3x 10^6个细胞/毫升至约8x 10^6个细胞/毫升、约0.3x 10^6个细胞/毫升至约7x 10^6个细胞/毫升、约0.3x 10^6个细胞/毫升至约6x 10^6个细胞/毫升、约0.3x 10^6个细胞/毫升至约5x 10^6个细胞/毫升、约0.3x 10^6个细胞/毫升至约4x 10^6个细胞/毫升、约0.3x 10^6个细胞/毫升至约3x 10^6个细胞/毫升、约0.3x 10^6个细胞/毫升至约2x 10^6个细胞/毫升、约0.3x 10^6个细胞/毫升至约1.5x 10^6个细胞/毫升、约0.3x 10^6个细胞/毫升至约1.0x 10^6个细胞/毫升、约0.3x 10^6个细胞/毫升至约0.8x 10^6个细胞/毫升、约0.3x 10^6个细胞/毫升至约0.5x 10^6个细胞/毫升、约0.5x 10^6个细胞/毫升至约10x 10^6个细胞/毫升、约0.5x 10^6个细胞/毫升至约9x 10^6个细胞/毫升、约0.5x 10^6个细胞/毫升至约8x 10^6个细胞/毫升、约0.5x 10^6个细胞/毫升至约7x 10^6个细胞/毫升、约0.5x 10^6个细胞/毫升至约6x 10^6个细胞/毫升、约0.5x 10^6个细胞/毫升至约5x 10^6个细胞/毫升、约0.5x 10^6个细胞/毫升至约4x 10^6个细胞/毫升、约0.5x 10^6个细胞/毫升至约3x 10^6个细胞/毫升、约0.5x 10^6个细胞/毫升至约2x 10^6个细胞/毫升、约0.5x 10^6个细胞/毫升至约1.5x 10^6个细胞/毫升、约0.5x 10^6个细胞/毫升至约1.0x 10^6个细胞/毫升、约0.5x 10^6个细胞/毫升至约0.8x 10^6个细胞/毫升、约0.8x 10^6个细胞/毫升至约10x 10^6个细胞/毫升、约0.8x 10^6个细胞/毫升至约9x 10^6个细胞/毫升、约0.8x 10^6个细胞/毫升至约8x 10^6个细胞/毫升、约0.8x 10^6个细胞/毫升至约7x 10^6个细胞/毫升、约0.8x 10^6个细胞/毫升至约6x 10^6个细胞/毫升、约0.8x 10^6个细胞/毫升至约5x 10^6个细胞/毫升、约0.8x 10^6个细胞/毫升至约4x 10^6个细胞/毫升、约0.8x 10^6个细胞/毫升至约3x 10^6个细胞/毫升、约0.8x 10^6个细胞/毫升至约2x 10^6个细胞/毫升、约0.8x 10^6个细胞/毫升至约1.5x 10^6个细胞/毫升、约0.8x 10^6个细胞/毫升至约1.0x 10^6个细胞/毫升、约1.0x 10^6个细胞/毫升至约10x 10^6个细胞/毫升、约1.0x 10^6个细胞/毫升至约9x 10^6个细胞/毫升、约1.0x 10^6个细胞/毫升至约8x 10^6个细胞/毫升、约1.0x 10^6个细胞/毫升至约7x 10^6个细胞/毫升、约1.0x 10^6个细胞/毫升至约6x 10^6个细胞/毫升、约1.0x 10^6个细胞/毫升至约5x 10^6个细胞/毫升、约1.0x 10^6个细胞/毫升至约4x 10^6个细胞/毫升、约1.0x 10^6个细胞/毫升至约3x 10^6个细胞/毫升、约1.0x 10^6个细胞/毫升至约2x 10^6个细胞/毫升、约1.0x 10^6个细胞/毫升至约1.5x 10^6个细胞/毫升、约1.5x 10^6个细胞/毫升至约10x 10^6个细胞/毫升、约1.5x 10^6个细胞/毫升至约9x 10^6个细胞/毫升、约1.5x 10^6个细胞/毫升至约8x 10^6个细胞/毫升、约1.5x 10^6个细胞/毫升至约7x 10^6个细胞/毫升、约1.5x 10^6个细胞/毫升至约6x 10^6个细胞/毫升、约1.5x 10^6个细胞/毫升至约5x 10^6个细胞/毫升、约1.5x 10^6个细胞/毫升至约4x 10^6个细胞/毫升、约1.5x 10^6个细胞/毫升至约3x 10^6个细胞/毫升、约1.5x 10^6个细胞/毫升至约2x 10^6个细胞/毫升、约2x 10^6个细胞/毫升至约10x 10^6个细胞/毫升、约2x 10^6个细胞/毫升至约9x 10^6个细胞/毫升、约2x 10^6个细胞/毫升至约8x 10^6个细胞/毫升、约2x 10^6个细胞/毫升至约7x 10^6个细胞/毫升、约2x 10^6个细胞/毫升至约6x 10^6个细胞/毫升、约2x 10^6个细胞/毫升至约5x 10^6个细胞/毫升、约2x 10^6个细胞/毫升至约4x 10^6个细胞/毫升、约2x 10^6个细胞/毫升至约3x 10^6个细胞/毫升、约3x 10^6个细胞/毫升至约10x 10^6个细胞/毫升、约3x 10^6个细胞/毫升至约9x 10^6个细胞/毫升、约3x 10^6个细胞/毫升至约8x 10^6个细胞/毫升、约3x 10^6个细胞/毫升至约7x 10^6个细胞/毫升、约3x 10^6个细胞/毫升至约6x 10^6个细胞/毫升、约3x 10^6个细胞/毫升至约5x 10^6个细胞/毫升、约3x 10^6个细胞/毫升至约4x 10^6个细胞/毫升、约4x 10^6个细胞/毫升至约10x 10^6个细胞/毫升、

约4x 10^6个细胞/毫升至约9x 10^6个细胞/毫升、约4x 10^6个细胞/毫升至约8x 10^6个细胞/毫升、约4x 10^6个细胞/毫升至约7x 10^6个细胞/毫升、约4x 10^6个细胞/毫升至约6x 10^6个细胞/毫升、约4x 10^6个细胞/毫升至约5x 10^6个细胞/毫升、约5x 10^6个细胞/毫升至约10x 10^6个细胞/毫升、约5x 10^6个细胞/毫升至约9x 10^6个细胞/毫升、约5x 10^6个细胞/毫升至约8x 10^6个细胞/毫升、约5x 10^6个细胞/毫升至约7x 10^6个细胞/毫升、约5x 10^6个细胞/毫升至约6x 10^6个细胞/毫升、约6x 10^6个细胞/毫升至约10x 10^6个细胞/毫升、约6x 10^6个细胞/毫升至约9x 10^6个细胞/毫升、约6x 10^6个细胞/毫升至约8x 10^6个细胞/毫升、约6x 10^6个细胞/毫升至约7x 10^6个细胞/毫升、约7x 10^6个细胞/毫升至约10x 10^6个细胞/毫升、约7x 10^6个细胞/毫升至约9x 10^6个细胞/毫升、约7x 10^6个细胞/毫升至约8x 10^6个细胞/毫升、约8x 10^6个细胞/毫升至约10x 10^6个细胞/毫升、约8x 10^6个细胞/毫升至约9x 10^6个细胞/毫升或约9x 10^6个细胞/毫升至约10x 10^6个细胞/毫升)。

[0182] 所述细胞(例如,哺乳动物细胞)可以含有重组核酸(例如,稳定整合在所述细胞的基因组中的核酸),其编码重组治疗性蛋白(例如,由所述细胞分泌的重组治疗性蛋白)。重组治疗性蛋白的非限制性例子描述于本文中并且是本领域已知的。

[0183] 重组治疗性蛋白

[0184] 重组治疗性蛋白可以是分泌性蛋白,其由所述细胞(例如,哺乳动物细胞)释放至细胞培养物的液体培养基中。例如,编码可溶性重组蛋白的核酸序列可以含有编码所述重组蛋白的N或C末端处的分泌信号肽的序列,所述分泌信号肽被所述细胞(例如,哺乳动物细胞)中存在的酶切割,随后释放至细胞培养物的液体培养基中。在其他情况下,所述重组蛋白是不分泌的可溶性蛋白,并且所述重组蛋白从所述细胞(例如,哺乳动物细胞)中回收。

[0185] 重组蛋白的非限制性例子包括免疫球蛋白(包括轻链和重链免疫球蛋白、抗体或抗体片段(例如,本文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)、美而赞(Myozyme)或思而赞(Cerezyme))、蛋白质(例如,人促红细胞生成素、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质或蛋白质片段(例如,用于疫苗的蛋白质)。在一些实施方案中,重组蛋白是工程化的抗原结合多肽,所述工程化的抗原结合多肽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(通过引用以其整体并入本文)中所述的重组抗原结合蛋白)。作为抗体的重组蛋白的非限制性例子包括:帕尼单抗、奥马珠单抗、阿巴伏单抗、阿昔单抗、阿克托单抗(actoxumab)、阿达木单抗、阿德木单抗(adecatumumab)、阿非莫单抗、阿夫土珠单抗(afutuzumab)、阿拉赛珠单抗(alacizumab)、阿拉赛珠单抗、阿仑单抗、阿利库单抗、阿妥莫单抗、阿玛妥昔单抗(amatuximab)、安那莫单抗(anatumomab)、阿泊珠单抗(apolizumab)、阿替努单抗(atinumab)、托珠单抗、巴西利单抗(basilizimab)、贝妥莫单抗、贝利木单抗、贝伐单抗、比西单抗、康纳单抗(canakinumab)、西妥昔单抗、达克珠单抗、登苏单抗(densumab)、依库丽单抗、依决洛单抗、依法珠单抗、依芬古单抗、厄马索单抗(ertumaxomab)、伊瑞西珠单抗(etaracizumab)、戈利木单抗、英夫利昔单抗、那他珠单抗、帕利珠单抗、帕尼单抗、帕妥珠单抗、兰尼单抗、利妥昔单抗、托珠单抗和曲妥珠单抗。治疗性抗体的另外的例子是本领域已知的。重组蛋白的另外的非限制性例子包括:阿糖苷酶α、拉罗尼酶、阿巴西普、加硫酶、促黄体素α、抗血友病因子、半乳糖苷酶β(agalsidase beta)、干扰素β-1a、达贝泊汀α(darbepoetin alfa)、替奈普酶、

依那西普、凝血因子IX、促卵泡激素、干扰素β-1a、伊米苷酶、阿法链道酶(dornase alfa)、阿法依泊汀(epoetin alfa)和阿替普酶。

[0186] 可以从液体培养基中回收分泌的可溶性重组蛋白。用于从细胞(例如,哺乳动物细胞)去除液体培养基的多种不同方法是本领域已知的,包括例如离心、过滤、移液和/或抽吸。然后可以从液体培养基中回收分泌的重组蛋白并使用多种生物化学技术进一步纯化,包括多种类型的色谱法(例如,亲和色谱法、分子筛色谱法、阳离子交换色谱法或阴离子交换色谱法)和/或过滤(例如,分子量截留过滤)。

[0187] 为了回收细胞内重组蛋白,可以使所述细胞(例如,哺乳动物细胞)裂解。用于裂解细胞(例如,哺乳动物细胞)的多种方法是本领域已知的,包括例如超声处理和/或洗涤剂、酶促和/或化学裂解。可以使用本领域已知的各种生物化学方法从细胞裂解物(例如,哺乳动物细胞裂解物)纯化重组蛋白,通常从离心步骤开始以去除细胞碎片,然后进行一个或多个另外的步骤(例如,一种或多种类型的色谱法(例如,亲和色谱法、分子筛色谱法、阳离子交换色谱法或阴离子交换色谱法)和/或过滤(例如,分子量截留过滤))。

[0188] 在一些实施方案中,经回收的重组蛋白为按重量计至少或约50%纯,例如按重量计至少或约55%纯、按重量计至少60%纯、按重量计至少65%纯、按重量计至少70%纯、按重量计至少75%纯、按重量计至少80%纯、按重量计至少85%纯、按重量计至少90%纯、按重量计至少95%纯、按重量计至少96%纯、按重量计至少97%纯、按重量计至少98%纯或按重量计至少或约99%纯或按重量计大于99%纯。

[0189] 在一些实施方案中,经回收的重组蛋白是重组人治疗性蛋白,其与人体中相同的天然蛋白质相比具有一种或多种不同的生物物理特性(例如,糖基化的类型或量的差异、磷酸化的差异、酰化的差异、金属化或金属化学计量的差异和/或辅因子结合的差异)。

[0190] 本文还提供了通过本文所述的任何方法产生的重组治疗性蛋白。

[0191] 液体培养基

[0192] 液体培养基是本领域中已知的。所述液体培养基可以补充有哺乳动物血清(例如,胎牛血清和牛血清)和/或生长激素或生长因子(例如,胰岛素、转铁蛋白和表皮生长因子)。可替代地或另外地,液体培养基可以是化学成分确定的液体培养基、无动物源性组分的液体培养基、无血清液体培养基或含血清的液体培养基。化学成分确定的液体培养基、无动物源性组分的液体培养基、无血清液体培养基和含血清的液体培养基的非限制性例子是可商购的。

[0193] 液体培养基通常含有能源(例如,碳水化合物,如葡萄糖)、必需氨基酸(例如,二十种氨基酸加上半胱氨酸的基本集合)、维生素和/或所需的低浓度的其他有机化合物、游离脂肪酸和/或痕量元素。如果需要的话,所述液体培养基可以补充有例如哺乳动物激素或生长因子(例如,胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐和缓冲液(例如,钙、镁和磷酸盐)、核苷和碱基(例如,腺苷、胸苷和次黄嘌呤)、蛋白质和组织水解产物和/或这些或其他添加剂的任何组合。

[0194] 在目前描述的方法中特别有用的液体培养基的非限制性例子包括例如CD CHO、Opti CHO和Forti CHO(均可获得自Life Technologies;格兰德艾兰,纽约州),Hycell CHO培养基(Thermo Fisher Scientific,Inc.;沃尔瑟姆,马萨诸塞州)、Ex-cell CD CHO融合培养基(Sigma-Aldrich Co.;圣路易斯,密苏里州)和PowerCHO培养基(Lonza Group,Ltd.;

巴塞尔,瑞士)。也可用于本发明方法的培养基组分包括但不限于化学成分确定的(CD)水解产物,例如CD蛋白胨、CD多肽(两种或更多种氨基酸)和CD生长因子。液体组织培养基和培养基组分的其他例子是本领域中已知的。

[0195] 灌注培养

[0196] 可以使用灌注培养进行细胞的培养。在容器中灌注培养细胞(例如,哺乳动物细胞)包括从所述容器去除第一体积的第一液体培养基(例如,含有任何浓度的哺乳动物细胞,例如基本上不含细胞的第一体积的第一液体培养基),并向所述第一液体培养基中添加第二体积的第二液体培养基。去除和添加可以同时或依序地执行,或者二者组合地执行。此外,去除和添加可以连续地(例如,以如下速度:经任何给定的时间段(例如,经24小时的时间段、经约1小时至约24小时的递增时间段或经大于24小时的递增时间段)去除和更换容器的体积或第一液体培养基体积的0.1%至800%之间(例如,1%与700%之间、1%与600%之间、1%与500%之间、1%与400%之间、1%与350%之间、1%与300%之间、1%与250%之间、1%与100%之间、100%与200%之间、5%与150%之间、10%与50%之间、15%与40%之间、8%与80%以及4%与30%之间)的体积)或定期地(例如,每三天一次、每隔一天一次、每天一次、每天两次、每天三次、每天四次或每天五次)进行,或其任何组合。在定期进行的情况下,去除或更换的体积(例如,在约24小时的时间段内、在约1小时至约24小时的递增时间段内或在大于24小时的递增时间段内)可以例如在容器的体积或第一液体培养基体积的0.1%至800%之间(例如,1%与700%之间、1%与600%之间、1%与500%之间、1%与400%之间、1%与300%之间、1%与200%之间、1%与100%之间、100%与200%之间、5%与150%之间、10%与50%之间、15%与40%之间、8%与80%之间以及4%与30%之间)。在一些情况下,在整个或部分培养时间段内经每24小时的时间段(或者可替代地,约1小时至约24小时的递增时间段或大于24小时的递增时间段)去除的第一液体培养基的第一体积和添加的第二液体培养基的第二体积可以保持大致相同。如本领域已知的,去除第一体积的第一液体培养基的速度(体积/时间单位)和添加第二体积的第二液体培养基的速度(体积/时间单位)可以变化。去除第一体积的第一液体培养基的速度(体积/时间单位)和添加第二体积的第二液体培养基的速度(体积/时间单位)可以大致相同或者可以不同。

[0197] 可替代地,在培养时间段内经每24小时的时间段(或者可替代地,1小时与约24小时之间的递增时间段或大于24小时的递增时间段)去除和添加的体积可以变化(例如,逐步增加)。例如,在培养时间段内每24小时的时间段(或者可替代地,约1小时与约24小时之间的递增时间段或大于24小时的递增时间段)内去除的第一液体培养基的体积和添加的第二液体培养基的体积可以从容器体积或第一液体培养基体积的0.5%至约20%之间的体积增加(例如,逐步地或通过交错的增量)至容器体积或第一液体培养基体积的约25%至约150%。

[0198] 熟练的从业人员将理解,第一液体培养基和第二液体培养基可以是相同类型的培养基。在其他情况下,第一液体培养基和第二液体培养基可以不同。

[0199] 可以例如通过机械系统去除第一体积的第一液体培养基,所述机械系统可以从所述容器去除第一体积的第一液体培养基(例如,基本上不含来自所述生物反应器的细胞的第一体积的第一液体培养基)。可替代地或另外地,第一体积的第一液体培养基可以通过使第一体积的第一液体培养基通过具有排除细胞(例如,哺乳动物细胞)的分子量截留的无菌

膜渗出或重力流动而去除。

[0200] 第二体积的第二液体培养基可以按自动化方式(例如,通过灌注泵)添加至所述第一液体培养基中。

[0201] 在一些情况下,去除第一体积的第一液体培养基(例如,基本上不含哺乳动物细胞的第一体积的第一液体培养基)并向所述第一液体培养基中添加第二体积的第二液体培养基不会在用细胞(例如,哺乳动物细胞)接种所述容器的至少1小时内(例如,2小时内、3小时内、4小时内、5小时内、6小时内、7小时内、8小时内、9小时内、10小时内、12小时内、14小时内、16小时内、18小时内、24小时内、36小时内、48小时内、72小时内、96小时内或96小时后)发生。

[0202] 补料分批培养

[0203] 可以使用补料分批培养进行细胞(例如,哺乳动物细胞)的培养。补料分批培养细胞(例如,哺乳动物细胞)包括经大部分培养时间段向第一液体培养基中添加(例如,定期或连续添加)第二体积的第二液体培养基。所述第二液体培养基的添加可以连续地(例如,以如下速度:经任何给定时间段(例如,经24小时的时间段、经约1小时至约24小时的递增时间段或经大于24小时的递增时间段)添加容器的体积或第一液体培养基体积的0.1%至300%之间(例如,1%与250%之间、1%与100%之间、100%与200%之间、5%与150%之间、10%与50%之间、15%与40%之间、8%与80%以及4%与30%之间)的体积)或定期地(例如,每三天一次、每隔一天一次、每天一次、每天两次、每天三次、每天四次或每天五次)进行,或其任何组合。在定期进行的情况下,添加的体积(例如,在约24小时的时间段内、在约1小时至约24小时的递增时间段内或在大于24小时的递增时间段内)可以例如在容器的体积或第一液体培养基体积的0.1%至300%之间(例如,1%与200%之间、1%与100%之间、100%与200%之间、5%与150%之间、10%与50%之间、15%与40%之间、8%与80%之间以及4%与30%之间)。在一些情况下,在整个或部分培养时间段内经每24小时的时间段(或者可替代地,约1小时至约24小时的递增时间段或大于24小时的递增时间段)添加的第二液体培养基的第二体积可以保持大约相同。如本领域已知的,添加第二体积的第二液体培养基的速度(体积/时间单位)可以在整个或部分培养时间段内变化。例如,在培养时间段内经每24小时的时间段(或者可替代地,1小时与约24小时之间的递增时间段或大于24小时的递增时间段)添加的第二液体培养基的体积可以变化(例如,逐步增加)。例如,在培养时间段内每24小时的时间段(或者可替代地,约1小时与约24小时之间的递增时间段或大于24小时的递增时间段)内添加的第二液体培养基的体积可以从容器体积或第一液体培养基体积的0.5%至约20%之间的体积增加(例如,逐步地或通过交错的增量)至容器体积或第一液体培养基体积的约25%至约150%。添加第二体积的第二液体培养基的速度(体积/时间单位)可以在整个或部分培养时间段内大致相同。

[0204] 熟练的从业人员将理解,第一液体培养基和第二液体培养基可以是相同类型的培养基。在其他情况下,第一液体培养基和第二液体培养基可以不同。第二液体培养基的体积可以按自动化方式(例如,通过灌注泵)添加至第一液体培养基中。

[0205] 在一些情况下,向所述第一液体培养基中添加第二体积的第二液体培养基不会在用细胞(例如,哺乳动物细胞)接种所述容器的至少1小时内(例如,2小时内、3小时内、4小时内、5小时内、6小时内、7小时内、8小时内、9小时内、10小时内、12小时内、14小时内、16小时

内、18小时内、24小时内、36小时内、48小时内、72小时内、96小时内或96小时后)发生。补料分批培养中的细胞培养基通常在培养时间段结束时收获并用于本文所述的任何过程中,然而,补料分批培养中的细胞培养基也可以在培养时间段中的一个或多个时间点收获并用于本文所述的任何过程中。

[0206] 熟练的从业人员将理解,多种培养参数(例如,容器、体积、更换培养物体积的速度或频率、搅拌频率、温度、培养基和CO_2浓度)中的任何一种能以任何组合用于进行这些方法。

[0207] 温度

[0208] 培养可以在32℃至约39℃(例如,约32℃至约37℃)的温度下进行。熟练的从业人员将理解,在培养方法中温度可以在特定的一个或多个时间点(例如,在第一时间段、第二时间段和第三时间段中的一个或多个时间段内)改变,例如按每小时或每天计算。例如,温度可以在用哺乳动物细胞初始接种摇瓶之后约一天、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长时间或者在本文所述的第一、第二和/或第三时间段内的任何时间点改变或移动(例如,增加或降低)。例如,温度可以向上移动(例如,变化高达或约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℃或10.0℃)。例如,温度可以向下移动(例如,变化高达或约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℃或10℃)。

[0209] CO_2

[0210] 培养可以包括在含有至多或约1%至15%CO_2(例如,至多或约14%CO_2、12%CO_2、10%CO_2、8%CO_2、6%CO_2、5%CO_2、4%CO_2、3%CO_2、2%CO_2或至多或约1%CO_2)的气氛中孵育细胞培养物。培养可以包括在潮湿的气氛(例如,至少或约20%、30%、40%、50%、60%、70%、85%、80%、85%、90%或至少或约95%湿度或约100%湿度)中孵育细胞培养物。

