



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I843012 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 05 月 21 日

(21)申請案號：110131996

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 12 月 22 日

(51)Int. Cl. : C12N5/16 (2006.01)

C07K16/00 (2006.01)

(30)優先權：2014/12/22 美國

62/095,734

(71)申請人：美商健臻公司 (美國) GENZYME CORPORATION (US)

美國

(72)發明人：黃 克里斯多佛 HWANG, CHRISTOPHER (US)；強生 提摩西 JOHNSON, TIMOTHY (US)；瓦瑟 傑森 WALTHER, JASON (US)；程騁 CHENG, CHENG (CN)；王 喬納森 WANG, JONATHAN (US)；沙 尼哈 SHAH, NEHA (US)；裴 璵雅 BAE, SEUL-A (US)

(74)代理人：陳彥希；何愛文

(56)參考文獻：

網路文獻 Karin Tördahl et al., "Study of a perfusion process of Chinese Hamster Ovary cells by ATF filtration in bioreactor", 11 September 2009.

期刊 Zhang S et al., "Foaming and media surfactant effects on the cultivation of animal cells in stirred and sparged bioreactors", Journal of Biotechnology, 25(3): 289-306, 1992/09

期刊 PENG, Haofan, et al. Development of small scale cell culture models for screening poloxamer 188 lot-to-lot variation.

Biotechnology Progress, 30.6: 1411-1418, 2014.

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：37 項 圖式數：15 共 104 頁

(54)名稱

培養哺乳動物細胞之方法

(57)摘要

本案提供在液體培養基中培養哺乳動物細胞的方法，所述液體培養基包含濃度為 1.8g/L 或濃度高於 1.8g/L 的 poloxamer-188 或者所述液體培養基中的包含的 poloxamer-188 濃度基於選自下組的一個或多個因素選擇：孔徑、孔類型、氣體流速、培養基中的活細胞密度和涉及細胞應激的標記物。

Provided herein are methods of culturing a mammalian cell in a liquid medium including poloxamer-188 at a concentration of 1.8 g/L or at a greater concentration than 1.8 g/L more or a liquid medium that includes a poloxamer-188 concentration that is selected based on one or more factors selected from the group of: pore size, pore type, gas flow rate, viable cell density in the medium, and markers related to cell stress.

指定代表圖：

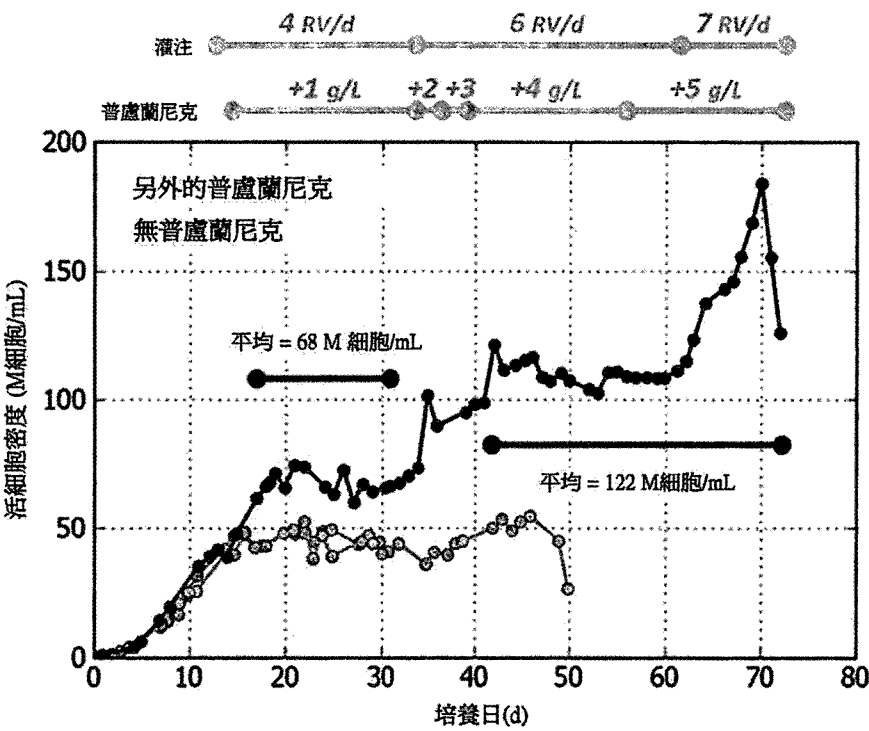


圖 1

發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

培養哺乳動物細胞之方法

METHODS OF CULTURING A MAMMALIAN CELL

【中文】

本案提供在液體培養基中培養哺乳動物細胞的方法，所述液體培養基包含濃度為 1.8 g/L 或濃度高於 1.8 g/L 的 poloxamer-188 或者所述液體培養基中的包含的 poloxamer-188 濃度基於選自下組的一個或多個因素選擇：孔徑、孔類型、氣體流速、培養基中的活細胞密度和涉及細胞應激的標記物。

【英文】

Provided herein are methods of culturing a mammalian cell in a liquid medium including poloxamer-188 at a concentration of 1.8 g/L or at a greater concentration than 1.8 g/L more or a liquid medium that includes a poloxamer-188 concentration that is selected based on one or more factors selected from the group of: pore size, pore type, gas flow rate, viable cell density in the medium, and markers related to cell stress.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：圖 1

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

培養哺乳動物細胞之方法

METHODS OF CULTURING A MAMMALIAN CELL

相關申請的交叉引用

此申請要求2014年12月22日提交的美國臨時專利申請序列號62/095,734的優先權，其全部內容併入本文。

【技術領域】

此發明涉及生物技術和製造重組蛋白的方法。

【先前技術】

背景

含有編碼重組蛋白的核酸的哺乳動物細胞常常用於產生治療上或商業上重要的蛋白。在多樣化的產品管線的目前環境中，生物技術公司越來越多地被驅動以開發用於高度靈活且具有成本效益地生產治療性蛋白藥物質的創新解決方案。

【發明內容】

本發明基於，至少部分基於，如下發現：包括編碼重組蛋白的核酸的哺乳動物細胞在包含濃度為1.8或濃度高於1.8 g/L的poloxamer-188 (例如，大於2.0 g/L，大於2.5 g/L，大於3.0 g/L，大於3.5 g/L，大於4.0 g/L，大於4.5 g/L，大於5.0 g/L，大於5.5 g/L，大於6.0 g/L，大於6.5 g/L，或大於7.0 g/L poloxamer-188)的培養基中存活且增殖，從而以poloxamer-188與消泡劑的特定比例實現最佳細胞生長，從而通過增加細胞培養物中的poloxamer-188濃度作為活細胞密度的函數來實現高細胞密度，且從而將最佳的poloxamer-188濃度添加至細胞培養物以促進細胞增殖，這取決於來自下組的一個或多個因素：孔徑、孔類型、氣體流速、培養基中的活細胞密度、和涉及細胞應激(cell stress)的標記(markers)。

本案例中提供的是培養哺乳動物細胞的方法，其包括：在足夠產生重組蛋白的條件下灌注培養包含編碼所述重組蛋白的核酸的哺乳動物細胞，其中灌注培養包括在包含濃度為1.8 g/L或濃度高於1.8 g/L的poloxamer-188的液體培養基中培養，且其中所述poloxamer-188在培養步驟前存在於所述培養基中和/或添加至所述培養基和/或在培養步驟過程中添加至所述培養基。在本案所述的任何方法的一些實施方案中，所述培養基包含濃度為1.8 g/L或濃度高於1.8 g/L (例如，濃度為2.8 g/L或濃度高於2.8 g/L，濃度為4.0 g/L或濃度高於4.0 g/L，濃度為6.0 g/L或濃度高於6.0 g/L，濃度為8.0 g/L或濃度高於8.0 g/L，或者濃度為10.0 g/L或濃度高於10.0 g/L)的poloxamer-188。

在本案所述的任何方法的一些實施方案中，所述培養基還包含消泡劑且所述培養基中消泡劑(g/L)與poloxamer-188 (g/L)的比例為所述液體培養基中約0.5%至約6.0% (例如，約1.0%至約5.5%，或約1.5%至約5.0%)。在本案所述的任何方法的一些實施方案中，所述方法包括在培養步驟前將poloxamer-188添加至所述培養基和/或在培養步驟過程中將poloxamer-188添加至所述培養基以在所述培養基中提供濃度為1.8 g/L或濃度高於1.8 g/L的poloxamer-188。在本案提供的任何方法的一些實施方案中，poloxamer-188存在於所述培養基中。在本案所述的任何方法的一些實施方案中，所述方法包括在培養步驟前將poloxamer-188添加至所述培養基和/或在培養步驟過程中將poloxamer-188添加至所述培養基以在所述培養基中提供濃度為2.8 g/L或濃度高於2.8 g/L (例如，濃度為4.0 g/L或濃度為大於4.0 g/L，濃度為6.0 g/L或濃度高於6.0 g/L，濃度為8.0 g/L或濃度高於8.0 g/L，或者濃度為10.0 g/L或濃度高於10.0 g/L)的poloxamer-188。

在本案所述的任何方法的一些實施方案中，所述方法包括將培養基中的poloxamer-188濃度隨時間增加。在本案所述的任何方法的一些實施方案中，將培養基中的poloxamer-188濃度隨時間增加是基於所述培養基中的活細胞密度。在本案所述的任何方法的一些實施方案中，所述方法包括當所述培養基中的活細胞密度為約 35×10^6 細胞/mL至約 60×10^6 細胞/mL時，將培養基中的poloxamer-188濃度增加到大於1.8 g/L (例如，約1.8 g/L至約3.0 g/L，或約2.3 g/L至約3.0 g/L)。在本案所述的任何方法的一些實施方案中，所述方法包括當所述培養基中的活細胞密度為約 60×10^6 細胞/mL至約 90×10^6 細胞/mL時，將培養基中的poloxamer-188濃度增加到大於3.0 g/L (例如，約3.0 g/L至約6.0 g/L，或約3.6

g/L至約6.0 g/L)。在本案所述的任何方法的一些實施方案中，所述方法包括當所述培養基中的活細胞密度為大於 90×10^6 細胞/mL時，將培養基中的poloxamer-188濃度增加到大於6.0 g/L (例如，大於7.0 g/L，大於8.0 g/L，或大於10.0 g/L)。本案所述的任何方法的一些實施方案包括：當所述培養基中的活細胞密度為約 35×10^6 細胞/mL至約 60×10^6 細胞/mL時，將培養基中的poloxamer-188濃度增加到約1.8 g/L至約3.0 g/L；當所述培養基中的活細胞密度為約 60×10^6 細胞/mL至約 90×10^6 細胞/mL時，將培養基中的poloxamer-188濃度增加到約3.0 g/L至約6.0 g/L；並且當所述培養基中的活細胞密度為大於 90×10^6 細胞/mL時，將培養基中的poloxamer-188濃度增加到大於6.0 g/L。本案所述的任何方法的一些實施方案還包括在培養過程中在一個或多個時間點確定所述培養基中的活細胞密度。

在本案所述的任何方法的一些實施方案中，所述灌注培養包括：提供包含配置於第一液體培養基中的哺乳動物細胞的容器；攪動溫育所述容器並在約32°C至約40°C的溫度進行至少約7天的培養期；和在培養期的首個48至96小時後連續地或周期地移出第一體積的第一液體培養基並向第一液體培養基添加第二體積的第二液體培養基，其中第一和第二體積是大約相等的。在本案所述的任何方法的一些實施方案中，第二液體培養基以高於第一液體培養基中的濃度包含poloxamer-188。在本案所述的任何方法的一些實施方案中，第一液體培養基包含濃度為1.8 g/L或濃度低於1.8 g/L的poloxamer-188，且第二液體培養基包含濃度高於1.8 g/L (例如，濃度高於2.8 g/L，濃度高於4.0 g/L，濃度高於6.0 g/L，濃度高於8.0 g/L，或濃度高於10.0 g/L)的poloxamer-188。在本案所述的任何方法的一些實施方案中，所述方法包括在將第二體積的第二液體培養基添加至第一液體培養基之前或之後，將poloxamer-188添加至第二液體培養基以在所述第二培養基中提供濃度為1.8 g/L或濃度高於1.8 g/L (例如，濃度高於2.8 g/L，濃度高於4.0 g/L，濃度高於6.0 g/L，濃度高於8.0 g/L，或濃度高於10.0 g/L)的poloxamer-188。

本案所述的任何方法的一些實施方案還包括：從哺乳動物細胞、從第一液體培養基或第二液體培養基，或其任何組合收集重組蛋白。本案所述的任何方法的一些實施方案還包括將收集的重組蛋白配製成藥物組合物。在本案所述的

任何方法的一些實施方案中，在培養實現大於 30×10^6 細胞/mL (例如，大於 50×10^6 細胞/mL，大於 100×10^6 細胞/mL，大於 150×10^6 細胞/mL，或大於 200×10^6 細胞/mL)的活細胞密度後進行收集。

本案中還提供的是培養哺乳動物細胞的方法，其包括：提供培養系統，其包含容器、配置於所述容器內的液體培養基和配置在所述容器內的噴霧器，所述噴霧器包含多個孔，所述孔經配置以將氣體通過所述噴霧器分配入所述液體培養基；和在所述培養系統中在足夠在該系統中產生重組蛋白的條件和氣體流速下灌注培養包含編碼所述重組蛋白的核酸的哺乳動物細胞，其中所述培養基包含的poloxamer-188濃度基於選自下組的一個或多個因素選擇：孔徑、孔類型、氣體流速、培養基中的活細胞密度和涉及細胞應激的標記物。在本案所述的任何方法的一些實施方案中，所述選擇的poloxamer-188濃度通過如下實現：在培養步驟前將poloxamer-188添加至所述培養基和/或在所述培養步驟過程中將poloxamer-188添加至所述培養基。

在本案所述的任何方法的一些實施方案中，所述因素為孔類型且所述孔類型是燒結孔或鑽孔。在本案所述的任何方法的一些實施方案中，所述方法包括當所述孔類型為鑽孔且所述孔徑為約 $750 \mu\text{m}$ 至約 1.5 mm 時，基於孔類型和孔徑選擇濃度為約 2.3 g/L 至約 3.3 g/L 的poloxamer-188，或當所述孔類型為鑽孔且所述孔徑為約 $900 \mu\text{m}$ 至約 1.1 mm 時，基於孔類型和孔徑選擇濃度為約 2.5 g/L 至約 3.1 g/L 的poloxamer-188。在本案所述的任何方法的一些實施方案中，所述方法包括當所述孔類型為鑽孔且所述孔徑為約 $250 \mu\text{m}$ 至約 $750 \mu\text{m}$ 時，基於孔類型和孔徑選擇濃度為約 3.3 g/L 至約 4.3 g/L 的poloxamer-188，或當所述孔類型為鑽孔且所述孔徑為約 $400 \mu\text{m}$ 至約 $600 \mu\text{m}$ 時，基於孔類型和孔徑選擇濃度為約 3.5 g/L 至約 4.1 g/L 的poloxamer-188。在本案所述的任何方法的一些實施方案中，所述方法包括當所述孔類型為鑽孔且所述孔徑為 $1 \mu\text{m}$ 至約 $250 \mu\text{m}$ (例如，約 $1 \mu\text{m}$ 至約 $200 \mu\text{m}$ ，約 $160 \mu\text{m}$ 至約 $190 \mu\text{m}$ ，或約 $170 \mu\text{m}$ 至約 $180 \mu\text{m}$)時，基於孔類型和孔徑選擇濃度高於 4.3 g/L (例如，濃度高於 5.0 g/L ，濃度高於 6.0 g/L ，濃度高於 8.0 g/L ，或濃度高於 10.0 g/L)的poloxamer-188。

在本案所述的任何方法的一些實施方案中，所述方法包括當所述孔類型為燒結孔且所述孔徑為大於 $150 \mu\text{m}$ 時，基於孔類型和孔徑選擇濃度為約 1.8 g/L 至約 3.3 g/L 的poloxamer-188。在本案所述的任何方法的一些實施方案中，所述方

法包括當所述孔類型為燒結孔且所述孔徑為約80 μm 至約150 μm 時，基於孔類型和孔徑選擇濃度為約3.3 g/L至約4.3 g/L的poloxamer-188，或當所述孔類型為燒結孔且所述孔徑為約90 μm 至約110 μm 時，基於孔類型和孔徑選擇濃度為約3.5 g/L至約4.1 g/L的poloxamer-188。在本案所述的任何方法的一些實施方案中，所述方法包括當所述孔類型為燒結孔且所述孔徑為約1 μm 至約80 μm 時，基於孔類型和孔徑選擇濃度高於4.5 g/L (例如，濃度高於5.0 g/L，濃度高於6.0 g/L，濃度高於8.0 g/L，或濃度高於10.0 g/L)的poloxamer-188。

在本案所述的任何方法的一些實施方案中，所述灌注培養包括：在攪拌下溫育包含第一液體培養基的培養系統且在約32°C至約40°C的溫度進行至少約7天的培養期；並在培養期的首個48至96小時之後，連續地或周期地移出第一體積的第一液體培養基並向第一液體培養基添加第二體積的第二液體培養基。在本案所述的任何方法的一些實施方案中，第二液體培養基以高於第一液體培養基中poloxamer-188的濃度包含poloxamer-188。在本案所述的任何方法的一些實施方案中，所述第二培養基包含選擇的poloxamer-188濃度。

本案所述的任何方法的一些實施方案還包括：從哺乳動物細胞的內部、從第一液體培養基或第二液體培養基，或其任何組合收集重組蛋白。本案所述的任何方法的一些實施方案還包括將所述收集的重組蛋白配製成藥物組合物。

在本案所述的任何方法的一些實施方案中，所述容器是灌注生物反應器。在本案所述的任何方法的一些實施方案中，所述灌注生物反應器具有約1.5 L至約25,000 L的體積。在本案所述的任何方法的一些實施方案中，所述培養期是大於10天。在本案所述的任何方法的一些實施方案中，(c)中添加第二體積的第二液體培養基和移出第一體積的第一液體培養基是連續進行的。在本案所述的任何方法的一些實施方案中，(c)中添加第二體積的第二液體培養基和移出第一體積的第一液體培養基是周期進行的。在本案所述的任何方法的一些實施方案中，(c)中添加的第二體積的第二液體培養基和移出的第一體積的第一液體培養基隨時間增加。在本案所述的任何方法的一些實施方案中，第一液體培養基和/或第二液體培養基選自下組：化學成分確定的液體培養基、無血清液體培養基、含有血清的液體培養基、無動物衍生組分的液體培養基、和無蛋白的培養基。在本案所述的任何方法的一些實施方案中，在時間期的約首個48至96小時後，在每24-小時時間中，(c)中添加的第二體積的第二液體培養基和移出的第一體積的

第一液體培養基為第一液體培養基體積或容器體積的約0.3x至約10x。

在本案所述的任何方法的一些實施方案中，所述哺乳動物細胞為中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、人胚胎腎(HEK)細胞、NSO細胞、幼倉鼠腎(BHK)細胞、PerC6細胞、Vero細胞、或HT-1080細胞系。在本案所述的任何方法的一些實施方案中，重組蛋白為免疫球蛋白、酶、生長因子、蛋白片段、或工程改造的蛋白。

如本案中使用的，名詞之前的單字“a”代表一個或多個特定的名詞。例如，短語“哺乳動物細胞”代表“一個或多個哺乳動物細胞”。

術語“哺乳動物細胞”意指來自或源自任何哺乳動物(例如，人、倉鼠、小鼠、綠猴、大鼠、豬、牛、或兔)的任何細胞。例如，哺乳動物細胞可為無限增殖化細胞(immortalized cell)。在一些實施方案中，哺乳動物細胞是分化的或未分化的細胞。哺乳動物細胞的非限制性實例在本案中描述。哺乳動物細胞的其他實例是本領域已知的。

術語“培養”或“細胞培養”意指哺乳動物細胞在受控的物理條件組下的維持或增殖。

術語“哺乳動物細胞的培養物”、“培養物”或“細胞培養物”意指含有多種哺乳動物細胞的液體培養基，所述哺乳動物細胞在受控的物理條件組下維持或增殖。

術語“液體培養基(liquid culture medium)”或“液體培養基(liquid medium)”意指包含足夠營養物以允許細胞(例如，哺乳動物細胞)在體外生長或增殖的流體。例如，液體培養基可包含如下的一種或多種：胺基酸(例如，20種胺基酸)、嘌呤(例如，次黃嘌呤)、嘧啶(例如，胸苷)、膽碱、肌醇、硫胺素、葉酸、生物素、鈣、煙醯胺、吡哆素、核黃素、胸苷、氰鈷胺素、丙酮酸、硫辛酸、鎂、葡萄糖、鈉、鉀、鐵、銅、鋅和碳酸氫鈉。在一些實施方案中，液體培養基可包含來自哺乳動物的血清。在一些實施方案中，液體培養基不包含來自哺乳動物的血清或另外的提取物(成分確定的液體培養基)。在一些實施方案中，液體培養基可包含痕量金屬、哺乳動物生長激素、和/或哺乳動物生長因子。液體培養基的另外的實例是基本培養基(例如，僅含有無機鹽、碳源和水的培養基)。液體培養基的非限制性實例在本案中描述。液體培養基的其他實例是本領域已知的且為商業上可得到的。液體培養基可包含任何密度的哺乳動物細胞。例如，如本案中使用的，從生物反應器移出的一定體積的液體培養基可為基本上無哺乳動物