[0211] 细胞活力测量

[0212] 可用于测定细胞培养物(例如,哺乳动物细胞培养物)的细胞活力的多种方法和测定是本领域已知的。例如,可以在细胞培养物的液体培养基中检测乳酸脱氢酶(LDH)。用于检测细胞培养物的液体培养基中LDH的商业试剂盒是本领域已知的。

[0213] 使用被活细胞排斥但被非活细胞选择性吸收的多种不同染料测定细胞活力。这些染料的非限制性例子包括碘化丙啶,台盼蓝和7-氨基放线菌素D。在与染料孵育后通过可视化或以其他方式检测细胞的染色来测定细胞的活力。

[0214] 用于测定细胞培养物的细胞活力的另外的测定包括检测细胞中的线粒体活性或半胱天冬酶活性(例如,刃天青和甲瓒(Formazan))。用于测定细胞培养物中的细胞活力的另外的方法是本领域已知的。

[0215] 预测敏化剂浓度对生产生物反应器中的细胞活力的影响的方法

[0216] 本文提供了预测敏化剂(例如,本文所述或本领域已知的任何敏化剂)浓度对生产生物反应器中的细胞活力的影响的方法,其包括:(a)在测试培养容器(例如,本文所述的任何测试培养容器)中测定多个测试条件下的细胞活力,其中所述多个测试条件由一组参数

定义;以及(b)基于所述多个条件下所述测试培养容器中的细胞活力,预测敏化剂浓度对生产生物反应器(例如,本文所述的任何生产生物反应器)中的细胞活力的影响。

[0217] 在一些实施方案中,所述参数组包括剪切应力、敏化剂浓度和保护剂(例如,本文所述的任何保护剂)浓度,由其组成或基本上由其组成。在这些方法的一些实施方案中,基于全因子筛选和/或内切中心复合设计选择所述多个测试条件。在任何这些方法的一些实施方案中,所述敏化剂是消泡剂(例如,基于聚二甲基硅氧烷的消泡剂、二甲基硅油或本文所述或本领域已知的任何其他消泡剂)。

[0218] 在一些实施方案中,所述测试培养容器(例如,本文所述或本领域已知的任何示例性测试培养容器)的体积为约5mL至约5L(或本文所述的此范围的任何子范围)。在一些实施方案中,所述测试培养容器是摇瓶,例如带挡板的摇瓶。

[0219] 在一些实施方案中,所述生产生物反应器(例如,本文所述或本领域已知的任何示例性生产生物反应器)的体积为约5L至约20,000L(或本文所述的此范围的任何子范围)。在一些例子中,所述生产生物反应器是灌注生物反应器。在其他例子中,所述生产生物反应器是补料分批生物反应器。

[0220] 如本文所述的比细胞死亡率由下式定义:

[0221] 比细胞死亡率=(比LDH产量)/(每个细胞的LDH含量)。

[0222] 这些方法的一些实施方案还包括使用一定浓度的敏化剂在所述生产生物反应器中培养细胞(例如,本文所述的任何细胞),所述浓度的敏化剂被预测在所述生产生物反应器中培养细胞(例如,本文所述的任何细胞)的过程中具有如下比细胞死亡率:低于每天40%、低于每天39%、低于每天38%、低于每天37%、低于每天36%、低于每天35%、低于每天34%、低于每天33%、低于每天32%、低于每天31%、低于每天30%、低于每天29%、低于每天28%、低于每天27%、低于每天26%、低于每天25%、低于每天24%、低于每天23%、低于每天22%、低于每天21%、低于每天20%、低于每天19%、低于每天18%、低于每天17%、低于每天16%、低于每天15%、低于每天14%、低于每天13%、低于每天12%、低于每天11%、低于每天10%、低于每天9%、低于每天8%、低于每天7%、低于每天6%、低于每天5%、低于每天4%、低于每天3%、低于每天2%或低于每天1%。本文所述的任何方法的一些实施方案还包括使用一定浓度的敏化剂在所述生产生物反应器中培养细胞(例如,本文所述的任何细胞),所述浓度的敏化剂被预测在所述生产生物反应器中培养细胞(例如,本文所述的任何细胞)的过程中具有如下比细胞死亡率:每天约0.1%至约40%、每天约0.1%至约38%、每天约0.1%至约36%、每天约0.1%至约34%、每天约0.1%至约32%、每天约0.1%至约30%、每天约0.1%至约28%、每天约0.1%至约26%、每天约0.1%至约24%、每天约0.1%至约22%、每天约0.1%至约20%、每天约0.1%至约18%、每天约0.1%至约16%、每天约0.1%至约14%、每天约0.1%至约12%、每天约0.1%至约10%、每天约0.1%至约8%、每天约0.1%至约6%、每天约0.1%至约5%、每天约0.1%至约4.5%、每天约0.1%至约4.0%、每天约0.1%至约3.5%、每天约0.1%至约3.0%、每天约0.1%至约2.5%、每天约0.1%至约2.0%、每天约0.1%至约1.5%、每天约0.1%至约1.0%、每天约0.1%至约0.5%、每天约0.5%至约40%、每天约0.5%至约38%、每天约0.5%至约36%、每天约0.5%至约34%、每天约0.5%至约32%、每天约0.5%至约30%、每天约0.5%至约28%、每天约0.5%至约26%、每天约0.5%至约24%、每天约0.5%至约22%、每天约0.5%

至约20%、每天约0.5%至约18%、每天约0.5%至约16%、每天约0.5%至约14%、每天约0.5%至约12%、每天约0.5%至约10%、每天约0.5%至约8%、每天约0.5%至约6%、每天约0.5%至约5%、每天约0.5%至约4.5%、每天约0.5%至约4.0%、每天约0.5%至约3.5%、每天约0.5%至约3.0%、每天约0.5%至约2.5%、每天约0.5%至约2.0%、每天约0.5%至约1.5%、每天约0.5%至约1.0%、每天约1.0%至约40%、每天约1.0%至约38%、每天约1.0%至约36%、每天约1.0%至约34%、每天约1.0%至约32%、每天约1.0%至约30%、每天约1.0%至约28%、每天约1.0%至约26%、每天约1.0%至约24%、每天约1.0%至约22%、每天约1.0%至约20%、每天约1.0%至约18%、每天约1.0%至约16%、每天约1.0%至约14%、每天约1.0%至约12%、每天约1.0%至约10%、每天约1.0%至约8%、每天约1.0%至约6%、每天约1.0%至约5%、每天约1.0%至约4.5%、每天约1.0%至约4.0%、每天约1.0%至约3.5%、每天约1.0%至约3.0%、每天约1.0%至约2.5%、每天约1.0%至约2.0%、每天约1.0%至约1.5%、每天约1.5%至约40%、每天约1.5%至约38%、每天约1.5%至约36%、每天约1.5%至约34%、每天约1.5%至约32%、每天约1.5%至约30%、每天约1.5%至约28%、每天约1.5%至约26%、每天约1.5%至约24%、每天约1.5%至约22%、每天约1.5%至约20%、每天约1.5%至约18%、每天约1.5%至约16%、每天约1.5%至约14%、每天约1.5%至约12%、每天约1.5%至约10%、每天约1.5%至约8%、每天约1.5%至约6%、每天约1.5%至约5%、每天约1.5%至约4.5%、每天约1.5%至约4.0%、每天约1.5%至约3.5%、每天约1.5%至约3.0%、每天约1.5%至约2.5%、每天约1.5%至约2.0%、每天约2.0%至约40%、每天约2.0%至约38%、每天约2.0%至约36%、每天约2.0%至约34%、每天约2.0%至约32%、每天约2.0%至约30%、每天约2.0%至约28%、每天约2.0%至约26%、每天约2.0%至约24%、每天约2.0%至约22%、每天约2.0%至约20%、每天约2.0%至约18%、每天约2.0%至约16%、每天约2.0%至约14%、每天约2.0%至约12%、每天约2.0%至约10%、每天约2.0%至约8%、每天约2.0%至约6%、每天约2.0%至约5%、每天约2.0%至约4.5%、每天约2.0%至约4.0%、每天约2.0%至约3.5%、每天约2.0%至约3.0%、每天约2.0%至约2.5%、每天约2.5%至约40%、每天约2.5%至约38%、每天约2.5%至约36%、每天约2.5%至约34%、每天约2.5%至约32%、每天约2.5%至约30%、每天约2.5%至约28%、每天约2.5%至约26%、每天约2.5%至约24%、每天约2.5%至约22%、每天约2.5%至约20%、每天约2.5%至约18%、每天约2.5%至约16%、每天约2.5%至约14%、每天约2.5%至约12%、每天约2.5%至约10%、每天约2.5%至约8%、每天约2.5%至约6%、每天约2.5%至约5%、每天约2.5%至约4.5%、每天约2.5%至约4.0%、每天约2.5%至约3.5%、每天约2.5%至约3.0%、每天约3.0%至约40%、每天约3.0%至约38%、每天约3.0%至约36%、每天约3.0%至约34%、每天约3.0%至约32%、每天约3.0%至约30%、每天约3.0%至约28%、每天约3.0%至约26%、每天约3.0%至约24%、每天约3.0%至约22%、每天约3.0%至约20%、每天约3.0%至约18%、每天约3.0%至约16%、每天约3.0%至约14%、每天约3.0%至约12%、每天约3.0%至约10%、每天约3.0%至约8%、每天约3.0%至约6%、每天约3.0%至约5%、每天约3.0%至约4.5%、每天约3.0%至约4.0%、每天约3.0%至约3.5%、每天约3.5%至约40%、每天约3.5%至约38%、每天约3.5%至约36%、每天约3.5%至约34%、每天约3.5%至约32%、每天约3.5%至约30%、每天约3.5%至约28%、每天约3.5%至约26%、每天约3.5%至约24%、每天约3.5%至约

22%、每天约3.5%至约20%、每天约3.5%至约18%、每天约3.5%至约16%、每天约3.5%至约14%、每天约3.5%至约12%、每天约3.5%至约10%、每天约3.5%至约8%、每天约3.5%至约6%、每天约3.5%至约5%、每天约3.5%至约4.5%、每天约3.5%至约4.0%、每天约4.0%至约40%、每天约4.0%至约38%、每天约4.0%至约36%、每天约4.0%至约34%、每天约4.0%至约32%、每天约4.0%至约30%、每天约4.0%至约28%、每天约4.0%至约26%、每天约4.0%至约24%、每天约4.0%至约22%、每天约4.0%至约20%、每天约4.0%至约18%、每天约4.0%至约16%、每天约4.0%至约14%、每天约4.0%至约12%、每天约4.0%至约10%、每天约4.0%至约8%、每天约4.0%至约6%、每天约4.0%至约5%、每天约4.0%至约4.5%、每天约4.5%至约40%、每天约4.5%至约38%、每天约4.5%至约36%、每天约4.5%至约34%、每天约4.5%至约32%、每天约4.5%至约30%、每天约4.5%至约28%、每天约4.5%至约26%、每天约4.5%至约24%、每天约4.5%至约22%、每天约4.5%至约20%、每天约4.5%至约18%、每天约4.5%至约16%、每天约4.5%至约14%、每天约4.5%至约12%、每天约4.5%至约10%、每天约4.5%至约8%、每天约4.5%至约6%、每天约4.5%至约5%、每天约5%至约40%、每天约5%至约38%、每天约5%至约36%、每天约5%至约34%、每天约5%至约32%、每天约5%至约30%、每天约5%至约28%、每天约5%至约26%、每天约5%至约24%、每天约5%至约22%、每天约5%至约20%、每天约5%至约18%、每天约5%至约16%、每天约5%至约14%、每天约5%至约12%、每天约5%至约10%、每天约5%至约8%、每天约5%至约6%、每天约6%至约40%、每天约6%至约38%、每天约6%至约36%、每天约6%至约34%、每天约6%至约32%、每天约6%至约30%、每天约6%至约28%、每天约6%至约26%、每天约6%至约24%、每天约6%至约22%、每天约6%至约20%、每天约6%至约18%、每天约6%至约16%、每天约6%至约14%、每天约6%至约12%、每天约6%至约10%、每天约6%至约8%、每天约8%至约40%、每天约8%至约38%、每天约8%至约36%、每天约8%至约34%、每天约8%至约32%、每天约8%至约30%、每天约8%至约28%、每天约8%至约26%、每天约8%至约24%、每天约8%至约22%、每天约8%至约20%、每天约8%至约18%、每天约8%至约16%、每天约8%至约14%、每天约8%至约12%、每天约8%至约10%、每天约10%至约40%、每天约10%至约38%、每天约10%至约36%、每天约10%至约34%、每天约10%至约32%、每天约10%至约30%、每天约10%至约28%、每天约10%至约26%、每天约10%至约24%、每天约10%至约22%、每天约10%至约20%、每天约10%至约18%、每天约10%至约16%、每天约10%至约14%、每天约10%至约12%、每天约12%至约40%、每天约12%至约38%、每天约12%至约36%、每天约12%至约34%、每天约12%至约32%、每天约12%至约30%、每天约12%至约28%、每天约12%至约26%、每天约12%至约24%、每天约12%至约22%、每天约12%至约20%、每天约12%至约18%、每天约12%至约16%、每天约12%至约14%、每天约14%至约40%、每天约14%至约38%、每天约14%至约36%、每天约14%至约34%、每天约14%至约32%、每天约14%至约30%、每天约14%至约28%、每天约14%至约26%、每天约14%至约24%、每天约14%至约22%、每天约14%至约20%、每天约14%至约18%、每天约14%至约16%、每天约16%至约40%、每天约16%至约38%、每天约16%至约36%、每天约16%至约34%、每天约16%至约32%、每天约16%至约30%、每天约16%至约28%、每天约16%至约26%、每天约16%至约24%、每天约16%至约22%、每天约16%至约20%、每天约16%至约18%、每天约18%至约40%、每

天约18％至约38％、每天约18％至约36％、每天约18％至约34％、每天约18％至约32％、每天约18％至约30％、每天约18％至约28％、每天约18％至约26％、每天约18％至约24％、每天约18％至约22％、每天约18％至约20％、每天约20％至约40％、每天约20％至约38％、每天约20％至约36％、每天约20％至约34％、每天约20％至约32％、每天约20％至约30％、每天约20％至约28％、每天约20％至约26％、每天约20％至约24％、每天约20％至约22％、每天约22％至约40％、每天约22％至约38％、每天约22％至约36％、每天约22％至约34％、每天约22％至约32％、每天约22％至约30％、每天约22％至约28％、每天约22％至约26％、每天约22％至约24％、每天约24％至约40％、每天约24％至约38％、每天约24％至约36％、每天约24％至约34％、每天约24％至约32％、每天约24％至约30％、每天约24％至约28％、每天约24％至约26％、每天约26％至约40％、每天约26％至约38％、每天约26％至约36％、每天约26％至约34％、每天约26％至约32％、每天约26％至约30％、每天约26％至约28％、每天约28％至约40％、每天约28％至约38％、每天约28％至约36％、每天约28％至约34％、每天约28％至约32％、每天约28％至约30％、每天约30％至约40％、每天约30％至约38％、每天约30％至约36％、每天约30％至约34％、每天约30％至约32％、每天约32％至约40％、每天约32％至约38％、每天约32％至约36％、每天约32％至约34％、每天约34％至约40％、每天约34％至约38％、每天约34％至约36％、每天约36％至约40％、每天约36％至约38％或每天约38％至约40％。

[0223] 这些方法的一些实施方案还包括使用一定浓度的敏化剂在所述生产生物反应器(例如,本文所述的任何生产生物反应器)中培养细胞(例如,本文所述的任何细胞),所述浓度的敏化剂被预测在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中产生如下细胞比LDH产量:低于150nU/细胞/天、低于145nU/细胞/天、低于140nU/细胞/天、低于135nU/细胞/天、低于130nU/细胞/天、低于125nU/细胞/天、低于120nU/细胞/天、低于115nU/细胞/天、低于150nU/细胞/天、低于110nU/细胞/天、低于105nU/细胞/天、低于100nU/细胞/天、低于95nU/细胞/天、低于90nU/细胞/天、低于85nU/细胞/天、低于80nU/细胞/天、低于75nU/细胞/天、低于70nU/细胞/天、低于65nU/细胞/天、低于60nU/细胞/天、低于55nU/细胞/天、低于50nU/细胞/天、低于45nU/细胞/天、低于45nU/细胞/天、低于40nU/细胞/天、低于35nU/细胞/天、低于30nU/细胞/天、低于25nU/细胞/天、低于20nU/细胞/天、低于15nU/细胞/天、低于10nU/细胞/天、低于5nU/细胞/天或低于1nU/细胞/天。这些方法的一些实施方案还包括使用一定浓度的敏化剂在所述生产生物反应器(例如,本文所述的任何生产生物反应器)中培养细胞(例如,本文所述的任何细胞),所述浓度的敏化剂被预测在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中产生如下细胞比LDH产量:约0.1nU/细胞/天至约150nU/细胞/天、约0.1nU/细胞/天至约140nU/细胞/天、约0.1nU/细胞/天至约130nU/细胞/天、约0.1nU/细胞/天至约120nU/细胞/天、约0.1nU/细胞/天至约110nU/细胞/天、约0.1nU/细胞/天至约100nU/细胞/天、约0.1nU/细胞/天至约95nU/细胞/天、约0.1nU/细胞/天至约90nU/细胞/天、约0.1nU/细胞/天至约85nU/细胞/天、约0.1nU/细胞/天至约80nU/细胞/天、约0.1nU/细胞/天至约75nU/细胞/天、约0.1nU/细胞/天至约70nU/细胞/天、约0.1nU/细胞/天至约65nU/细胞/天、约0.1nU/细胞/天至约60nU/细胞/天、约0.1nU/细胞/天至约55nU/细胞/天、约0.1nU/细胞/天至约50nU/细胞/天、约0.1nU/细胞/天至约45nU/细胞/天、约0.1nU/细胞/天至约40nU/细胞/天、约0.1nU/细胞/天至约35nU/细胞/天、约0.1nU/细胞/天至约30nU/细胞/天、约

0.1nU/细胞/天至约25nU/细胞/天、约0.1nU/细胞/天至约20nU/细胞/天、约0.1nU/细胞/天至约15nU/细胞/天、约0.1nU/细胞/天至约10nU/细胞/天、约0.1nU/细胞/天至约5nU/细胞/天、约0.1nU/细胞/天至约2.5nU/细胞/天、约0.1nU/细胞/天至约1.0nU/细胞/天、约1.0nU/细胞/天至约150nU/细胞/天、约1.0nU/细胞/天至约140nU/细胞/天、约1.0nU/细胞/天至约130nU/细胞/天、约1.0nU/细胞/天至约120nU/细胞/天、约1.0nU/细胞/天至约110nU/细胞/天、约1.0nU/细胞/天至约100nU/细胞/天、约1.0nU/细胞/天至约95nU/细胞/天、约1.0nU/细胞/天至约90nU/细胞/天、约1.0nU/细胞/天至约85nU/细胞/天、约1.0nU/细胞/天至约80nU/细胞/天、约1.0nU/细胞/天至约75nU/细胞/天、约1.0nU/细胞/天至约70nU/细胞/天、约1.0nU/细胞/天至约65nU/细胞/天、约1.0nU/细胞/天至约60nU/细胞/天、约1.0nU/细胞/天至约55nU/细胞/天、约1.0nU/细胞/天至约50nU/细胞/天、约1.0nU/细胞/天至约45nU/细胞/天、约1.0nU/细胞/天至约40nU/细胞/天、约1.0nU/细胞/天至约35nU/细胞/天、约1.0nU/细胞/天至约30nU/细胞/天、约1.0nU/细胞/天至约25nU/细胞/天、约1.0nU/细胞/天至约20nU/细胞/天、约1.0nU/细胞/天至约15nU/细胞/天、约1.0nU/细胞/天至约10nU/细胞/天、约1.0nU/细胞/天至约5nU/细胞/天、约1.0nU/细胞/天至约2.5nU/细胞/天、约2.5nU/细胞/天至约150nU/细胞/天、约2.5nU/细胞/天至约140nU/细胞/天、约2.5nU/细胞/天至约130nU/细胞/天、约2.5nU/细胞/天至约120nU/细胞/天、约2.5nU/细胞/天至约110nU/细胞/天、约2.5nU/细胞/天至约100nU/细胞/天、约2.5nU/细胞/天至约95nU/细胞/天、约2.5nU/细胞/天至约90nU/细胞/天、约2.5nU/细胞/天至约85nU/细胞/天、约2.5nU/细胞/天至约80nU/细胞/天、约2.5nU/细胞/天至约75nU/细胞/天、约2.5nU/细胞/天至约70nU/细胞/天、约2.5nU/细胞/天至约65nU/细胞/天、约2.5nU/细胞/天至约60nU/细胞/天、约2.5nU/细胞/天至约55nU/细胞/天、约2.5nU/细胞/天至约50nU/细胞/天、约2.5nU/细胞/天至约45nU/细胞/天、约2.5nU/细胞/天至约40nU/细胞/天、约2.5nU/细胞/天至约35nU/细胞/天、约2.5nU/细胞/天至约30nU/细胞/天、约2.5nU/细胞/天至约25nU/细胞/天、约2.5nU/细胞/天至约20nU/细胞/天、约2.5nU/细胞/天至约15nU/细胞/天、约2.5nU/细胞/天至约10nU/细胞/天、约2.5nU/细胞/天至约5nU/细胞/天、约5nU/细胞/天至约150nU/细胞/天、约5nU/细胞/天至约140nU/细胞/天、约5nU/细胞/天至约130nU/细胞/天、约5nU/细胞/天至约120nU/细胞/天、约5nU/细胞/天至约110nU/细胞/天、约5nU/细胞/天至约100nU/细胞/天、约5nU/细胞/天至约95nU/细胞/天、约5nU/细胞/天至约90nU/细胞/天、约5nU/细胞/天至约85nU/细胞/天、约5nU/细胞/天至约80nU/细胞/天、约5nU/细胞/天至约75nU/细胞/天、约5nU/细胞/天至约70nU/细胞/天、约5nU/细胞/天至约65nU/细胞/天、约5nU/细胞/天至约60nU/细胞/天、约5nU/细胞/天至约55nU/细胞/天、约5nU/细胞/天至约50nU/细胞/天、约5nU/细胞/天至约45nU/细胞/天、约5nU/细胞/天至约40nU/细胞/天、约5nU/细胞/天至约35nU/细胞/天、约5nU/细胞/天至约30nU/细胞/天、约5nU/细胞/天至约25nU/细胞/天、约5nU/细胞/天至约20nU/细胞/天、约5nU/细胞/天至约15nU/细胞/天、约5nU/细胞/天至约10nU/细胞/天、约10nU/细胞/天至约150nU/细胞/天、约10nU/细胞/天至约140nU/细胞/天、约10nU/细胞/天至约130nU/细胞/天、约10nU/细胞/天至约120nU/细胞/天、约10nU/细胞/天至约110nU/细胞/天、约10nU/细胞/天至约100nU/细胞/天、约10nU/细胞/天至约95nU/细胞/天、约10nU/细胞/天至约90nU/细胞/天、约10nU/细胞/天至约85nU/细胞/天、约10nU/细胞/天至约80nU/细胞/天、约10nU/细胞/天至约75nU/细胞/天、约10nU/细胞/天至约70nU/