細胞。

術語“無動物衍生組分的液體培養基”意指不含有任何源自哺乳動物的組分(例如，蛋白或血清)的液體培養基。

術語“無血清液體培養基”意指不含有哺乳動物血清的液體培養基。

術語“含血清液體培養基”意指含有哺乳動物血清的液體培養基。

術語“化學成分確定的液體培養基”是本領域的術語並意指液體培養基，其中所有化學組分都是已知的。例如，化學成分確定的液體培養基不含有胎牛血清、牛血清白蛋白、或人血清白蛋白，因為這些制備物通常含有白蛋白和脂質的複雜混合物。

術語“無蛋白液體培養基”已知不含有任何蛋白質(例如，任何可檢測的蛋白質)的液體培養基。

術語“攪拌”已知攪動或以其他方式移動容器中液體培養基的部分。進行此從而，例如，增加生物反應器中液體培養基中的溶解 O_2 濃度。可使用任何本領域已知的方法，例如，工具或螺旋槳(propellor)來進行攪拌。可用於在生物反應器中進行液體培養基的部分的攪拌的例示性裝置和方法是本領域已知的。

術語“免疫球蛋白”意指多肽，其含有免疫球蛋白蛋白的至少15個胺基酸(例如，至少20、30、40、50、60、70、80、90、或100個胺基酸)的胺基酸序列(例如，可變域序列、框架序列、或恒定域序列)。免疫球蛋白可包含，例如，輕鏈免疫球蛋白的至少15個胺基酸，例如，重鏈免疫球蛋白的至少15個胺基酸。免疫球蛋白可為分離的抗體(例如，IgG、IgE、IgD、IgA、或IgM)。免疫球蛋白可為IgG的亞類(例如，IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4)。免疫球蛋白可為抗體片段，例如，Fab片段、F(ab')₂片段、或scFv片段。免疫球蛋白亦可為雙特異性抗體或三特異性抗體，或二聚體、三聚體、或多聚體抗體，或者雙功能抗體(diabody)、Affibody®、或Nanobody®。免疫球蛋白還可為工程改造的蛋白，其含有至少一個免疫球蛋白域(例如，融合蛋白)。免疫球蛋白的非限制性實例在本案描述且免疫球蛋白的另外的實例是本領域已知的。可使用本案所述的任何方法產生重組免疫球蛋白。

術語“蛋白片段”或“多肽片段”意指多肽序列的部分，其長度為至少或約4胺基酸，至少或約5胺基酸，至少或約6胺基酸，至少或約7胺基酸，至少或約8胺基酸，至少或約9胺基酸，至少或約10胺基酸，至少或約11胺基酸，至少或約12

胺基酸，至少或約13胺基酸，至少或約14胺基酸，至少或約15胺基酸，至少或約16胺基酸，至少或約17胺基酸，至少或約18胺基酸，至少或約19胺基酸，或至少或約20胺基酸，或長度多於20個胺基酸。可使用本案所述的任何方法產生重組蛋白片段。

術語“工程改造的蛋白”意指多肽，其天然不由生物體(例如，哺乳動物)內存在的內源核酸編碼。工程改造的蛋白的實例包括酶(例如，具有一個或多個胺基酸取代、缺失、插入、或添加，其導致工程改造的酶的穩定性和/或催化活性增加)、融合蛋白、抗體(例如，二價抗體、三價抗體、或雙功能抗體)、和抗原結合蛋白，其含有至少一個重組的支架序列(scaffolding sequence)。可使用本案所述的任何方法產生重組的工程改造的蛋白。

術語“分泌的蛋白”或“分泌的重組蛋白”意指蛋白(例如，重組蛋白)，當其在哺乳動物細胞中被翻譯時原始含有至少一個分泌信號序列，並且通過(至少部分地通過)哺乳動物細胞中分泌信號序列的酶切被至少部分地分泌入細胞外空間(例如，液體培養基)。熟練專業人員會理解“分泌的”蛋白不需要完全與細胞分離才被認為是分泌的蛋白。

術語“灌注生物反應器”意指在第一液體培養基中含有多種細胞(例如，哺乳動物細胞)的生物反應器，其中培養生物反應器中存在的細胞包括周期地或連續地移出第一液體培養基並在同時或稍後向生物反應器添加基本上相同體積的第二液體培養基。在一些實例中，移出的第一液體培養基的體積和添加的體積在培養期過程中隨增加的時間(例如，約24-小時時間，約1分鐘-約24-小時的時間，或大於24小時的時間)存在增量變化(例如，增加或減少)(例如，以天為基礎的液體培養基再進料速率)。每天移出的和替代的培養基的部分可取決於被培養的特定細胞、初始的接種密度、和特定時間的細胞密度而變化。“RV”或“反應器體積”意指培養過程開始時存在的液體培養基的體積(例如，接種後存在的液體培養基的總體積)。

術語“進料分批生物反應器”是本領域的術語並意指在第一液體培養基中含有多種細胞(例如，哺乳動物細胞)的生物反應器，其中培養生物反應器中存在的細胞包括周期地或連續地將第二液體培養基添加至第一液體培養基而不大量或顯著地從細胞培養物移出第一液體培養基或第二液體培養基。第二液體培養基可與第一液體培養基相同。在進料分批培養的一些實例中，第二液體培養基是

第一液體培養基的濃縮形式。在進料分批培養的一些實例中，第二液體培養基作為幹粉添加。

術語“噴霧器”是本領域的術語並意指裝置，其具有入口、主體和具有一個或多個孔的表面，其中所述入口、主體和一個或多個孔經設計以允許氣體通過入口、通過主體流動，並流出一個或多個孔。當將噴霧器用於細胞培養時，一個或多個孔之一與細胞培養物接觸，使得氣體流出至少一個孔並流入細胞培養物。噴霧器常常通過它們的孔徑和孔類型來描述。具有孔徑和孔類型的不同組合的噴霧器的非限制性實例在本案描述。

術語“孔徑”是本領域的術語並指具有單孔的噴霧器中的單孔的直徑或具有兩個或多個孔的噴霧器中兩個或多個孔的平均直徑。

術語“涉及細胞應激的標記物”是本領域的術語並意指生物分子，其由細胞在生理應激下(例如，經受壞死性細胞死亡或凋亡性細胞死亡的細胞)釋放入液體培養基，或在受生理應激(例如，經受壞死性細胞死亡或凋亡性細胞死亡的細胞)下的細胞中產生或具有升高水平。由細胞在生理應激下釋放的涉及細胞應激的標記物的非限制性實例包括蛋白酶(例如，活化的半胱天冬酶(caspase))、乳酸脫氫酶、基因組DNA (例如，核小體DNA)、細胞色素c、和活化的PARP。在受生理應激下的細胞中產生或具有升高水平的涉及細胞應激的標記物的非限制性實例包括活化的半胱天冬酶、細胞色素c、活化的PARP、和外部化磷脂醯絲氨酸(externalized phosphatidylserine)。

“比生產速率(Specific productivity rate)”或“SPR”是本領域的術語並如在本案所使用的指每個哺乳動物細胞每天產生的重組蛋白的質量(mass)或酶活性。重組治療性抗體的SPR通常測量為質量/細胞/天。重組治療性酶的SPR通常測量為單位/細胞/天或(單位/質量)/細胞/天。

“體積生產速率(Volume productivity rate)”或“VPR”是本領域的術語並如在本案所使用的指每體積培養物(例如，每L的生物反應器、容器或管體積)每天產生的重組蛋白的質量(mass)或酶活性。重組治療性抗體的VPR通常測量為質量/L/天。重組治療性酶的VPR通常測量為單位/L/天或(單位/質量)/L/天。

短語“濃度為...的poloxamer-188”和“poloxamer-188濃度”在本案中可互換使用。短語“X g/L或更高的poloxamer-188”和“濃度為X g/L或濃度高於X g/L的poloxamer-188”在本案中可互換使用。

除非另外限定，本案例中使用的所有技術和科學術語具有與本發明所屬領域的普通技術人員所通常理解的相同的含義。本案例所述的方法和材料用於本發明；本領域已知的其他合適的方法和材料也可使用。所述材料、方法和實例僅僅是說明性的而非意欲為限制性的。本案例提及的所有出版物、專利申請、專利、序列、數據庫條目和其他參考文件通過提述以它們的整體並入。在沖突的情況中，以包含定義的本說明書(specification)為準。

本發明的其他特征和優勢會由如下詳細的描述和附圖以及從請求項中顯而易見。

【圖式簡單說明】

附圖簡述

圖1是在使用不含另外的poloxamer-188的液體培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(在培養期的長度中穩定濃度的1.8 g/L poloxamer-188) (灰色數據)和使用含有增加量的poloxamer-188的液體培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(在培養期的長度中從1.8 g/L增加至6.8 g/L的poloxamer-188) (黑色數據)中活細胞密度隨時間的圖。

圖2是在使用含有增加量的poloxamer-188的液體培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(在培養期的長度中從1.8 g/L增加至6.8 g/L的poloxamer-188)中比生長速率隨時間的圖。

圖3是在使用不含另外的poloxamer-188的液體培養基在培養期長度中進行的兩個灌注細胞培養操作(在培養期的長度中穩定濃度的1.8 g/L poloxamer-188) (灰色數據)和使用含有增加量的poloxamer-188的液體培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(在培養期的長度中從1.8 g/L增加至6.8 g/L的poloxamer-188) (黑色數據)中活細胞的百分數的圖。

圖4是在使用含有增加量的poloxamer-188的液體培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(在培養期的長度中從1.8 g/L增加至6.8 g/L的poloxamer-188)中體積生產率(volumetric productivity)隨時間的圖。

圖5是在使用含有增加量的poloxamer-188的液體培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(在培養期的長度中從1.8 g/L增加至6.8 g/L的poloxamer-188)中比生產率(specific productivity)隨時間的圖。

圖6是Bis-Tris凝膠，其顯示存在於如下的重組抗體的降解產物：收獲自含有6.8 g/L poloxamer-188的灌注細胞培養物的澄清的液體培養基(泳道1)；收獲自含有6.8 g/L poloxamer-188的灌注細胞培養物的澄清的液體培養基，其已在室溫溫育7天(泳道1a)；收獲自含有3.95 g/L poloxamer-188的灌注細胞培養物的澄清的液體培養基(泳道2)；收獲自含有3.95 g/L poloxamer-188的灌注細胞培養物並在室溫溫育7天的澄清的液體培養基(泳道2a)；收獲自含有3.95 g/L poloxamer-188的灌注細胞培養物的澄清的液體培養基，其補充 poloxmer-188 以達到6.8 g/L poloxamer-188 的濃度並在室溫溫育9天(泳道2b)；收獲自含有3.0 g/L poloxamer-188的灌注細胞培養物的澄清的液體培養基(泳道3)；收獲自含有3.0 g/L poloxamer-188的灌注細胞培養物並在室溫溫育7天的澄清的液體培養基(泳道3a)；和收獲自含有3.0 g/L poloxamer-188的灌注細胞培養物的澄清的液體培養基，其補充 poloxmer-188 以達到6.8 g/L poloxamer-188 的濃度並在室溫溫育9天(泳道3b)。

圖7是使用具有孔徑為20 μm 的燒結孔的噴霧器和含有增加量的 poloxamer-188 的培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(在培養期的長度中從1.8 g/L增加至5.8 g/L的 poloxamer-188) (方形)；使用具有孔徑為200 μm 的鑽孔的噴霧器和含有增加量的 poloxamer-188 的培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(在培養期的長度中從1.8 g/L增加至4.8 g/L的 poloxamer-188) (三角)；使用具有孔徑為500 μm 的鑽孔的噴霧器和含有增加量的 poloxamer-188 的培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(從1.8 g/L增加至3.8 g/L的 poloxamer-188) (圓圈)的活細胞密度隨時間的圖。

圖8是使用具有孔徑為20 μm 的燒結孔的噴霧器和含有增加量的 poloxamer-188 的培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(在培養期的長度中從1.8 g/L增加至5.8 g/L的 poloxamer-188) (方形)；使用具有孔徑為200 μm 的鑽孔的噴霧器和含有增加量的 poloxamer-188 的培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(在培養期的長度中從1.8 g/L增加至4.8 g/L的 poloxamer-188) (三角)；使用具有孔徑為500 μm 的鑽孔的噴霧器和含有增加量的 poloxamer-188 的培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(從1.8 g/L增加至3.8 g/L的 poloxamer-188) (圓圈)的比生長速率隨時間的圖。

圖9是使用具有孔徑為20 μm 的燒結孔的噴霧器和含有增加量的

poloxamer-188的培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(在培養期的長度中從1.8 g/L增加至5.8 g/L的poloxamer-188) (方形)；使用具有孔徑為200 μm 的鑽孔的噴霧器和含有增加量的poloxamer-188的培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(在培養期的長度中從1.8 g/L增加至4.8 g/L的poloxamer-188) (三角)；使用具有孔徑為500 μm 的鑽孔的噴霧器和含有增加量的poloxamer-188的培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(從1.8 g/L增加至3.8 g/L的poloxamer-188) (圓圈)的比乳糖脫氫酶產生隨時間的圖。

圖 10 是使用具有孔徑為 20 μm 的燒結孔的噴霧器和含有增加量的 poloxamer-188 的培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(在培養期的長度中從1.8 g/L增加至5.8 g/L的poloxamer-188) (方形)；使用具有孔徑為200 μm 的鑽孔的噴霧器和含有增加量的poloxamer-188的培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(在培養期的長度中從1.8 g/L增加至4.8 g/L的poloxamer-188) (三角)；使用具有孔徑為500 μm 的鑽孔的噴霧器和含有增加量的poloxamer-188的培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(從1.8 g/L增加至3.8 g/L的poloxamer-188) (圓圈)的百分數活細胞隨時間的圖。

圖 11 是使用具有孔徑為 20 μm 的燒結孔的噴霧器和含有 1.8 g/L poloxamer-188 的培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(空心圓圈)；使用具有孔徑為20 μm 的燒結孔的噴霧器和含有增加量的poloxamer-188的培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(在培養期的長度中從1.8 g/L增加至5.8 g/L的poloxamer-188) (方形)；使用具有孔徑為200 μm 的鑽孔的噴霧器和含有增加量的poloxamer-188的培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(在培養期的長度中從1.8 g/L增加至4.8 g/L的poloxamer-188) (三角)；使用具有孔徑為500 μm 的鑽孔的噴霧器和含有增加量的poloxamer-188的培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(從1.8 g/L增加至3.8 g/L的poloxamer-188) (實心圓圈)的比乳糖脫氫酶產生隨時間的圖。

圖 12 是使用具有孔徑為 20 μm 的燒結孔的噴霧器和含有增加量的 poloxamer-188 的培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(在培養期的長度中從1.8 g/L增加至5.8 g/L的poloxamer-188) (方形)；使用具有孔徑為200 μm 的鑽孔的噴霧器和含有增加量的poloxamer-188的培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(在培養期的長度中從1.8 g/L增加至4.8 g/L的poloxamer-188)

(三角)；使用具有孔徑為500 μm 的鑽孔的噴霧器和含有增加量的poloxamer-188的培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(從1.8 g/L增加至3.8 g/L的poloxamer-188) (圓圈)的體積生產率隨時間的圖。

圖13是使用具有孔徑為20 μm 的燒結孔的噴霧器和含有增加量的poloxamer-188的培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(在培養期的長度中從1.8 g/L增加至5.8 g/L的poloxamer-188) (方形)；使用具有孔徑為200 μm 的鑽孔的噴霧器和含有增加量的poloxamer-188的培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(在培養期的長度中從1.8 g/L增加至4.8 g/L的poloxamer-188) (三角)；使用具有孔徑為500 μm 的鑽孔的噴霧器和含有增加量的poloxamer-188的培養基在培養期長度中進行的灌注細胞培養操作(從1.8 g/L增加至3.8 g/L的poloxamer-188) (圓圈)的有氧葡萄糖消耗隨時間的圖。

圖14是使用含有0%消泡劑-c對poloxamer-188比例(實心圓圈)、5.6 %消泡劑-c對poloxamer-188比例(空心圓圈)、11.1%消泡劑-c對poloxamer-188比例(實心方形)、27.8%消泡劑-c對poloxamer-188比例(空心方形)，或55.6%消泡劑-c對poloxamer-188比例(實心三角)的CD-CHO液體培養基進行的不同分批搖瓶細胞培養操作的活細胞密度隨時間的圖。

圖15是使用含有0%消泡劑-c對poloxamer-188比例(實心圓圈)、5.6 %消泡劑-c對poloxamer-188比例(空心圓圈)、11.1%消泡劑-c對poloxamer-188比例(實心方形)、27.8%消泡劑-c對poloxamer-188比例(空心方形)，或a 55.6%消泡劑-c對poloxamer-188比例(實心三角)的CD-CHO液體培養基進行的不同分批搖瓶細胞培養操作的比乳糖脫氫酶產生速率隨時間的圖。

【實施方式】

發明詳述

本文中提供的是培養哺乳動物細胞的方法，其包括：在足夠產生重組蛋白的條件下培養包含編碼所述重組蛋白的核酸的哺乳動物細胞，其中所述培養包括在包含濃度為1.8 g/L或濃度高於1.8 g/L的poloxamer-188的液體培養基中培養，且其中所述poloxamer-188在培養步驟前存在於所述培養基中和/或添加至所述培養基和/或在培養步驟過程中添加至所述培養基。還提供的是培養哺乳動物細胞的方法，其包括：提供培養系統，其包含容器、配置於所述容器內的液體培養

基和配置在所述容器內的噴霧器，所述噴霧器包含多個孔，所述孔經配置以將氣體通過所述噴霧器分配入所述液體培養基；和在所述培養系統中在足夠在該系統中產生重組蛋白的條件和氣體流速下培養包含編碼所述重組蛋白的核酸的哺乳動物細胞，其中所述培養基包含的poloxamer-188濃度基於選自下組的一個或多個因素選擇：孔徑、孔類型、氣體流速、培養基中的活細胞密度和涉及細胞應激的標記物。這些方法的例示性非限制性方面在下面描述。

在一些實施方案中，本案提供的方法能實現細胞培養物，其具有大於 20×10^6 細胞/mL，大於 25×10^6 細胞/mL，大於 30×10^6 細胞/mL，大於 35×10^6 細胞/mL，大於 40×10^6 細胞/mL，大於 45×10^6 細胞/mL，大於 50×10^6 細胞/mL，大於 55×10^6 細胞/mL，大於 60×10^6 細胞/mL，大於 65×10^6 細胞/mL，大於 70×10^6 細胞/mL，大於 75×10^6 細胞/mL，大於 80×10^6 細胞/mL，大於 85×10^6 細胞/mL，大於 90×10^6 細胞/mL，大於 95×10^6 細胞/mL，大於 100×10^6 細胞/mL，大於 105×10^6 細胞/mL，大於 110×10^6 細胞/mL，大於 115×10^6 細胞/mL，大於 120×10^6 細胞/mL，大於 125×10^6 細胞/mL，大於 130×10^6 細胞/mL，大於 135×10^6 細胞/mL，大於 140×10^6 細胞/mL，大於 145×10^6 細胞/mL，大於 150×10^6 細胞/mL，大於 155×10^6 細胞/mL，大於 160×10^6 細胞/mL，大於 165×10^6 細胞/mL，大於 170×10^6 細胞/mL，大於 175×10^6 細胞/mL，大於 180×10^6 細胞/mL，大於 185×10^6 細胞/mL，大於 190×10^6 細胞/mL，大於 195×10^6 細胞/mL，大於 200×10^6 細胞/mL，大於 205×10^6 細胞/mL，大於 210×10^6 細胞/mL，大於 215×10^6 細胞/mL，大於 220×10^6 細胞/mL，大於 225×10^6 細胞/mL，大於 230×10^6 細胞/mL，大於 235×10^6 細胞/mL，大於 240×10^6 細胞/mL，大於 245×10^6 細胞/mL，或大於 250×10^6 細胞/mL的活細胞密度。用於確定細胞培養物的活細胞密度的方法是本領域已知的。

在一些實施方案中，本案提供的方法提供細胞培養物，其在至少5天(例如，至少10天，至少15天，至少20天，至少25天，至少30天，至少35天，至少40天，至少45天，至少50天，至少55天，至少60天，至少65天，或至少70天)的培養期具有大於75% (例如，大於80%，大於85%，或大於90%)的百分數細胞存活率。

在一些實施方案中，本案提供的方法能實現培養，其在培養期過程中的任何時間開始的至少5天(例如，至少10天，至少15天，至少20天，至少25天，至少30天，至少35天，至少40天，至少45天，至少50天，至少55天，至少60天，至少65天，或至少70天)中具有至少1.5 g/L/d (例如，至少1.6 g/L/d，至少1.7 g/L/d，至少1.8

g/L/d，至少1.9 g/L/d，至少2.0 g/L/d，至少2.1 g/L/d，至少2.2 g/L/d，至少2.3 g/L/d，至少2.4 g/L/d，至少2.5 g/L/d，至少2.6 g/L/d，至少2.7 g/L/d，至少2.8 g/L/d，至少2.9 g/L/d，至少3.0 g/L/d，至少3.1 g/L/d，至少3.2 g/L/d，至少3.3 g/L/d，至少3.4 g/L/d，至少3.5 g/L/d，至少3.6 g/L/d，至少3.7 g/L/d，至少3.8 g/L/d，至少3.9 g/L/d，至少4.0 g/L/d，至少4.1 g/L/d，至少4.2 g/L/d，至少4.3 g/L/d，至少4.4 g/L/d，或至少4.5 g/L/d)的體積生產率 (VPR)。