细胞/天、约10nU/细胞/天至约65nU/细胞/天、约10nU/细胞/天至约60nU/细胞/天、约10nU/细胞/天至约55nU/细胞/天、约10nU/细胞/天至约50nU/细胞/天、约10nU/细胞/天至约45nU/细胞/天、约10nU/细胞/天至约40nU/细胞/天、约10nU/细胞/天至约35nU/细胞/天、约10nU/细胞/天至约30nU/细胞/天、约10nU/细胞/天至约25nU/细胞/天、约10nU/细胞/天至约20nU/细胞/天、约10nU/细胞/天至约15nU/细胞/天、约15nU/细胞/天至约150nU/细胞/天、约15nU/细胞/天至约140nU/细胞/天、约15nU/细胞/天至约130nU/细胞/天、约15nU/细胞/天至约120nU/细胞/天、约15nU/细胞/天至约110nU/细胞/天、约15nU/细胞/天至约100nU/细胞/天、约15nU/细胞/天至约95nU/细胞/天、约15nU/细胞/天至约90nU/细胞/天、约15nU/细胞/天至约85nU/细胞/天、约15nU/细胞/天至约80nU/细胞/天、约15nU/细胞/天至约75nU/细胞/天、约15nU/细胞/天至约70nU/细胞/天、约15nU/细胞/天至约65nU/细胞/天、约15nU/细胞/天至约60nU/细胞/天、约15nU/细胞/天至约55nU/细胞/天、约15nU/细胞/天至约50nU/细胞/天、约15nU/细胞/天至约45nU/细胞/天、约15nU/细胞/天至约40nU/细胞/天、约15nU/细胞/天至约35nU/细胞/天、约15nU/细胞/天至约30nU/细胞/天、约15nU/细胞/天至约25nU/细胞/天、约15nU/细胞/天至约20nU/细胞/天、约20nU/细胞/天至约150nU/细胞/天、约20nU/细胞/天至约140nU/细胞/天、约20nU/细胞/天至约130nU/细胞/天、约20nU/细胞/天至约120nU/细胞/天、约20nU/细胞/天至约110nU/细胞/天、约20nU/细胞/天至约100nU/细胞/天、约20nU/细胞/天至约95nU/细胞/天、约20nU/细胞/天至约90nU/细胞/天、约20nU/细胞/天至约85nU/细胞/天、约20nU/细胞/天至约80nU/细胞/天、约20nU/细胞/天至约75nU/细胞/天、约20nU/细胞/天至约70nU/细胞/天、约20nU/细胞/天至约65nU/细胞/天、约20nU/细胞/天至约60nU/细胞/天、约20nU/细胞/天至约55nU/细胞/天、约20nU/细胞/天至约50nU/细胞/天、约20nU/细胞/天至约45nU/细胞/天、约20nU/细胞/天至约40nU/细胞/天、约20nU/细胞/天至约35nU/细胞/天、约20nU/细胞/天至约30nU/细胞/天、约20nU/细胞/天至约25nU/细胞/天、约25nU/细胞/天至约150nU/细胞/天、约25nU/细胞/天至约140nU/细胞/天、约25nU/细胞/天至约130nU/细胞/天、约25nU/细胞/天至约120nU/细胞/天、约25nU/细胞/天至约110nU/细胞/天、约25nU/细胞/天至约100nU/细胞/天、约25nU/细胞/天至约95nU/细胞/天、约25nU/细胞/天至约90nU/细胞/天、约25nU/细胞/天至约85nU/细胞/天、约25nU/细胞/天至约80nU/细胞/天、约25nU/细胞/天至约75nU/细胞/天、约25nU/细胞/天至约70nU/细胞/天、约25nU/细胞/天至约65nU/细胞/天、约25nU/细胞/天至约60nU/细胞/天、约25nU/细胞/天至约55nU/细胞/天、约25nU/细胞/天至约50nU/细胞/天、约25nU/细胞/天至约45nU/细胞/天、约25nU/细胞/天至约40nU/细胞/天、约25nU/细胞/天至约35nU/细胞/天、约25nU/细胞/天至约30nU/细胞/天、约30nU/细胞/天至约150nU/细胞/天、约30nU/细胞/天至约140nU/细胞/天、约30nU/细胞/天至约130nU/细胞/天、约30nU/细胞/天至约120nU/细胞/天、约30nU/细胞/天至约110nU/细胞/天、约30nU/细胞/天至约100nU/细胞/天、约30nU/细胞/天至约95nU/细胞/天、约30nU/细胞/天至约90nU/细胞/天、约30nU/细胞/天至约85nU/细胞/天、约30nU/细胞/天至约80nU/细胞/天、约30nU/细胞/天至约75nU/细胞/天、约30nU/细胞/天至约70nU/细胞/天、约30nU/细胞/天至约65nU/细胞/天、约30nU/细胞/天至约60nU/细胞/天、约30nU/细胞/天至约55nU/细胞/天、约30nU/细胞/天至约50nU/细胞/天、约30nU/细胞/天至约45nU/细胞/天、约30nU/细胞/天至约40nU/细胞/天、约30nU/细胞/天至约35nU/细胞/天、约35nU/细胞/天至约150nU/细胞/天、约35nU/

细胞/天至约140nU/细胞/天、约35nU/细胞/天至约130nU/细胞/天、约35nU/细胞/天至约120nU/细胞/天、约35nU/细胞/天至约110nU/细胞/天、约35nU/细胞/天至约100nU/细胞/天、约35nU/细胞/天至约95nU/细胞/天、约35nU/细胞/天至约90nU/细胞/天、约35nU/细胞/天至约85nU/细胞/天、约35nU/细胞/天至约80nU/细胞/天、约35nU/细胞/天至约75nU/细胞/天、约35nU/细胞/天至约70nU/细胞/天、约35nU/细胞/天至约65nU/细胞/天、约35nU/细胞/天至约60nU/细胞/天、约35nU/细胞/天至约55nU/细胞/天、约35nU/细胞/天至约50nU/细胞/天、约35nU/细胞/天至约45nU/细胞/天、约35nU/细胞/天至约40nU/细胞/天、约40nU/细胞/天至约150nU/细胞/天、约40nU/细胞/天至约140nU/细胞/天、约40nU/细胞/天至约130nU/细胞/天、约40nU/细胞/天至约120nU/细胞/天、约40nU/细胞/天至约110nU/细胞/天、约40nU/细胞/天至约100nU/细胞/天、约40nU/细胞/天至约95nU/细胞/天、约40nU/细胞/天至约90nU/细胞/天、约40nU/细胞/天至约85nU/细胞/天、约40nU/细胞/天至约80nU/细胞/天、约40nU/细胞/天至约75nU/细胞/天、约40nU/细胞/天至约70nU/细胞/天、约40nU/细胞/天至约65nU/细胞/天、约40nU/细胞/天至约60nU/细胞/天、约40nU/细胞/天至约55nU/细胞/天、约40nU/细胞/天至约50nU/细胞/天、约40nU/细胞/天至约45nU/细胞/天、约45nU/细胞/天至约150nU/细胞/天、约45nU/细胞/天至约140nU/细胞/天、约45nU/细胞/天至约130nU/细胞/天、约45nU/细胞/天至约120nU/细胞/天、约45nU/细胞/天至约110nU/细胞/天、约45nU/细胞/天至约100nU/细胞/天、约45nU/细胞/天至约95nU/细胞/天、约45nU/细胞/天至约90nU/细胞/天、约45nU/细胞/天至约85nU/细胞/天、约45nU/细胞/天至约80nU/细胞/天、约45nU/细胞/天至约75nU/细胞/天、约45nU/细胞/天至约70nU/细胞/天、约45nU/细胞/天至约65nU/细胞/天、约45nU/细胞/天至约60nU/细胞/天、约45nU/细胞/天至约55nU/细胞/天、约45nU/细胞/天至约50nU/细胞/天、约50nU/细胞/天至约150nU/细胞/天、约50nU/细胞/天至约140nU/细胞/天、约50nU/细胞/天至约130nU/细胞/天、约50nU/细胞/天至约120nU/细胞/天、约50nU/细胞/天至约110nU/细胞/天、约50nU/细胞/天至约100nU/细胞/天、约50nU/细胞/天至约95nU/细胞/天、约50nU/细胞/天至约90nU/细胞/天、约50nU/细胞/天至约85nU/细胞/天、约50nU/细胞/天至约80nU/细胞/天、约50nU/细胞/天至约75nU/细胞/天、约50nU/细胞/天至约70nU/细胞/天、约50nU/细胞/天至约65nU/细胞/天、约50nU/细胞/天至约60nU/细胞/天、约50nU/细胞/天至约55nU/细胞/天、约55nU/细胞/天至约150nU/细胞/天、约55nU/细胞/天至约140nU/细胞/天、约55nU/细胞/天至约130nU/细胞/天、约55nU/细胞/天至约120nU/细胞/天、约55nU/细胞/天至约110nU/细胞/天、约55nU/细胞/天至约100nU/细胞/天、约55nU/细胞/天至约95nU/细胞/天、约55nU/细胞/天至约90nU/细胞/天、约55nU/细胞/天至约85nU/细胞/天、约55nU/细胞/天至约80nU/细胞/天、约55nU/细胞/天至约75nU/细胞/天、约55nU/细胞/天至约70nU/细胞/天、约55nU/细胞/天至约65nU/细胞/天、约55nU/细胞/天至约60nU/细胞/天、约60nU/细胞/天至约150nU/细胞/天、约60nU/细胞/天至约140nU/细胞/天、约60nU/细胞/天至约130nU/细胞/天、约60nU/细胞/天至约120nU/细胞/天、约60nU/细胞/天至约110nU/细胞/天、约60nU/细胞/天至约100nU/细胞/天、约60nU/细胞/天至约95nU/细胞/天、约60nU/细胞/天至约90nU/细胞/天、约60nU/细胞/天至约85nU/细胞/天、约60nU/细胞/天至约80nU/细胞/天、约60nU/细胞/天至约75nU/细胞/天、约60nU/细胞/天至约70nU/细胞/天、约60nU/细胞/天至约65nU/细胞/天、约65nU/细胞/天至约150nU/细胞/天、约65nU/细胞/天至约140nU/细胞/天、约65nU/细

胞/天至约130nU/细胞/天、约65nU/细胞/天至约120nU/细胞/天、约65nU/细胞/天至约110nU/细胞/天、约65nU/细胞/天至约100nU/细胞/天、约65nU/细胞/天至约95nU/细胞/天、约65nU/细胞/天至约90nU/细胞/天、约65nU/细胞/天至约85nU/细胞/天、约65nU/细胞/天至约80nU/细胞/天、约65nU/细胞/天至约75nU/细胞/天、约65nU/细胞/天至约70nU/细胞/天、约70nU/细胞/天至约150nU/细胞/天、约70nU/细胞/天至约140nU/细胞/天、约70nU/细胞/天至约130nU/细胞/天、约70nU/细胞/天至约120nU/细胞/天、约70nU/细胞/天至约110nU/细胞/天、约70nU/细胞/天至约100nU/细胞/天、约70nU/细胞/天至约95nU/细胞/天、约70nU/细胞/天至约90nU/细胞/天、约70nU/细胞/天至约85nU/细胞/天、约70nU/细胞/天至约80nU/细胞/天、约70nU/细胞/天至约75nU/细胞/天、约75nU/细胞/天至约150nU/细胞/天、约75nU/细胞/天至约140nU/细胞/天、约75nU/细胞/天至约130nU/细胞/天、约75nU/细胞/天至约120nU/细胞/天、约75nU/细胞/天至约110nU/细胞/天、约75nU/细胞/天至约100nU/细胞/天、约75nU/细胞/天至约95nU/细胞/天、约75nU/细胞/天至约90nU/细胞/天、约75nU/细胞/天至约85nU/细胞/天、约75nU/细胞/天至约80nU/细胞/天、约80nU/细胞/天至约150nU/细胞/天、约80nU/细胞/天至约140nU/细胞/天、约80nU/细胞/天至约130nU/细胞/天、约80nU/细胞/天至约120nU/细胞/天、约80nU/细胞/天至约110nU/细胞/天、约80nU/细胞/天至约100nU/细胞/天、约80nU/细胞/天至约95nU/细胞/天、约80nU/细胞/天至约90nU/细胞/天、约80nU/细胞/天至约85nU/细胞/天、约85nU/细胞/天至约150nU/细胞/天、约85nU/细胞/天至约140nU/细胞/天、约85nU/细胞/天至约130nU/细胞/天、约85nU/细胞/天至约120nU/细胞/天、约85nU/细胞/天至约110nU/细胞/天、约85nU/细胞/天至约100nU/细胞/天、约85nU/细胞/天至约95nU/细胞/天、约85nU/细胞/天至约90nU/细胞/天、约90nU/细胞/天至约150nU/细胞/天、约90nU/细胞/天至约140nU/细胞/天、约90nU/细胞/天至约130nU/细胞/天、约90nU/细胞/天至约120nU/细胞/天、约90nU/细胞/天至约110nU/细胞/天、约90nU/细胞/天至约100nU/细胞/天、约90nU/细胞/天至约95nU/细胞/天、约95nU/细胞/天至约150nU/细胞/天、约95nU/细胞/天至约140nU/细胞/天、约95nU/细胞/天至约130nU/细胞/天、约95nU/细胞/天至约120nU/细胞/天、约95nU/细胞/天至约110nU/细胞/天、约95nU/细胞/天至约100nU/细胞/天、约100nU/细胞/天至约150nU/细胞/天、约100nU/细胞/天至约140nU/细胞/天、约100nU/细胞/天至约130nU/细胞/天、约100nU/细胞/天至约120nU/细胞/天、约100nU/细胞/天至约110nU/细胞/天、约110nU/细胞/天至约150nU/细胞/天、约110nU/细胞/天至约140nU/细胞/天、约110nU/细胞/天至约130nU/细胞/天、约110nU/细胞/天至约120nU/细胞/天、约120nU/细胞/天至约150nU/细胞/天、约120nU/细胞/天至约140nU/细胞/天、约120nU/细胞/天至约130nU/细胞/天、约130nU/细胞/天至约150nU/细胞/天、约130nU/细胞/天至约140nU/细胞/天或约140nU/细胞/天至约150nU/细胞/天。

[0224] 生长率是复合生长计算,其可以使用下面的方程式确定。

[0225] 最终细胞密度=初始密度x e^{kt},

[0226] 其中k是生长常数,并且t是以天计的时间。

[0227] 表观生长率是计算的死亡率加上生长率的总和。

[0228] 本文所述的任何方法的一些实施方案还包括使用一定浓度的敏化剂在所述生产生物反应器(例如,本文所述的任何生产生物反应器)中培养细胞(例如,本文所述的任何细胞),所述浓度的敏化剂被预测在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中产生如下表观

生长率:大于每天1%、大于每天1.5%、大于每天2%、大于每天2.5%、大于每天3%、大于每天3.5%、大于每天4.0%、大于每天4.5%、大于每天5.0%、大于每天5.5%、大于每天6.0%、大于每天6.5%、大于每天7.0%、大于每天7.5%、大于每天8.0%、大于每天8.5%、大于每天9.0%、大于每天9.5%、大于每天10.0%、大于每天10.5%、大于每天11.0%、大于每天11.5%、大于每天12.0%、大于每天12.5%、大于每天13.0%、大于每天13.5%、大于每天14.0%、大于每天14.5%、大于每天15.0%、大于每天16%、大于每天17%、大于每天18%、大于每天19%、大于每天20%、大于每天21%、大于每天22%、大于每天23%、大于每天24%、大于每天25%、大于每天30%、大于每天35%、大于每天40%、大于每天45%、大于每天50%、大于每天55%、大于每天60%、大于每天65%、大于每天70%、大于每天75%、大于每天80%、大于每天85%、大于每天90%、大于每天95%、大于每天100%、大于每天105%、大于每天110%、大于每天115%、大于每天120%、大于每天125%、大于每天130%、大于每天135%、大于每天140%、大于每天145%或大于每天150%。本文所述的任何方法的一些实施方案还包括使用一定浓度的敏化剂在所述生产生物反应器(例如,本文所述的任何生产生物反应器)中培养细胞(例如,本文所述的任何细胞),所述浓度的敏化剂被预测在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中产生如下表观生长率:每天约0.1%至每天约150%、每天约0.1%至每天约140%、每天约0.1%至每天约135%、每天约0.1%至每天约130%、每天约0.1%至每天约125%、每天约0.1%至每天约120%、每天约0.1%至每天约115%、每天约0.1%至每天约110%、每天约0.1%至每天约105%、每天约0.1%至每天约100%、每天约0.1%至每天约95%、每天约0.1%至每天约90%、每天约0.1%至每天约85%、每天约0.1%至每天约80%、每天约0.1%至每天约75%、每天约0.1%至每天约70%、每天约0.1%至每天约65%、每天约0.1%至每天约60%、每天约0.1%至每天约55%、每天约0.1%至每天约50%、每天约0.1%至每天约45%、每天约0.1%至每天约40%、每天约0.1%至每天约35%、每天约0.1%至每天约30%、每天约0.1%至每天约25%、每天约0.1%至每天约20%、每天约0.1%至每天约18%、每天约0.1%至每天约16%、每天约0.1%至每天约14%、每天约0.1%至每天约12%、每天约0.1%至每天约10%、每天约0.1%至每天约9.0%、每天约0.1%至每天约8.0%、每天约0.1%至每天约7.0%、每天约0.1%至每天约6.0%、每天约0.1%至每天约5.0%、每天约0.1%至每天约4.5%、每天约0.1%至每天约4.0%、每天约0.1%至每天约3.5%、每天约0.1%至每天约3.0%、每天约0.1%至每天约2.5%、每天约0.1%至每天约2.0%、每天约0.1%至每天约1.5%、每天约0.1%至每天约1.0%、每天约0.1%至每天约0.5%、每天约0.5%至每天约140%、每天约0.5%至每天约135%、每天约0.5%至每天约130%、每天约0.5%至每天约125%、每天约0.5%至每天约120%、每天约0.5%至每天约115%、每天约0.5%至每天约110%、每天约0.5%至每天约105%、每天约0.5%至每天约100%、每天约0.5%至每天约95%、每天约0.5%至每天约90%、每天约0.5%至每天约85%、每天约0.5%至每天约80%、每天约0.5%至每天约75%、每天约0.5%至每天约70%、每天约0.5%至每天约65%、每天约0.5%至每天约60%、每天约0.5%至每天约55%、每天约0.5%至每天约50%、每天约0.5%至每天约45%、每天约0.5%至每天约40%、每天约0.5%至每天约35%、每天约0.5%至每天约30%、每天约0.5%至每天约25%、每天约0.5%至每天约20%、每天约0.5%至每天约18%、每天约0.5%至每天约16%、每天约0.5%至每天约14%、每天约0.5%至每天约12%、每天约0.5%至每天约

10％、每天约0.5％至每天约9.0％、每天约0.5％至每天约8.0％、每天约0.5％至每天约7.0％、每天约0.5％至每天约6.0％、每天约0.5％至每天约5.0％、每天约0.5％至每天约4.5％、每天约0.5％至每天约4.0％、每天约0.5％至每天约3.5％、每天约0.5％至每天约3.0％、每天约0.5％至每天约2.5％、每天约0.5％至每天约2.0％、每天约0.5％至每天约1.5％、每天约0.5％至每天约1.0％、每天约1.0％至每天约140％、每天约1.0％至每天约135％、每天约1.0％至每天约130％、每天约1.0％至每天约125％、每天约1.0％至每天约120％、每天约1.0％至每天约115％、每天约1.0％至每天约110％、每天约1.0％至每天约105％、每天约1.0％至每天约100％、每天约1.0％至每天约95％、每天约1.0％至每天约90％、每天约1.0％至每天约85％、每天约1.0％至每天约80％、每天约1.0％至每天约75％、每天约1.0％至每天约70％、每天约1.0％至每天约65％、每天约1.0％至每天约60％、每天约1.0％至每天约55％、每天约1.0％至每天约50％、每天约1.0％至每天约45％、每天约1.0％至每天约40％、每天约1.0％至每天约35％、每天约1.0％至每天约30％、每天约1.0％至每天约25％、每天约1.0％至每天约20％、每天约1.0％至每天约18％、每天约1.0％至每天约16％、每天约1.0％至每天约14％、每天约1.0％至每天约12％、每天约1.0％至每天约10％、每天约1.0％至每天约9.0％、每天约1.0％至每天约8.0％、每天约1.0％至每天约7.0％、每天约1.0％至每天约6.0％、每天约1.0％至每天约5.0％、每天约1.0％至每天约4.5％、每天约1.0％至每天约4.0％、每天约1.0％至每天约3.5％、每天约1.0％至每天约3.0％、每天约1.0％至每天约2.5％、每天约1.0％至每天约2.0％、每天约1.0％至每天约1.5％、每天约1.5％至每天约140％、每天约1.5％至每天约135％、每天约1.5％至每天约130％、每天约1.5％至每天约125％、每天约1.5％至每天约120％、每天约1.5％至每天约115％、每天约1.5％至每天约110％、每天约1.5％至每天约105％、每天约1.5％至每天约100％、每天约1.5％至每天约95％、每天约1.5％至每天约90％、每天约1.5％至每天约85％、每天约1.5％至每天约80％、每天约1.5％至每天约75％、每天约1.5％至每天约70％、每天约1.5％至每天约65％、每天约1.5％至每天约60％、每天约1.5％至每天约55％、每天约1.5％至每天约50％、每天约1.5％至每天约45％、每天约1.5％至每天约40％、每天约1.5％至每天约35％、每天约1.5％至每天约30％、每天约1.5％至每天约25％、每天约1.5％至每天约20％、每天约1.5％至每天约18％、每天约1.5％至每天约16％、每天约1.5％至每天约14％、每天约1.5％至每天约12％、每天约1.5％至每天约10％、每天约1.5％至每天约9.0％、每天约1.5％至每天约8.0％、每天约1.5％至每天约7.0％、每天约1.5％至每天约6.0％、每天约1.5％至每天约5.0％、每天约1.5％至每天约4.5％、每天约1.5％至每天约4.0％、每天约1.5％至每天约3.5％、每天约1.5％至每天约3.0％、每天约1.5％至每天约2.5％、每天约1.5％至每天约2.0％、每天约2.0％至每天约140％、每天约2.0％至每天约135％、每天约2.0％至每天约130％、每天约2.0％至每天约125％、每天约2.0％至每天约120％、每天约2.0％至每天约115％、每天约2.0％至每天约110％、每天约2.0％至每天约105％、每天约2.0％至每天约100％、每天约2.0％至每天约95％、每天约2.0％至每天约90％、每天约2.0％至每天约85％、每天约2.0％至每天约80％、每天约2.0％至每天约75％、每天约2.0％至每天约70％、每天约2.0％至每天约65％、每天约2.0％至每天约60％、每天约2.0％至每天约55％、每天约2.0％至每天约50％、每天约2.0％至每天约45％、每天约2.0％至每天约40％、每天约2.0％至每天约35％、每天约2.0％至每天约30％、每天约2.0％

至每天约25%、每天约2.0%至每天约20%、每天约2.0%至每天约18%、每天约2.0%至每天约16%、每天约2.0%至每天约14%、每天约2.0%至每天约12%、每天约2.0%至每天约10%、每天约2.0%至每天约9.0%、每天约2.0%至每天约8.0%、每天约2.0%至每天约7.0%、每天约2.0%至每天约6.0%、每天约2.0%至每天约5.0%、每天约2.0%至每天约4.5%、每天约2.0%至每天约4.0%、每天约2.0%至每天约3.5%、每天约2.0%至每天约3.0%、每天约2.0%至每天约2.5%、每天约2.5%至每天约140%、每天约2.5%至每天约135%、每天约2.5%至每天约130%、每天约2.5%至每天约125%、每天约2.5%至每天约120%、每天约2.5%至每天约115%、每天约2.5%至每天约110%、每天约2.5%至每天约105%、每天约2.5%至每天约100%、每天约2.5%至每天约95%、每天约2.5%至每天约90%、每天约2.5%至每天约85%、每天约2.5%至每天约80%、每天约2.5%至每天约75%、每天约2.5%至每天约70%、每天约2.5%至每天约65%、每天约2.5%至每天约60%、每天约2.5%至每天约55%、每天约2.5%至每天约50%、每天约2.5%至每天约45%、每天约2.5%至每天约40%、每天约2.5%至每天约35%、每天约2.5%至每天约30%、每天约2.5%至每天约25%、每天约2.5%至每天约20%、每天约2.5%至每天约18%、每天约2.5%至每天约16%、每天约2.5%至每天约14%、每天约2.5%至每天约12%、每天约2.5%至每天约10%、每天约2.5%至每天约9.0%、每天约2.5%至每天约8.0%、每天约2.5%至每天约7.0%、每天约2.5%至每天约6.0%、每天约2.5%至每天约5.0%、每天约2.5%至每天约4.5%、每天约2.5%至每天约4.0%、每天约2.5%至每天约3.5%、每天约2.5%至每天约3.0%、每天约3.0%至每天约140%、每天约3.0%至每天约135%、每天约3.0%至每天约130%、每天约3.0%至每天约125%、每天约3.0%至每天约120%、每天约3.0%至每天约115%、每天约3.0%至每天约110%、每天约3.0%至每天约105%、每天约3.0%至每天约100%、每天约3.0%至每天约95%、每天约3.0%至每天约90%、每天约3.0%至每天约85%、每天约3.0%至每天约80%、每天约3.0%至每天约75%、每天约3.0%至每天约70%、每天约3.0%至每天约65%、每天约3.0%至每天约60%、每天约3.0%至每天约55%、每天约3.0%至每天约50%、每天约3.0%至每天约45%、每天约3.0%至每天约40%、每天约3.0%至每天约35%、每天约3.0%至每天约30%、每天约3.0%至每天约25%、每天约3.0%至每天约20%、每天约3.0%至每天约18%、每天约3.0%至每天约16%、每天约3.0%至每天约14%、每天约3.0%至每天约12%、每天约3.0%至每天约10%、每天约3.0%至每天约9.0%、每天约3.0%至每天约8.0%、每天约3.0%至每天约7.0%、每天约3.0%至每天约6.0%、每天约3.0%至每天约5.0%、每天约3.0%至每天约4.5%、每天约3.0%至每天约4.0%、每天约3.0%至每天约3.5%、每天约3.5%至每天约140%、每天约3.5%至每天约135%、每天约3.5%至每天约130%、每天约3.5%至每天约125%、每天约3.5%至每天约120%、每天约3.5%至每天约115%、每天约3.5%至每天约110%、每天约3.5%至每天约105%、每天约3.5%至每天约100%、每天约3.5%至每天约95%、每天约3.5%至每天约90%、每天约3.5%至每天约85%、每天约3.5%至每天约80%、每天约3.5%至每天约75%、每天约3.5%至每天约70%、每天约3.5%至每天约65%、每天约3.5%至每天约60%、每天约3.5%至每天约55%、每天约3.5%至每天约50%、每天约3.5%至每天约45%、每天约3.5%至每天约40%、每天约3.5%至每天约35%、每天约3.5%至每天约30%、每天约3.5%至每天约25%、每天约3.5%至每天约20%、每天约3.5%至每天约18%、每天约3.5%至每

天约16％、每天约3.5％至每天约14％、每天约3.5％至每天约12％、每天约3.5％至每天约10％、每天约3.5％至每天约9.0％、每天约3.5％至每天约8.0％、每天约3.5％至每天约7.0％、每天约3.5％至每天约6.0％、每天约3.5％至每天约5.0％、每天约3.5％至每天约4.5％、每天约3.5％至每天约4.0％、每天约4.0％至每天约140％、每天约4.0％至每天约135％、每天约4.0％至每天约130％、每天约4.0％至每天约125％、每天约4.0％至每天约120％、每天约4.0％至每天约115％、每天约4.0％至每天约110％、每天约4.0％至每天约105％、每天约4.0％至每天约100％、每天约4.0％至每天约95％、每天约4.0％至每天约90％、每天约4.0％至每天约85％、每天约4.0％至每天约80％、每天约4.0％至每天约75％、每天约4.0％至每天约70％、每天约4.0％至每天约65％、每天约4.0％至每天约60％、每天约4.0％至每天约55％、每天约4.0％至每天约50％、每天约4.0％至每天约45％、每天约4.0％至每天约40％、每天约4.0％至每天约35％、每天约4.0％至每天约30％、每天约4.0％至每天约25％、每天约4.0％至每天约20％、每天约4.0％至每天约18％、每天约4.0％至每天约16％、每天约4.0％至每天约14％、每天约4.0％至每天约12％、每天约4.0％至每天约10％、每天约4.0％至每天约9.0％、每天约4.0％至每天约8.0％、每天约4.0％至每天约7.0％、每天约4.0％至每天约6.0％、每天约4.0％至每天约5.0％、每天约4.0％至每天约4.5％、每天约4.5％至每天约140％、每天约4.5％至每天约135％、每天约4.5％至每天约130％、每天约4.5％至每天约125％、每天约4.5％至每天约120％、每天约4.5％至每天约115％、每天约4.5％至每天约110％、每天约4.5％至每天约105％、每天约4.5％至每天约100％、每天约4.5％至每天约95％、每天约4.5％至每天约90％、每天约4.5％至每天约85％、每天约4.5％至每天约80％、每天约4.5％至每天约75％、每天约4.5％至每天约70％、每天约4.5％至每天约65％、每天约4.5％至每天约60％、每天约4.5％至每天约55％、每天约4.5％至每天约50％、每天约4.5％至每天约45％、每天约4.5％至每天约40％、每天约4.5％至每天约35％、每天约4.5％至每天约30％、每天约4.5％至每天约25％、每天约4.5％至每天约20％、每天约4.5％至每天约18％、每天约4.5％至每天约16％、每天约4.5％至每天约14％、每天约4.5％至每天约12％、每天约4.5％至每天约10％、每天约4.5％至每天约9.0％、每天约4.5％至每天约8.0％、每天约4.5％至每天约7.0％、每天约4.5％至每天约6.0％、每天约4.5％至每天约5.0％、每天约5.0％至每天约140％、每天约5.0％至每天约135％、每天约5.0％至每天约130％、每天约5.0％至每天约125％、每天约5.0％至每天约120％、每天约5.0％至每天约115％、每天约5.0％至每天约110％、每天约5.0％至每天约105％、每天约5.0％至每天约100％、每天约5.0％至每天约95％、每天约5.0％至每天约90％、每天约5.0％至每天约85％、每天约5.0％至每天约80％、每天约5.0％至每天约75％、每天约5.0％至每天约70％、每天约5.0％至每天约65％、每天约5.0％至每天约60％、每天约5.0％至每天约55％、每天约5.0％至每天约50％、每天约5.0％至每天约45％、每天约5.0％至每天约40％、每天约5.0％至每天约35％、每天约5.0％至每天约30％、每天约5.0％至每天约25％、每天约5.0％至每天约20％、每天约5.0％至每天约18％、每天约5.0％至每天约16％、每天约5.0％至每天约14％、每天约5.0％至每天约12％、每天约5.0％至每天约10％、每天约5.0％至每天约9.0％、每天约5.0％至每天约8.0％、每天约5.0％至每天约7.0％、每天约5.0％至每天约6.0％、每天约6.0％至每天约140％、每天约6.0％至每天约135％、每天约6.0％至每天约130％、每天约6.0％至每天约125％、每天约6.0％至每天约

120%、每天约6.0%至每天约115%、每天约6.0%至每天约110%、每天约6.0%至每天约105%、每天约6.0%至每天约100%、每天约6.0%至每天约95%、每天约6.0%至每天约90%、每天约6.0%至每天约85%、每天约6.0%至每天约80%、每天约6.0%至每天约75%、每天约6.0%至每天约70%、每天约6.0%至每天约65%、每天约6.0%至每天约60%、每天约6.0%至每天约55%、每天约6.0%至每天约50%、每天约6.0%至每天约45%、每天约6.0%至每天约40%、每天约6.0%至每天约35%、每天约6.0%至每天约30%、每天约6.0%至每天约25%、每天约6.0%至每天约20%、每天约6.0%至每天约18%、每天约6.0%至每天约16%、每天约6.0%至每天约14%、每天约6.0%至每天约12%、每天约6.0%至每天约10%、每天约6.0%至每天约9.0%、每天约6.0%至每天约8.0%、每天约6.0%至每天约7.0%、每天约7.0%至每天约140%、每天约7.0%至每天约135%、每天约7.0%至每天约130%、每天约7.0%至每天约125%、每天约7.0%至每天约120%、每天约7.0%至每天约115%、每天约7.0%至每天约110%、每天约7.0%至每天约105%、每天约7.0%至每天约100%、每天约7.0%至每天约95%、每天约7.0%至每天约90%、每天约7.0%至每天约85%、每天约7.0%至每天约80%、每天约7.0%至每天约75%、每天约7.0%至每天约70%、每天约7.0%至每天约65%、每天约7.0%至每天约60%、每天约7.0%至每天约55%、每天约7.0%至每天约50%、每天约7.0%至每天约45%、每天约7.0%至每天约40%、每天约7.0%至每天约35%、每天约7.0%至每天约30%、每天约7.0%至每天约25%、每天约7.0%至每天约20%、每天约7.0%至每天约18%、每天约7.0%至每天约16%、每天约7.0%至每天约14%、每天约7.0%至每天约12%、每天约7.0%至每天约10%、每天约7.0%至每天约9.0%、每天约7.0%至每天约8.0%、每天约8.0%至每天约140%、每天约8.0%至每天约135%、每天约8.0%至每天约130%、每天约8.0%至每天约125%、每天约8.0%至每天约120%、每天约8.0%至每天约115%、每天约8.0%至每天约110%、每天约8.0%至每天约105%、每天约8.0%至每天约100%、每天约8.0%至每天约95%、每天约8.0%至每天约90%、每天约8.0%至每天约85%、每天约8.0%至每天约80%、每天约8.0%至每天约75%、每天约8.0%至每天约70%、每天约8.0%至每天约65%、每天约8.0%至每天约60%、每天约8.0%至每天约55%、每天约8.0%至每天约50%、每天约8.0%至每天约45%、每天约8.0%至每天约40%、每天约8.0%至每天约35%、每天约8.0%至每天约30%、每天约8.0%至每天约25%、每天约8.0%至每天约20%、每天约8.0%至每天约18%、每天约8.0%至每天约16%、每天约8.0%至每天约14%、每天约8.0%至每天约12%、每天约8.0%至每天约10%、每天约8.0%至每天约9.0%/天、每天约9.0%至每天约140%、每天约9.0%至每天约135%、每天约9.0%至每天约130%、每天约9.0%至每天约125%、每天约9.0%至每天约120%、每天约9.0%至每天约115%、每天约9.0%至每天约110%、每天约9.0%至每天约105%、每天约9.0%至每天约100%、每天约9.0%至每天约95%、每天约9.0%至每天约90%、每天约9.0%至每天约85%、每天约9.0%至每天约80%、每天约9.0%至每天约75%、每天约9.0%至每天约70%、每天约9.0%至每天约65%、每天约9.0%至每天约60%、每天约9.0%至每天约55%、每天约9.0%至每天约50%、每天约9.0%至每天约45%、每天约9.0%至每天约40%、每天约9.0%至每天约35%、每天约9.0%至每天约30%、每天约9.0%至每天约25%、每天约9.0%至每天约20%、每天约9.0%至每天约18%、每天约9.0%至每天约16%、每天约9.0%至每天约14%、每天约9.0%至每天约12%、每天约9.0%至每天约

10％、每天约10％至每天约140％、每天约10％至每天约135％、每天约10％至每天约130％、每天约10％至每天约125％、每天约10％至每天约120％、每天约10％至每天约115％、每天约10％至每天约110％、每天约10％至每天约105％、每天约10％至每天约100％、每天约10％至每天约95％、每天约10％至每天约90％、每天约10％至每天约85％、每天约10％至每天约80％、每天约10％至每天约75％、每天约10％至每天约70％、每天约10％至每天约65％、每天约10％至每天约60％、每天约10％至每天约55％、每天约10％至每天约50％、每天约10％至每天约45％、每天约10％至每天约40％、每天约10％至每天约35％、每天约10％至每天约30％、每天约10％至每天约25％、每天约10％至每天约20％、每天约10％至每天约18％、每天约10％至每天约16％、每天约10％至每天约14％、每天约10％至每天约12％、每天约12％至每天约140％、每天约12％至每天约135％、每天约12％至每天约130％、每天约12％至每天约125％、每天约12％至每天约120％、每天约12％至每天约115％、每天约12％至每天约110％、每天约12％至每天约105％、每天约12％至每天约100％、每天约12％至每天约95％、每天约12％至每天约90％、每天约12％至每天约85％、每天约12％至每天约80％、每天约12％至每天约75％、每天约12％至每天约70％、每天约12％至每天约65％、每天约12％至每天约60％、每天约12％至每天约55％、每天约12％至每天约50％、每天约12％至每天约45％、每天约12％至每天约40％、每天约12％至每天约35％、每天约12％至每天约30％、每天约12％至每天约25％、每天约12％至每天约20％、每天约12％至每天约18％、每天约12％至每天约16％、每天约12％至每天约14％、每天约14％至每天约140％、每天约14％至每天约135％、每天约14％至每天约130％、每天约14％至每天约125％、每天约14％至每天约120％、每天约14％至每天约115％、每天约14％至每天约110％、每天约14％至每天约105％、每天约14％至每天约100％、每天约14％至每天约95％、每天约14％至每天约90％、每天约14％至每天约85％、每天约14％至每天约80％、每天约14％至每天约75％、每天约14％至每天约70％、每天约14％至每天约65％、每天约14％至每天约60％、每天约14％至每天约55％、每天约14％至每天约50％、每天约14％至每天约45％、每天约14％至每天约40％、每天约14％至每天约35％、每天约14％至每天约30％、每天约14％至每天约25％、每天约14％至每天约20％、每天约14％至每天约18％、每天约14％至每天约16％、每天约16％至每天约140％、每天约16％至每天约135％、每天约16％至每天约130％、每天约16％至每天约125％、每天约16％至每天约120％、每天约16％至每天约115％、每天约16％至每天约110％、每天约16％至每天约105％、每天约16％至每天约100％、每天约16％至每天约95％、每天约16％至每天约90％、每天约16％至每天约85％、每天约16％至每天约80％、每天约16％至每天约75％、每天约16％至每天约70％、每天约16％至每天约65％、每天约16％至每天约60％、每天约16％至每天约55％、每天约16％至每天约50％、每天约16％至每天约45％、每天约16％至每天约40％、每天约16％至每天约35％、每天约16％至每天约30％、每天约16％至每天约25％、每天约16％至每天约20％、每天约16％至每天约18％、每天约18％至每天约140％、每天约18％至每天约135％、每天约18％至每天约130％、每天约18％至每天约125％、每天约18％至每天约120％、每天约18％至每天约115％、每天约18％至每天约110％、每天约18％至每天约105％、每天约18％至每天约100％、每天约18％至每天约95％、每天约18％至每天约90％、每天约18％至每天约85％、每天约18％至每天约80％、每天约18％至每天约75％、每天约18％至每天约70％、每天约18％至每天约65％、每天约18％至每

天约60％、每天约18％至每天约55％、每天约18％至每天约50％、每天约18％至每天约45％、每天约18％至每天约40％、每天约18％至每天约35％、每天约18％至每天约30％、每天约18％至每天约25％、每天约18％至每天约20％、每天约20％至每天约140％、每天约20％至每天约135％、每天约20％至每天约130％、每天约20％至每天约125％、每天约20％至每天约120％、每天约20％至每天约115％、每天约20％至每天约110％、每天约20％至每天约105％、每天约20％至每天约100％、每天约20％至每天约95％、每天约20％至每天约90％、每天约20％至每天约85％、每天约20％至每天约80％、每天约20％至每天约75％、每天约20％至每天约70％、每天约20％至每天约65％、每天约20％至每天约60％、每天约20％至每天约55％、每天约20％至每天约50％、每天约20％至每天约45％、每天约20％至每天约40％、每天约20％至每天约35％、每天约20％至每天约30％、每天约20％至每天约25％、每天约25％至每天约140％、每天约25％至每天约135％、每天约25％至每天约130％、每天约25％至每天约125％、每天约25％至每天约120％、每天约25％至每天约115％、每天约25％至每天约110％、每天约25％至每天约105％、每天约25％至每天约100％、每天约25％至每天约95％、每天约25％至每天约90％、每天约25％至每天约85％、每天约25％至每天约80％、每天约25％至每天约75％、每天约25％至每天约70％、每天约25％至每天约65％、每天约25％至每天约60％、每天约25％至每天约55％、每天约25％至每天约50％、每天约25％至每天约45％、每天约25％至每天约40％、每天约25％至每天约35％、每天约25％至每天约30％、每天约30％至每天约140％、每天约30％至每天约135％、每天约30％至每天约130％、每天约30％至每天约125％、每天约30％至每天约120％、每天约30％至每天约115％、每天约30％至每天约110％、每天约30％至每天约105％、每天约30％至每天约100％、每天约30％至每天约95％、每天约30％至每天约90％、每天约30％至每天约85％、每天约30％至每天约80％、每天约30％至每天约75％、每天约30％至每天约70％、每天约30％至每天约65％、每天约30％至每天约60％、每天约30％至每天约55％、每天约30％至每天约50％、每天约30％至每天约45％、每天约30％至每天约40％、每天约30％至每天约35％、每天约35％至每天约140％、每天约35％至每天约135％、每天约35％至每天约130％、每天约35％至每天约125％、每天约35％至每天约120％、每天约35％至每天约115％、每天约35％至每天约110％、每天约35％至每天约105％、每天约35％至每天约100％、每天约35％至每天约95％、每天约35％至每天约90％、每天约35％至每天约85％、每天约35％至每天约80％、每天约35％至每天约75％、每天约35％至每天约70％、每天约35％至每天约65％、每天约35％至每天约60％、每天约35％至每天约55％、每天约35％至每天约50％、每天约35％至每天约45％、每天约35％至每天约40％、每天约40％至每天约140％、每天约40％至每天约135％、每天约40％至每天约130％、每天约40％至每天约125％、每天约40％至每天约120％、每天约40％至每天约115％、每天约40％至每天约110％、每天约40％至每天约105％、每天约40％至每天约100％、每天约40％至每天约95％、每天约40％至每天约90％、每天约40％至每天约85％、每天约40％至每天约80％、每天约40％至每天约75％、每天约40％至每天约70％、每天约40％至每天约65％、每天约40％至每天约60％、每天约40％至每天约55％、每天约40％至每天约50％、每天约40％至每天约45％、每天约45％至每天约140％、每天约45％至每天约135％、每天约45％至每天约130％、每天约45％至每天约125％、每天约45％至每天约120％、每天约45％至每天约115％、每天约45％至每天约110％、每天约45％至每

天约105％、每天约45％至每天约100％、每天约45％至每天约95％、每天约45％至每天约90％、每天约45％至每天约85％、每天约45％至每天约80％、每天约45％至每天约75％、每天约45％至每天约70％、每天约45％至每天约65％、每天约45％至每天约60％、每天约45％至每天约55％、每天约45％至每天约50％、每天约50％至每天约140％、每天约50％至每天约135％、每天约50％至每天约130％、每天约50％至每天约125％、每天约50％至每天约120％、每天约50％至每天约115％、每天约50％至每天约110％、每天约50％至每天约105％、每天约50％至每天约100％、每天约50％至每天约95％、每天约50％至每天约90％、每天约50％至每天约85％、每天约50％至每天约80％、每天约50％至每天约75％、每天约50％至每天约70％、每天约50％至每天约65％、每天约50％至每天约60％、每天约50％至每天约55％、每天约55％至每天约140％、每天约55％至每天约135％、每天约55％至每天约130％、每天约55％至每天约125％、每天约55％至每天约120％、每天约55％至每天约115％、每天约55％至每天约110％、每天约55％至每天约105％、每天约55％至每天约100％、每天约55％至每天约95％、每天约55％至每天约90％、每天约55％至每天约85％、每天约55％至每天约80％、每天约55％至每天约75％、每天约55％至每天约70％、每天约55％至每天约65％、每天约55％至每天约60％、每天约60％至每天约140％、每天约60％至每天约135％、每天约60％至每天约130％、每天约60％至每天约125％、每天约60％至每天约120％、每天约60％至每天约115％、每天约650％至每天约110％、每天约60％至每天约105％、每天约60％至每天约100％、每天约60％至每天约95％、每天约60％至每天约90％、每天约60％至每天约85％、每天约60％至每天约80％、每天约60％至每天约75％、每天约60％至每天约70％、每天约60％至每天约65％、每天约65％至每天约140％、每天约65％至每天约135％、每天约65％至每天约130％、每天约65％至每天约125％、每天约65％至每天约120％、每天约65％至每天约115％、每天约65％至每天约110％、每天约65％至每天约105％、每天约65％至每天约100％、每天约65％至每天约95％、每天约65％至每天约90％、每天约65％至每天约85％、每天约65％至每天约80％、每天约65％至每天约75％、每天约65％至每天约70％、每天约70％至每天约140％、每天约70％至每天约135％、每天约70％至每天约130％、每天约70％至每天约125％、每天约70％至每天约120％、每天约70％至每天约115％、每天约70％至每天约110％、每天约70％至每天约105％、每天约70％至每天约100％、每天约70％至每天约95％、每天约70％至每天约90％、每天约70％至每天约85％、每天约70％至每天约80％、每天约70％至每天约75％、每天约75％至每天约140％、每天约75％至每天约135％、每天约75％至每天约130％、每天约75％至每天约125％、每天约75％至每天约120％、每天约75％至每天约115％、每天约75％至每天约110％、每天约75％至每天约105％、每天约75％至每天约100％、每天约75％至每天约95％、每天约75％至每天约90％、每天约75％至每天约85％、每天约75％至每天约80％、每天约80％至每天约140％、每天约80％至每天约135％、每天约80％至每天约130％、每天约80％至每天约125％、每天约80％至每天约120％、每天约80％至每天约115％、每天约80％至每天约110％、每天约80％至每天约105％、每天约80％至每天约100％、每天约80％至每天约95％、每天约80％至每天约90％、每天约80％至每天约85％、每天约85％至每天约140％、每天约85％至每天约135％、每天约85％至每天约130％、每天约85％至每天约125％、每天约85％至每天约120％、每天约85％至每天约115％、每天约85％至每天约110％、每天约85％至每天约