在一些實施方案中，本案提供的方法得到重組蛋白的產生當收集時具有降低水平(例如，約或小於5%的降低，約或小於10%的降低，約或小於15%的降低，約或小於20%的降低，約或小於25%的降低，約或小於30%的降低，約或小於35%的降低，約或小於40%的降低，約或小於45%的降低，約或小於50%的降低，約或小於55%的降低，約或小於60%的降低，約或小於65%的降低，約或小於70%，約或小於75%的降低，約或小於80%的降低，約或小於80%的降低，約或小於85%的降低，或者約或小於90%的降低)的降解(相比於在不包括在包含1.8 g/L或更高的poloxamer-188的液體培養基中培養)的相似方法中產生的重組蛋白)。從細胞培養物收集的重組蛋白的降解的水平可檢測，例如，使用凝膠電泳和/或免疫印跡檢測。

在一些實施方案中，所述方法得到細胞培養物，其在培養期內的任何時間開始的至少約5 (例如，至少10，至少15，至少20，至少25，至少30，至少35，至少40，至少45，至少50，至少55，至少60，至少65，或至少70)連續天中具有小於60 nU/細胞/天 (例如，小於55 nU/細胞/天，小於50 nU/細胞/天，小於45 nU/細胞/天，小於40 nU/細胞/天，小於35 nU/細胞/天，小於30 nU/細胞/天，小於25 nU/細胞/天，或小於20 nU/細胞/天)的比乳酸脫氫酶生產。

在一些實施方案中，所述方法得到細胞在穩態(穩定期)中維持至少5天(例如，至少10天，至少15天，至少20天，至少25天，至少30天，至少35天，至少40天，至少45天，或至少50天)，例如，以約或大於 30×10^6 細胞/mL，約或大於 35×10^6 細胞/mL，約或大於 40×10^6 細胞/mL，約或大於 45×10^6 細胞/mL，約或大於 50×10^6 細胞/mL，約或大於 55×10^6 細胞/mL，約或大於 60×10^6 細胞/mL，約或大於 65×10^6 細胞/mL，約或大於 70×10^6 細胞/mL，約或大於 75×10^6 細胞/mL，約或大於 80×10^6 細胞/mL，約或大於 85×10^6 細胞/mL，約或大於 90×10^6 細胞/mL，約或大於 95×10^6 細胞/mL，約或大於 100×10^6 細胞/mL，約或大於 105×10^6 細胞

/mL，約或大於 110×10^6 細胞/mL，約或大於 115×10^6 細胞/mL，約或大於 120×10^6 細胞/mL，約或大於 125×10^6 細胞/mL，約或大於 130×10^6 細胞/mL，約或大於 135×10^6 細胞/mL，約或大於 140×10^6 細胞/mL，約或大於 145×10^6 細胞/mL，約或大於 150×10^6 細胞/mL，約或大於 155×10^6 細胞/mL，約或大於 160×10^6 細胞/mL，約或大於 165×10^6 細胞/mL，約或大於 170×10^6 細胞/mL，約或大於 175×10^6 細胞/mL，約或大於 180×10^6 細胞/mL，約或大於 185×10^6 細胞/mL，約或大於 190×10^6 細胞/mL，約或大於 195×10^6 細胞/mL，或者約或大於 200×10^6 細胞/mL的活細胞密度。

培養體積

所述任何方法中的培養步驟(例如，灌注培養步驟)可包括在允許細胞在培養中維持和增殖的條件下溫育具有20 L-約8,000 L (例如，約20 L-約7,000 L，約20 L-約6,000 L，約20 L-約5,000 L，約20 L-約4,000 L，約20 L-約3,000 L，約20 L-約2,500 L，約20 L-約2,000 L，約20 L-約1,500 L，約20 L-約1,000 L，約20 L-約500 L，約20 L-約200 L，約20 L-約100 L，約100 L-約8,000 L，約100 L-約7,000 L，約100 L-約6,000 L，約100 L-約5,000 L，約100 L-約4,000 L，約100 L-約3,000 L，約100 L-約2,000 L，約100 L-約1,500 L，約100 L-約1,000 L，約100 L-約800 L，約100 L-約700 L，約100 L-約600 L，約100 L-約500 L，約100 L-約400 L，約100 L-約300 L，約100 L-約200 L，約500 L-約8,000 L，約500 L-約7,000 L，約500 L-約6,000 L，約500 L-約5,000 L，約500 L-約4,000 L，約500 L-約3,000 L，約500 L-約2,000 L，約500 L-約1,500 L，約500 L-約1,000 L，約500 L-約750 L，約1,000 L-約8,000 L，約1,000 L-約7,000 L，約1,000 L-約6,000 L，約1,000 L-約5,000 L，約1,000 L-約4,000 L，約1,000 L-約3,000 L，約1,000 L-約2,000 L，約1,000 L-約1,500 L，約2,000 L-約8,000 L，約2,000 L-約7,000 L，約2,000 L-約6,000 L，約2,000 L-約5,000 L，約2,000 L-約4,000 L，約2,000 L-約3,000 L，約3,000 L-約8,000 L，約3,000 L-約7,000 L，約3,000 L-約6,000 L，約3,000 L-約5,000 L，約3,000 L-約4,000 L，約4,000 L-約8,000 L，約4,000 L-約7,000 L，約4,000 L-約6,000 L，約4,000 L-約5,000 L，約5,000 L-約8,000 L，約5,000 L-約7,000 L，約5,000 L-約6,000 L，約6,000 L-約8,000 L，約6,000 L-約7,000 L，或約7,000 L或約8,000 L)的體積的細胞培養物。

如本領域中已知的，細胞培養物的體積在培養期(例如，如下所述)過程中可

保持基本上相同或可隨時間增加。

培養期

本案所述任何方法中的培養(例如，灌注培養)可在約3天至約100天(例如，約3天-約95天，約3天-約90天，約3天-約85天，約3天-約80天，約3天-約75天，約3天-約70天，約3天-約65天，約3天-約60天，約3天-約55天，約3天-約50天，約3天-約45天，約3天-約40天，約3天-約35天，約3天-約30天，約3天-約25天，約3天-約20天，約3天-約15天，約3天-約10天，約5天-約100天，約5天-約95天，約5天-約90天，約5天-約85天，約5天-約80天，約5天-約75天，約5天-約70天，約5天-約65天，約5天-約60天，約5天-約55天，約5天-約50天，約5天-約45天，約5天-約40天，約5天-約35天，約5天-約30天，約5天-約25天，約5天-約20天，約5天-約15天，約5天-約10天，約10天-約100天，約10天-約95天，約10天-約90天，約10天-約85天，約10天-約80天，約10天-約75天，約10天-約70天，約10天-約65天，約10天-約60天，約10天-約55天，約10天-約50天，約10天-約45天，約10天-約40天，約10天-約35天，約10天-約30天，約10天-約25天，約10天-約20天，約10天-約15天，約15天-約100天，約15天-約95天，約15天-約90天，約15天-約85天，約15天-約80天，約15天-約75天，約15天-約70天，約15天-約65天，約15天-約60天，約15天-約55天，約15天-約50天，約15天-約45天，約15天-約40天，約15天-約35天，約15天-約30天，約15天-約25天，約15天-約20天，約20天-約100天，約20天-約95天，約20天-約90天，約20天-約85天，約20天-約80天，約20天-約75天，約20天-約70天，約20天-約65天，約20天-約60天，約20天-約55天，約20天-約50天，約20天-約45天，約20天-約40天，約20天-約35天，約20天-約30天，約20天-約25天，約25天-約100天，約25天-約95天，約25天-約90天，約25天-約85天，約25天-約80天，約25天-約75天，約25天-約70天，約25天-約65天，約25天-約60天，約25天-約55天，約25天-約50天，約25天-約45天，約25天-約40天，約25天-約35天，約25天-約30天，約30天-約100天，約30天-約90天，約30天-約80天，約30天-約70天，約30天-約60天，約30天-約50天，約30天-約40天，約40天-約100天，約40天-約90天，約40天-約80天，約40天-約70天，約40天-約60天，約40天-約50天，約50天-約100天，約50天-約90天，約50天-約80天，約50天-約70天，約50天-約60天，約60天-約100天，約60天-約90天，約60天-約80天，約60天-約70天，約70天-約100天，約70天-約90天，約70天-約80天，約80天-約100天，約80天-約90天，或約90天-約100天)的時間期中進行。

哺乳動物細胞

本案提供的方法中培養的(例如，灌注培養的)哺乳動物細胞可為在懸液中生長的細胞或粘附細胞。可在本案所述的任何方法中培養的哺乳動物細胞的非限制性實例包括：中國倉鼠卵巢(CHO)細胞(例如，CHO DG44細胞或CHO-K1s細胞)、Sp2.0、骨髓瘤細胞(例如，NS/O)、B-細胞、雜交瘤細胞、T-細胞、人胚胎腎(HEK)細胞(例如，HEK 293E和HEK 293F)、非洲綠猴腎上皮細胞(Vero)細胞、NSO細胞、幼倉鼠腎(BHK)細胞、PerC6細胞、Vero細胞、或HT-1080細胞和Madin-Darby Canine (Cocker Spaniel)腎上皮細胞(MDCK)細胞。在培養粘附細胞的一些實施例中，培養物還可包含多種微載體(例如，含有一個或多個孔的微載體)。可在本案所述的任何方法中培養的另外的哺乳動物細胞是本領域已知的。

所述哺乳動物細胞可含有編碼重組蛋白的重組核酸(例如，穩定整合在所述哺乳動物細胞的基因組中的核酸)。編碼例示性重組蛋白的重組核酸的非限制性實例在下面描述，作為可使用本案所述的方法產生的重組蛋白。在一些實例中，所述在生物反應器(例如，本案所述的任何生物反應器)中培養的哺乳動物細胞源自更大的培養(larger culture)。

可使用分子生物學和分子遺傳學中已知的多種方法將編碼重組蛋白的核酸導入哺乳動物細胞。非限制性實例包括轉染(例如，脂(質)轉染)、轉導(例如，慢病毒、腺病毒或反轉錄病毒感染)和電穿孔。在一些實例中，編碼重組蛋白的核酸未穩定地整合入哺乳動物細胞的染色體(瞬時轉染)，而在其他實例中將核酸整合。可替換地或此外，編碼重組蛋白的核酸可存在於質粒中和/或哺乳動物人工染色體(例如，人的人工染色體)中。可替換地或此外，可使用病毒載體(例如，慢病毒、反轉錄病毒或腺病毒載體)將核酸導入所述細胞。可將所述核酸可操作地連接於啟動子序列(例如，強啟動子，如 β -肌動蛋白啟動子和CMV啟動子，或誘導型啟動子)。如果需要，含有核酸的載體可亦含有選擇標記(例如，賦予哺乳動物細胞潮黴素(hygromycin)、嘌呤黴素(puromycin)或新黴素(neomycin)抗性的基因)。

在一些實例中，重組蛋白是分泌的蛋白並由哺乳動物細胞釋放入胞外培養基(例如，灌注培養中的第一和/或第二液體培養基或進料分批培養中的第一液體培養基和/或進料液體培養基)。例如，編碼可溶性重組蛋白的核酸序列可含有編碼在重組蛋白的N-或C-末端的分泌信號肽的序列，其由所述哺乳動物細胞中存

在的酶切割，並隨後釋放入胞外培養基(例如，第一和/或第二液體培養基)。

生物反應器

本案所述的任何方法中的培養步驟可使用生物反應器(例如，灌注生物反應器或進料分批生物反應器)進行。用於進行培養步驟的生物反應器(例如，灌注生物反應器或進料分批生物反應器)可具有約24 L至約25,000 L (例如，約24 L-約20,000 L，約24 L-約15,000 L，約24 L-約10,000 L，約24 L-約9,500 L，約24 L-約9,000 L，約24 L-約8,500 L，約24 L-約8,000 L，約24 L-約7,500 L，約24 L-約7,000 L，約24 L-約6,500 L，約24 L-約6,000 L，約24 L-約5,500 L，約24 L-約5,000 L，約24 L-約4,500 L，約24 L-約4,000 L，約24 L-約3,500 L，約24 L-約3,000 L，約24 L-約2,500 L，約24 L-約2,000 L，約24 L-約1,500 L，約24 L-約1,000 L，約24 L-約900 L，約24 L-約800 L，約24 L-約700 L，約24 L-約600 L，約24 L-約500 L，約24 L-約400 L，約24 L-約300 L，約24 L-約200 L，約24 L-約100 L，約100 L-約25,000 L，約100 L-約20,000 L，約100 L-約15,000，約100 L-約10,000 L，約100 L-約9,500 L，約100 L-約9,000 L，約100 L-約8,500 L，約100 L-約8,000 L，約100 L-約7,500 L，約100 L-約7,000 L，約100 L-約6,500 L，約100 L-約6,000 L，約100 L-約5,500 L，約100 L-約5,000 L，約100 L-約4,500 L，約100 L-約4,000 L，約100 L-約3,500 L，約100 L-約3,000 L，約100 L-約2,500 L，約100 L-約2,000 L，約100 L-約1,500 L，約100 L-約1,000 L，約100 L-約900 L，約100 L-約800 L，約100 L-約700 L，約100 L-約600 L，約100 L-約500 L，約100 L-約400 L，約100 L-約300 L，約100 L-約200 L，約200 L-約25,000 L，約200 L-約20,000 L，約200 L-約15,000 L，約200 L-約10,000 L，約200 L-約9,500 L，約200 L-約9,000 L，約200 L-約8,500 L，約200 L-約8,000 L，約200 L-約7,500 L，約200 L-約7,000 L，約200 L-約6,500 L，約200 L-約6,000 L，約200 L-約5,500 L，約200 L-約5,000 L，約200 L-約4,500 L，約200 L-約4,000 L，約200 L-約3,500 L，約200 L-約3,000 L，約200 L-約2,500 L，約200 L-約2,000 L，約200 L-約1,500 L，約200 L-約1,000 L，約200 L-約900 L，約200 L-約800 L，約200 L-約700 L，約200 L-約600 L，約200 L-約500 L，約200 L-約400 L，約200 L-約300 L，約500 L-約25,000 L，約500 L-約20,000 L，約500 L-約15,000 L，約500 L-約10,000 L，約500 L-約9,500 L，約500 L-約9,000 L，約500 L-約8,500 L，約500 L-約8,000 L，約500 L-約7,500 L，約500 L-約7,000 L，約500 L-約6,500 L，約500 L-約6,000 L，約500 L-約5,500 L，約500 L-約5,000 L，約500 L-約4,500 L，約500 L-約4,000 L，約500 L-約3,500 L，

約500 L-約3,000 L，約500 L-約2,500 L，約500 L-約2,000 L，約500 L-約1,500 L，
 約500 L-約1,000 L，約500 L-約900 L，約500 L-約800 L，約500 L-約700 L，約500 L-
 約600 L，約1,000 L-約25,000 L，約1,000 L-約20,000 L，約1,000 L-約15,000 L，約
 1,000 L-約10,000 L，約1,000 L-約9,500 L，約1,000 L-約9,000 L，約1,000 L-約8,500
 L，約1,000 L-約8,000 L，約1,000 L-約7,500 L，約1,000 L-約7,000 L，約1,000 L-
 約6,500 L，約1,000 L-約6,000 L，約1,000 L-約5,500 L，約1,000 L-約5,000 L，約1,000
 L-約4,500 L，約1,000 L-約4,000 L，約1,000 L-約3,500 L，約1,000 L-約3,000 L，約
 1,000 L-約2,500 L，約1,000 L-約2,000 L，約1,000 L-約1,500 L，約2,000 L-約25,000
 L，約2,000 L-約20,000 L，約2,000 L-約15,000 L，約2,000 L-約10,000 L，約2,000 L-
 約9,500 L，約2,000 L-約9,000 L，約2,000 L-約8,500 L，約2,000 L-約8,000 L，約2,000
 L-約7,500 L，約2,000 L-約7,000 L，約2,000 L-約6,500 L，約2,000 L-約6,000 L，約
 2,000 L-約5,500 L，約2,000 L-約5,000 L，約2,000 L-約4,500 L，約2,000 L-約4,000 L，
 約2,000 L-約3,500 L，約2,000 L-約3,000 L，約2,000 L-約2,500 L，約3,000 L-約25,000
 L，約3,000 L-約20,000 L，約3,000 L-約15,000 L，約3,000 L-約10,000 L，約3,000 L-
 約9,500 L，約3,000 L-約9,000 L，約3,000 L-約8,500 L，約3,000 L-約8,000 L，約3,000
 L-約7,500 L，約3,000 L-約7,000 L，約3,000 L-約6,500 L，約3,000 L-約6,000 L，約
 3,000 L-約5,500 L，約3,000 L-約5,000 L，約3,000 L-約4,500 L，約3,000 L-約4,000 L，
 約3,000 L-約3,500 L，約4,000 L-約9,000 L，約4,000 L-約25,000 L，約4,000 L-約
 20,000 L，約4,000 L-約15,000 L，約4,000 L-約10,000 L，約4,000 L-約9,500 L，約
 4,000 L-約9,000 L，約4,000 L-約8,500 L，約4,000 L-約8,000 L，約4,000 L-約7,500 L，
 約4,000 L-約7,000 L，約4,000 L-約6,500 L，約4,000 L-約6,000 L，約4,000 L-約5,500
 L，約4,000 L-約5,000 L，約4,000 L-約4,500 L，約5,000 L-約25,000 L，約5,000 L-
 約20,000 L，約5,000 L-約15,000 L，約5,000 L-約10,000 L，約5,000 L-約9,500 L，
 約5,000 L-約9,000 L，約5,000 L-約8,500 L，約5,000 L-約8,000 L，約5,000 L-約7,500
 L，約5,000 L-約7,000 L，約5,000 L-約6,500 L，約5,000 L-約6,000 L，約5,000 L-
 約5,500 L，約6,000 L-約25,000 L，約6,000 L-約20,000 L，約6,000 L-約15,000 L，
 約6,000 L-約10,000 L，約6,000 L-約9,500 L，約6,000 L-約9,000 L，約6,000 L-約8,500
 L，約6,000 L-約8,000 L，約6,000 L-約7,500 L，約6,000 L-約7,000 L，約6,000 L-
 約6,500 L，7,000 L-約25,000 L，約7,000 L-約20,000 L，約7,000 L-約15,000 L，約
 7,000 L-約10,000 L，約7,000 L-約9,500 L，約7,000 L-約9,000 L，約7,000 L-約8,500

培養系統

21

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

L-約5,500 L, 約6,000 L-約20,000 L, 約6,000 L-約10,000 L, 約6,000 L-約9,500 L, 約6,000 L-約9,000 L, 約6,000 L-約8,500 L, 約6,000 L-約8,000 L, 約6,000 L-約7,500 L, 約6,000 L-約7,000 L, 約6,000 L-約6,500 L, 約7,000 L-約20,000 L, 約7,000 L-約15,000 L, 約7,000 L-約10,000 L, 約7,000 L-約9,500 L, 約7,000 L-約9,000 L, 約7,000 L-約8,500 L, 約7,000 L-約8,000 L, 約7,000 L-約7,500 L, 約8,000 L-約20,000 L, 約8,000 L-約15,000 L, 約8,000 L-約10,000 L, 約8,000 L-約9,500 L, 約8,000 L-約9,000 L, 約8,000 L-約8,500 L, 約9,000 L-約20,000 L, 約9,000 L-約15,000 L, 約9,000 L-約10,000 L, 約9,000 L-約9,500 L, 約10,000 L-約20,000 L, 約10,000 L-約15,000 L, 或者約15,000 L-約20,000 L)的内部體積(容積)。容器可由金屬(例如, 不鏽鋼)、塑料、或玻璃, 或其任何組合制成。

在一些實施方案中, 噴霧器的一個或多個孔可具有約750 μm -約1.5 mm (例如, 約750 μm -約1.45 mm, 約750 μm -約1.4 mm, 約750 μm -約1.35 mm, 約750 μm -約1.3 mm, 約750 μm -約1.25 mm, 約750 μm -約1.2 mm, 約750 μm -約1.15 mm, 約750 μm -約1.1 mm, 約750 μm -約1.05 mm, 約750 μm -約1.0 mm, 約750 μm -約950 μm , 約750 μm -約900 μm , 約750 μm -約850 μm , 約750 μm -約800 μm , 約800 μm -約1.5 mm, 約800 μm -約1.45 mm, 約800 μm -約1.4 mm, 約800 μm -約1.35 mm, 約800 μm -約1.3 mm, 約800 μm -約1.25 mm, 約800 μm -約1.2 mm, 約800 μm -約1.15 mm, 約800 μm -約1.1 mm, 約800 μm -約1.05 mm, 約800 μm -約1.0 mm, 約800 μm -約950 μm , 約800 μm -約900 μm , 約800 μm -約850 μm , 約850 μm -約1.5 mm, 約850 μm -約1.45 mm, 約850 μm -約1.4 mm, 約850 μm -約1.35 mm, 約850 μm -約1.3 mm, 約850 μm -約1.25 mm, 約850 μm -約1.2 mm, 約850 μm -約1.15 mm, 約850 μm -約1.1 mm, 約850 μm -約1.05 mm, 約850 μm -約1.0 mm, 約850 μm -約950 μm , 約850 μm -約900 μm , 約900 μm -約1.5 mm, 約900 μm -約1.45 mm, 約900 μm -約1.4 mm, 約900 μm -約1.35 mm, 約900 μm -約1.3 mm, 約900 μm -約1.25 mm, 約900 μm -約1.2 mm, 約900 μm -約1.15 mm, 約900 μm -約1.1 mm, 約900 μm -約1.05 mm, 約900 μm -約1.0 mm, 約900 μm -約950 μm , 約950 μm -約1.5 mm, 約950 μm -約1.45 mm, 約950 μm -約1.4 mm, 約950 μm -約1.35 mm, 約950 μm -約1.3 mm, 約950 μm -約1.25 mm, 約950 μm -約1.2 mm, 約950 μm -約1.15 mm, 約950 μm -約1.1 mm, 約950 μm -約1.05 mm, 約950 μm -約1.0 mm, 約1.0 mm-約1.5 mm, 約1.0 mm-約1.45 mm, 約1.0 mm-約1.4 mm, 約1.0 mm-約1.35 mm, 約

1.0 mm-約1.3 mm，約1.0 mm-約1.25 mm，約1.0 mm-約1.2 mm，約1.0 mm-約1.15 mm，約1.0 mm-約1.1 mm，約1.0 mm-約1.05 mm，約1.05 mm-約1.5 mm，約1.05 mm-約1.45 mm，約1.05 mm-約1.4 mm，約1.05 mm-約1.35 mm，約1.05 mm-約1.3 mm，約1.05 mm-約1.25 mm，約1.05 mm-約1.2 mm，約1.05 mm-約1.15 mm，約1.05 mm-約1.1 mm，約1.1 mm-約1.5 mm，約1.1 mm-約1.45 mm，約1.1 mm-約1.4 mm，約1.1 mm-約1.35 mm，約1.1 mm-約1.3 mm，約1.1 mm-約1.25 mm，約1.1 mm-約1.2 mm，約1.1 mm-約1.15 mm，約1.15 mm-約1.5 mm，約1.15 mm-約1.45 mm，約1.15 mm-約1.4 mm，約1.15 mm-約1.35 mm，約1.15 mm-約1.3 mm，約1.15 mm-約1.25 mm，約1.15 mm-約1.2 mm，約1.2 mm-約1.5 mm，約1.2 mm-約1.45 mm，約1.2 mm-約1.4 mm，約1.2 mm-約1.35 mm，約1.2 mm-約1.3 mm，約1.2 mm-約1.25 mm，約1.25 mm-約1.5 mm，約1.25 mm-約1.45 mm，約1.25 mm-約1.4 mm，約1.25 mm-約1.35 mm，約1.25 mm-約1.3 mm，約1.3 mm-約1.5 mm，約1.3 mm-約1.45 mm，約1.3 mm-約1.4 mm，約1.3 mm-約1.35 mm，約1.35 mm-約1.5 mm，約1.35 mm-約1.45 mm，約1.35 mm-約1.4 mm，約1.4 mm-約1.5 mm，約1.4 mm-約1.45 mm，或約1.45 mm-約1.5 mm)的孔徑。

在一些實施方案中，噴霧器的一個或多個孔可具有約250 μm -約750 μm (例如，約250 μm -約700 μm ，約250 μm -約650 μm ，約250 μm -約600 μm ，約250 μm -約550 μm ，約250 μm -約500 μm ，約250 μm -約450 μm ，約250 μm -約400 μm ，約250 μm -約350 μm ，約250 μm -約300 μm ，約300 μm -約750 μm ，約300 μm -約650 μm ，約300 μm -約600 μm ，約300 μm -約550 μm ，約300 μm -約500 μm ，約300 μm -約450 μm ，約300 μm -約400 μm ，約300 μm -約350 μm ，約350 μm -約750 μm ，約350 μm -約700 μm ，約350 μm -約650 μm ，約350 μm -約600 μm ，約350 μm -約550 μm ，約350 μm -約500 μm ，約350 μm -約450 μm ，約350 μm -約400 μm ，約400 μm -約750 μm ，約400 μm -約700 μm ，約400 μm -約650 μm ，約400 μm -約600 μm ，約400 μm -約550 μm ，約400 μm -約500 μm ，約400 μm -約450 μm ，約450 μm -約750 μm ，約450 μm -約700 μm ，約450 μm -約650 μm ，約450 μm -約600 μm ，約450 μm -約550 μm ，約450 μm -約500 μm ，約500 μm -約750 μm ，約500 μm -約700 μm ，約500 μm -約650 μm ，約500 μm -約600 μm ，約500 μm -約550 μm ，約550 μm -約750 μm ，約550 μm -約700 μm ，約550 μm -約650 μm ，約550 μm -約600 μm ，約600 μm -約750 μm ，約600 μm -約700 μm ，約600 μm -約650 μm ，約650 μm -約750 μm ，約650 μm -約700 μm ，或

[illegible]

約40 μm-約170 μm, 約40 μm-約160 μm, 約40 μm-約150 μm, 約40 μm-約140 μm, 約40 μm-約130 μm, 約40 μm-約120 μm, 約40 μm-約110 μm, 約40 μm-約100 μm, 約40 μm-約90 μm, 約40 μm-約80 μm, 約40 μm-約70 μm, 約40 μm-約60 μm, 約40 μm-約50 μm, 約50 μm-約250 μm, 約50 μm-約240 μm, 約50 μm-約230 μm, 約50 μm-約220 μm, 約50 μm-約210 μm, 約50 μm-約200 μm, 約50 μm-約190 μm, 約50 μm-約180 μm, 約50 μm-約170 μm, 約50 μm-約160 μm, 約50 μm-約150 μm, 約50 μm-約140 μm, 約50 μm-約130 μm, 約50 μm-約120 μm, 約50 μm-約110 μm, 約50 μm-約100 μm, 約50 μm-約90 μm, 約50 μm-約80 μm, 約50 μm-約70 μm, 約50 μm-約60 μm, 約60 μm-約250 μm, 約60 μm-約240 μm, 約60 μm-約230 μm, 約60 μm-約220 μm, 約60 μm-約210 μm, 約60 μm-約200 μm, 約60 μm-約190 μm, 約60 μm-約180 μm, 約60 μm-約170 μm, 約60 μm-約160 μm, 約60 μm-約150 μm, 約60 μm-約140 μm, 約60 μm-約130 μm, 約60 μm-約120 μm, 約60 μm-約110 μm, 約60 μm-約100 μm, 約60 μm-約90 μm, 約60 μm-約80 μm, 約60 μm-約70 μm, 約70 μm-約250 μm, 約70 μm-約240 μm, 約70 μm-約230 μm, 約70 μm-約220 μm, 約70 μm-約210 μm, 約70 μm-約200 μm, 約70 μm-約190 μm, 約70 μm-約180 μm, 約70 μm-約170 μm, 約70 μm-約160 μm, 約70 μm-約150 μm, 約70 μm-約140 μm, 約70 μm-約130 μm, 約70 μm-約120 μm, 約70 μm-約110 μm, 約70 μm-約100 μm, 約70 μm-約90 μm, 約70 μm-約80 μm, 約80 μm-約250 μm, 約80 μm-約240 μm, 約80 μm-約230 μm, 約80 μm-約220 μm, 約80 μm-約210 μm, 約80 μm-約200 μm, 約80 μm-約190 μm, 約80 μm-約180 μm, 約80 μm-約170 μm, 約80 μm-約160 μm, 約80 μm-約150 μm, 約80 μm-約140 μm, 約80 μm-約130 μm, 約80 μm-約120 μm, 約80 μm-約110 μm, 約80 μm-約100 μm, 約80 μm-約90 μm, 約90 μm-約250 μm, 約90 μm-約240 μm, 約90 μm-約230 μm, 約90 μm-約220 μm, 約90 μm-約210 μm, 約90 μm-約200 μm, 約90 μm-約190 μm, 約90 μm-約180 μm, 約90 μm-約170 μm, 約90 μm-約160 μm, 約90 μm-約150 μm, 約90 μm-約140 μm, 約90 μm-約130 μm, 約90 μm-約120 μm, 約90 μm-約110 μm, 約90 μm-約100 μm, 約100 μm-約250 μm, 約100 μm-約240 μm, 約100 μm-約230 μm, 約100 μm-約220 μm, 約100 μm-約210 μm, 約100 μm-約200 μm, 約100 μm-約190 μm, 約100 μm-約180 μm, 約100 μm-約170 μm, 約100 μm-約160 μm, 約100 μm-約150 μm, 約100 μm-約140 μm, 約100 μm-約130 μm, 約100 μm-約120 μm, 約100 μm-約110 μm, 約100 μm-約100 μm, 約110 μm-約250 μm,

約110 μm-約240 μm, 約110 μm-約230 μm, 約110 μm-約220 μm, 約110 μm-約210 μm, 約110 μm-約200 μm, 約100 μm-約190 μm, 約100 μm-約180 μm, 約100 μm-約170 μm, 約100 μm-約160 μm, 約100 μm-約150 μm, 約100 μm-約140 μm, 約100 μm-約130 μm, 約100 μm-約120 μm, 約100 μm-約110 μm, 約110 μm-約250 μm, 約110 μm-約240 μm, 約110 μm-約230 μm, 約110 μm-約220 μm, 約110 μm-約210 μm, 約110 μm-約200 μm, 約110 μm-約190 μm, 約110 μm-約180 μm, 約110 μm-約170 μm, 約110 μm-約160 μm, 約110 μm-約150 μm, 約110 μm-約140 μm, 約110 μm-約130 μm, 約110 μm-約120 μm, 約120 μm-約250 μm, 約120 μm-約240 μm, 約120 μm-約230 μm, 約120 μm-約220 μm, 約120 μm-約210 μm, 約120 μm-約200 μm, 約120 μm-約190 μm, 約120 μm-約180 μm, 約120 μm-約170 μm, 約120 μm-約160 μm, 約120 μm-約150 μm, 約120 μm-約140 μm, 約120 μm-約130 μm, 約130 μm-約250 μm, 約130 μm-約240 μm, 約130 μm-約230 μm, 約130 μm-約220 μm, 約130 μm-約210 μm, 約130 μm-約200 μm, 約130 μm-約190 μm, 約130 μm-約180 μm, 約130 μm-約170 μm, 約130 μm-約160 μm, 約130 μm-約150 μm, 約130 μm-約140 μm, 約140 μm-約250 μm, 約140 μm-約240 μm, 約140 μm-約230 μm, 約140 μm-約220 μm, 約140 μm-約210 μm, 約140 μm-約200 μm, 約140 μm-約190 μm, 約140 μm-約180 μm, 約140 μm-約170 μm, 約140 μm-約160 μm, 約140 μm-約150 μm, 約150 μm-約250 μm, 約150 μm-約240 μm, 約150 μm-約230 μm, 約150 μm-約220 μm, 約150 μm-約210 μm, 約150 μm-約200 μm, 約150 μm-約190 μm, 約150 μm-約180 μm, 約150 μm-約170 μm, 約150 μm-約160 μm, 約160 μm-約250 μm, 約160 μm-約240 μm, 約160 μm-約230 μm, 約160 μm-約220 μm, 約160 μm-約210 μm, 約160 μm-約200 μm, 約160 μm-約190 μm, 約160 μm-約180 μm, 約160 μm-約170 μm, 約170 μm-約250 μm, 約170 μm-約240 μm, 約170 μm-約230 μm, 約170 μm-約220 μm, 約170 μm-約210 μm, 約170 μm-約200 μm, 約170 μm-約190 μm, 約170 μm-約180 μm, 約180 μm-約250 μm, 約180 μm-約240 μm, 約180 μm-約230 μm, 約180 μm-約220 μm, 約180 μm-約210 μm, 約180 μm-約200 μm, 約180 μm-約190 μm, 約190 μm-約250 μm, 約190 μm-約240 μm, 約190 μm-約230 μm, 約190 μm-約220 μm, 約190 μm-約210 μm, 約190 μm-約200 μm, 約200 μm-約250 μm, 約200 μm-約240 μm, 約200 μm-約230 μm, 約200 μm-約220 μm, 約200 μm-約210 μm, 約210 μm-約250 μm, 約210 μm-約240 μm, 約210 μm-約230 μm, 約210 μm-

約220 μm ，約220 μm -約250 μm ，約220 μm -約240 μm ，約220 μm -約230 μm ，約230 μm -約250 μm ，約230 μm -約240 μm ，或約240 μm -約250 μm)的孔徑。

噴霧器的一個或多個孔可具有例如，鑽孔或燒結孔的孔類型。所述培養系統可包括用於攪動配置在所述容器內的液體培養基的裝置(例如，葉輪(impellor)和旋轉所述葉輪的馬達)。所述容器可包括一個或多個端口(和任選的泵)，其允許添加材料(例如，液體培養基、poloxamer-188、堿或酸(根據需要調節pH)、和/或消泡劑)至配置於所述容器中的液體培養基和/或移出液體培養基(例如，澄清的液體培養基或細胞培養的樣品)。培養系統還可包括一個或多個傳感器，用於在培養期過程中監測液體培養基中的pH、 dO_2 、溫度和 dCO_2 。培養系統可包括過濾裝置(例如，進行交替切向過濾或切向流過濾的裝置)，其處理一定體積的細胞培養物以提供基本上無細胞的澄清的液體培養基。培養系統可包括加熱/冷卻裝置，其允許調節配置於所述容器中的液體培養基的溫度。細胞培養系統的另外的特征是本領域中已知的。

灌注培養

在本案所述的任何方法中，培養步驟可為灌注培養。如本領域中已知的，灌注培養包括從生物反應器移出第一體積的第一液體培養基，並向所述生物反應器添加第二體積的第二液體培養基，其中第一體積和第二體積是大約相等的。通過一些細胞保留裝置或通過一些技術如沉降錐中的細胞沉降將哺乳動物細胞保留在生物反應器中。

如本領域中已知的，灌注培養不同於進料分批培養，且灌注培養中使用的培養基和/或培養條件常常不同於進料分批培養中使用的那些。

灌注培養中培養基的移出和添加可同時或順序，或兩者的一些組合來進行。此外，移出和添加可連續地，如以移出並替代生物反應器體積的0.1%至800%，1%-700%，1%-600%，1%-500%，1%-400%，1%-350%，1%-300%，1%-250%，1%-100%，100%-200%，5%-150%，10%-50%，15%-40%，8%-80%，或4%-30%的體積的速率進行。

移出的第一體積的第一液體培養基和添加的第二體積的第二液體培養基在一些實例中可在各24-小時時間中被保持大約相同。如本領域中已知的，移出第一體積的第一液體培養基的速率(體積/時間單位)和添加第二體積的第二液體培養基的速率(體積/時間單位)可變化並取決於特定細胞培養系統的條件。移出第

一體積的第一液體培養基的速率(體積/時間單位)和添加第二體積的第二液體培養基的速率(體積/時間單位)可為大約相同或可不同。

可替換地，移出和添加的體積可通過在各24-小時時間中逐漸增加而變化。例如，各24-小時時間內移出的第一體積的第一液體培養基的體積和添加的第二體積的第二液體培養基的體積可在培養期中增加。所述體積可在培養期中從生物反應器體積的0.5%至約20%的體積增加。所述體積可在培養期中增加至生物反應器容積或培養期開始時細胞培養物體積的約25%至約150%。

在本案所述的方法的一些實例中，在培養期的首個48至96小時後，在(培養期內)各24-小時時間中，移出的第一體積的第一液體培養基和添加的第二體積的第二液體培養基為培養期開始時細胞培養物體積的約10%至約95%，約10%至約20%，約20%至約30%，約30%至約40%，約40%至約50%，約50%至約60%，約60%至約70%，約70%至約80%，約80%至約90%，約85%至約95%，約60%至約80%，或約70%。

熟練專業人員會理解的是，第一液體培養基和第二液體培養基可為相同類型的培養基。在其他實例中，第一液體培養基和第二液體培養基可不同。就一種或多種培養基組分而言，第二液體培養基可為更濃縮的。

可通過使用任何自動系統來移出第一體積的第一液體培養基。例如，可使用交替切向流過濾。可替換地，可通過使第一體積的第一液體培養基滲過或重力流過具有排除哺乳動物細胞的截留分子量的無菌膜來移出第一體積的第一液體培養基。可替換地，可通過使攪拌速率停止或顯著降低至少1分鐘，至少2分鐘，3分鐘，4分鐘，5分鐘，10分鐘，15分鐘，20分鐘，25分鐘，30分鐘，40分鐘，50分鐘，或1小時的時間，並從生物反應器的頂部移出或抽吸第一體積的第一液體培養基來移出第一體積的第一液體培養基。

可通過泵將第二體積的第二液體培養基添加至第一液體培養基。可人工地，如通過將第二體積的第二液體培養基直接移液或注射入第一液體培養基或以自動的方式來將第二液體培養基添加至第一液體培養基。

在本案所述的方法的一些實施方案中，包括(任選地提供含有配置於第一液體培養基中的哺乳動物細胞的容器和)攪拌溫育所述容器並在約32°C至約40°C的溫度進行至少約7天的培養期；和在培養期的首個48至96小時後連續地或周期地移出第一體積的第一液體培養基和向第一液體培養基添加第二體積的第二液

體培養基，其中第一和第二體積是大約相等的。在一些實施方案中，在培養期的約首個48至96小時後在各24-小時時間中，移出的第一體積的第一液體培養基和添加的第二體積的第二液體培養基為第一液體培養基體積或所述容器體積的約0.3x至約10x。

灌注培養的一些實例包括攪拌溫育含有第一液體培養基的培養系統並在約32°C至約40°C的溫度進行至少約7天的培養期；和在培養期的首個48至96小時後連續地或周期地移出第一體積的第一液體培養基和向第一液體培養基添加第二體積的第二液體培養基。

進料分批培養

本案所述的方法中培養步驟可包括進料分批培養。如本領域中已知的，進料分批培養包括增量的或連續的將進料液體培養基添加至初始細胞培養物，而不大量地或顯著地從所述細胞培養物中移出第一液體培養基。在一些實例中，進料液體培養基與第一液體培養基相同。進料培養基可為液體形式(進料液體培養基)或幹粉。在其他實例中，進料液體培養基是第一液體培養基的濃縮形式和/或作為幹粉添加。

可在培養期過程中的特定時間點或多個時間點將進料液體培養基添加至初始細胞培養物。例如，可在培養期開始後其為6小時-7天，約6小時-約6天，約6小時-約5天，約6小時-約4天，約6小時-約3天，約6小時-約2天，約6小時-約1天，約12小時-約7天，約12小時-約6天，約12小時-約5天，約12小時-約4天，約12小時-約3天，約12小時-約2天，約1天-約7天，約1天-約6天，約1天-約5天，約1天-約4天，約1天-約3天，約1天-約2天，約2天-約7天，約2天-約6天，約2天-約5天，約2天-約4天，約2天-約3天，約3天-約7天，約3天-約6天，約3天-約5天，約3天-約4天，約4天-約7天，約4天-約6天，約4天-約5天，約5天-約7天，或者約5天-約6天的時間點將進料液體培養基添加至初始細胞培養物。

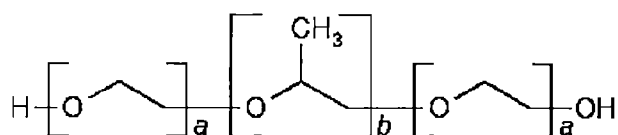
在培養基過程中，可將進料液體培養基連續地添加至初始細胞培養物，或可周期地(例如，每天)添加至初始細胞培養物。在一些實例中，將進料液體培養基周期地添加至初始細胞培養物時，可添加進料液體培養基一次、兩次、三次、四次或五次。添加至初始細胞培養物的進料液體培養基的體積或進料固體培養基的量在培養期過程中可變化(例如，增加)。在培養期過程中在任何24小時時間中添加至初始細胞培養物的進料液體培養基的體積可為生物反應器的容積的一些部

分。在培養期過程中在任何24小時時間中添加至初始細胞培養物的進料液體培養基的體積可為含有培養物的生物反應器容積的0.01X-約0.3X (例如, 約0.01X-約0.28X, 約0.01X-約0.26X, 約0.01X-約0.24X, 約0.01X-約0.22X, 約0.01X-約0.20X, 約0.01X-約0.18X, 約0.01X-約0.16X, 約0.01X-約0.14X, 約0.01X-約0.12X, 約0.01X-約0.10X, 約0.01X-約0.08X, 約0.01X-約0.06X, 約0.01X-約0.04X, 約0.025X-約0.3X, 約0.025X-約0.28X, 約0.025X-約0.26X, 約0.025X-約0.24X, 約0.025X-約0.22X, 約0.025X-約0.20X, 約0.025X-約0.18X, 約0.025X-約0.16X, 約0.025X-約0.14X, 約0.025X-約0.12X, 約0.025X-約0.10X, 約0.025X-約0.08X, 約0.025X-約0.06X, 約0.025X-約0.04X, 約0.05X-約0.3X, 約0.05X-約0.28X, 約0.05X-約0.26X, 約0.05X-約0.24X, 約0.05X-約0.22X, 約0.05X-約0.20X, 約0.05X-約0.18X, 約0.05X-約0.16X, 約0.05X-約0.14X, 約0.05X-約0.12X, 約0.05X-約0.10X, 約0.1X-約0.3X, 約0.1X-約0.28X, 約0.1X-約0.26X, 約0.1X-約0.24X, 約0.1X-約0.22X, 約0.1X-約0.20X, 約0.1X-約0.18X, 約0.1X-約0.16X, 約0.1X-約0.14X, 約0.1X, 約0.15X-約0.3X, 約0.15X-約0.2X, 約0.2X-約0.3X, 或約0.25X-約0.3X)。

在其他實施方案中, 在培養期中在任何24小時時間中添加至初始細胞培養物的進料液體培養基的體積可為培養期開始時細胞培養物體積的0.02X-約1.0X (例如, 約0.02X-約0.9X, 約0.02X-約0.8X, 約0.02X-約0.7X, 約0.02X-約0.6X, 約0.02X-約0.5X, 約0.02X-約0.4X, 約0.02X-約0.3X, 約0.02X-約0.2X, 約0.02X-約0.1X, 約0.05X-約1.0X, 約0.05X-約0.8X, 約0.05X-約0.7X, 約0.05X-約0.6X, 約0.05X-約0.5X, 約0.05X-約0.4X, 約0.05X-約0.3X, 約0.05X-約0.2X, 約0.05X-約0.1X, 約0.1X-約1.0X, 約0.1X-約0.9X, 約0.1X-約0.8X, 約0.1X-約0.7X, 約0.1X-約0.6X, 約0.1X-約0.5X, 約0.1X-約0.4X, 約0.1X-約0.3X, 約0.1X-約0.2X, 約0.2X-約1.0X, 約0.2X-約0.9X, 約0.2X-約0.8X, 約0.2X-約0.7X, 約0.2X-約0.6X, 約0.2X-約0.5X, 或約0.2X-約0.4X)。