105％、每天约85％至每天约100％、每天约85％至每天约95％、每天约85％至每天约90％、每天约90％至每天约140％、每天约90％至每天约135％、每天约90％至每天约130％、每天约90％至每天约125％、每天约90％至每天约120％、每天约90％至每天约115％、每天约90％至每天约110％、每天约90％至每天约105％、每天约90％至每天约100％、每天约90％至每天约95％、每天约95％至每天约140％、每天约95％至每天约135％、每天约95％至每天约130％、每天约95％至每天约125％、每天约95％至每天约120％、每天约95％至每天约115％、每天约95％至每天约110％、每天约95％至每天约105％、每天约95％至每天约100％、每天约100％至每天约140％、每天约100％至每天约135％、每天约100％至每天约130％、每天约100％至每天约125％、每天约100％至每天约120％、每天约100％至每天约115％、每天约100％至每天约110％、每天约100％至每天约105％、每天约105％至每天约140％、每天约105％至每天约135％、每天约105％至每天约130％、每天约105％至每天约125％、每天约105％至每天约120％、每天约105％至每天约115％、每天约105％至每天约110％、每天约110％至每天约140％、每天约110％至每天约135％、每天约110％至每天约130％、每天约110％至每天约125％、每天约110％至每天约120％、每天约110％至每天约115％、每天约115％至每天约140％、每天约115％至每天约135％、每天约115％至每天约130％、每天约115％至每天约125％、每天约115％至每天约120％、每天约120％至每天约140％、每天约120％至每天约135％、每天约120％至每天约130％、每天约120％至每天约125％、每天约125％至每天约140％、每天约125％至每天约135％、每天约125％至每天约130％、每天约130％至每天约140％、每天约130％至每天约135％或每天约135％至每天约140％。

[0229] 在这些方法的一些实施方案中,所述细胞含有编码重组治疗性蛋白的核酸。这些方法的一些实施方案还包括收集或回收所述重组治疗性蛋白。这些方法的一些实施方案还包括纯化所述重组治疗性蛋白。这些方法的一些实施方案还包括配制经纯化的重组治疗性蛋白。

[0230] 在这些方法的一些实施方案中,所述细胞是细菌(例如,本文所述或本领域已知的任何示例性细菌)、酵母(例如,本文所述或本领域已知的任何示例性酵母细胞)或哺乳动物细胞(例如,本文所述或本领域已知的任何示例性哺乳动物细胞)。

[0231] 在这些方法的一些实施方案中,通过测量所述测试培养容器中的乳酸脱氢酶(LDH)浓度来测定细胞活力。

[0232] 在一些实施方案中,所述测试培养容器是带挡板的摇瓶(例如,本文所述或本领域已知的任何带挡板的摇瓶),并且所述多个测试条件包括以下中的一个或多个:(a)约125RPM至约400RPM(或本文所述的此范围的任何子范围)的旋转搅拌;(b)约0ppm至约120ppm(或本文所述的此范围的任何子范围)的敏化剂(例如,本文所述或本领域已知的任何敏化剂)浓度;以及(c)约1g/L至约10g/L(或本文所述的此范围的任何子范围)的保护剂(例如,本文所述或本领域已知的任何保护剂)浓度。在一些实施方案中,所述保护剂是泊洛沙姆(例如,泊洛沙姆-188、泊洛沙姆-401、泊洛沙姆-402或泊洛沙姆-407)、泊洛沙胺(例如,泊洛沙胺-904或泊洛沙胺-908)或普朗尼克多元醇。

[0233] 提高生产生物反应器中的细胞活力的方法

[0234] 本文还提供了提高生产生物反应器(例如,本文所述的任何生产生物反应器)中的

细胞活力的方法,其包括:(a)在测试培养容器中测定多个测试条件下的细胞活力,其中所述多个条件由一组参数定义;(b)基于所述多个条件下所述测试培养容器中的细胞活力,选择对于生产生物反应器中的细胞活力最佳的条件;以及(c)在所选择的条件下在所述生产生物反应器中培养细胞。

[0235] 在这些方法的一些实施方案中,所述参数组包括剪切应力、敏化剂(例如,本文所述或本领域已知的任何敏化剂)浓度和保护剂(例如,本文所述或本领域已知的任何保护剂)浓度,基本上由其组成或由其组成。在这些方法的一些实施方案中,基于全因子筛选和/或内切中心复合设计选择所述多个测试条件。在这些方法的一些实施方案中,所述敏化剂是消泡剂(例如,基于聚二甲基硅氧烷的消泡剂、二甲基硅油或本文所述或本领域已知的任何其他消泡剂)。

[0236] 在这些方法的一些实施方案中,所述测试培养容器(例如,本文所述或本领域已知的任何测试培养容器)的体积为约5mL至约5L(或本文所述的此范围的任何子范围)。在这些方法的一些实施方案中,所述测试培养容器是摇瓶,例如带挡板的摇瓶(例如,本文所述或本领域已知的任何带挡板的摇瓶)。

[0237] 在这些方法的一些实施方案中,所述生产生物反应器(例如,本文所述的任何生产生物反应器)的体积为约5L至约20,000L(或本文所述的此范围的任何子范围)。在一些例子中,所述生产生物反应器是灌注生物反应器。在其他例子中,所述生产生物反应器是补料分批生物反应器。

[0238] 在一些实施方案中,步骤(c)在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致低于每天1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%或40%的比细胞死亡率。在一些实施方案中,步骤(c)在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致每天约0.1%至约40%(或本文所述的此范围的任何子范围)的比细胞死亡率。

[0239] 在一些实施方案中,步骤(c)在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致如下细胞比LDH产量:低于150nU/细胞/天、低于145nU/细胞/天、低于140nU/细胞/天、低于135nU/细胞/天、低于130nU/细胞/天、低于125nU/细胞/天、低于120nU/细胞/天、低于115nU/细胞/天、低于150nU/细胞/天、低于110nU/细胞/天、低于105nU/细胞/天、低于100nU/细胞/天、低于95nU/细胞/天、低于90nU/细胞/天、低于85nU/细胞/天、低于80nU/细胞/天、低于75nU/细胞/天、低于70nU/细胞/天、低于65nU/细胞/天、低于60nU/细胞/天、低于55nU/细胞/天、低于50nU/细胞/天、低于45nU/细胞/天、低于45nU/细胞/天、低于40nU/细胞/天、低于35nU/细胞/天、低于30nU/细胞/天、低于25nU/细胞/天、低于20nU/细胞/天、低于15nU/细胞/天、低于10nU/细胞/天、低于5nU/细胞/天或低于1nU/细胞/天。在这些方法的一些实施方案中,步骤(c)在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致约0.1nU/细胞/天至约150nU/细胞/天(或本文所述的此范围的任何子范围)的细胞比LDH产量。

[0240] 在一些实施方案中,步骤(c)在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致如下表观生长率:大于每天1%、大于每天1.5%、大于每天2%、大于每天2.5%、大于每天3%、大于每天3.5%、大于每天4.0%、大于每天4.5%、大于每天5.0%、大于每天5.5%、大于每天6.0%、大于每天6.5%、大于每天7.0%、大于每天7.5%、大于每天8.0%、大于每天

8.5%、大于每天9.0%、大于每天9.5%、大于每天10.0%、大于每天10.5%、大于每天11.0%、大于每天11.5%、大于每天12.0%、大于每天12.5%、大于每天13.0%、大于每天13.5%、大于每天14.0%、大于每天14.5%、大于每天15.0%、大于每天16%、大于每天17%、大于每天18%、大于每天19%、大于每天20%、大于每天21%、大于每天22%、大于每天23%、大于每天24%、大于每天25%、大于每天30%、大于每天35%、大于每天40%、大于每天45%、大于每天50%、大于每天55%、大于每天60%、大于每天65%、大于每天70%、大于每天75%、大于每天80%、大于每天85%、大于每天90%、大于每天95%、大于每天100%、大于每天105%、大于每天110%、大于每天115%、大于每天120%、大于每天125%、大于每天130%、大于每天135%、大于每天140%、大于每天145%或大于每天150%。在这些方法的一些实施方案中,步骤(c)在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致每天约0.1%至每天约150%(或本文所述的此范围的任何子范围)的表观生长率。

[0241] 在这些方法的一些实施方案中,所述细胞(例如,本文所述的任何细胞)含有编码重组治疗性蛋白(例如,本文所述的任何重组治疗性蛋白)的核酸。这些方法的一些实施方案还包括收集或回收所述重组治疗性蛋白。这些方法的一些实施方案还包括纯化所述重组治疗性蛋白。这些方法的一些实施方案还包括配制经纯化的重组治疗性蛋白。在这些方法的一些实施方案中,所述细胞是细菌(例如,本文所述或本领域已知的任何示例性细菌)、酵母细胞(例如,本文所述或本领域已知的任何示例性酵母细胞)或哺乳动物细胞(例如,本文所述或本领域已知的任何示例性哺乳动物细胞)。

[0242] 在这些方法的一些实施方案中,通过测量所述测试培养容器中的乳酸脱氢酶(LDH)浓度来测定细胞活力。在这些方法的一些实施方案中,所述测试培养容器是带挡板的摇瓶,并且所述多个测试条件包括(或由……组成)以下中的一个或多个(例如,两个或三个):(a)约125RPM至约400RPM(或本文所述的此范围的任何子范围)的旋转搅拌;(b)约0ppm至约120ppm(或本文所述的此范围的任何子范围)的敏化剂(例如,本文所述或本领域已知的任何敏化剂)浓度;以及(c)约1g/L至约10g/L(或本文所述的此范围的任何子范围)的保护剂(例如,本文所述或本领域已知的任何保护剂)浓度。在这些方法的一些实施方案中,所述保护剂是泊洛沙姆(例如,泊洛沙姆-188、泊洛沙姆-401、泊洛沙姆-402或泊洛沙姆-407)、泊洛沙胺(例如,泊洛沙胺-904或泊洛沙胺-908)或普朗尼克多元醇。

[0243] 用于预测生产生物反应器中的细胞活力的方法

[0244] 本文还提供了预测生产生物反应器(例如,本文所述的任何生产生物反应器)中的细胞活力的方法,其包括:(a)选择包括至少两个参数(例如,2、3、4、5或6个)的一组参数;(b)在测试培养容器(例如,本文所述的任何测试培养容器)中测定如通过所述参数组定义的多个测试条件下的细胞活力;以及(c)基于所述多个条件下所述测试培养容器中的细胞活力,预测所述生产生物反应器中的细胞活力。

[0245] 在这些方法的一些实施方案中,所述参数组包括剪切应力、敏化剂(例如,本文所述或本领域已知的任何示例性敏化剂)浓度和保护剂(例如,本文所述或本领域已知的任何保护剂)浓度,基本上由其组成或由其组成。在这些方法的一些实施方案中,基于全因子筛选和/或内切中心复合设计选择所述多个测试条件。

[0246] 在这些方法的一些实施方案中,所述敏化剂是消泡剂(例如,基于聚二甲基硅氧烷的消泡剂、二甲基硅油或本文所述或本领域已知的任何其他消泡剂)。

[0247] 在这些方法的一些实施方案中,所述测试培养容器(例如,本文所述或本领域已知的任何测试培养容器)的体积为约5mL至约5L(或本文所述的此范围的任何子范围)。在这些方法的一些实施方案中,所述测试培养容器是摇瓶,例如带挡板的摇瓶(例如,本文所述或本领域已知的任何带挡板的摇瓶)。

[0248] 在这些方法的一些实施方案中,所述生产生物反应器(例如,本文所述的任何生产生物反应器)的体积为约5L至约20,000L(或本文所述的此范围的任何子范围)。在一些例子中,所述生产生物反应器是灌注生物反应器。在其他例子中,所述生产生物反应器是补料分批生物反应器。

[0249] 这些方法的一些实施方案还包括使用一定条件在所述生产生物反应器中培养细胞,所述条件被预测在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致低于每天1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%或40%的比细胞死亡率。这些方法的一些实施方案还包括使用一定条件在所述生产生物反应器中培养细胞,所述条件被预测在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致每天约0.1%至约40%(或本文所述的此范围的任何子范围)的比细胞死亡率。

[0250] 这些方法的一些实施方案还包括使用一定条件在所述生产生物反应器中培养细胞,所述条件被预测在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致如下细胞比LDH产量:低于150nU/细胞/天、低于145nU/细胞/天、低于140nU/细胞/天、低于135nU/细胞/天、低于130nU/细胞/天、低于125nU/细胞/天、低于120nU/细胞/天、低于115nU/细胞/天、低于150nU/细胞/天、低于110nU/细胞/天、低于105nU/细胞/天、低于100nU/细胞/天、低于95nU/细胞/天、低于90nU/细胞/天、低于85nU/细胞/天、低于80nU/细胞/天、低于75nU/细胞/天、低于70nU/细胞/天、低于65nU/细胞/天、低于60nU/细胞/天、低于55nU/细胞/天、低于50nU/细胞/天、低于45nU/细胞/天、低于45nU/细胞/天、低于40nU/细胞/天、低于35nU/细胞/天、低于30nU/细胞/天、低于25nU/细胞/天、低于20nU/细胞/天、低于15nU/细胞/天、低于10nU/细胞/天、低于5nU/细胞/天或低于1nU/细胞/天。这些方法的一些实施方案还包括使用一定条件在所述生产生物反应器中培养细胞,所述条件被预测在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致约0.1nU/细胞/天至约150nU/细胞/天(或本文所述的此范围的任何子范围)的细胞比LDH产量。

[0251] 这些方法的一些实施方案还包括使用一定条件在所述生产生物反应器中培养细胞,所述条件被预测在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致如下表观生长率:大于每天1%、大于每天1.5%、大于每天2%、大于每天2.5%、大于每天3%、大于每天3.5%、大于每天4.0%、大于每天4.5%、大于每天5.0%、大于每天5.5%、大于每天6.0%、大于每天6.5%、大于每天7.0%、大于每天7.5%、大于每天8.0%、大于每天8.5%、大于每天9.0%、大于每天9.5%、大于每天10.0%、大于每天10.5%、大于每天11.0%、大于每天11.5%、大于每天12.0%、大于每天12.5%、大于每天13.0%、大于每天13.5%、大于每天14.0%、大于每天14.5%、大于每天15.0%、大于每天16%、大于每天17%、大于每天18%、大于每天19%、大于每天20%、大于每天21%、大于每天22%、大于每天23%、大于每天24%、大于每天25%、大于每天30%、大于每天35%、大于每天40%、大于每天45%、大于每

天50％、大于每天55％、大于每天60％、大于每天65％、大于每天70％、大于每天75％、大于每天80％、大于每天85％、大于每天90％、大于每天95％、大于每天100％、大于每天105％、大于每天110％、大于每天115％、大于每天120％、大于每天125％、大于每天130％、大于每天135％、大于每天140％、大于每天145％或大于每天150％。这些方法的一些实施方案还包括使用一定条件在所述生产生物反应器中培养细胞,所述条件被预测在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致每天约0.1％至每天约150％(或本文所述的此范围的任何子范围)的表观生长率。

[0252] 在这些方法的一些实施方案中,所述细胞(例如,本文所述的任何细胞)含有编码重组治疗性蛋白(例如,本文所述的任何重组治疗性蛋白)的核酸。这些方法的一些实施方案还包括收集或回收所述重组治疗性蛋白。这些方法的一些实施方案还包括纯化所述重组治疗性蛋白。这些方法的一些实施方案还包括配制经纯化的重组治疗性蛋白。在这些方法的一些实施方案中,所述细胞是细菌(例如,本文所述或本领域已知的任何示例性细菌)、酵母细胞(例如,本文所述或本领域已知的任何示例性酵母细胞)或哺乳动物细胞(例如,本文所述或本领域已知的任何示例性哺乳动物细胞)。

[0253] 在这些方法的一些实施方案中,通过测量所述测试培养容器中的乳酸脱氢酶(LDH)浓度来测定细胞活力。在这些方法的一些实施方案中,所述测试培养容器是带挡板的摇瓶,并且所述多个测试条件包括(或由……组成)以下中的一个或多个(例如,两个或三个):(a)约125RPM至约400RPM(或本文所述的此范围的任何子范围)的旋转搅拌;(b)约0ppm至约120ppm(或本文所述的此范围的任何子范围)的敏化剂(例如,本文所述或本领域已知的任何敏化剂)浓度;以及(c)约1g/L至约10g/L(或本文所述的此范围的任何子范围)的保护剂(例如,本文所述或本领域已知的任何保护剂)浓度。在这些方法的一些实施方案中,所述保护剂是泊洛沙姆(例如,泊洛沙姆-188、泊洛沙姆-401、泊洛沙姆-402或泊洛沙姆-407)、泊洛沙胺(例如,泊洛沙胺-904或泊洛沙胺-908)或普朗尼克多元醇。

[0254] 用于在生产生物反应器中培养细胞的方法

[0255] 本文还提供了在生产生物反应器中培养细胞(例如,本文所述的任何细胞)的方法,其包括在一个或多个(例如,两个、三个或四个)以下条件下在液体培养基中培养所述细胞:

[0256] (a)所述生产生物反应器的P/V(W/m^3)为约1.0至约110(例如,约3.0至约7.0、约4.0至约6.0、约5.0至约6.0或约6.0)(例如,约1.0至约110、约1.0至约95、约1.0至约90、约1.0至约85、约1.0至约80、约1.0至约75、约1.0至约70、约1.0至约65、约1.0至约60、约1.0至约55、约1.0至约50、约1.0至约45、约1.0至约40、约1.0至约35、约1.0至约30、约1.0至约25、约1.0至约20、约1.0至约18、约1.0至约16、约1.0至约14、约1.0至约12、约1.0至约10、约1.0至约9.0、约1.0至约8.0、约1.0至约7.0、约1.0至约6.0、约1.0至约5.0、约1.0至约4.0、约1.0至约3.0,至约1.0至约2.0、约2.0至约110、约2.0至约95、约2.0至约90、约2.0至约85、约2.0至约80、约2.0至约75、约2.0至约70、约2.0至约65、约2.0至约60、约2.0至约55、约2.0至约50、约2.0至约45、约2.0至约40、约2.0至约35、约2.0至约30、约2.0至约25、约2.0至约20、约2.0至约18、约2.0至约16、约2.0至约14、约2.0至约12、约2.0至约10、约2.0至约9.0、约2.0至约8.0、约2.0至约7.0、约2.0至约6.0、约2.0至约5.0、约2.0至约4.0、约2.0至约3.0、约3.0至约110、约3.0至约95、约3.0至约90、约3.0至约85、约3.0至约80、约3.0至约75、约

3.0至约70、约3.0至约65、约3.0至约60、约3.0至约55、约3.0至约50、约3.0至约45、约3.0至约40、约3.0至约35、约3.0至约30、约3.0至约25、约3.0至约20、约3.0至约18、约3.0至约16、约3.0至约14、约3.0至约12、约3.0至约10、约3.0至约9.0、约3.0至约8.0、约3.0至约7.0、约3.0至约6.0、约3.0至约5.0、约3.0至约4.0、约4.0至约110、约4.0至约95、约4.0至约90、约4.0至约85、约4.0至约80、约4.0至约75、约4.0至约70、约4.0至约65、约4.0至约60、约4.0至约55、约4.0至约50、约4.0至约45、约4.0至约40、约4.0至约35、约4.0至约30、约4.0至约25、约4.0至约20、约4.0至约18、约4.0至约16、约4.0至约14、约4.0至约12、约4.0至约10、约4.0至约9.0、约4.0至约8.0、约4.0至约7.0、约4.0至约6.0、约4.0至约5.0、约5.0至约110、约5.0至约95、约5.0至约90、约5.0至约85、约5.0至约80、约5.0至约75、约5.0至约70、约5.0至约65、约5.0至约60、约5.0至约55、约5.0至约50、约5.0至约45、约5.0至约40、约5.0至约35、约5.0至约30、约5.0至约25、约5.0至约20、约5.0至约18、约5.0至约16、约5.0至约14、约5.0至约12、约5.0至约10、约5.0至约9.0、约5.0至约8.0、约5.0至约7.0、约5.0至约6.0、约6.0至约110、约6.0至约95、约6.0至约90、约6.0至约85、约6.0至约80、约6.0至约75、约6.0至约70、约6.0至约65、约6.0至约60、约6.0至约55、约6.0至约50、约6.0至约45、约6.0至约40、约6.0至约35、约6.0至约30、约6.0至约25、约6.0至约20、约6.0至约18、约6.0至约16、约6.0至约14、约6.0至约12、约6.0至约10、约6.0至约9.0、约6.0至约8.0、约6.0至约7.0、约7.0至约110、约7.0至约95、约7.0至约90、约7.0至约85、约7.0至约80、约7.0至约75、约7.0至约70、约7.0至约65、约7.0至约60、约7.0至约55、约7.0至约50、约7.0至约45、约7.0至约40、约7.0至约35、约7.0至约30、约7.0至约25、约7.0至约20、约7.0至约18、约7.0至约16、约7.0至约14、约7.0至约12、约7.0至约10、约7.0至约9.0、约7.0至约8.0、约8.0至约110、约8.0至约95、约8.0至约90、约8.0至约85、约8.0至约80、约8.0至约75、约8.0至约70、约8.0至约65、约8.0至约60、约8.0至约55、约8.0至约50、约8.0至约45、约8.0至约40、约8.0至约35、约8.0至约30、约8.0至约25、约8.0至约20、约8.0至约18、约8.0至约16、约8.0至约14、约8.0至约12、约8.0至约10、约8.0至约9.0、约9.0至约110、约9.0至约95、约9.0至约90、约9.0至约85、约9.0至约80、约9.0至约75、约9.0至约70、约9.0至约65、约9.0至约60、约9.0至约55、约9.0至约50、约9.0至约45、约9.0至约40、约9.0至约35、约9.0至约30、约9.0至约25、约9.0至约20、约9.0至约18、约9.0至约16、约9.0至约14、约9.0至约12、约9.0至约10、约10至约110、约10至约95、约10至约90、约10至约85、约10至约80、约10至约75、约10至约70、约10至约65、约10至约60、约10至约55、约10至约50、约10至约45、约10至约40、约10至约35、约10至约30、约10至约25、约10至约20、约10至约18、约10至约16、约10至约14、约10至约12、约12至约110、约12至约95、约12至约90、约12至约85、约12至约80、约12至约75、约12至约70、约12至约65、约12至约60、约12至约55、约12至约50、约12至约45、约12至约40、约12至约35、约12至约30、约12至约25、约12至约20、约12至约18、约12至约16、约12至约14、约14至约110、约14至约95、约14至约90、约14至约85、约14至约80、约14至约75、约14至约70、约14至约65、约14至约60、约14至约55、约14至约50、约14至约45、约14至约40、约14至约35、约14至约30、约14至约25、约14至约20、约14至约18、约14至约16、约16至约110、约16至约95、约16至约90、约16至约85、约16至约80、约16至约75、约16至约70、约16至约65、约16至约60、约16至约55、约16至约50、约16至约45、约16至约40、约16至约35、约16至约30、约16至约25、约16至约20、约16至约18、约18至约110、约18至约95、约18至约90、约18至约85、约18至约80、约18至约75、约18至