Poloxamer-188

Poloxamer-188是本領域中已知的分子。Poloxamer-188是非離子合成的環氧乙烷(ethylene oxide)和環氧丙烷(propylene oxide)的嵌段共聚物。Poloxamer-188具有約7680至約9510的平均分子量, 且按重量計-約81.8% ± 1.9%的其組成由氧乙烯(oxyethylene)代表。例如, poloxamer-188具有下式I中所示的結構, 其中a為80和b為27。Poloxamer-188具有9003-11-6的CAS編號。



(式I)

Poloxamer-188在商業上可從多個不同的銷售商得到，所述銷售商包括，例如，Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)、Mediatech, Inc. (Manassas, VA)、MAST Therapeutics, Inc. (San Diego, CA)、EMD Millipore (Billerica, MA)、BASF (Ludwigshafen, Germany)、Pluronic® F-68 Life Technologies (Carlsbad, CA)和PhytoTechnology Laboratories, LLC (Shawnee Mission, KS)。

本案提供的方法包括在液體培養基中培養哺乳動物細胞(例如，包含編碼重組蛋白的核酸的哺乳動物細胞)，所述液體培養基包含濃度為約1.8 g/L或濃度高於1.8 g/L (例如，濃度為約1.9 g/L或濃度高於1.9 g/L，濃度為約2.0 g/L或濃度高於2.0 g/L，濃度為約2.1 g/L或濃度高於2.1 g/L，濃度為約2.2 g/L或濃度高於2.2 g/L，濃度為約2.3 g/L或濃度高於2.3 g/L，濃度為約2.4 g/L或濃度高於2.4 g/L，濃度為約2.5 g/L或濃度高於2.5 g/L，濃度為約2.6 g/L或濃度高於2.6 g/L，濃度為約2.7 g/L或濃度高於2.7 g/L，濃度為約2.8 g/L或濃度高於2.8 g/L，濃度為約2.9 g/L或濃度高於2.9 g/L，濃度為約3.0 g/L或濃度高於3.0 g/L，濃度為約3.1 g/L或濃度高於3.1 g/L，濃度為約3.2 g/L或濃度高於3.2 g/L，濃度為約3.3 g/L或濃度高於3.3 g/L，濃度為約3.4 g/L或濃度高於3.4 g/L，濃度為約3.5 g/L或濃度高於3.5 g/L，濃度為約3.6 g/L或濃度高於3.6 g/L，濃度為約3.7 g/L或濃度高於3.7 g/L，濃度為約3.8 g/L或濃度高於3.8 g/L，濃度為約3.9 g/L或濃度高於3.9 g/L，濃度為約4.0 g/L或濃度高於4.0 g/L，濃度為約4.1 g/L或濃度高於4.1 g/L，濃度為約4.2 g/L或濃度高於4.2 g/L，濃度為約4.3 g/L或濃度高於4.3 g/L，濃度為約4.4 g/L或濃度高於4.4 g/L，濃度為約4.5 g/L或濃度高於4.5 g/L，濃度為約4.6 g/L或濃度高於4.6 g/L，濃度為約4.7 g/L或濃度高於4.7 g/L，濃度為約4.8 g/L或濃度高於4.8 g/L，濃度為約4.9 g/L或濃度高於4.9 g/L，濃度為約5.0 g/L或濃度高於5.0 g/L，濃度為約5.1 g/L或濃度高於5.1 g/L，濃度為約5.2 g/L或濃度高於5.2 g/L，濃度為約5.3 g/L或濃度高於5.3 g/L，濃度為約5.4 g/L或濃度高於5.4 g/L，濃度為約5.5 g/L或濃度高於5.5 g/L，濃度為約5.6 g/L或濃度高於5.6 g/L，濃度為約5.7 g/L或濃度高於5.7 g/L，濃度為約5.8 g/L或濃度高於5.8 g/L，濃度為約5.9 g/L或濃度高

於5.9 g/L，濃度為約6.0 g/L或濃度高於6.0 g/L，濃度為約6.1 g/L或濃度高於6.1 g/L，濃度為約6.2 g/L或濃度高於6.2 g/L，濃度為約6.3 g/L或濃度高於6.3 g/L，濃度為約6.4 g/L或濃度高於6.4 g/L，濃度為約6.5 g/L或濃度高於6.5 g/L，濃度為約6.6 g/L或濃度高於6.6 g/L，濃度為約6.7 g/L或濃度高於6.7 g/L，濃度為約6.8 g/L或濃度高於6.8 g/L，濃度為約6.9 g/L或濃度高於6.9 g/L，濃度為約7.0 g/L或濃度高於7.0 g/L，濃度為約7.1 g/L或濃度高於7.1 g/L，濃度為約7.2 g/L或濃度高於7.2 g/L，濃度為約7.3 g/L或濃度高於7.3 g/L，濃度為約7.4 g/L或濃度高於7.4 g/L，濃度為約7.5 g/L或濃度高於7.5 g/L，濃度為約7.6 g/L或濃度高於7.6 g/L，濃度為約7.7 g/L或濃度高於7.7 g/L，濃度為約7.8 g/L或濃度高於7.8 g/L，濃度為約7.9 g/L或濃度高於7.9 g/L，濃度為約8.0 g/L或濃度高於8.0 g/L，濃度為約8.1 g/L或濃度高於8.1 g/L，濃度為約8.2 g/L或濃度高於8.2 g/L，濃度為約8.3 g/L或濃度高於8.3 g/L，濃度為約8.4 g/L或濃度高於8.4 g/L，濃度為約8.5 g/L或濃度高於8.5 g/L，濃度為約8.6 g/L或濃度高於8.6 g/L，濃度為約8.7 g/L或濃度高於8.7 g/L，濃度為約8.8 g/L或濃度高於8.8 g/L，濃度為約8.9 g/L或濃度高於8.9 g/L，濃度為約9.0 g/L或濃度高於9.0 g/L，濃度為約9.1 g/L或濃度高於9.1 g/L，濃度為約9.2 g/L或濃度高於9.2 g/L，濃度為約9.3 g/L或濃度高於9.3 g/L，濃度為約9.4 g/L或濃度高於9.4 g/L，濃度為約9.5 g/L或濃度高於9.5 g/L，濃度為約9.6 g/L或濃度高於9.6 g/L，濃度為約9.7 g/L或濃度高於9.7 g/L，濃度為約9.8 g/L或濃度高於9.8 g/L，濃度為約9.9 g/L或濃度高於9.9 g/L，濃度為約10.0 g/L或濃度高於10.0 g/L，濃度為約10.1 g/L或濃度高於10.1 g/L，濃度為約10.2 g/L或濃度高於10.2 g/L，濃度為約10.3 g/L或濃度高於10.3 g/L，濃度為約10.4 g/L或濃度高於10.4 g/L，濃度為約10.5 g/L或濃度高於10.5 g/L，濃度為約10.6 g/L或濃度高於10.6 g/L，濃度為約10.7 g/L或濃度高於10.7 g/L，濃度為約10.8 g/L或濃度高於10.8 g/L，濃度為約10.9 g/L或濃度高於10.9 g/L，濃度為約11.0 g/L或濃度高於11.0 g/L，濃度為約11.1 g/L或濃度高於11.1 g/L，濃度為約11.2 g/L或濃度高於11.2 g/L，濃度為約11.3 g/L或濃度高於11.3 g/L，濃度為約11.4 g/L或濃度高於11.4 g/L，濃度為約11.5 g/L或濃度高於11.5 g/L，濃度為約11.6 g/L或濃度高於11.6 g/L，濃度為約11.7 g/L或濃度高於11.7 g/L，濃度為約11.8 g/L或濃度高於11.8 g/L，濃度為約11.9 g/L或濃度高於11.9 g/L，濃度為約12.0 g/L或濃度高於12.0 g/L，濃度為約12.1 g/L或濃度高於12.1 g/L，濃度為約12.2 g/L或濃度高於12.2 g/L，濃度為約12.3 g/L或濃度高

於12.3 g/L，濃度為約12.4 g/L或濃度高於12.4 g/L，濃度為約12.5 g/L或濃度高於12.5 g/L，濃度為約12.6 g/L或濃度高於12.6 g/L，濃度為約12.7 g/L或濃度高於12.7 g/L，濃度為約12.8 g/L或濃度高於12.8 g/L，濃度為約12.9 g/L或濃度高於12.9 g/L，濃度為約13.0 g/L或濃度高於13.0 g/L，濃度為約13.1 g/L或濃度高於13.1 g/L，濃度為約13.2 g/L或濃度高於13.2 g/L，濃度為約13.3 g/L或濃度高於13.3 g/L，濃度為約13.4 g/L或濃度高於13.4 g/L，濃度為約13.5 g/L或濃度高於13.5 g/L，濃度為約13.6 g/L或濃度高於13.6 g/L，濃度為約13.7 g/L或濃度高於13.7 g/L，濃度為約13.8 g/L或濃度高於13.8 g/L，濃度為約13.9 g/L或濃度高於13.9 g/L，濃度為約14.0 g/L或濃度高於14.0 g/L，濃度為約14.1 g/L或濃度高於14.1 g/L，濃度為約14.2 g/L或濃度高於14.2 g/L，濃度為約14.3 g/L或濃度高於14.3 g/L，濃度為約14.4 g/L或濃度高於14.4 g/L，濃度為約14.5 g/L或濃度高於14.5 g/L，濃度為約14.6 g/L或濃度高於14.6 g/L，濃度為約14.7 g/L或濃度高於14.7 g/L，濃度為約14.8 g/L或濃度高於14.8 g/L，濃度為約14.9 g/L或濃度高於14.9 g/L，或濃度為約15.0 g/L或濃度高於15.0 g/L)的poloxamer-188。

在一些實施方案中，本案提供的方法包括在液體培養基中培養哺乳動物細胞(例如，包含編碼重組蛋白的核酸的哺乳動物細胞)，所述液體培養基包含濃度為約1.8 g/L-約16.0 g/L(例如，約1.8 g/L-約15.8 g/L，約1.8 g/L-約15.6 g/L，約1.8 g/L-約15.4 g/L，約1.8 g/L-約15.2 g/L，約1.8 g/L-約15.0 g/L，約1.8 g/L-約14.8 g/L，約1.8 g/L-約14.6 g/L，約1.8 g/L-約14.4 g/L，約1.8 g/L-約14.2 g/L，約1.8 g/L-約14.0 g/L，約1.8 g/L-約13.8 g/L，約1.8 g/L-約13.6 g/L，約1.8 g/L-約13.4 g/L，約1.8 g/L-約13.2 g/L，約1.8 g/L-約13.0 g/L，約1.8 g/L-約12.8 g/L，約1.8 g/L-約12.6 g/L，約1.8 g/L-約12.4 g/L，約1.8 g/L-約12.2 g/L，約1.8 g/L-約12.0 g/L，約1.8 g/L-約11.8 g/L，約1.8 g/L-約11.6 g/L，約1.8 g/L-約11.4 g/L，約1.8 g/L-約11.2 g/L，約1.8 g/L-約11.0 g/L，約1.8 g/L-約10.8 g/L，約1.8 g/L-約10.6 g/L，約1.8 g/L-約10.4 g/L，約1.8 g/L-約10.2 g/L，約1.8 g/L-約10.0 g/L，約1.8 g/L-約9.8 g/L，約1.8 g/L-約9.6 g/L，約1.8 g/L-約9.4 g/L，約1.8 g/L-約9.2 g/L，約1.8 g/L-約9.0 g/L，約1.8 g/L-約8.8 g/L，約1.8 g/L-約8.6 g/L，約1.8 g/L-約8.4 g/L，約1.8 g/L-約8.2 g/L，約1.8 g/L-約8.0 g/L，約1.8 g/L-約7.8 g/L，約1.8 g/L-約7.6 g/L，約1.8 g/L-約7.4 g/L，約1.8 g/L-約7.2 g/L，約1.8 g/L-約7.0 g/L，約1.8 g/L-約6.8 g/L，約1.8 g/L-約6.6 g/L，約1.8 g/L-約6.4 g/L，約1.8 g/L-約6.2 g/L，約1.8 g/L-約6.0 g/L，約1.8 g/L-約5.8 g/L，

約1.8 g/L-約5.6 g/L, 約1.8 g/L-約5.4 g/L, 約1.8 g/L-約5.2 g/L, 約1.8 g/L-約5.0 g/L, 約1.8 g/L-約4.8 g/L, 約1.8 g/L-約4.6 g/L, 約1.8 g/L-約4.4 g/L, 約1.8 g/L-約4.2 g/L, 約1.8 g/L-約4.0 g/L, 約1.8 g/L-約3.8 g/L, 約1.8 g/L-約3.6 g/L, 約1.8 g/L-約3.4 g/L, 約1.8 g/L-約3.2 g/L, 約1.8 g/L-約3.0 g/L, 約1.8 g/L-約2.8 g/L, 約2.0 g/L-約16.0 g/L, 約2.0 g/L-約15.8 g/L, 約2.0 g/L-約15.6 g/L, 約2.0 g/L-約15.4 g/L, 約2.0 g/L-約15.2 g/L, 約2.0 g/L-約15.0 g/L, 約2.0 g/L-約14.8 g/L, 約2.0 g/L-約14.6 g/L, 約2.0 g/L-約14.4 g/L, 約2.0 g/L-約14.2 g/L, 約2.0 g/L-約14.0 g/L, 約2.0 g/L-約13.8 g/L, 約2.0 g/L-約13.6 g/L, 約2.0 g/L-約13.4 g/L, 約2.0 g/L-約13.2 g/L, 約2.0 g/L-約13.0 g/L, 約2.0 g/L-約12.8 g/L, 約2.0 g/L-約12.6 g/L, 約2.0 g/L-約12.4 g/L, 約2.0 g/L-約12.2 g/L, 約2.0 g/L-約12.0 g/L, 約2.0 g/L-約11.8 g/L, 約2.0 g/L-約11.6 g/L, 約2.0 g/L-約11.4 g/L, 約2.0 g/L-約11.2 g/L, 約2.0 g/L-約11.0 g/L, 約2.0 g/L-約10.8 g/L, 約2.0 g/L-約10.6 g/L, 約2.0 g/L-約10.4 g/L, 約2.0 g/L-約10.2 g/L, 約2.0 g/L-約10.0 g/L, 約2.0 g/L-約9.8 g/L, 約2.0 g/L-約9.6 g/L, 約2.0 g/L-約9.4 g/L, 約2.0 g/L-約9.2 g/L, 約2.0 g/L-約9.0 g/L, 約2.0 g/L-約8.8 g/L, 約2.0 g/L-約8.6 g/L, 約2.0 g/L-約8.4 g/L, 約2.0 g/L-約8.2 g/L, 約2.0 g/L-約8.0 g/L, 約2.0 g/L-約7.8 g/L, 約2.0 g/L-約7.6 g/L, 約2.0 g/L-約7.4 g/L, 約2.0 g/L-約7.2 g/L, 約2.0 g/L-約7.0 g/L, 約2.0 g/L-約6.8 g/L, 約2.0 g/L-約6.6 g/L, 約2.0 g/L-約6.4 g/L, 約2.0 g/L-約6.2 g/L, 約2.0 g/L-約6.0 g/L, 約2.0 g/L-約5.8 g/L, 約2.0 g/L-約5.6 g/L, 約2.0 g/L-約5.4 g/L, 約2.0 g/L-約5.2 g/L, 約2.0 g/L-約5.0 g/L, 約2.0 g/L-約4.8 g/L, 約2.0 g/L-約4.6 g/L, 約2.0 g/L-約4.4 g/L, 約2.0 g/L-約4.2 g/L, 約2.0 g/L-約4.0 g/L, 約2.0 g/L-約3.8 g/L, 約2.0 g/L-約3.6 g/L, 約2.0 g/L-約3.4 g/L, 約2.0 g/L-約3.2 g/L, 約2.0 g/L-約3.0 g/L, 約2.2 g/L-約16.0 g/L, 約2.2 g/L-約15.8 g/L, 約2.2 g/L-約15.6 g/L, 約2.2 g/L-約15.4 g/L, 約2.2 g/L-約15.2 g/L, 約2.2 g/L-約15.0 g/L, 約2.2 g/L-約14.8 g/L, 約2.2 g/L-約14.6 g/L, 約2.2 g/L-約14.4 g/L, 約2.2 g/L-約14.2 g/L, 約2.2 g/L-約14.0 g/L, 約2.2 g/L-約13.8 g/L, 約2.2 g/L-約13.6 g/L, 約2.2 g/L-約13.4 g/L, 約2.2 g/L-約13.2 g/L, 約2.2 g/L-約13.0 g/L, 約2.2 g/L-約12.8 g/L, 約2.2 g/L-約12.6 g/L, 約2.2 g/L-約12.4 g/L, 約2.2 g/L-約12.2 g/L, 約2.2 g/L-約12.0 g/L, 約2.2 g/L-約11.8 g/L, 約2.2 g/L-約11.6 g/L, 約2.2 g/L-約11.4 g/L, 約2.2 g/L-約11.2 g/L, 約2.2 g/L-約11.0 g/L, 約2.2 g/L-約10.8 g/L, 約2.2 g/L-約10.6 g/L, 約2.2 g/L-約10.4 g/L, 約2.2 g/L-約10.2 g/L, 約2.2 g/L-約10.0 g/L, 約2.2 g/L-約9.8

g/L, 約2.2 g/L-約9.6 g/L, 約2.2 g/L-約9.4 g/L, 約2.2 g/L-約9.2 g/L, 約2.2 g/L-約9.0 g/L, 約2.2 g/L-約8.8 g/L, 約2.2 g/L-約8.6 g/L, 約2.2 g/L-約8.4 g/L, 約2.2 g/L-約8.2 g/L, 約2.2 g/L-約8.0 g/L, 約2.2 g/L-約7.8 g/L, 約2.2 g/L-約7.6 g/L, 約2.2 g/L-約7.4 g/L, 約2.2 g/L-約7.2 g/L, 約2.2 g/L-約7.0 g/L, 約2.2 g/L-約6.9 g/L, 約2.2 g/L-約6.8 g/L, 約2.2 g/L-約6.6 g/L, 約2.2 g/L-約6.4 g/L, 約2.2 g/L-約6.2 g/L, 約2.2 g/L-約6.0 g/L, 約2.2 g/L-約5.8 g/L, 約2.2 g/L-約5.6 g/L, 約2.2 g/L-約5.4 g/L, 約2.2 g/L-約5.2 g/L, 約2.2 g/L-約5.0 g/L, 約2.2 g/L-約4.8 g/L, 約2.2 g/L-約4.6 g/L, 約2.2 g/L-約4.4 g/L, 約2.2 g/L-約4.2 g/L, 約2.2 g/L-約4.0 g/L, 約2.2 g/L-約3.8 g/L, 約2.2 g/L-約3.6 g/L, 約2.2 g/L-約3.4 g/L, 約2.2 g/L-約3.2 g/L, 約2.4 g/L-約16.0 g/L, 約2.4 g/L-約15.8 g/L, 約2.4 g/L-約15.6 g/L, 約2.4 g/L-約15.4 g/L, 約2.4 g/L-約15.2 g/L, 約2.4 g/L-約15.0 g/L, 約2.4 g/L-約14.8 g/L, 約2.4 g/L-約14.6 g/L, 約2.4 g/L-約14.4 g/L, 約2.4 g/L-約14.2 g/L, 約2.4 g/L-約14.0 g/L, 約2.4 g/L-約13.8 g/L, 約2.4 g/L-約13.6 g/L, 約2.4 g/L-約13.4 g/L, 約2.4 g/L-約13.2 g/L, 約2.4 g/L-約13.0 g/L, 約2.4 g/L-約12.8 g/L, 約2.4 g/L-約12.6 g/L, 約2.4 g/L-約12.4 g/L, 約2.4 g/L-約12.2 g/L, 約2.4 g/L-約12.0 g/L, 約2.4 g/L-約11.8 g/L, 約2.4 g/L-約11.6 g/L, 約2.4 g/L-約11.4 g/L, 約2.4 g/L-約11.2 g/L, 約2.4 g/L-約11.0 g/L, 約2.4 g/L-約10.8 g/L, 約2.4 g/L-約10.6 g/L, 約2.4 g/L-約10.4 g/L, 約2.4 g/L-約10.2 g/L, 約2.4 g/L-約10.0 g/L, 約2.4 g/L-約9.8 g/L, 約2.4 g/L-約9.6 g/L, 約2.4 g/L-約9.4 g/L, 約2.4 g/L-約9.2 g/L, 約2.4 g/L-約9.0 g/L, 約2.4 g/L-約8.8 g/L, 約2.4 g/L-約8.6 g/L, 約2.4 g/L-約8.4 g/L, 約2.4 g/L-約8.2 g/L, 約2.4 g/L-約8.0 g/L, 約2.4 g/L-約7.8 g/L, 約2.4 g/L-約7.6 g/L, 約2.4 g/L-約7.4 g/L, 約2.4 g/L-約7.2 g/L, 約2.4 g/L-約7.0 g/L, 約2.4 g/L-約6.9 g/L, 約2.4 g/L-約6.8 g/L, 約2.4 g/L-約6.6 g/L, 約2.4 g/L-約6.4 g/L, 約2.4 g/L-約6.2 g/L, 約2.4 g/L-約6.0 g/L, 約2.4 g/L-約5.8 g/L, 約2.4 g/L-約5.6 g/L, 約2.4 g/L-約5.4 g/L, 約2.4 g/L-約5.2 g/L, 約2.4 g/L-約5.0 g/L, 約2.4 g/L-約4.8 g/L, 約2.4 g/L-約4.6 g/L, 約2.4 g/L-約4.4 g/L, 約2.4 g/L-約4.2 g/L, 約2.4 g/L-約4.0 g/L, 約2.4 g/L-約3.8 g/L, 約2.4 g/L-約3.6 g/L, 約2.4 g/L-約3.4 g/L, 約2.6 g/L-約16.0 g/L, 約2.6 g/L-約15.8 g/L, 約2.6 g/L-約15.6 g/L, 約2.6 g/L-約15.4 g/L, 約2.6 g/L-約15.2 g/L, 約2.6 g/L-約15.0 g/L, 約2.6 g/L-約14.8 g/L, 約2.6 g/L-約14.6 g/L, 約2.6 g/L-約14.4 g/L, 約2.6 g/L-約14.2 g/L, 約2.6 g/L-約14.0 g/L, 約2.6 g/L-約13.8 g/L, 約2.6 g/L-約13.6 g/L, 約2.6 g/L-約13.4 g/L, 約2.6 g/L-