约70、约18至约65、约18至约60、约18至约55、约18至约50、约18至约45、约18至约40、约18至约35、约18至约30、约18至约25、约18至约20、约20至约110、约20至约95、约20至约90、约20至约85、约20至约80、约20至约75、约20至约70、约20至约65、约20至约60、约20至约55、约20至约50、约20至约45、约20至约40、约20至约35、约20至约30、约20至约25、约25至约110、约25至约95、约25至约90、约25至约85、约25至约80、约25至约75、约25至约70、约25至约65、约25至约60、约25至约55、约25至约50、约25至约45、约25至约40、约25至约35、约25至约30、约30至约110、约30至约95、约30至约90、约30至约85、约30至约80、约30至约75、约30至约70、约30至约65、约30至约60、约30至约55、约30至约50、约30至约45、约30至约40、约30至约35、约35至约110、约35至约95、约35至约90、约35至约85、约35至约80、约35至约75、约35至约70、约35至约65、约35至约60、约35至约55、约35至约50、约35至约45、约35至约40、约40至约110、约40至约95、约40至约90、约40至约85、约40至约80、约40至约75、约40至约70、约40至约65、约40至约60、约40至约55、约40至约50、约40至约45、约45至约110、约45至约95、约45至约90、约45至约85、约45至约80、约45至约75、约45至约70、约45至约65、约45至约60、约45至约55、约45至约50、约50至约110、约50至约95、约50至约90、约50至约85、约50至约80、约50至约75、约50至约70、约50至约65、约50至约60、约50至约55、约55至约110、约55至约95、约55至约90、约55至约85、约55至约80、约55至约75、约55至约70、约55至约65、约55至约60、约60至约110、约60至约95、约60至约90、约60至约85、约60至约80、约60至约75、约60至约70、约60至约65、约65至约110、约65至约95、约65至约90、约65至约85、约65至约80、约65至约75、约65至约70、约70至约110、约70至约95、约70至约90、约70至约85、约70至约80、约70至约75、约75至约110、约75至约95、约75至约90、约75至约85、约75至约80、约80至约110、约80至约95、约80至约90、约80至约85、约85至约110、约85至约95、约85至约90、约90至约110、约90至约95、约95至约110、约95至约105、约95至约100、约100至约110、约100至约105或约105至约110)；

[0257] (b)所述生产生物反应器的每分钟每液体体积的空气体积(VVM)(min^{-1})为约0.01至约0.10(例如,约0.02至约0.08、约0.04至约0.06或约0.06)(例如,约0.01至约0.10、约0.01至约0.09、约0.01至约0.08、约0.01至约0.07、约0.01至约0.06、约0.01至约0.05、约0.01至约0.04、约0.01至约0.03、约0.01至约0.02、约0.02至约0.10、约0.02至约0.09、约0.02至约0.08、约0.02至约0.07、约0.02至约0.06、约0.02至约0.05、约0.02至约0.04、约0.02至约0.03、约0.03至约0.10、约0.03至约0.09、约0.03至约0.08、约0.03至约0.07、约0.03至约0.06、约0.03至约0.05、约0.03至约0.04、约0.04至约0.10、约0.04至约0.09、约0.04至约0.08、约0.04至约0.07、约0.04至约0.06、约0.04至约0.05、约0.05至约0.10、约0.05至约0.09、约0.05至约0.08、约0.05至约0.07、约0.05至约0.06、约0.06至约0.10、约0.06至约0.09、约0.06至约0.08、约0.06至约0.07、约0.07至约0.10、约0.07至约0.09、约0.07至约0.08、约0.08至约0.10、约0.08至约0.09或约0.09至约0.10)；

[0258] (c)所述培养基包含敏化剂(例如,本文所述或本领域已知的任何敏化剂),所述敏化剂的浓度为约0ppm至约5,000ppm(或本文所述的此范围的任何子范围)；以及

[0259] (d)所述液体培养基包含保护剂(例如,本文所述或本领域已知的任何保护剂),所述保护剂的浓度为约1g/L至约15g/L(例如,本文所述的此范围的任何子范围,例如约1g/L至约15g/L、约1g/L至约14g/L、约1g/L至约13g/L、约1g/L至约12g/L、约1g/L至约11g/L、约

2g/L至约15g/L、约2g/L至约14g/L、约2g/L至约13g/L、约2g/L至约12g/L、约2g/L至约11g/L、约3g/L至约15g/L、约3g/L至约14g/L、约3g/L至约13g/L、约3g/L至约12g/L、约3g/L至约11g/L、约4g/L至约15g/L、约4g/L至约14g/L、约4g/L至约13g/L、约4g/L至约12g/L、约4g/L至约11g/L、约5g/L至约15g/L、约5g/L至约14g/L、约5g/L至约13g/L、约5g/L至约12g/L、约5g/L至约11g/L、约6g/L至约15g/L、约6g/L至约14g/L、约6g/L至约13g/L、约6g/L至约12g/L、约6g/L至约11g/L、约7g/L至约15g/L、约7g/L至约14g/L、约7g/L至约13g/L、约7g/L至约12g/L、约7g/L至约11g/L、约8g/L至约15g/L、约8g/L至约14g/L、约8g/L至约13g/L、约8g/L至约12g/L、约8g/L至约11g/L、约9g/L至约15g/L、约9g/L至约14g/L、约9g/L至约13g/L、约9g/L至约12g/L、约9g/L至约11g/L、约10g/L至约15g/L、约10g/L至约14g/L、约10g/L至约13g/L、约10g/L至约12g/L、约10g/L至约11g/L、约11g/L至约15g/L、约11g/L至约14g/L、约11g/L至约13g/L、约11g/L至约12g/L、约12g/L至约15g/L、约12g/L至约14g/L、约12g/L至约13g/L、约13g/L至约15g/L、约13g/L至约14g/L或约14g/L至约15g/L)。

[0260] 在优化条件下,比细胞死亡率可以低于或被预测低于每天1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%或40%。在优化条件下,比细胞死亡率可以为约0.1%至约40%(或本文所述的此范围的任何子范围)。

[0261] 在一些实施方案中,可以通过测量乳酸脱氢酶(LDH)浓度来测定细胞活力。细胞比LDH产量(nU/细胞/天)可以低于或被预测低于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200(例如,150)。在一些实施方案中,LDH产量(nU/细胞/天)可以为约0.1至约200(例如,本文所述的此范围的任何子范围,例如约0.1至约200、约0.1至约190、约0.1至约180、约0.1至约170、约0.1至约160、约0.5至约200、约0.5至约190、约0.5至约180、约0.5至约170、约0.5至约160、约1.0至约200、约1.0至约190、约1.0至约180、约1.0至约170、约1.0至约160、约2.5至约200、约2.5至约190、约2.5至约180、约2.5至约170、约2.5至约160、约5.0至约200、约5.0至约190、约5.0至约180、约5.0至约170、约5.0至约160、约10至约200、约10至约190、约10至约180、约10至约170、约10至约160、约20至约200、约20至约190、约20至约180、约20至约170、约20至约160、约30至约200、约30至约190、约30至约180、约30至约170、约30至约160、约40至约200、约40至约190、约40至约180、约40至约170、约40至约160、约50至约200、约50至约190、约50至约180、约50至约170、约50至约160、约60至约200、约60至约190、约60至约180、约60至约170、约60至约160、约70至约200、约70至约190、约70至约180、约70至约170、约70至约160、约80至约200、约80至约190、约80至约180、约80至约170、约80至约160、约90至约200、约90至约190、约90至约180、约90至约170、约90至约160、约100至约200、约100至约190、约100至约180、约100至约170、约100至约160、约110至约200、约110至约190、约110至约180、约110至约170、约110至约160、约120至约200、约120至约190、约120至约180、约120至约170、约120至约160、约130至约200、约130至约190、约130至约180、约130至约170、约130至约160、约140至约200、约140至约190、约140至约180、约140至约170、约140至约160、约150至约200、约150至约190、约150至约180、约150至约170、约150至约160、约160至约200、约160至约190、约160至约180、约160至约170、约170至约200、约170至约190、约170至约180、约180至约200、

约180至约190或约190至约200)。

[0262] 在一些实施方案中,表观生长率可以超过或被预测大于每天1%、大于每天1.5%、大于每天2%、大于每天2.5%、大于每天3%、大于每天3.5%、大于每天4.0%、大于每天4.5%、大于每天5.0%、大于每天5.5%、大于每天6.0%、大于每天6.5%、大于每天7.0%、大于每天7.5%、大于每天8.0%、大于每天8.5%、大于每天9.0%、大于每天9.5%、大于每天10.0%、大于每天10.5%、大于每天11.0%、大于每天11.5%、大于每天12.0%、大于每天12.5%、大于每天13.0%、大于每天13.5%、大于每天14.0%、大于每天14.5%、大于每天15.0%、大于每天16%、大于每天17%、大于每天18%、大于每天19%、大于每天20%、大于每天21%、大于每天22%、大于每天23%、大于每天24%、大于每天25%、大于每天30%、大于每天35%、大于每天40%、大于每天45%、大于每天50%、大于每天55%、大于每天60%、大于每天65%、大于每天70%、大于每天75%、大于每天80%、大于每天85%、大于每天90%、大于每天95%、大于每天100%、大于每天105%、大于每天110%、大于每天115%、大于每天120%、大于每天125%、大于每天130%、大于每天135%、大于每天140%、大于每天145%或大于每天150%。在一些实施方案中,表观生长率可以为每天约0.1%至每天约150%(例如,本文所述的此范围的任何子范围,例如约0.1%至约48%、约0.1%至约46%、约0.1%至约44%、约0.1%至约42%、约0.5%至约50%、约0.5%至约48%、约0.5%至约46%、约0.5%至约44%、约0.5%至约42%、约1.0%至约50%、约1.0%至约48%、约1.0%至约46%、约1.0%至约44%、约1.0%至约42%、约2.0%至约50%、约2.0%至约48%、约2.0%至约46%、约2.0%至约44%、约2.0%至约42%、约4.0%至约50%、约4.0%至约48%、约4.0%至约46%、约4.0%至约44%、约4.0%至约42%、约6.0%至约50%、约6.0%至约48%、约6.0%至约46%、约6.0%至约44%、约6.0%至约42%、约8.0%至约50%、约8.0%至约48%、约8.0%至约46%、约8.0%至约44%、约8.0%至约42%、约10%至约50%、约10%至约48%、约10%至约46%、约10%至约44%、约10%至约42%、约12%至约50%、约12%至约48%、约12%至约46%、约12%至约44%、约12%至约42%、约14%至约50%、约14%至约48%、约14%至约46%、约14%至约44%、约14%至约42%、约16%至约50%、约16%至约48%、约16%至约46%、约16%至约44%、约16%至约42%、约18%至约50%、约18%至约48%、约18%至约46%、约18%至约44%、约18%至约42%、约20%至约50%、约20%至约48%、约20%至约46%、约20%至约44%、约20%至约42%、约22%至约50%、约22%至约48%、约22%至约46%、约22%至约44%、约22%至约42%、约24%至约50%、约24%至约48%、约24%至约46%、约24%至约44%、约24%至约42%、约26%至约50%、约26%至约48%、约26%至约46%、约26%至约44%、约26%至约42%、约28%至约50%、约28%至约48%、约28%至约46%、约28%至约44%、约28%至约42%、约30%至约50%、约30%至约48%、约30%至约46%、约30%至约44%、约30%至约42%、约32%至约50%、约32%至约48%、约32%至约46%、约32%至约44%、约32%至约42%、约34%至约50%、约34%至约48%、约34%至约46%、约34%至约44%、约34%至约42%、约36%至约50%、约36%至约48%、约36%至约46%、约36%至约44%、约36%至约42%、约38%至约50%、约38%至约48%、约38%至约46%、约38%至约44%、约38%至约42%、约40%至约50%、约40%至约48%、约40%至约46%、约40%至约44%、约40%至约42%、约42%至约50%、约42%至约48%、约42%至约46%、约42%至约44%、约44%至约50%、约44%至约48%、约

44％至约46％、约46％至约50％、约46％至约48％或约48％至约50％)。

[0263] 在这些方法的一些实施方案中,所述敏化剂是消泡剂(例如,基于聚二甲基硅氧烷的消泡剂、二甲基硅油或本文所述或本领域已知的任何其他消泡剂)。在一些实施方案中,所述保护剂是泊洛沙姆(例如,泊洛沙姆-188、泊洛沙姆-401、泊洛沙姆-402或泊洛沙姆-407)、泊洛沙胺(例如,泊洛沙胺-904或泊洛沙胺-908)或普朗尼克多元醇。

[0264] 在这些方法的一些实施方案中,所述生产生物反应器(例如,本文所述或本领域已知的任何示例性生产生物反应器)的体积为约5L至约20,000L(或本文所述的此范围的任何子范围)。在这些方法的一些实施方案中,所述生产生物反应器是灌注生物反应器。在这些方法的一些实施方案中,所述生产生物反应器是补料分批生物反应器。

[0265] 在一些实施方案中,所述方法在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致低于每天1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、16％、17％、18％、19％、20％、21％、22％、23％、24％、25％、26％、27％、28％、29％、30％、31％、32％、33％、34％、35％、36％、37％、38％、39％或40％的比细胞死亡率。在一些实施方案中,所述方法在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致每天约0.1％至约40％(或本文所述的此范围的任何子范围)的比细胞死亡率。

[0266] 在一些实施方案中,所述方法在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致如下细胞比LDH产量:低于150nU/细胞/天、低于145nU/细胞/天、低于140nU/细胞/天、低于135nU/细胞/天、低于130nU/细胞/天、低于125nU/细胞/天、低于120nU/细胞/天、低于115nU/细胞/天、低于150nU/细胞/天、低于110nU/细胞/天、低于105nU/细胞/天、低于100nU/细胞/天、低于95nU/细胞/天、低于90nU/细胞/天、低于85nU/细胞/天、低于80nU/细胞/天、低于75nU/细胞/天、低于70nU/细胞/天、低于65nU/细胞/天、低于60nU/细胞/天、低于55nU/细胞/天、低于50nU/细胞/天、低于45nU/细胞/天、低于45nU/细胞/天、低于40nU/细胞/天、低于35nU/细胞/天、低于30nU/细胞/天、低于25nU/细胞/天、低于20nU/细胞/天、低于15nU/细胞/天、低于10nU/细胞/天、低于5nU/细胞/天或低于1nU/细胞/天。在这些方法的一些实施方案中,所述方法在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致约0.1nU/细胞/天至约150nU/细胞/天(或本文所述的此范围的任何子范围)的细胞比LDH产量。

[0267] 在一些实施方案中,所述方法在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致如下表观生长率:大于每天1％、大于每天1.5％、大于每天2％、大于每天2.5％、大于每天3％、大于每天3.5％、大于每天4.0％、大于每天4.5％、大于每天5.0％、大于每天5.5％、大于每天6.0％、大于每天6.5％、大于每天7.0％、大于每天7.5％、大于每天8.0％、大于每天8.5％、大于每天9.0％、大于每天9.5％、大于每天10.0％、大于每天10.5％、大于每天11.0％、大于每天11.5％、大于每天12.0％、大于每天12.5％、大于每天13.0％、大于每天13.5％、大于每天14.0％、大于每天14.5％、大于每天15.0％、大于每天16％、大于每天17％、大于每天18％、大于每天19％、大于每天20％、大于每天21％、大于每天22％、大于每天23％、大于每天24％、大于每天25％、大于每天30％、大于每天35％、大于每天40％、大于每天45％、大于每天50％、大于每天55％、大于每天60％、大于每天65％、大于每天70％、大于每天75％、大于每天80％、大于每天85％、大于每天90％、大于每天95％、大于每天100％、大于每天105％、大于每天110％、大于每天115％、大于每天120％、大于每天125％、大于每天130％、大于每天135％、大于每天140％、大于每天145％或大于每天150％。在这些方法的

一些实施方案中,所述方法在所述生产生物反应器中培养细胞的过程中导致每天约0.1%至每天约150%(或本文所述的此范围的任何子范围)的表观生长率。

[0268] 在这些方法的一些实施方案中,所述细胞(例如,本文所述的任何细胞)含有编码重组治疗性蛋白(例如,本文所述的任何重组治疗性蛋白)的核酸。这些方法的一些实施方案还包括收集或回收所述重组治疗性蛋白。这些方法的一些实施方案还包括纯化所述重组治疗性蛋白。这些方法的一些实施方案还包括配制经纯化的重组治疗性蛋白。

[0269] 在这些方法的一些实施方案中,所述细胞是细菌(例如,本文所述或本领域已知的任何示例性细菌)、酵母细胞(例如,本文所述或本领域已知的任何酵母细胞)或哺乳动物细胞(例如,本文所述或本领域已知的任何哺乳动物细胞)。

[0270] 在这些方法的一些实施方案中,通过测量所述测试培养容器中的乳酸脱氢酶(LDH)浓度来测定细胞活力。

[0271] 实施例

[0272] 在以下实施例中进一步描述本发明,所述实施例不限制权利要求中所述的本发明的范围。

[0273] 实施例1:测试培养容器的全因子筛选与内切中心复合设计的组合

[0274] 选择旋转搅拌(RPM^3)、敏化剂浓度和保护剂浓度作为参数。全因子设计与内切中心复合设计相组合用于确定一组测试条件(图7)。测量每个测试条件下的比LDH产量值。结果用于提供所选择的参数的估计等高线。鉴定出性能不良区域和操作故障区域(图9)。

[0275] 实施例2:预测台式规模下的比LDH产量值

[0276] 在台式规模下进行概念验证实验以测定如本文所述的预测方法的准确性。

[0277] 将台式规模中的保护剂浓度设定为三个不同的水平。对于每个水平,测试了两个台式培养生物反应器。测量由于灌注过程引起的比LDH产量值峰值,并将其与预测值进行比较。

[0278] 来自台式规模实验的实际观察值与那些预测值非常匹配($P<0.0001$,$R^2=0.84$)(图13A和图13C)。结果证明,如本文所述的方法可以成功地用于预测更高规模下多种参数的影响。

[0279] 进行了保持消泡剂浓度范围为每天30-40ppm消泡剂添加量的实验。普朗尼克浓度从1.8g/L(虚线)、2.8g/L(实线,实心圆)、3.8g/L(实线,空心圆)进行调节。重复地进行实验。这证明了在改变普朗尼克浓度时模型预测比LDH产量的能力。

[0280] 还进行了将消泡剂的浓度从每天30ppm增加至80ppm的实验。预测的LDH范围为90.19-96.38,这与实际观察到的LDH范围94.74-99.36非常匹配(图14)。结果显示如本文所述的方法可以成功地用于预测消泡剂的影响。

[0281] 实施例3:预测生产规模下的比LDH产量值

[0282] 在生产规模下进行实验以测定如本文所述的模型的准确性。

[0283] 测试了三个50L生产生物反应器和两个100L生产生物反应器。实验测试了范围为1.8g/L至5.8g/L的泊洛沙姆-188(普朗尼克)浓度。

[0284] 比LDH产量的实际观察值与这些预测值非常匹配($P<0.0001$,$R^2=0.84$)(图15A和图15B)。结果证明,如本文所述的方法可以成功地用于预测生产规模(生产生物反应器规模)下所选择的参数的影响。

[0285] 其他实施方案

[0286] 应当理解,虽然已经结合其具体实施方式对本发明进行了描述,但是前面的描述旨在说明而非限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求书的范围限定。其他方面、优点和修改在以下权利要求书的范围内。

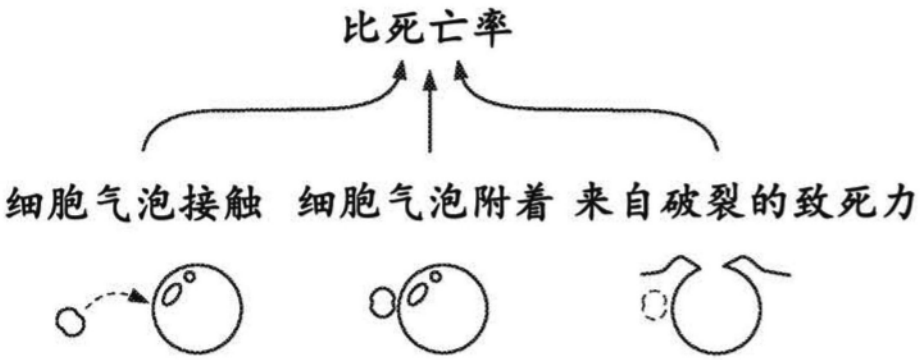

比死亡率
细胞气泡接触
细胞气泡附着
来自破裂的致死力

图1

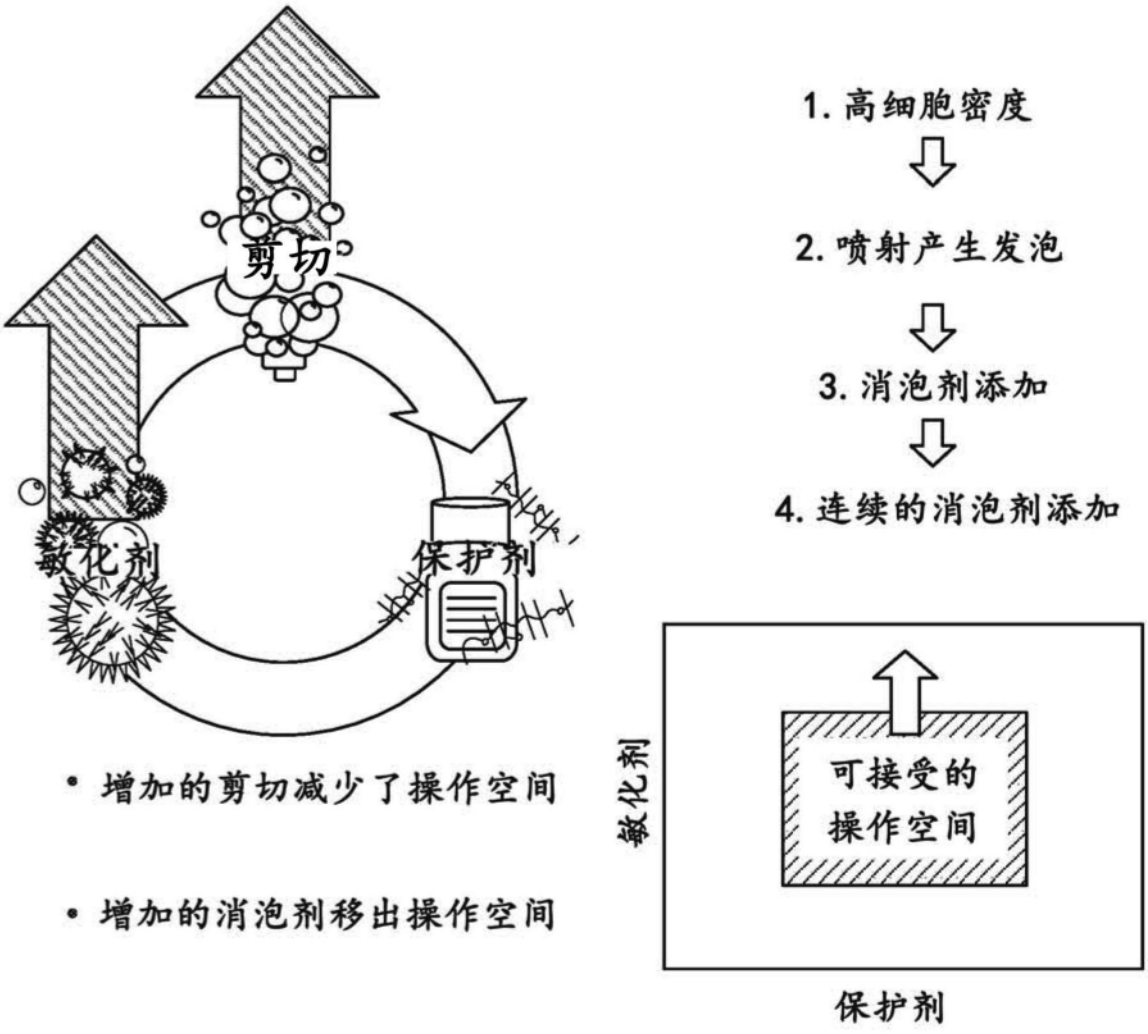

剪切
敏化剂
保护剂
• 增加的剪切减少了操作空间
• 增加的消泡剂移出操作空间
1. 高细胞密度
2. 喷射产生发泡
3. 消泡剂添加
4. 连续的消泡剂添加
敏化剂
可接受的
操作空间
保护剂