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

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

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

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

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

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

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

•

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

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

• •

約7.6 g/L-約14.4 g/L，約7.6 g/L-約14.2 g/L，約7.6 g/L-約14.0 g/L，約7.6 g/L-約13.8 g/L，約7.6 g/L-約13.6 g/L，約7.6 g/L-約13.4 g/L，約7.6 g/L-約13.2 g/L，約7.6 g/L-約13.0 g/L，約7.6 g/L-約12.8 g/L，約7.6 g/L-約12.6 g/L，約7.6 g/L-約12.4 g/L，約7.6 g/L-約12.2 g/L，約7.6 g/L-約12.0 g/L，約7.6 g/L-約11.8 g/L，約7.6 g/L-約11.6 g/L，約7.6 g/L-約11.4 g/L，約7.6 g/L-約11.2 g/L，約7.6 g/L-約11.0 g/L，約7.6 g/L-約10.8 g/L，約7.6 g/L-約10.6 g/L，約7.6 g/L-約10.4 g/L，約7.6 g/L-約10.2 g/L，約7.6 g/L-約10.0 g/L，約7.6 g/L-約9.8 g/L，約7.6 g/L-約9.6 g/L，約7.6 g/L-約9.4 g/L，約7.6 g/L-約9.2 g/L，約7.6 g/L-約9.0 g/L，約7.6 g/L-約8.8 g/L，約7.6 g/L-約8.6 g/L，約7.8 g/L-約16.0 g/L，約7.8 g/L-約15.8 g/L，約7.8 g/L-約15.6 g/L，約7.8 g/L-約15.4 g/L，約7.8 g/L-約15.2 g/L，約7.8 g/L-約15.0 g/L，約7.8 g/L-約14.8 g/L，約7.8 g/L-約14.6 g/L，約7.8 g/L-約14.4 g/L，約7.8 g/L-約14.2 g/L，約7.8 g/L-約14.0 g/L，約7.8 g/L-約13.8 g/L，約7.8 g/L-約13.6 g/L，約7.8 g/L-約13.4 g/L，約7.8 g/L-約13.2 g/L，約7.8 g/L-約13.0 g/L，約7.8 g/L-約12.8 g/L，約7.8 g/L-約12.6 g/L，約7.8 g/L-約12.4 g/L，約7.8 g/L-約12.2 g/L，約7.8 g/L-約12.0 g/L，約7.8 g/L-約11.8 g/L，約7.8 g/L-約11.6 g/L，約7.8 g/L-約11.4 g/L，約7.8 g/L-約11.2 g/L，約7.8 g/L-約11.0 g/L，約7.8 g/L-約10.8 g/L，約7.8 g/L-約10.6 g/L，約7.8 g/L-約10.4 g/L，約7.8 g/L-約10.2 g/L，約7.8 g/L-約10.0 g/L，約7.8 g/L-約9.8 g/L，約7.8 g/L-約9.6 g/L，約7.8 g/L-約9.4 g/L，約7.8 g/L-約9.2 g/L，約7.8 g/L-約9.0 g/L，約7.8 g/L-約8.8 g/L，約8.0 g/L-約16.0 g/L，約8.0 g/L-約15.8 g/L，約8.0 g/L-約15.6 g/L，約8.0 g/L-約15.4 g/L，約8.0 g/L-約15.2 g/L，約8.0 g/L-約15.0 g/L，約8.0 g/L-約14.8 g/L，約8.0 g/L-約14.6 g/L，約8.0 g/L-約14.4 g/L，約8.0 g/L-約14.2 g/L，約8.0 g/L-約14.0 g/L，約8.0 g/L-約13.8 g/L，約8.0 g/L-約13.6 g/L，約8.0 g/L-約13.4 g/L，約8.0 g/L-約13.2 g/L，約8.0 g/L-約13.0 g/L，約8.0 g/L-約12.8 g/L，約8.0 g/L-約12.6 g/L，約8.0 g/L-約12.4 g/L，約8.0 g/L-約12.2 g/L，約8.0 g/L-約12.0 g/L，約8.0 g/L-約11.8 g/L，約8.0 g/L-約11.6 g/L，約8.0 g/L-約11.4 g/L，約8.0 g/L-約11.2 g/L，約8.0 g/L-約11.0 g/L，約8.0 g/L-約10.8 g/L，約8.0 g/L-約10.6 g/L，約8.0 g/L-約10.4 g/L，約8.0 g/L-約10.2 g/L，約8.0 g/L-約10.0 g/L，約8.0 g/L-約9.8 g/L，約8.0 g/L-約9.6 g/L，約8.0 g/L-約9.4 g/L，約8.0 g/L-約9.2 g/L，約8.0 g/L-約9.0 g/L，約8.5 g/L-約16.0 g/L，約8.5 g/L-約15.5 g/L，約8.5 g/L-約15.0 g/L，約8.5 g/L-約14.5 g/L，約8.5 g/L-約14.0 g/L，約8.5 g/L-約13.5 g/L，約8.5 g/L-約13.0

g/L, 約8.5 g/L-約12.5 g/L, 約8.5 g/L-約12.0 g/L, 約8.5 g/L-約11.5 g/L, 約8.5 g/L-約11.0 g/L, 約8.5 g/L-約10.5 g/L, 約8.5 g/L-約10.0 g/L, 約8.5 g/L-約9.5 g/L, 約9.0 g/L-約16.0 g/L, 約9.0 g/L-約15.5 g/L, 約9.0 g/L-約15.0 g/L, 約9.0 g/L-約14.5 g/L, 約9.0 g/L-約14.0 g/L, 約9.0 g/L-約13.5 g/L, 約9.0 g/L-約13.0 g/L, 約9.0 g/L-約12.5 g/L, 約9.0 g/L-約12.0 g/L, 約9.0 g/L-約11.5 g/L, 約9.0 g/L-約11.0 g/L, 約9.0 g/L-約10.5 g/L, 約9.0 g/L-約10.0 g/L, 約9.5 g/L-約16.0 g/L, 約9.5 g/L-約15.5 g/L, 約9.5 g/L-約15.0 g/L, 約9.5 g/L-約14.5 g/L, 約9.5 g/L-約14.0 g/L, 約9.5 g/L-約13.5 g/L, 約9.5 g/L-約13.0 g/L, 約9.5 g/L-約12.5 g/L, 約9.5 g/L-約12.0 g/L, 約9.5 g/L-約11.5 g/L, 約9.5 g/L-約11.0 g/L, 約9.5 g/L-約10.5 g/L, 約10.0 g/L-約16.0 g/L, 約10.0 g/L-約15.5 g/L, 約10.0 g/L-約15.0 g/L, 約10.0 g/L-約14.5 g/L, 約10.0 g/L-約14.0 g/L, 約10.0 g/L-約13.5 g/L, 約10.0 g/L-約13.0 g/L, 約10.0 g/L-約12.5 g/L, 約10.0 g/L-約12.0 g/L, 約10.0 g/L-約11.5 g/L, 約10.0 g/L-約11.0 g/L, 約10.5 g/L-約16.0 g/L, 約10.5 g/L-約15.5 g/L, 約10.5 g/L-約15.0 g/L, 約10.5 g/L-約14.5 g/L, 約10.5 g/L-約14.0 g/L, 約10.5 g/L-約13.5 g/L, 約10.5 g/L-約13.0 g/L, 約10.5 g/L-約12.5 g/L, 約10.5 g/L-約12.0 g/L, 約10.5 g/L-約11.5 g/L, 約11.0 g/L-約16.0 g/L, 約11.0 g/L-約15.5 g/L, 約11.0 g/L-約15.0 g/L, 約11.0 g/L-約14.5 g/L, 約11.0 g/L-約14.0 g/L, 約11.0 g/L-約13.5 g/L, 約11.0 g/L-約13.0 g/L, 約11.0 g/L-約12.5 g/L, 約11.0 g/L-約12.0 g/L, 約11.5 g/L-約16.0 g/L, 約11.5 g/L-約15.5 g/L, 約11.5 g/L-約15.0 g/L, 約11.5 g/L-約14.5 g/L, 約11.5 g/L-約14.0 g/L, 約11.5 g/L-約13.5 g/L, 約11.5 g/L-約13.0 g/L, 約11.5 g/L-約12.5 g/L, 約12.0 g/L-約16.0 g/L, 約12.0 g/L-約15.5 g/L, 約12.0 g/L-約15.0 g/L, 約12.0 g/L-約14.5 g/L, 約12.0 g/L-約14.0 g/L, 約12.0 g/L-約13.5 g/L, 約12.0 g/L-約13.0 g/L, 約12.5 g/L-約16.0 g/L, 約12.5 g/L-約15.5 g/L, 約12.5 g/L-約15.0 g/L, 約12.5 g/L-約14.5 g/L, 約12.5 g/L-約14.0 g/L, 約12.5 g/L-約13.5 g/L, 約13.0 g/L-約16.0 g/L, 約13.0 g/L-約15.5 g/L, 約13.0 g/L-約15.0 g/L, 約13.0 g/L-約14.5 g/L, 約13.0 g/L-約14.0 g/L, 約13.5 g/L-約16.0 g/L, 約13.5 g/L-約15.5 g/L, 約13.5 g/L-約15.0 g/L, 約13.5 g/L-約14.5 g/L, 約14.0 g/L-約16.0 g/L, 約14.0 g/L-約15.5 g/L, 約14.0 g/L-約15.0 g/L, 約14.5 g/L-約16.0 g/L, 約14.5 g/L-約15.5 g/L, 或約15.0 g/L-約16.0 g/L)的poloxamer-188。

在一些實施方案中, 在培養步驟前使poloxamer-188存在於培養基中和/或將poloxamer-188添加至所述培養基和/或在培養步驟過程中將poloxamer-188添加

至所述培養基。例如，本案提供的方法可進一步包括在培養步驟前和/或在培養步驟過程中添加poloxamer-188以在所述培養基中提供1.8 g/L或更高的濃度(例如，本案所述的任何例示的poloxamer-188濃度或poloxamer-188的範圍)。在一些實例中，將另外的poloxamer-188添加至包含一些poloxamer-188的液體培養基以提供1.8 g/L或更高poloxamer-188的濃度(例如，本案所述的任何例示的poloxamer-188濃度或poloxamer-188的範圍)。例如，在培養步驟前和/或在培養步驟過程中可將poloxamer-188添加至第一液體培養基、第二液體培養基、和/或進料液體培養基。

在一些實例中，在培養步驟過程中將poloxamer-188以一個或多個(例如，兩個、三個、四個或五個)等分試樣添加至培養基。可以連續的方式將poloxamer-188添加至培養基。在一些實例中，第一液體培養基可含有poloxamer-188，並且在培養期過程中將另外的poloxamer-188添加至培養基。在一些實施方案中，poloxamer-188存在於培養基中。

當培養步驟包括灌注培養時，第二液體培養基可以高於第一液體培養基中的濃度包含poloxamer-188。例如，第一液體培養基可包含濃度為1.8 g/L或濃度小於1.8 g/L的poloxamer-188，而第二液體培養基包含濃度高於1.8 g/L的poloxamer-188 (例如，本案所述的任何poloxamer-188的濃度或範圍，例如，濃度高於1.9 g/L，濃度高於2.0 g/L，濃度高於2.1 g/L，濃度高於2.2 g/L，濃度高於2.3 g/L，濃度高於2.4 g/L，濃度高於2.5 g/L，濃度高於2.6 g/L，濃度高於2.7 g/L，濃度高於2.8 g/L，濃度高於2.9 g/L，濃度高於3.0 g/L，濃度高於3.1 g/L，濃度高於3.2 g/L，濃度高於3.3 g/L，濃度高於3.4 g/L，濃度高於3.5 g/L，濃度高於3.6 g/L，濃度高於3.7 g/L，濃度高於3.8 g/L，濃度高於3.9 g/L，濃度高於4.0 g/L，濃度高於4.1 g/L，濃度高於4.2 g/L，濃度高於4.3 g/L，濃度高於4.4 g/L，濃度高於4.5 g/L，濃度高於4.6 g/L，濃度高於4.7 g/L，濃度高於4.8 g/L，濃度高於4.9 g/L，濃度高於5.0 g/L，濃度高於5.1 g/L，濃度高於5.2 g/L，濃度高於5.3 g/L，濃度高於5.4 g/L，濃度高於5.5 g/L，濃度高於5.6 g/L，濃度高於5.7 g/L，濃度高於5.8 g/L，濃度高於5.9 g/L，濃度高於6.0 g/L，濃度高於6.1 g/L，濃度高於6.2 g/L，濃度高於6.3 g/L，濃度高於6.4 g/L，濃度高於6.5 g/L，濃度高於6.6 g/L，濃度高於6.7 g/L，濃度高於6.8 g/L，濃度高於6.9 g/L，濃度高於7.0 g/L，濃度高於7.1 g/L，濃度高於7.2 g/L，濃度高於7.3 g/L，濃度高於7.4 g/L，濃度高於7.5 g/L，濃度高於7.6 g/L，濃度高於7.7 g/L，濃度高於7.8 g/L，濃度高於7.9 g/L，濃度高於8.0 g/L，濃度高於8.1 g/L，

濃度高於8.2 g/L，濃度高於8.3 g/L，濃度高於8.4 g/L，濃度高於8.5 g/L，濃度高於8.6 g/L，濃度高於8.7 g/L，濃度高於8.8 g/L，濃度高於8.9 g/L，濃度高於9.0 g/L，濃度高於9.1 g/L，濃度高於9.2 g/L，濃度高於9.3 g/L，濃度高於9.4 g/L，濃度高於9.5 g/L，濃度高於9.6 g/L，濃度高於9.7 g/L，濃度高於9.8 g/L，濃度高於9.9 g/L，濃度高於10.0 g/L，濃度高於10.1 g/L，濃度高於10.2 g/L，濃度高於10.3 g/L，濃度高於10.4 g/L，濃度高於10.5 g/L，濃度高於10.6 g/L，濃度高於10.7 g/L，濃度高於10.8 g/L，濃度高於10.9 g/L，濃度高於11.0 g/L，濃度高於11.1 g/L，濃度高於11.2 g/L，濃度高於11.3 g/L，濃度高於11.4 g/L，濃度高於11.5 g/L，濃度高於11.6 g/L，濃度高於11.7 g/L，濃度高於11.8 g/L，濃度高於11.9 g/L，濃度高於12.0 g/L，濃度高於12.1 g/L，濃度高於12.2 g/L，濃度高於12.3 g/L，濃度高於12.4 g/L，濃度高於12.5 g/L，濃度高於12.6 g/L，濃度高於12.7 g/L，濃度高於12.8 g/L，濃度高於12.9 g/L，濃度高於13.0 g/L，濃度高於13.1 g/L，濃度高於13.2 g/L，濃度高於13.3 g/L，濃度高於13.4 g/L，濃度高於13.5 g/L，濃度高於13.6 g/L，濃度高於13.7 g/L，濃度高於13.8 g/L，濃度高於13.9 g/L，濃度高於14.0 g/L，濃度高於14.1 g/L，濃度高於14.2 g/L，濃度高於14.3 g/L，濃度高於14.4 g/L，濃度高於14.5 g/L，濃度高於14.6 g/L，濃度高於14.7 g/L，濃度高於14.8 g/L，濃度高於14.9 g/L，濃度高於15.0 g/L，濃度高於15.1 g/L，濃度高於15.2 g/L，濃度高於15.3 g/L，濃度高於15.4 g/L，濃度高於15.5 g/L，濃度高於15.6 g/L，濃度高於15.7 g/L，濃度高於15.8 g/L，濃度高於15.9 g/L，或濃度高於16.0 g/L poloxamer-188)。

當培養步驟包括進料分批培養時，進料液體培養基可以高於第一液體培養基中的濃度包含poloxamer-188。例如，第一液體培養基可包括濃度為1.8 g/L或濃度小於1.8 g/L的poloxamer-188，而進料液體培養基包含濃度高於1.8 g/L (例如，濃度高於2.0 g/L，濃度高於2.5 g/L，濃度高於3.0 g/L，濃度高於3.5 g/L，濃度高於4.0 g/L，濃度高於4.5 g/L，濃度高於5.0 g/L，濃度高於5.5 g/L，濃度高於6.0 g/L，濃度高於6.5 g/L，濃度高於7.0 g/L，濃度高於7.5 g/L，濃度高於8.0 g/L，濃度高於8.5 g/L，濃度高於9.0 g/L，濃度高於9.5 g/L，濃度高於10 g/L，濃度高於10.5 g/L，濃度高於11.0 g/L，濃度高於11.5 g/L，濃度高於12.0 g/L，濃度高於12.5 g/L，濃度高於13.0 g/L，濃度高於13.5 g/L，濃度高於14.0 g/L，濃度高於14.5 g/L，濃度高於15.0 g/L，濃度高於15.5 g/L，濃度高於16.0 g/L，濃度高於16.5 g/L，濃度高於17.0 g/L，濃度高於17.5 g/L，濃度高於18.0 g/L，濃度高於18.5 g/L，濃度高於

19.0 g/L，濃度高於19.5 g/L，濃度高於20.0 g/L，濃度高於20.5 g/L，濃度高於21.0 g/L，濃度高於21.5 g/L，濃度高於22.0 g/L，濃度高於22.5 g/L，濃度高於23.0 g/L，濃度高於23.5 g/L，濃度高於24.0 g/L，濃度高於24.5 g/L，濃度高於25.0 g/L，濃度高於25.5 g/L，濃度高於26.0 g/L，濃度高於26.5 g/L，濃度高於27.0 g/L，濃度高於28.0 g/L，濃度高於28.5 g/L，濃度高於29.0 g/L，濃度高於29.5 g/L，濃度高於30.0 g/L，濃度高於30.5 g/L，濃度高於31.0 g/L，濃度高於31.5 g/L，濃度高於32.0 g/L，濃度高於32.5 g/L，濃度高於33.0 g/L，濃度高於33.5 g/L，濃度高於34.0 g/L，濃度高於34.5 g/L，濃度高於35.0 g/L，濃度高於35.5 g/L，濃度高於36.0 g/L，濃度高於36.5 g/L，濃度高於37.0 g/L，濃度高於37.5 g/L，濃度高於38.0 g/L，濃度高於38.5 g/L，濃度高於39.0 g/L，濃度高於39.5 g/L或濃度高於40.0 g/L)的 poloxamer-188。

本案提供的任何方法的一些實施方案包括隨時間增加培養物中的 poloxamer-188濃度。在一些實施方案中，培養基包含poloxamer-188濃度，其基於選自下組的一個或多個因素選擇：孔徑、孔類型、氣體流速、培養基中的活細胞密度和涉及細胞應激的標記物。在這些方法中，培養基中選擇的 poloxamer-188濃度可通過如下實現：在培養步驟之前將poloxamer-188添加至所述培養基和/或在培養步驟過程中將poloxamer-188添加至所述培養基。選擇的 poloxamer-188濃度可為本案所述的任何例示的poloxamer-188的濃度或範圍。

基於一個或多個因素選擇Poloxamer-188的濃度

本案所述方法的一些實施方案包括在包含poloxamer-188濃度的液體培養基中培養哺乳動物細胞，所述poloxamer-188濃度基於選自下組的一個或多個因素選擇：孔徑、孔類型、氣體流速、培養基中的活細胞密度和涉及細胞應激的標記物。

孔類型的不同實例是本領域中已知的。孔類型的非限制性實例是燒結孔和鑽孔。

適於細胞培養的多種氣體流速是本領域中已知的。通常，較高的氣體流速指示應選擇(相比於使用較低氣體流速的培養步驟)更高的poloxamer-188濃度，而較低的氣體流速指示應選擇(相比於使用較高氣體流速的培養步驟)更低的 poloxamer-188濃度。

多種非限制性活細胞密度在本案描述。通常，較高的活細胞密度指示應選

擇(相比於包含較低活細胞密度的培養基)更高的poloxamer-188濃度，而較低的活細胞密度指示應選擇(相比於包含較高活細胞密度的培養基)更低的poloxamer-188濃度。

由細胞在生理應激下釋放的例示性細胞應激的標記物包括蛋白酶(例如，活化的半胱天冬酶(caspase))、乳酸脫氫酶、基因組DNA (例如，核小體DNA)、細胞色素c、和活化的PARP。在受生理應激下的細胞中產生或具有升高水平的涉及細胞應激的標記物的非限制性實例包括活化的半胱天冬酶、細胞色素c、活化的PARP、和外部化磷脂醯絲氨酸(externalized phosphatidylserine)。任何這些細胞應激的標記物中的一種或多種(例如，兩種、三種、四種、五種、六種或七種)相比於對照值的水平升高指示應選擇更高的poloxamer-188濃度。一種或多種細胞應激的標記物的水平相比於對照值與對照值大約相同或低於對照值指示應選擇更低的poloxamer-188濃度。在本案所述的任何實例中，對照水平可為不經曆凋亡或不在會觸發壞死的條件下培養的對照細胞中的水平。檢測一種或多種細胞應激的標記物的水平的方法是本領域已知的。商業上可得到的套盒可用於測量所述一種或多種細胞應激的標記物。

在本案所述的任何實施方案中，選擇的poloxamer-188濃度是通過如下實現的：在培養步驟之前將poloxamer-188添加至所述培養基和/或在培養步驟過程中將poloxamer-188添加至所述培養基。在一些實施方案中，所述方法包括當孔類型為鑽孔且孔徑為約750 μm -約1.5 mm (例如，約750 μm 至約1.45 mm，約750 μm -約1.40 mm，約750 μm -約1.35 mm，約750 μm -約1.30 mm，約750 μm -約1.25 mm，約750 μm -約1.20 mm，約750 μm -約1.15 mm，約750 μm -約1.10 mm，約750 μm -約1.05 mm，約750 μm -約1.00 mm，約750 μm -約950 μm ，約750 μm -約900 μm ，約750 μm -約850 μm ，約750 μm -約800 μm ，約800 μm -約1.5 mm，約800 μm -約1.45 mm，約800 μm -約1.40 mm，約800 μm -約1.35 mm，約800 μm -約1.30 mm，約800 μm -約1.25 mm，約800 μm -約1.20 mm，約800 μm -約1.15 mm，約800 μm -約1.10 mm，約800 μm -約1.05 mm，約800 μm -約1.00 mm，約800 μm -約950 μm ，約800 μm -約900 μm ，約800 μm -約850 μm ，約850 μm -約1.5 mm，約850 μm -約1.45 mm，約850 μm -約1.40 mm，約850 μm -約1.35 mm，約850 μm -約1.30 mm，約850 μm -約1.25 mm，約850 μm -約1.20 mm，約850 μm -約1.15 mm，約850 μm -約1.10 mm，約850 μm -約1.05 mm，約850 μm -約1.00 mm，約850 μm -約950 μm ，約850 μm -

約900 μm ，約900 μm -約1.5 mm，約900 μm -約1.45 mm，約900 μm -約1.40 mm，
 約900 μm -約1.35 mm，約900 μm -約1.30 mm，約900 μm -約1.25 mm，約900 μm -
 約1.20 mm，約900 μm -約1.15 mm，約900 μm -約1.10 mm，約900 μm -約1.05 mm，
 約900 μm -約1.00 mm，約900 μm -約950 μm ，約950 μm -約1.5 mm，約950 μm -約
 1.45 mm，約950 μm -約1.40 mm，約950 μm -約1.35 mm，約950 μm -約1.30 mm，
 約950 μm -約1.25 mm，約950 μm -約1.20 mm，約950 μm -約1.15 mm，約950 μm -
 約1.10 mm，約950 μm -約1.05 mm，約950 μm -約1.00 mm，約1.0 mm-約1.5 mm，
 約1.0 mm-約1.45 mm，約1.0 mm-約1.40 mm，約1.0 mm-約1.35 mm，約1.0 mm-
 約1.30 mm，約1.0 mm-約1.25 mm，約1.0 mm-約1.20 mm，約1.0 mm-約1.15 mm，
 約1.0 mm-約1.10 mm，約1.0 mm-約1.05 mm，約1.05 mm-約1.5 mm，約1.05 mm-
 約1.45 mm，約1.05 mm-約1.40 mm，約1.05 mm-約1.35 mm，約1.05 mm-約1.30 mm，
 約1.05 mm-約1.25 mm，約1.05 mm-約1.20 mm，約1.05 mm-約1.15 mm，約1.05
 mm-約1.10 mm，約1.10 mm-約1.5 mm，約1.10 mm-約1.45 mm，約1.10 mm-約1.40
 mm，約1.10 mm-約1.35 mm，約1.10 mm-約1.30 mm，約1.10 mm-約1.25 mm，約
 1.10 mm-約1.20 mm，約1.10 mm-約1.15 mm，約1.15 mm-約1.5 mm，約1.15 mm-
 約1.45 mm，約1.15 mm-約1.40 mm，約1.15 mm-約1.35 mm，約1.15 mm-約1.30 mm，
 約1.15 mm-約1.25 mm，約1.15 mm-約1.20 mm，約1.20 mm-約1.5 mm，約1.20 mm-
 約1.45 mm，約1.20 mm-約1.40 mm，約1.20 mm-約1.35 mm，約1.20 mm-約1.30 mm，
 約1.20 mm-約1.25 mm，約1.25 mm-約1.5 mm，約1.25 mm-約1.45 mm，約1.25 mm-
 約1.40 mm，約1.25 mm-約1.35 mm，約1.25 mm-約1.30 mm，約1.30 mm-約1.5 mm，
 約1.30 mm-約1.45 mm，約1.30 mm-約1.40 mm，約1.30 mm-約1.35 mm，約1.35
 mm-約1.5 mm，約1.35 mm-約1.45 mm，約1.35 mm-約1.40 mm，約1.40 mm-約1.5
 mm，約1.40 mm-約1.45 mm，或約1.45 mm-約1.50)時，基於孔類型和孔徑選擇
 約2.3 g/L-約3.3 g/L (例如，約2.3 g/L-約3.2 g/L，約2.3 g/L-約3.1 g/L，約2.3 g/L-
 約3.0 g/L，約2.3 g/L-約2.9 g/L，約2.3 g/L-約2.8 g/L，約2.3 g/L-約2.7 g/L，約2.3
 g/L-約2.6 g/L，約2.3 g/L-約2.5 g/L，約2.4 g/L-約3.3 g/L，約2.4 g/L-約3.2 g/L，
 約2.4 g/L-約3.1 g/L，約2.4 g/L-約3.0 g/L，約2.4 g/L-約2.9 g/L，約2.4 g/L-約2.8 g/L，
 約2.4 g/L-約2.7 g/L，約2.4 g/L-約2.6 g/L，約2.5 g/L-約3.3 g/L，約2.5 g/L-約3.2 g/L，
 約2.5 g/L-約3.1 g/L，約2.5 g/L-約3.0 g/L，約2.5 g/L-約2.9 g/L，約2.5 g/L-約2.8 g/L，
 約2.5 g/L-約2.7 g/L，約2.6 g/L-約3.3 g/L，約2.6 g/L-約3.2 g/L，約2.6 g/L-約3.1 g/L，

約2.6 g/L-約3.0 g/L，約2.6 g/L-約2.9 g/L，約2.6 g/L-約2.8 g/L，約2.7 g/L-約3.3 g/L，約2.7 g/L-約3.2 g/L，約2.7 g/L-約3.1 g/L，約2.7 g/L-約3.0 g/L，約2.7 g/L-約2.9 g/L，約2.8 g/L-約3.3 g/L，約2.8 g/L-約3.2 g/L，約2.8 g/L-約3.1 g/L，約2.8 g/L-約3.0 g/L，約2.9 g/L-約3.3 g/L，約2.9 g/L-約3.2 g/L，約2.9 g/L-約3.1 g/L，約3.0 g/L-約3.3 g/L，約3.0 g/L-約3.2 g/L，或約3.1 g/L-約3.3 g/L)的poloxamer-188濃度，。

在一些實施方案中，所述方法包括當孔類型是鑽孔且孔徑為約250 μm -約750 μm (例如，約250 μm -約700 μm ，約250 μm -約650 μm ，約250 μm -約600 μm ，約250 μm -約550 μm ，約250 μm -約500 μm ，約250 μm -約450 μm ，約250 μm -約400 μm ，約250 μm -約350 μm ，約250 μm -約300 μm ，約300 μm -約750 μm ，約300 μm -約700 μm ，約300 μm -約650 μm ，約300 μm -約600 μm ，約300 μm -約550 μm ，約300 μm -約500 μm ，約300 μm -約450 μm ，約300 μm -約400 μm ，約300 μm -約350 μm ，約350 μm -約750 μm ，約350 μm -約700 μm ，約350 μm -約650 μm ，約350 μm -約600 μm ，約350 μm -約550 μm ，約350 μm -約500 μm ，約350 μm -約450 μm ，約350 μm -約400 μm ，約400 μm -約750 μm ，約400 μm -約700 μm ，約400 μm -約650 μm ，約400 μm -約600 μm ，約400 μm -約550 μm ，約400 μm -約500 μm ，約400 μm -約450 μm ，約450 μm -約750 μm ，約450 μm -約700 μm ，約450 μm -約650 μm ，約450 μm -約600 μm ，約450 μm -約550 μm ，約450 μm -約500 μm ，約500 μm -約750 μm ，約500 μm -約700 μm ，約500 μm -約650 μm ，約500 μm -約600 μm ，約550 μm -約750 μm ，約550 μm -約700 μm ，約550 μm -約650 μm ，約550 μm -約600 μm ，約600 μm -約750 μm ，約600 μm -約700 μm ，約600 μm -約650 μm ，約650 μm -約750 μm ，約650 μm -約700 μm ，或約700 μm 和750 μm)時，基於孔類型和孔徑選擇約3.3 g/L-約4.3 g/L (例如，約3.3 g/L-約4.2 g/L，約3.3 g/L-約4.1 g/L，約3.3 g/L-約4.0 g/L，約3.3 g/L-約3.9 g/L，約3.3 g/L-約3.8 g/L，約3.3 g/L-約3.7 g/L，約3.3 g/L-約3.6 g/L，約3.3 g/L-約3.5 g/L，約3.4 g/L-約4.3 g/L，約3.4 g/L-約4.2 g/L，約3.4 g/L-約4.1 g/L，約3.4 g/L-約4.0 g/L，約3.4 g/L-約3.9 g/L，約3.4 g/L-約3.8 g/L，約3.4 g/L-約3.7 g/L，約3.4 g/L-約3.6 g/L，約3.5 g/L-約4.3 g/L，約3.5 g/L-約4.2 g/L，約3.5 g/L-約4.1 g/L，約3.5 g/L-約4.0 g/L，約3.5 g/L-約3.9 g/L，約3.5 g/L-約3.8 g/L，約3.5 g/L-約3.7 g/L，約3.6 g/L-約4.3 g/L，約3.6 g/L-約4.2 g/L，約3.6 g/L-約4.1 g/L，約3.6 g/L-約4.0 g/L，約3.6 g/L-約3.9 g/L，約3.6 g/L-約3.8 g/L，約3.7 g/L-約4.3 g/L，約3.7 g/L-約4.2 g/L，約3.7 g/L-約4.1 g/L，約3.7 g/L-約4.0 g/L，約3.7 g/L-約3.9 g/L，約3.8 g/L-約4.3 g/L，

約3.8 g/L-約4.2 g/L，約3.8 g/L-約4.1 g/L，約3.8 g/L-約4.0 g/L，約3.9 g/L-約4.3 g/L，約3.9 g/L-約4.2 g/L，約3.9 g/L-約4.1 g/L，約4.0 g/L-約4.3 g/L，約4.0 g/L-約4.2 g/L，或約4.1 g/L-約4.3 g/L)的poloxamer-188濃度。

所述方法可包括，例如，當孔類型是鑽孔且孔徑為約1 μm -約250 μm (例如，約1 μm -約200 μm ，約1 μm -約150 μm ，約1 μm -約100 μm ，約1 μm -約50 μm ，約1 μm -約25 μm ，約10 μm -約250 μm ，約10 μm -約200 μm ，約10 μm -約150 μm ，約10 μm -約100 μm ，約10 μm -約50 μm ，約10 μm -約25 μm ，約25 μm -約250 μm ，約25 μm -約200 μm ，約25 μm -約150 μm ，約25 μm -約100 μm ，約25 μm -約50 μm ，約50 μm -約250 μm ，約50 μm -約200 μm ，約50 μm -約150 μm ，約50 μm -約100 μm ，約100 μm -約250 μm ，約100 μm -約200 μm ，約100 μm -約150 μm ，約150 μm -約250 μm ，約150 μm -約200 μm ，或者約200 μm -約250 μm)時，基於孔類型和孔徑選擇濃度高於約4.3 g/L (例如，濃度高於約4.4 g/L，濃度高於約4.5 g/L，濃度高於約4.6 g/L，濃度高於約4.7 g/L，濃度高於約4.8 g/L，濃度高於約4.9 g/L，濃度高於約5.0 g/L，濃度高於約5.1 g/L，濃度高於約5.2 g/L，濃度高於約5.3 g/L，濃度高於約5.4 g/L，濃度高於約5.5 g/L，濃度高於約5.6 g/L，濃度高於約5.7 g/L，濃度高於約5.8 g/L，濃度高於約5.9 g/L，濃度高於約6.0 g/L，濃度高於約6.1 g/L，濃度高於約6.2 g/L，濃度高於約6.3 g/L，濃度高於約6.4 g/L，濃度高於約6.5 g/L，濃度高於約6.6 g/L，濃度高於約6.7 g/L，濃度高於約6.8 g/L，濃度高於約6.9 g/L，濃度高於約7.0 g/L，濃度高於約7.1 g/L，濃度高於約7.2 g/L，濃度高於約7.3 g/L，濃度高於約7.4 g/L，濃度高於約7.5 g/L，濃度高於約7.6 g/L，濃度高於約7.7 g/L，濃度高於約7.8 g/L，濃度高於約7.9 g/L，濃度高於約8.0 g/L，濃度高於約8.1 g/L，濃度高於約8.2 g/L，濃度高於約8.2 g/L，濃度高於約8.3 g/L，濃度高於約8.4 g/L，濃度高於約8.5 g/L，濃度高於約8.6 g/L，濃度高於約8.7 g/L，濃度高於約8.8 g/L，濃度高於約8.9 g/L，濃度高於約9.0 g/L，濃度高於約9.1 g/L，濃度高於約9.2 g/L，濃度高於約9.3 g/L，濃度高於約9.4 g/L，濃度高於約9.5 g/L，濃度高於約9.6 g/L，濃度高於約9.7 g/L，濃度高於約9.8 g/L，濃度高於約9.9 g/L，或濃度高於約10.0 g/L)的poloxamer-188。

在一些實例中，所述方法包括當孔類型是鑽孔且孔徑為約160 μm -約190 μm (例如，約160 μm -約185 μm ，約160 μm -約180 μm ，約160 μm -約175 μm ，約160 μm -約170 μm ，約160 μm -約165 μm ，約165 μm -約190 μm ，約165 μm -約185 μm ，約

165 μm -約180 μm ，約165 μm -約175 μm ，約165 μm -約170 μm ，約170 μm -約190 μm ，約170 μm -約185 μm ，約170 μm -約180 μm ，約170 μm -約175 μm ，約175 μm -約190 μm ，約175 μm -約185 μm ，約175 μm -約180 μm ，約180 μm -約190 μm ，約180 μm -約185 μm ，或約185 μm -約190 μm)時，基於孔類型和孔徑選擇濃度高於4.3 g/L (例如，濃度高於約4.4 g/L，濃度高於約4.5 g/L，濃度高於約4.6 g/L，濃度高於約4.7 g/L，濃度高於約4.8 g/L，濃度高於約4.9 g/L，濃度高於約5.0 g/L，濃度高於約5.1 g/L，濃度高於約5.2 g/L，濃度高於約5.3 g/L，濃度高於約5.4 g/L，濃度高於約5.5 g/L，濃度高於約5.6 g/L，濃度高於約5.7 g/L，濃度高於約5.8 g/L，濃度高於約5.9 g/L，濃度高於約6.0 g/L，濃度高於約6.1 g/L，濃度高於約6.2 g/L，濃度高於約6.3 g/L，濃度高於約6.4 g/L，濃度高於約6.5 g/L，濃度高於約6.6 g/L，濃度高於約6.7 g/L，濃度高於約6.8 g/L，濃度高於約6.9 g/L，濃度高於約7.0 g/L，濃度高於約7.1 g/L，濃度高於約7.2 g/L，濃度高於約7.3 g/L，濃度高於約7.4 g/L，濃度高於約7.5 g/L，濃度高於約7.6 g/L，濃度高於約7.7 g/L，濃度高於約7.8 g/L，濃度高於約7.9 g/L，濃度高於約8.0 g/L，濃度高於約8.1 g/L，濃度高於約8.2 g/L，濃度高於約8.2 g/L，濃度高於約8.3 g/L，濃度高於約8.4 g/L，濃度高於約8.5 g/L，濃度高於約8.6 g/L，濃度高於約8.7 g/L，濃度高於約8.8 g/L，濃度高於約8.9 g/L，濃度高於約9.0 g/L，濃度高於約9.1 g/L，濃度高於約9.2 g/L，濃度高於約9.3 g/L，濃度高於約9.4 g/L，濃度高於約9.5 g/L，濃度高於約9.6 g/L，濃度高於約9.7 g/L，濃度高於約9.8 g/L，濃度高於約9.9 g/L，或濃度高於約10.0 g/L)的 poloxamer-188。

在一些實施方案中，所述方法包括當孔類型是燒結孔且孔徑為大於150 μm (例如，大於155 μm ，大於160 μm ，大於165 μm ，大於170 μm ，大於175 μm ，大於約180 μm ，大於185 μm ，大於約190 μm ，大於約195 μm ，大於約200 μm ，大於約205 μm ，大於約210 μm ，大於約215 μm ，大於約220 μm ，大於約225 μm ，大於約230 μm ，大於約235 μm ，大於約240 μm ，大於約245 μm ，大於約250 μm ，大於約255 μm ，大於約260 μm ，大於約265 μm ，大於約270 μm ，大於約275 μm ，大於約280 μm ，大於約290 μm ，大於約300 μm ，大於約350 μm ，大於約400 μm ，大於約450 μm ，或大於約500 μm)時，基於孔類型和孔徑選擇濃度為約1.8 g/L-約3.3 g/L (例如，約1.8 g/L-約3.2 g/L，約1.8 g/L-約3.1 g/L，約1.8 g/L-約3.0 g/L，約1.8 g/L-約2.9 g/L，約1.8 g/L-約2.8 g/L，約1.8 g/L-約2.7 g/L，約1.8 g/L-約2.6 g/L，

約1.8 g/L-約2.5 g/L, 約1.8 g/L-約2.4 g/L, 約1.8 g/L-約2.3 g/L, 約1.8 g/L-約2.2 g/L, 約1.8 g/L-約2.1 g/L, 約1.8 g/L-約2.0 g/L, 約1.9 g/L-約3.3 g/L, 約1.9 g/L-約3.2 g/L, 約1.9 g/L-約3.1 g/L, 約1.9 g/L-約3.0 g/L, 約1.9 g/L-約2.9 g/L, 約1.9 g/L-約2.8 g/L, 約1.9 g/L-約2.7 g/L, 約1.9 g/L-約2.6 g/L, 約1.9 g/L-約2.5 g/L, 約1.9 g/L-約2.4 g/L, 約1.9 g/L-約2.3 g/L, 約1.9 g/L-約2.2 g/L, 約1.9 g/L-約2.1 g/L, 約2.0 g/L-約3.3 g/L, 約2.0 g/L-約3.2 g/L, 約2.0 g/L-約3.1 g/L, 約2.0 g/L-約3.0 g/L, 約2.0 g/L-約2.9 g/L, 約2.0 g/L-約2.8 g/L, 約2.0 g/L-約2.7 g/L, 約2.0 g/L-約2.6 g/L, 約2.0 g/L-約2.5 g/L, 約2.0 g/L-約2.4 g/L, 約2.0 g/L-約2.3 g/L, 約2.0 g/L-約2.2 g/L, 約2.1 g/L-約3.3 g/L, 約2.1 g/L-約3.2 g/L, 約2.1 g/L-約3.1 g/L, 約2.1 g/L-約3.0 g/L, 約2.1 g/L-約2.9 g/L, 約2.1 g/L-約2.8 g/L, 約2.1 g/L-約2.7 g/L, 約2.1 g/L-約2.6 g/L, 約2.1 g/L-約2.5 g/L, 約2.1 g/L-約2.4 g/L, 約2.1 g/L-約2.3 g/L, 約2.2 g/L-約3.3 g/L, 約2.2 g/L-約3.2 g/L, 約2.2 g/L-約3.1 g/L, 約2.2 g/L-約3.0 g/L, 約2.2 g/L-約2.9 g/L, 約2.2 g/L-約2.8 g/L, 約2.2 g/L-約2.7 g/L, 約2.2 g/L-約2.6 g/L, 約2.2 g/L-約2.5 g/L, 約2.2 g/L-約2.4 g/L, 約2.3 g/L-約3.3 g/L, 約2.3 g/L-約3.2 g/L, 約2.3 g/L-約3.1 g/L, 約2.3 g/L-約3.0 g/L, 約2.3 g/L-約2.9 g/L, 約2.3 g/L-約2.8 g/L, 約2.3 g/L-約2.7 g/L, 約2.3 g/L-約2.6 g/L, 約2.3 g/L-約2.5 g/L, 約2.4 g/L-約3.3 g/L, 約2.4 g/L-約3.2 g/L, 約2.4 g/L-約3.1 g/L, 約2.4 g/L-約3.0 g/L, 約2.4 g/L-約2.9 g/L, 約2.4 g/L-約2.8 g/L, 約2.4 g/L-約2.7 g/L, 約2.4 g/L-約2.6 g/L, 約2.5 g/L-約3.3 g/L, 約2.5 g/L-約3.2 g/L, 約2.5 g/L-約3.1 g/L, 約2.5 g/L-約3.0 g/L, 約2.5 g/L-約2.9 g/L, 約2.5 g/L-約2.8 g/L, 約2.5 g/L-約2.7 g/L, 約2.6 g/L-約3.3 g/L, 約2.6 g/L-約3.2 g/L, 約2.6 g/L-約3.1 g/L, 約2.6 g/L-約3.0 g/L, 約2.6 g/L-約2.9 g/L, 約2.6 g/L-約2.8 g/L, 約2.7 g/L-約3.3 g/L, 約2.7 g/L-約3.2 g/L, 約2.7 g/L-約3.1 g/L, 約2.7 g/L-約3.0 g/L, 約2.7 g/L-約2.9 g/L, 約2.8 g/L-約3.3 g/L, 約2.8 g/L-約3.2 g/L, 約2.8 g/L-約3.1 g/L, 約2.8 g/L-約3.0 g/L, 約2.9 g/L-約3.3 g/L, 約2.9 g/L-約3.2 g/L, 約2.9 g/L-約3.1 g/L, 約3.0 g/L-約3.3 g/L, 約3.0 g/L-約3.2 g/L, 或約3.1 g/L-約3.3 g/L)的poloxamer-188。