图2

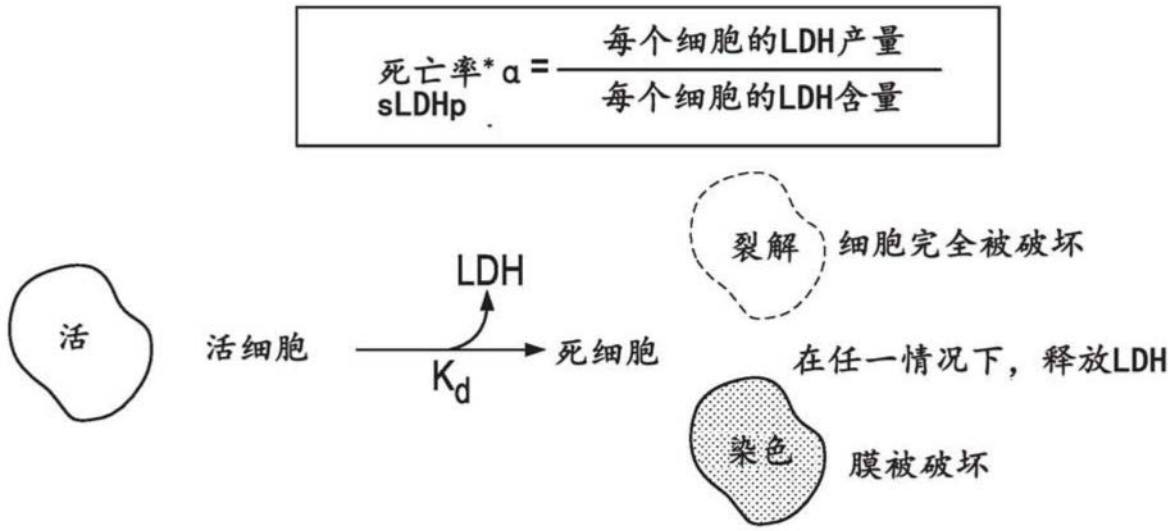

死亡率* α = 每个细胞的LDH产量 / 每个细胞的LDH含量
sLDHp
裂解
细胞完全被破坏
LDH
活
活细胞
死细胞
K_d
在任一情况下，释放LDH
染色
膜被破坏

图3

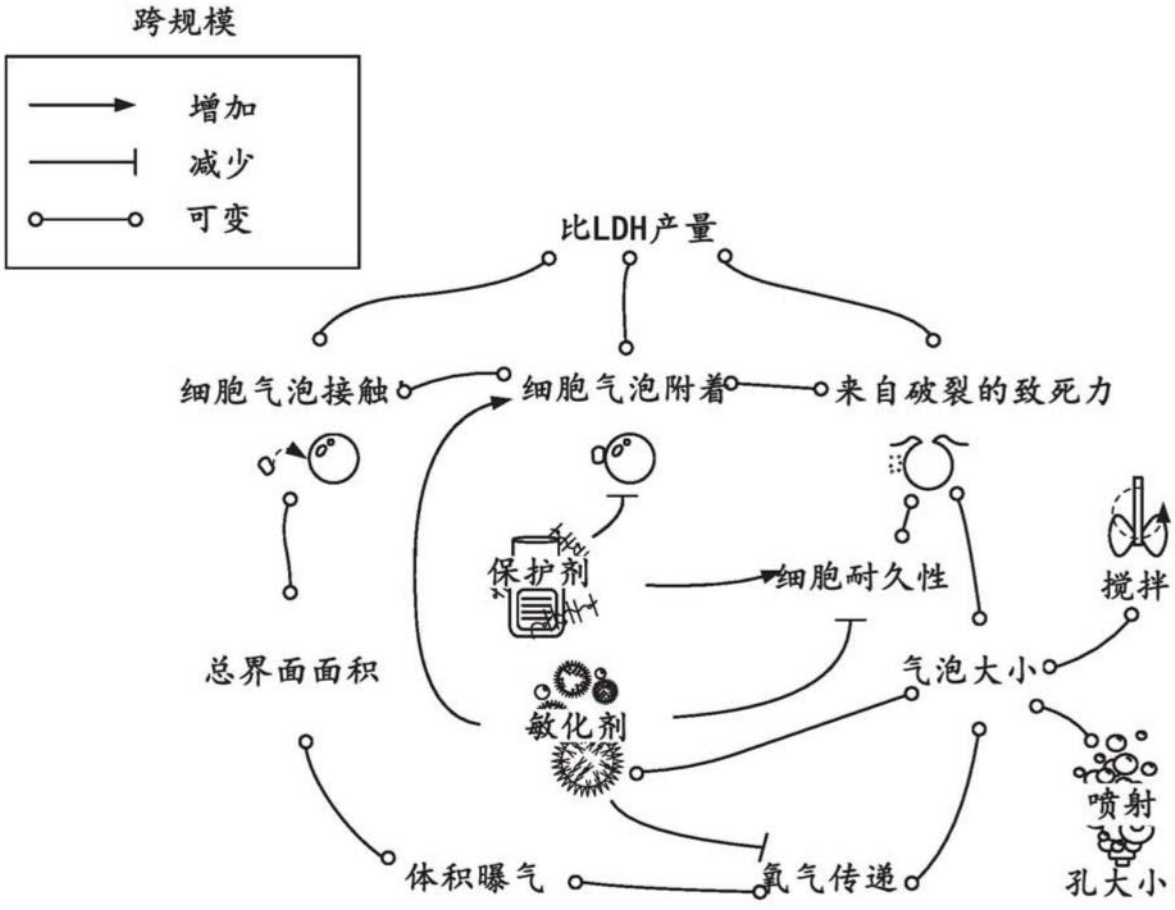

跨规模
增加
减少
可变
比LDH产量
细胞气泡接触
细胞气泡附着
来自破裂的致死力
保护剂
细胞耐久性
搅拌
总界面面积
气泡大小
敏化剂
喷射
体积曝气
氧气传递
孔大小

图4

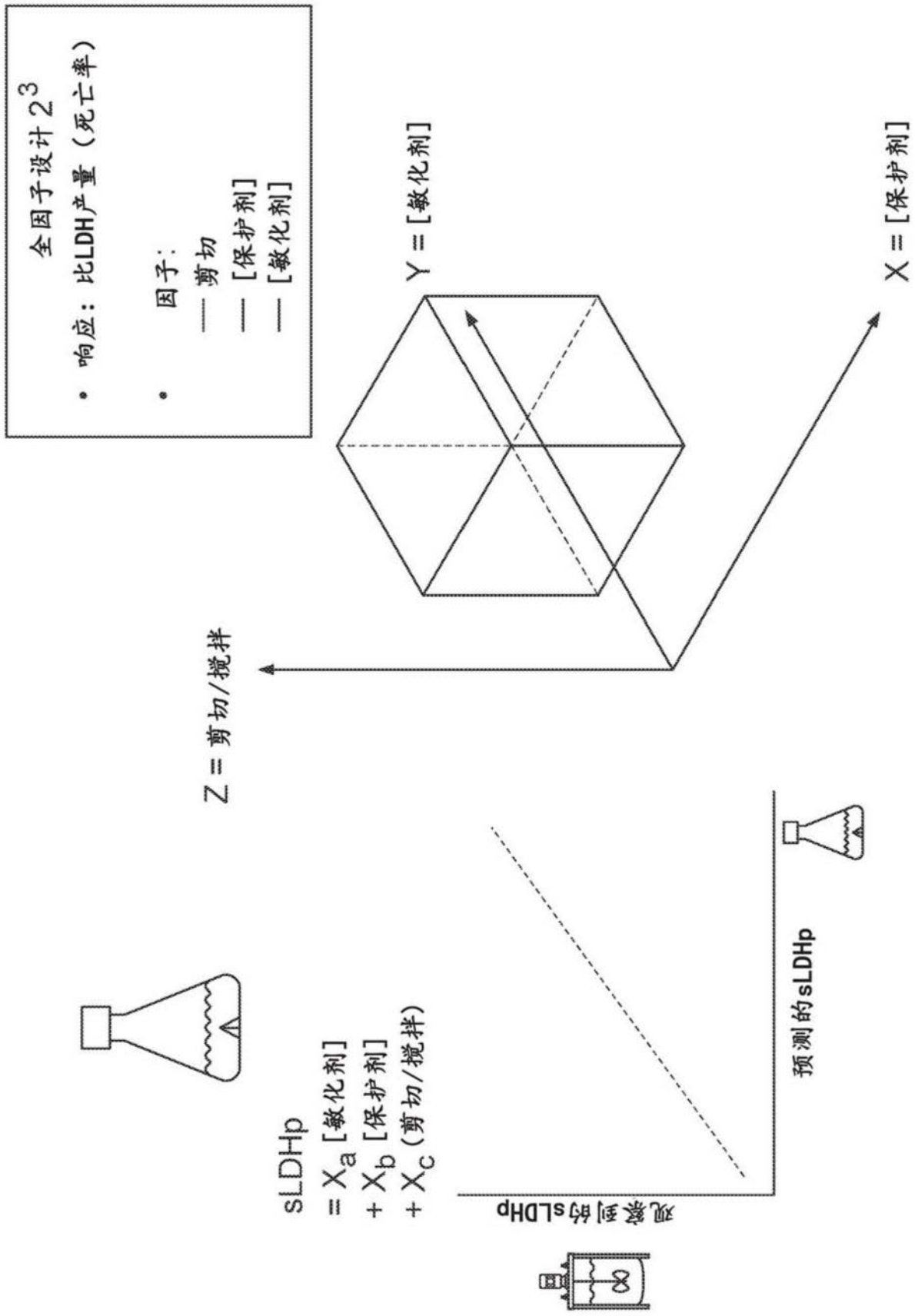

全因子设计 2^3
• 响应：比LDH产量（死亡率）
• 因子：
— 剪切
— [保护剂]
— [敏化剂]
Y = [敏化剂]
X = [保护剂]
Z = 剪切/搅拌
sLDHp
$= X_a$ [敏化剂]
$+ X_b$ [保护剂]
$+ X_c$（剪切/搅拌）
观察到的sLDHp
预测的sLDHp

图5

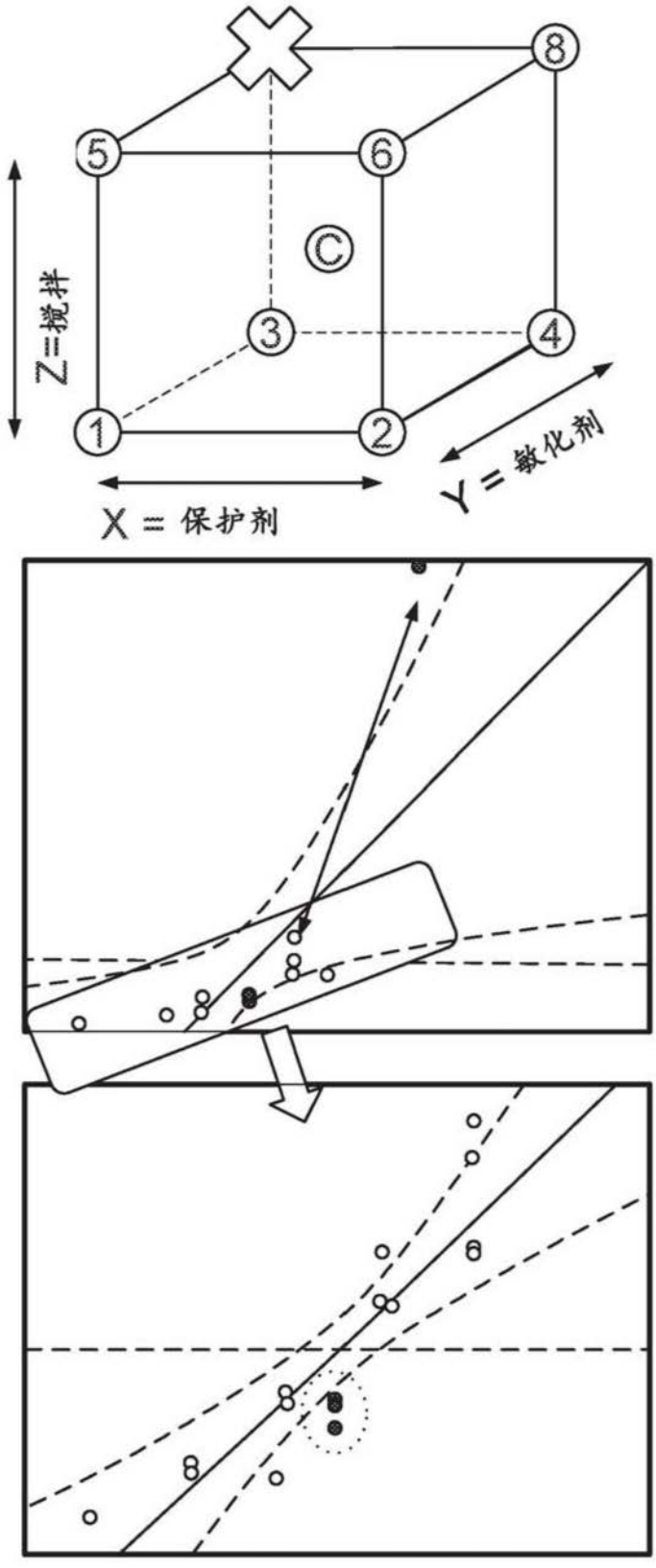


图6

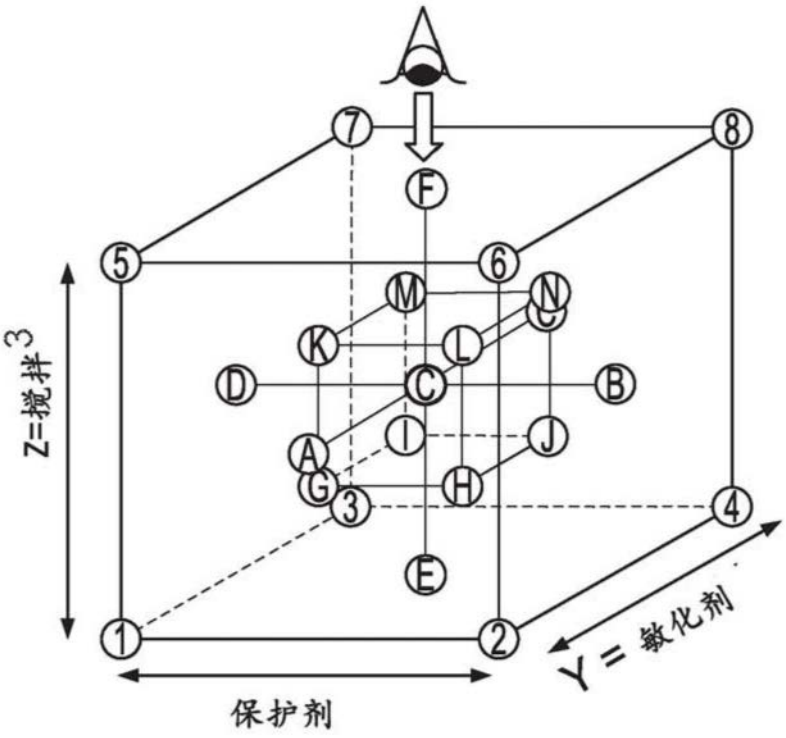


图7

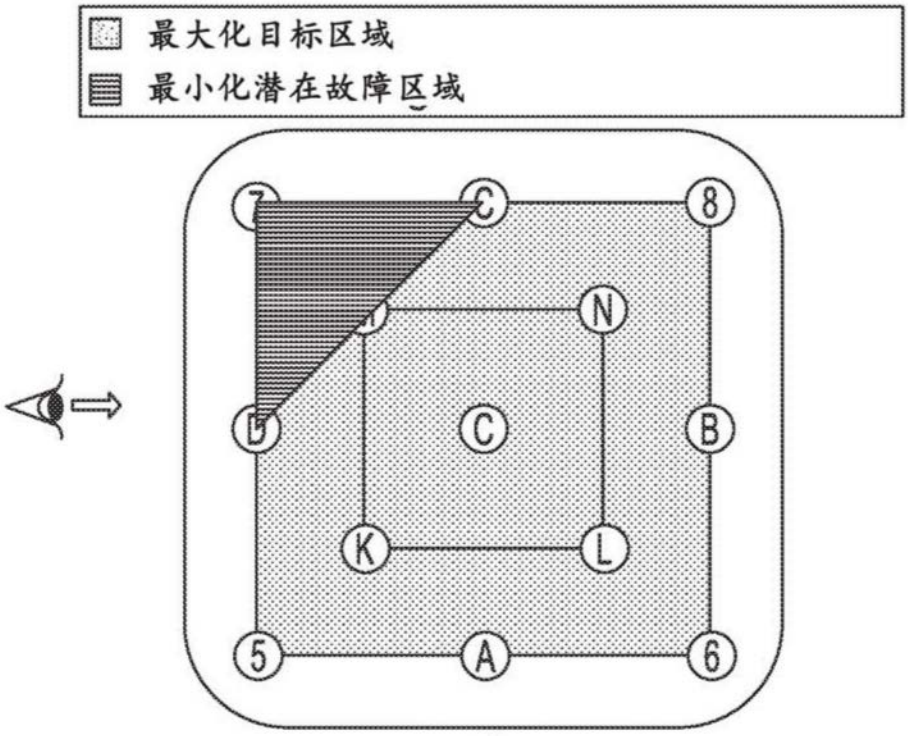


图8

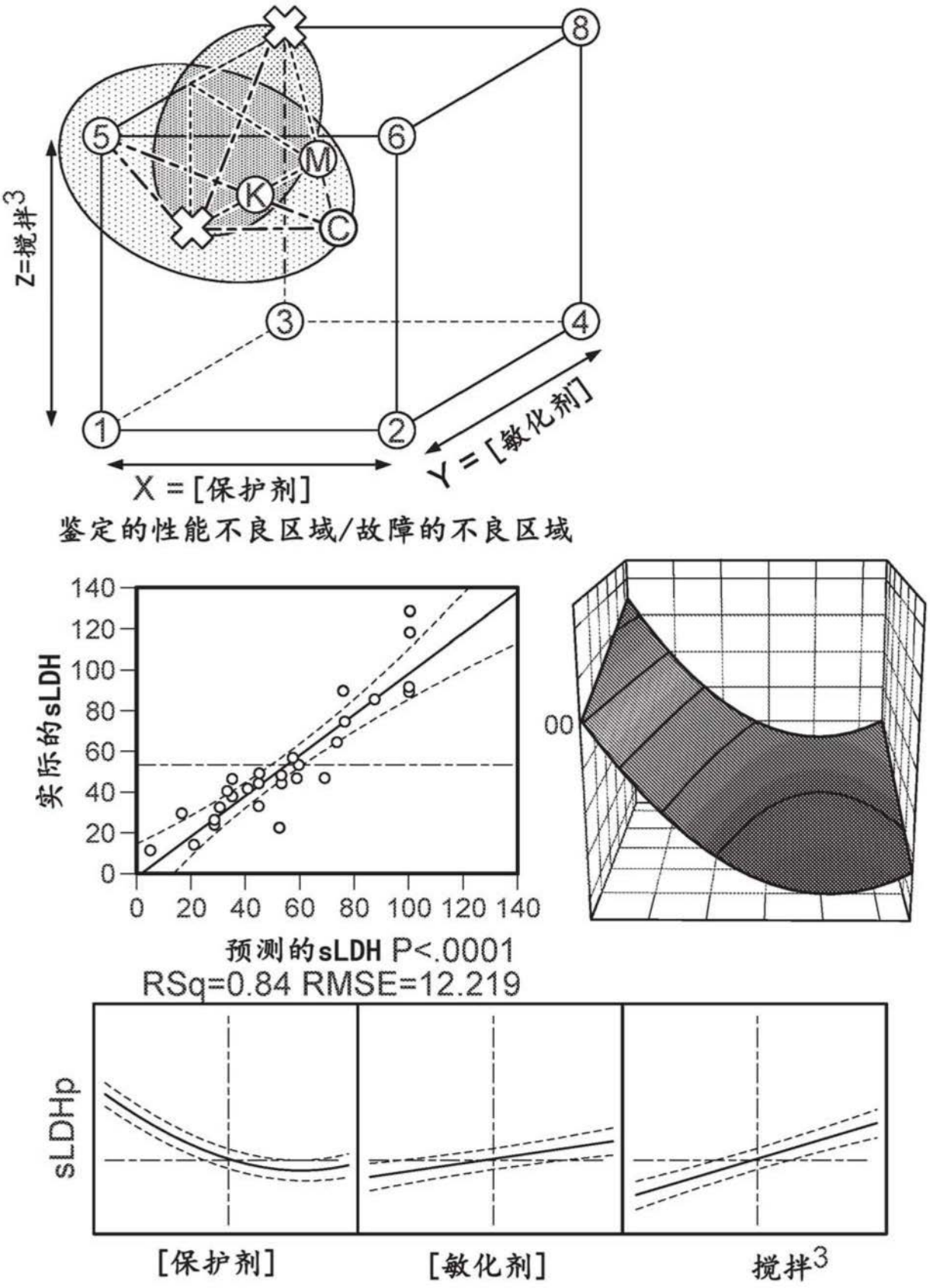

8
5
6
M
K
C
3
4
1
2
Z=搅拌3
X =[保护剂]
Y=[敏化剂]
鉴定的性能不良区域/故障的不良区域
实际的sLDH
预测的sLDH P<.0001
RSq=0.84 RMSE=12.219
00
sLDHp
[保护剂]
[敏化剂]
搅拌3

图9

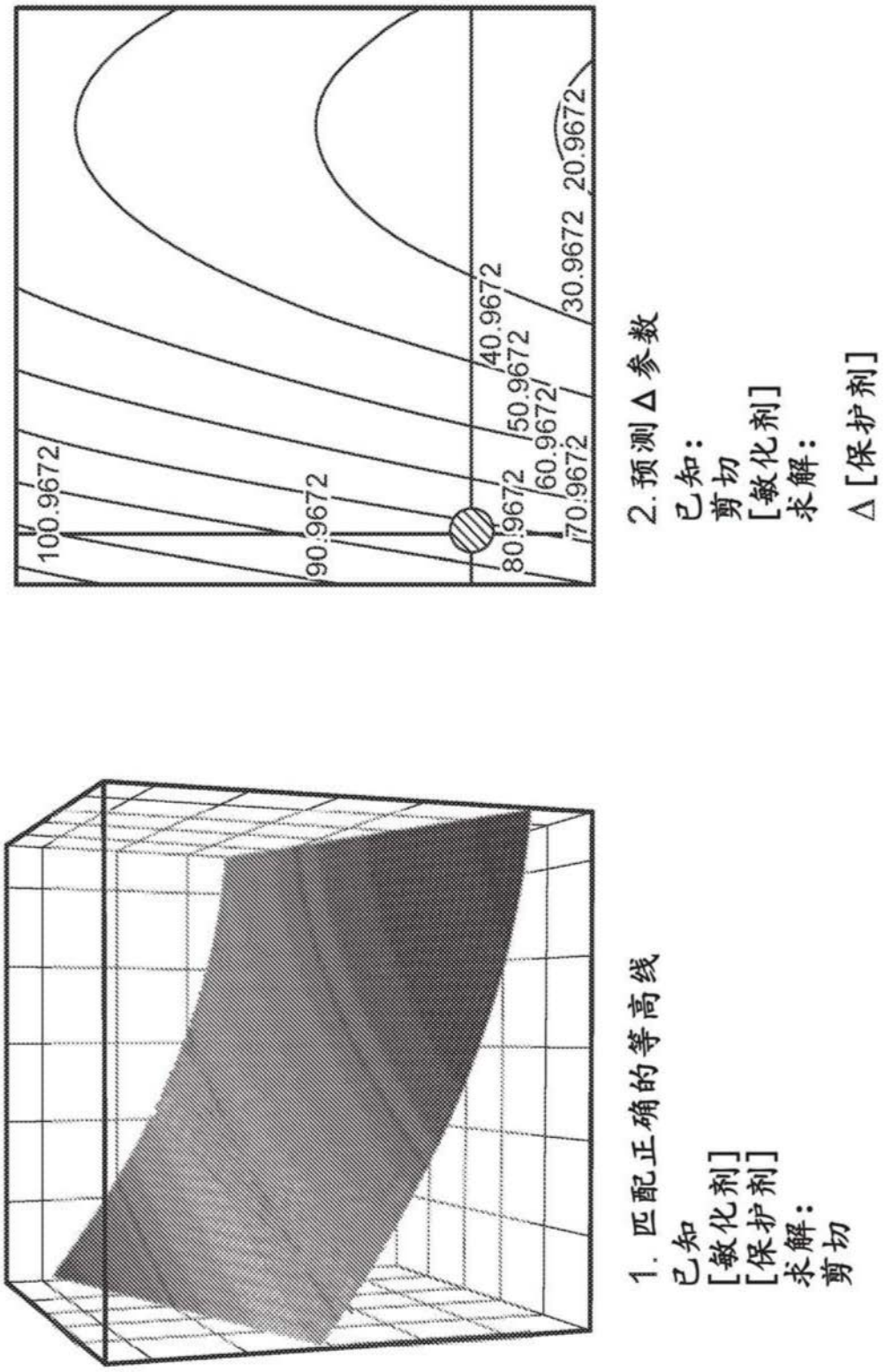

100.9672
90.9672
80.9672
70.9672
60.9672
50.9672
40.9672
30.9672
20.9672
2. 预测 Δ 参数
已知：
剪切
[敏化剂]
求解：
Δ [保护剂]
1. 匹配正确的等高线
已知
[敏化剂]
[保护剂]
求解：
剪切

图10

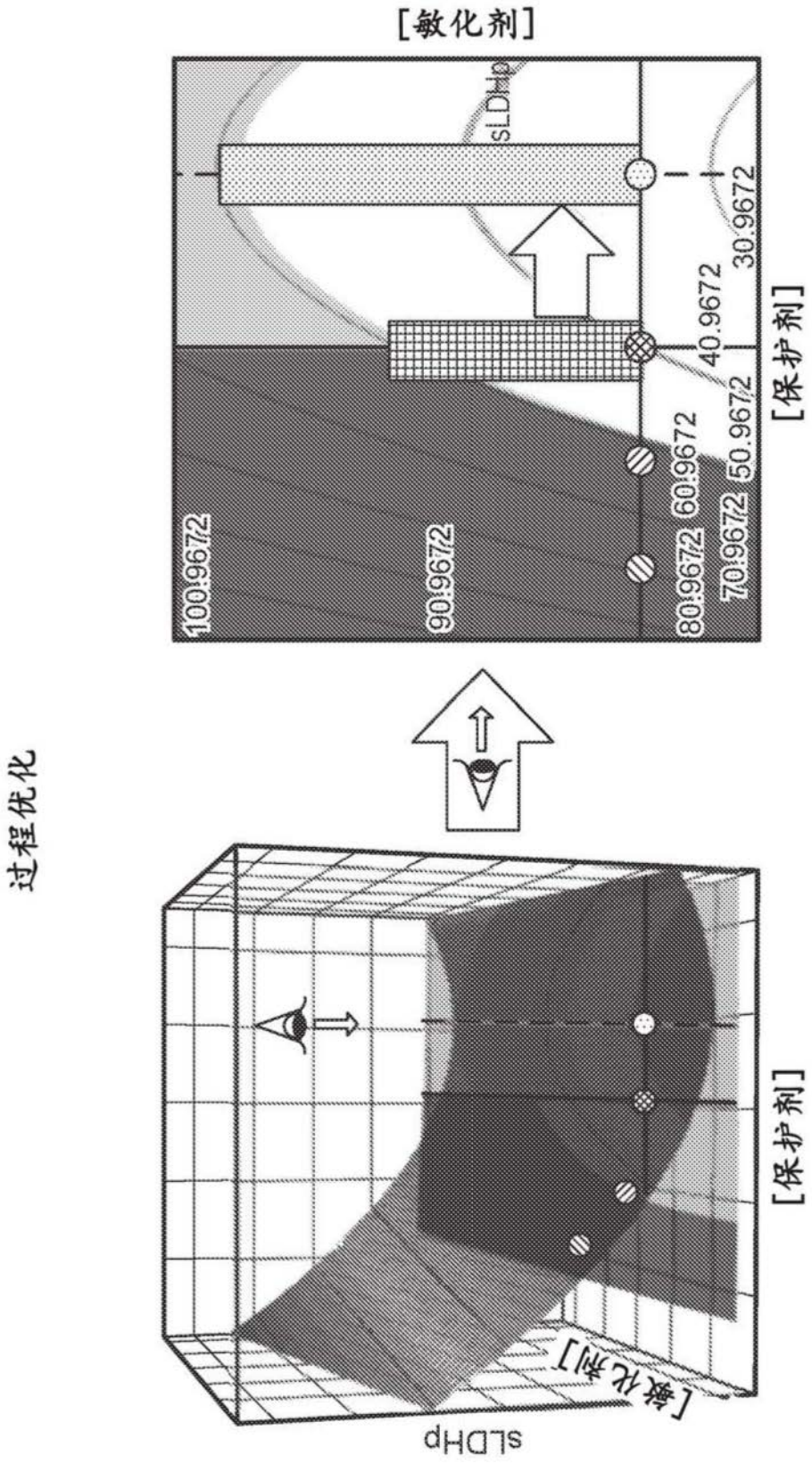

[敏化剂]
sLDHp
100:9672
90:9672
80:9672
70:9672
60:9672
50:9672
40:9672
30:9672
[保护剂]
过程优化
sLDHp
[敏化剂]
[保护剂]

图11

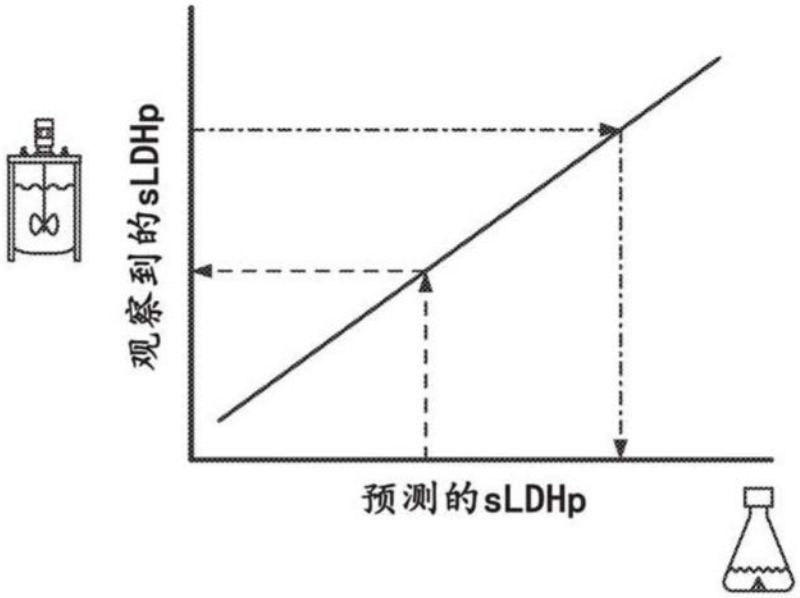

观察到的sLDHp
预测的sLDHp

图12

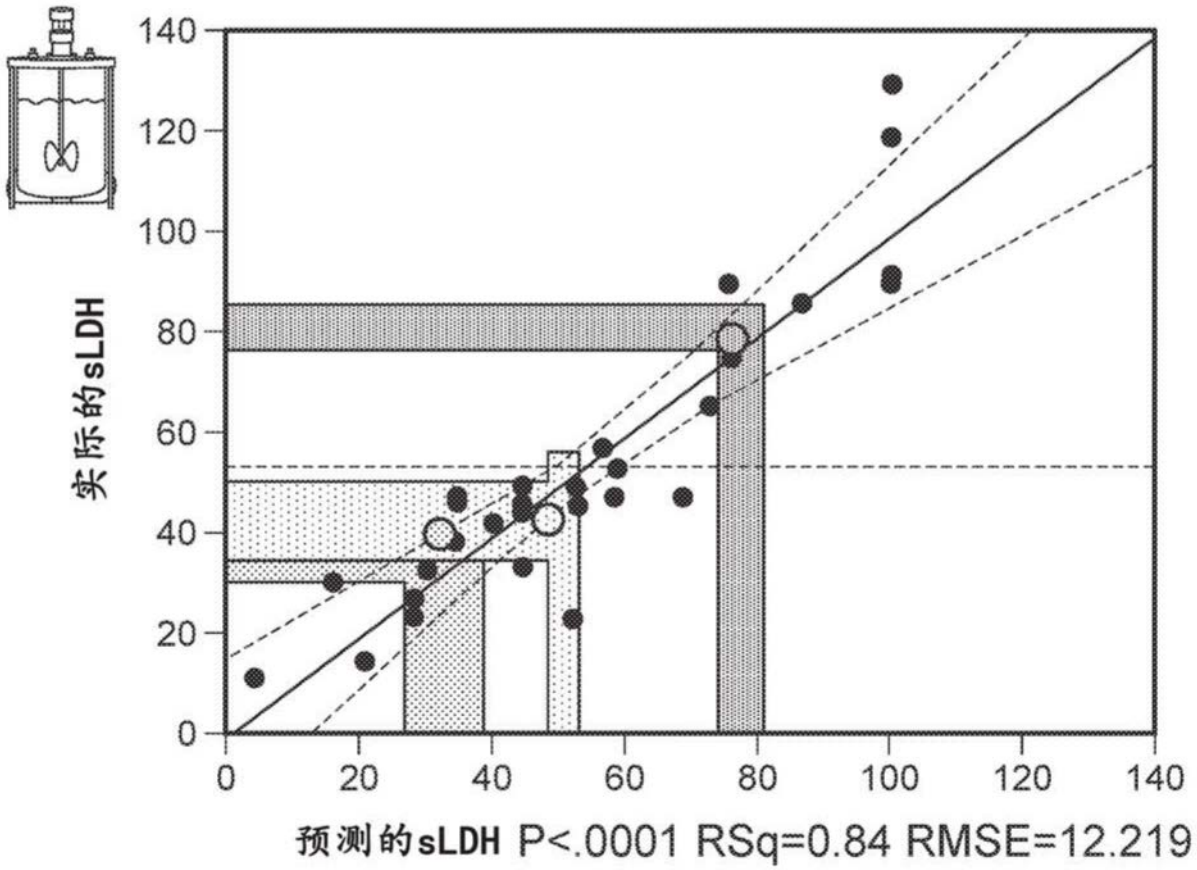

实际的sLDH
预测的sLDH P<.0001 RSq=0.84 RMSE=12.219
0
20
40
60
80
100
120
140

图13A

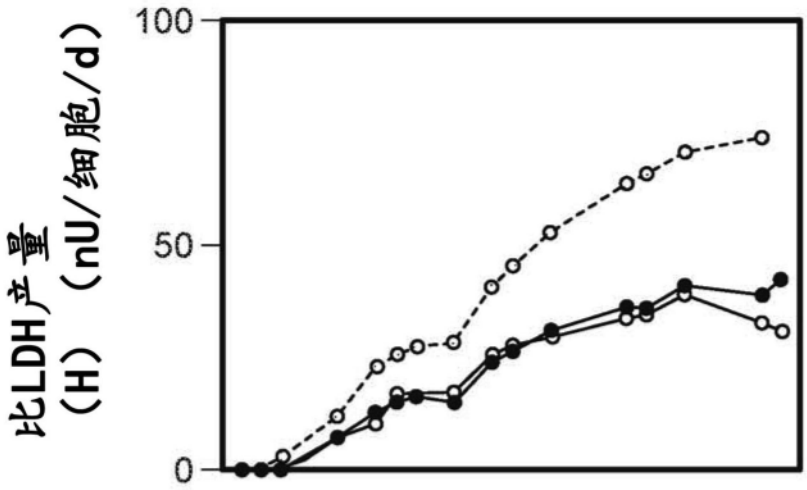
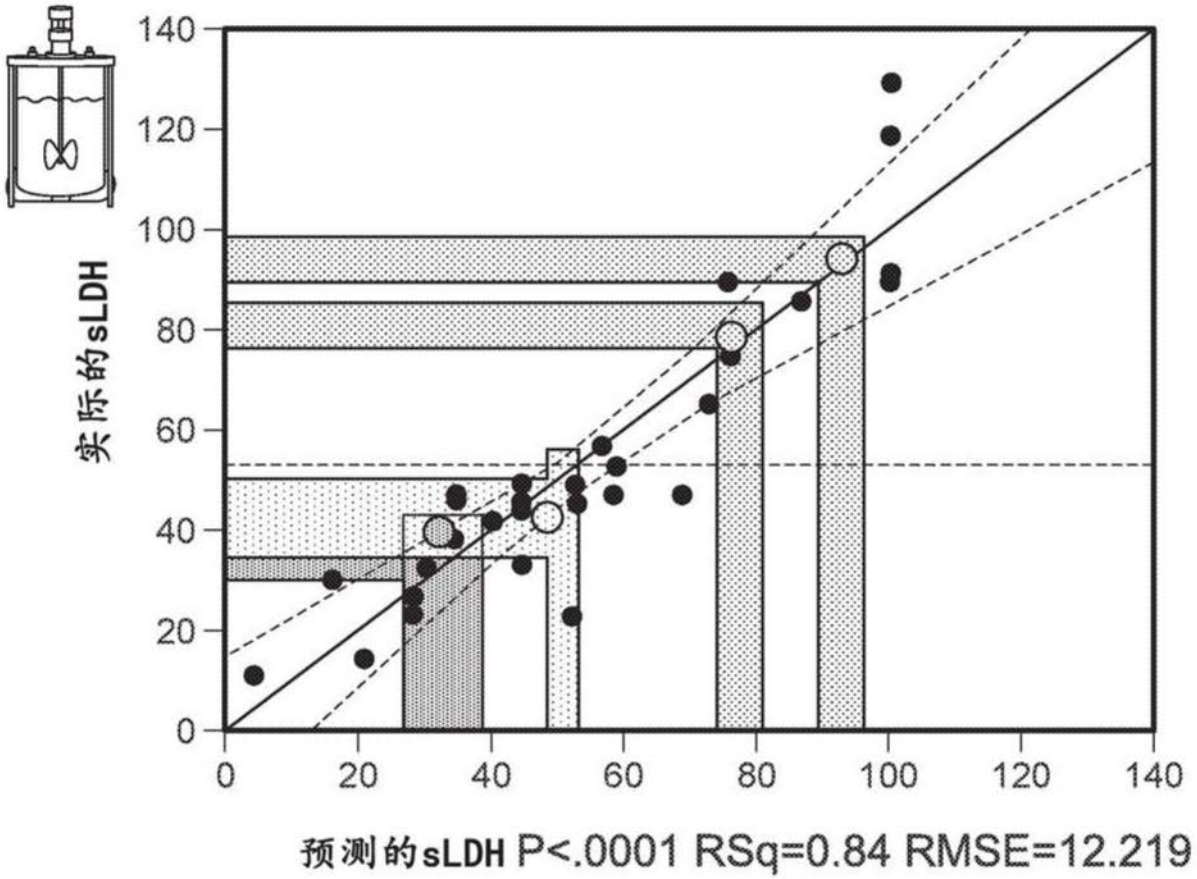


图13B

10L 台式		摇瓶模型	
观察到的LDH		预测的LDH	
Avg	Std	Avg	Std
39.00	8.49	37.00	4.24
43.00	7.07	54.00	4.24
80.50	3.54	80.00	4.24
Min	Max	Min	Max
30.51	47.49	32.76	41.24
35.93	50.07	49.76	58.24
76.96	84.04	75.76	84.24

图13C



对于变化的条件，**n=1**

消泡剂从30 ppm增加到80 ppm			
观察到的LDH范围		预测的LDH范围	
94.74	99.36	90.19	96.38

图14

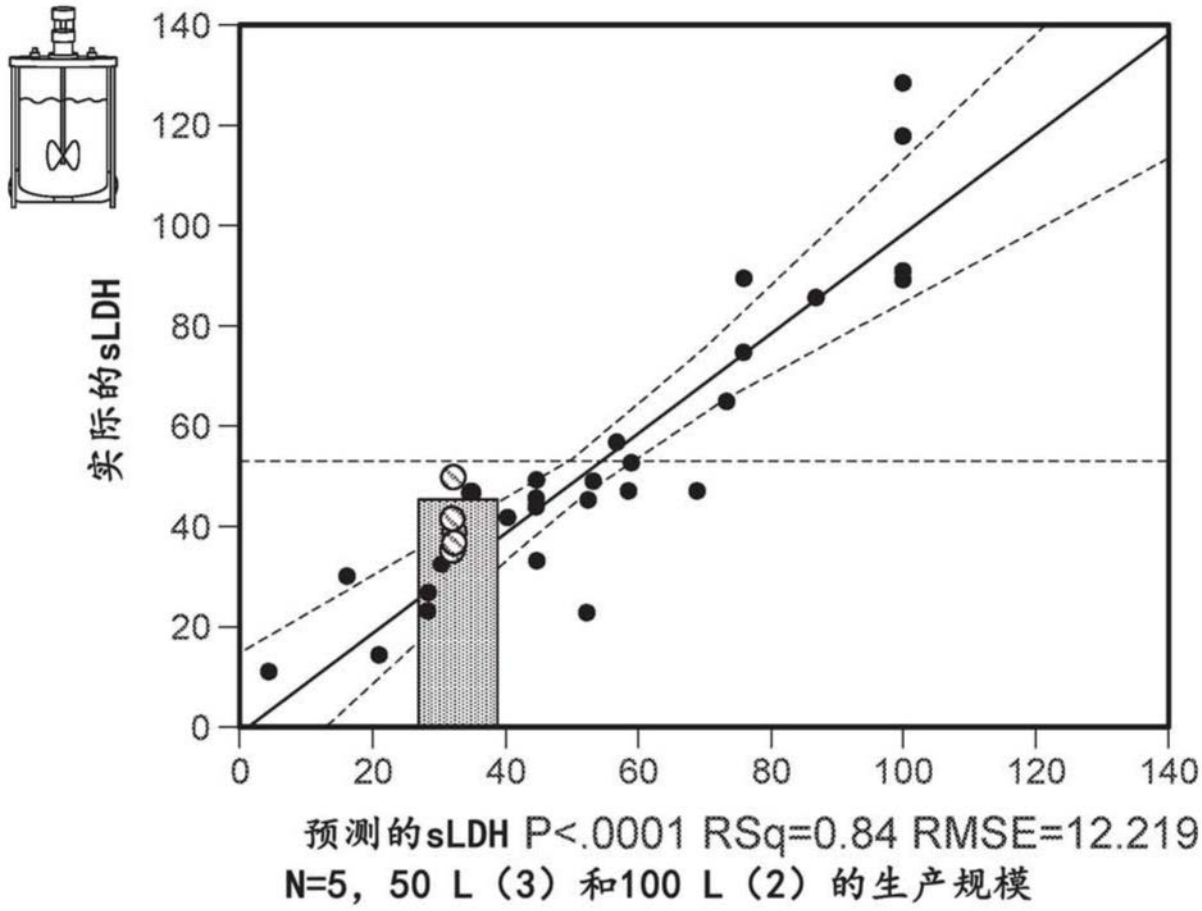


图15A

LDH		预测	
50L		模型	std
S16	39.72	37.00	4.24
S18	51.05	37.00	4.24
S19	39.6	37.00	4.24
100L		37.00	4.24
S27	37.61	37.00	4.24
S28	42.55	37.00	4.24

图15B