所述方法可包括, 例如, 當孔類型是燒結孔且孔徑為約80 μm -約150 μm (例如, 約80 μm -約145 μm , 約80 μm -約140 μm , 約80 μm -約135 μm , 約80 μm -約130 μm , 約80 μm -約125 μm , 約80 μm -約120 μm , 約80 μm -約115 μm , 約80 μm -約110 μm , 約80 μm -約105 μm , 約80 μm -約100 μm , 約80 μm -約95 μm , 約80 μm -約90 μm , 約80 μm -約85 μm , 約85 μm -約150 μm , 約85 μm -約145 μm , 約85 μm -

• *l*

約3.6 g/L-約4.2 g/L，約3.6 g/L-約4.1 g/L，約3.6 g/L-約4.0 g/L，約3.6 g/L-約3.9 g/L，約3.6 g/L-約3.8 g/L，約3.7 g/L-約4.3 g/L，約3.7 g/L-約4.2 g/L，約3.7 g/L-約4.1 g/L，約3.7 g/L-約4.0 g/L，約3.7 g/L-約3.9 g/L，約3.8 g/L-約4.3 g/L，約3.8 g/L-約4.2 g/L，約3.8 g/L-約4.1 g/L，約3.8 g/L-約4.0 g/L，約3.9 g/L-約4.3 g/L，約3.9 g/L-約4.2 g/L，約3.9 g/L-約4.1 g/L，約4.0 g/L-約4.3 g/L，約4.0 g/L-約4.2 g/L，或約4.1 g/L-約4.3 g/L)的poloxamer-188。

所述方法可包括，例如，當孔類型是燒結孔且孔徑為約1 μm -約80 μm (例如，約1 μm -約50 μm ，約1 μm -約25 μm ，約1 μm -約10 μm ，約1 μm -約5 μm ，約5 μm -約80 μm ，約5 μm -約50 μm ，約5 μm -約25 μm ，約5 μm -約10 μm ，約10 μm -約80 μm ，約10 μm -約50 μm ，約10 μm -約25 μm ，約25 μm -約80 μm ，約25 μm -約50 μm ，或者約50 μm -約80 μm)時，基於孔類型和孔徑選擇濃度為約4.5 g/L或濃度高於約4.5 g/L (例如，濃度為約4.6 g/L或濃度為大於4.6 g/L，濃度為約4.7 g/L或濃度為大於4.7 g/L，濃度為約4.8 g/L或濃度為大於4.8 g/L，濃度為約4.9 g/L或濃度為大於4.9 g/L，濃度為約5.0 g/L或濃度為大於5.0 g/L，濃度為約5.1 g/L或濃度為大於5.1 g/L，濃度為約5.2 g/L或濃度為大於5.2 g/L，濃度為約5.3 g/L或濃度為大於5.3 g/L，濃度為約5.4 g/L或濃度為大於5.4 g/L，濃度為約5.5 g/L或濃度為大於5.5 g/L，濃度為約5.6 g/L或濃度為大於5.6 g/L，濃度為約5.7 g/L或濃度為大於5.7 g/L，濃度為約5.8 g/L或濃度為大於5.8 g/L，濃度為約6.0 g/L或濃度為大於6.0 g/L，濃度為約6.1 g/L或濃度為大於6.1 g/L，濃度為約6.2 g/L或濃度為大於6.2 g/L，濃度為約6.3 g/L或濃度為大於6.3 g/L，濃度為約6.4 g/L或濃度為大於6.4 g/L，濃度為約6.5 g/L或濃度為大於6.5 g/L，濃度為約6.6 g/L或濃度為大於6.6 g/L，濃度為約6.7 g/L或濃度為大於6.7 g/L，濃度為約6.8 g/L或濃度為大於6.8 g/L，濃度為約6.9 g/L或濃度為大於6.9 g/L，濃度為約7.0 g/L或濃度為大於7.0 g/L，濃度為約7.1 g/L或濃度為大於7.1 g/L，濃度為約7.2 g/L或濃度為大於7.2 g/L，濃度為約7.3 g/L或濃度為大於7.3 g/L，濃度為約7.4 g/L或濃度為大於7.4 g/L，濃度為約7.5 g/L或濃度為大於7.5 g/L，濃度為約7.6 g/L或濃度為大於7.6 g/L，濃度為約7.7 g/L或濃度為大於7.7 g/L，濃度為約7.8 g/L或濃度為大於7.8 g/L，濃度為約7.9 g/L或濃度為大於7.9 g/L，濃度為約8.0 g/L或濃度為大於8.0 g/L，濃度為約8.1 g/L或濃度為大於8.1 g/L，濃度為約8.2 g/L或濃度為大於8.2 g/L，濃度為約8.3 g/L或濃度為大於8.3 g/L，濃度為約8.4 g/L或濃度為大於8.4 g/L，濃度為約8.5 g/L或濃度為大於8.5 g/L，

濃度為約8.6 g/L或濃度為大於8.6 g/L，濃度為約8.7 g/L或濃度為大於8.7 g/L，濃度為約8.8 g/L或濃度為大於8.8 g/L，濃度為約8.9 g/L或濃度為大於8.9 g/L，濃度為約9.0 g/L或濃度為大於9.0 g/L，濃度為約9.1 g/L或濃度為大於9.1 g/L，濃度為約9.2 g/L或濃度為大於9.2 g/L，濃度為約9.3 g/L或濃度為大於9.3 g/L，濃度為約9.4 g/L或濃度為大於9.4 g/L，濃度為約9.5 g/L或濃度為大於9.5 g/L，濃度為約9.6 g/L或濃度為大於9.6 g/L，濃度為約9.7 g/L或濃度為大於9.7 g/L，濃度為約9.8 g/L或濃度為大於9.8 g/L，濃度為約9.9 g/L或濃度為大於9.9 g/L，或濃度為約10.0 g/L或濃度為大於10.0 g/L)的poloxamer-188。

當所述培養為灌注培養時，第二液體培養基可包括選擇的poloxamer-188濃度。

基於活細胞密度增加Poloxamer-188濃度

本案所述的任何方法的一些實施方案包括基於培養基中的活細胞密度隨時間增加培養基中的poloxamer-188濃度。例如，本案所述的任何方法可包括當培養基中的活細胞密度為約 20×10^6 細胞/mL至約 60×10^6 細胞/mL (例如，約 20×10^6 細胞/mL-約 58×10^6 細胞/mL，約 20×10^6 細胞/mL至約 56×10^6 細胞/mL，約 20×10^6 細胞/mL-約 54×10^6 細胞/mL，約 20×10^6 細胞/mL-約 52×10^6 細胞/mL，約 20×10^6 細胞/mL-約 50×10^6 細胞/mL，約 20×10^6 細胞/mL-約 48×10^6 細胞/mL，約 20×10^6 細胞/mL-約 46×10^6 細胞/mL，約 20×10^6 細胞/mL-約 44×10^6 細胞/mL，約 20×10^6 細胞/mL-約 42×10^6 細胞/mL，約 20×10^6 細胞/mL至約 40×10^6 細胞/mL，約 20×10^6 細胞/mL-約 38×10^6 細胞/mL，約 20×10^6 細胞/mL-約 36×10^6 細胞/mL，約 20×10^6 細胞/mL-約 34×10^6 細胞/mL，約 20×10^6 細胞/mL-約 32×10^6 細胞/mL，約 20×10^6 細胞/mL-約 30×10^6 細胞/mL，約 20×10^6 細胞/mL至約 28×10^6 細胞/mL，約 20×10^6 細胞/mL-約 26×10^6 細胞/mL，約 20×10^6 細胞/mL-約 24×10^6 細胞/mL，約 20×10^6 細胞/mL-約 22×10^6 細胞/mL，約 22×10^6 細胞/mL-約 60×10^6 細胞/mL，約 22×10^6 細胞/mL-約 58×10^6 細胞/mL，約 22×10^6 細胞/mL至約 56×10^6 細胞/mL，約 22×10^6 細胞/mL-約 54×10^6 細胞/mL，約 22×10^6 細胞/mL-約 52×10^6 細胞/mL，約 22×10^6 細胞/mL-約 50×10^6 細胞/mL，約 22×10^6 細胞/mL-約 48×10^6 細胞/mL，約 22×10^6 細胞/mL-約 46×10^6 細胞/mL，約 22×10^6 細胞/mL-約 44×10^6 細胞/mL，約 22×10^6 細胞/mL-約 42×10^6 細胞/mL，約 22×10^6 細胞/mL至約 40×10^6 細胞/mL，約 22×10^6 細胞/mL-約 38×10^6 細胞/mL，約 22×10^6 細胞/mL-約 36×10^6 細胞/mL，約 22×10^6 細胞/mL-約 34×10^6 細胞/mL，約 22×10^6 細胞/mL-約 32×10^6 細胞/mL，約 22×10^6 細胞/mL-約 30×10^6 細胞/mL，約 22×10^6 細胞/mL至約 28×10^6 細胞/mL，約 22×10^6 細胞/mL-約 26×10^6 細胞/mL，約 22×10^6 細胞/mL-約 24×10^6 細胞/mL，約 22×10^6 細胞/mL-約 22×10^6 細胞/mL)的poloxamer-188濃度。

• •

細胞/mL-約 42×10^6 細胞/mL, 約 38×10^6 細胞/mL至約 40×10^6 細胞/mL, 約 40×10^6 細胞/mL-約 60×10^6 細胞/mL, 約 40×10^6 細胞/mL-約 58×10^6 細胞/mL, 約 40×10^6 細胞/mL至約 56×10^6 細胞/mL, 約 40×10^6 細胞/mL-約 54×10^6 細胞/mL, 約 40×10^6 細胞/mL-約 52×10^6 細胞/mL, 約 40×10^6 細胞/mL-約 50×10^6 細胞/mL, 約 40×10^6 細胞/mL-約 48×10^6 細胞/mL, 約 40×10^6 細胞/mL-約 46×10^6 細胞/mL, 約 40×10^6 細胞/mL-約 44×10^6 細胞/mL, 約 40×10^6 細胞/mL-約 42×10^6 細胞/mL, 約 42×10^6 細胞/mL-約 60×10^6 細胞/mL, 約 42×10^6 細胞/mL-約 58×10^6 細胞/mL, 約 42×10^6 細胞/mL至約 56×10^6 細胞/mL, 約 42×10^6 細胞/mL-約 54×10^6 細胞/mL, 約 42×10^6 細胞/mL-約 52×10^6 細胞/mL, 約 42×10^6 細胞/mL-約 50×10^6 細胞/mL, 約 42×10^6 細胞/mL-約 48×10^6 細胞/mL, 約 42×10^6 細胞/mL-約 46×10^6 細胞/mL, 約 42×10^6 細胞/mL-約 44×10^6 細胞/mL, 約 44×10^6 細胞/mL-約 60×10^6 細胞/mL, 約 44×10^6 細胞/mL-約 58×10^6 細胞/mL, 約 44×10^6 細胞/mL至約 56×10^6 細胞/mL, 約 44×10^6 細胞/mL-約 54×10^6 細胞/mL, 約 44×10^6 細胞/mL-約 52×10^6 細胞/mL, 約 44×10^6 細胞/mL-約 50×10^6 細胞/mL, 約 44×10^6 細胞/mL-約 48×10^6 細胞/mL, 約 44×10^6 細胞/mL-約 46×10^6 細胞/mL, 約 46×10^6 細胞/mL-約 60×10^6 細胞/mL, 約 46×10^6 細胞/mL-約 58×10^6 細胞/mL, 約 46×10^6 細胞/mL至約 56×10^6 細胞/mL, 約 46×10^6 細胞/mL-約 54×10^6 細胞/mL, 約 46×10^6 細胞/mL-約 52×10^6 細胞/mL, 約 46×10^6 細胞/mL-約 50×10^6 細胞/mL, 約 46×10^6 細胞/mL-約 48×10^6 細胞/mL, 約 48×10^6 細胞/mL-約 60×10^6 細胞/mL, 約 48×10^6 細胞/mL-約 58×10^6 細胞/mL, 約 48×10^6 細胞/mL至約 56×10^6 細胞/mL, 約 48×10^6 細胞/mL-約 54×10^6 細胞/mL, 約 48×10^6 細胞/mL-約 52×10^6 細胞/mL, 約 48×10^6 細胞/mL-約 50×10^6 細胞/mL, 約 50×10^6 細胞/mL-約 60×10^6 細胞/mL, 約 50×10^6 細胞/mL-約 58×10^6 細胞/mL, 約 50×10^6 細胞/mL至約 56×10^6 細胞/mL, 約 50×10^6 細胞/mL-約 54×10^6 細胞/mL, 約 50×10^6 細胞/mL-約 52×10^6 細胞/mL, 約 52×10^6 細胞/mL-約 60×10^6 細胞/mL, 約 52×10^6 細胞/mL-約 58×10^6 細胞/mL, 約 52×10^6 細胞/mL至約 56×10^6 細胞/mL, 約 52×10^6 細胞/mL-約 54×10^6 細胞/mL, 約 54×10^6 細胞/mL-約 60×10^6 細胞/mL, 約 54×10^6 細胞/mL-約 58×10^6 細胞/mL, 約 54×10^6 細胞/mL至約 56×10^6 細胞/mL, 約 56×10^6 細胞/mL-約 60×10^6 細胞/mL, 約 56×10^6 細胞/mL-約 58×10^6 細胞/mL, 或約 58×10^6 細胞/mL-約 60×10^6 細胞/mL)時, 將培養基中的poloxamer-188濃度增加到大於1.8 g/L (例如, 約1.8 g/L-約3.0 g/L, 約1.8 g/L-約2.9 g/L, 約1.8 g/L-約2.8 g/L, 約

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

本案所述的任何方法可包括當培養基中的活細胞密度為約 60×10^6 細胞/mL至約 90×10^6 細胞/mL (例如, 約 60×10^6 細胞/mL-約 88×10^6 細胞/mL, 約 60×10^6 細胞/mL至約 86×10^6 細胞/mL, 約 60×10^6 細胞/mL-約 84×10^6 細胞/mL, 約 60×10^6 細胞/mL-約 82×10^6 細胞/mL, 約 60×10^6 細胞/mL-約 80×10^6 細胞/mL, 約 60×10^6 細胞/mL-約 78×10^6 細胞/mL, 約 60×10^6 細胞/mL-約 76×10^6 細胞/mL, 約 60×10^6 細胞/mL-約 74×10^6 細胞/mL, 約 60×10^6 細胞/mL-約 72×10^6 細胞/mL, 約 60×10^6 細胞/mL至約 70×10^6 細胞/mL, 約 60×10^6 細胞/mL-約 68×10^6 細胞/mL, 約 60×10^6 細胞/mL-約 66×10^6 細胞/mL, 約 60×10^6 細胞/mL-約 64×10^6 細胞/mL, 約 60×10^6 細胞/mL-約 62×10^6 細胞/mL, 約 62×10^6 細胞/mL-約 90×10^6 細胞/mL, 約 62×10^6 細胞/mL-約 88×10^6 細胞/mL, 約 62×10^6 細胞/mL至約 86×10^6 細胞/mL, 約 62×10^6 細胞/mL-約 84×10^6 細胞/mL, 約 62×10^6 細胞/mL-約 82×10^6 細胞/mL, 約 62×10^6 細胞/mL-約 80×10^6 細胞/mL, 約 62×10^6 細胞/mL-約 78×10^6 細胞/mL, 約 62×10^6 細胞/mL-約 76×10^6 細胞/mL, 約 62×10^6 細胞/mL-約 74×10^6 細胞/mL, 約 62×10^6 細胞/mL-約 72×10^6 細胞/mL, 約 62×10^6 細胞/mL至約 70×10^6 細胞/mL, 約 62×10^6

細胞/mL至約 86×10^6 細胞/mL，約 74×10^6 細胞/mL-約 84×10^6 細胞/mL，約 74×10^6 細胞/mL-約 82×10^6 細胞/mL，約 74×10^6 細胞/mL-約 80×10^6 細胞/mL，約 74×10^6 細胞/mL-約 78×10^6 細胞/mL，約 74×10^6 細胞/mL-約 76×10^6 細胞/mL，約 76×10^6 細胞/mL-約 90×10^6 細胞/mL，約 76×10^6 細胞/mL-約 88×10^6 細胞/mL，約 76×10^6 細胞/mL至約 86×10^6 細胞/mL，約 76×10^6 細胞/mL-約 84×10^6 細胞/mL，約 76×10^6 細胞/mL-約 82×10^6 細胞/mL，約 76×10^6 細胞/mL-約 80×10^6 細胞/mL，約 76×10^6 細胞/mL-約 78×10^6 細胞/mL，約 78×10^6 細胞/mL-約 90×10^6 細胞/mL，約 78×10^6 細胞/mL-約 88×10^6 細胞/mL，約 78×10^6 細胞/mL至約 86×10^6 細胞/mL，約 78×10^6 細胞/mL-約 84×10^6 細胞/mL，約 78×10^6 細胞/mL-約 82×10^6 細胞/mL，約 78×10^6 細胞/mL-約 80×10^6 細胞/mL，約 80×10^6 細胞/mL-約 90×10^6 細胞/mL，約 80×10^6 細胞/mL-約 88×10^6 細胞/mL，約 80×10^6 細胞/mL至約 86×10^6 細胞/mL，約 80×10^6 細胞/mL-約 84×10^6 細胞/mL，約 80×10^6 細胞/mL-約 82×10^6 細胞/mL，約 82×10^6 細胞/mL-約 90×10^6 細胞/mL，約 82×10^6 細胞/mL-約 88×10^6 細胞/mL，約 82×10^6 細胞/mL至約 86×10^6 細胞/mL，約 82×10^6 細胞/mL-約 84×10^6 細胞/mL，約 84×10^6 細胞/mL-約 90×10^6 細胞/mL，約 84×10^6 細胞/mL-約 88×10^6 細胞/mL，約 84×10^6 細胞/mL至約 86×10^6 細胞/mL，約 86×10^6 細胞/mL-約 90×10^6 細胞/mL，約 86×10^6 細胞/mL-約 88×10^6 細胞/mL，或約 88×10^6 細胞/mL-約 90×10^6 細胞/mL)時，將培養基中的poloxamer-188濃度增加到約3.0 g/L-約6.0 g/L (例如，約3.0 g/L-約5.9 g/L，約3.0 g/L-約5.8 g/L，約3.0 g/L-約5.7 g/L，約3.0 g/L-約5.6 g/L，約3.0 g/L-約5.5 g/L，約3.0 g/L-約5.4 g/L，約3.0 g/L-約5.3 g/L，約3.0 g/L-約5.2 g/L，約3.0 g/L-約5.1 g/L，約3.0 g/L-約5.0 g/L，約3.0 g/L-約4.9 g/L，約3.0 g/L-約4.8 g/L，約3.0 g/L-約4.7 g/L，約3.0 g/L-約4.6 g/L，約3.0 g/L-約4.5 g/L，約3.0 g/L-約4.4 g/L，約3.0 g/L-約4.3 g/L，約3.0 g/L-約4.2 g/L，約3.0 g/L-約4.1 g/L，約3.0 g/L-約4.0 g/L，約3.0 g/L-約3.9 g/L，約3.0 g/L-約3.8 g/L，約3.0 g/L-約3.7 g/L，約3.0 g/L-約3.6 g/L，約3.0 g/L-約3.5 g/L，約3.0 g/L-約3.4 g/L，約3.0 g/L-約3.3 g/L，約3.0 g/L-約3.2 g/L，約3.1 g/L-約6.0 g/L，約3.1 g/L-約5.9 g/L，約3.1 g/L-約5.8 g/L，約3.1 g/L-約5.7 g/L，約3.1 g/L-約5.6 g/L，約3.1 g/L-約5.5 g/L，約3.1 g/L-約5.4 g/L，約3.1 g/L-約5.3 g/L，約3.1 g/L-約5.2 g/L，約3.1 g/L-約5.1 g/L，約3.1 g/L-約5.0 g/L，約3.1 g/L-約4.9 g/L，約3.1 g/L-約4.8 g/L，約3.1 g/L-約4.7 g/L，約3.1 g/L-約4.6 g/L，約3.1 g/L-約4.5 g/L，約3.1 g/L-約4.4 g/L，約3.1 g/L-約4.3 g/L，約3.1 g/L-約4.2 g/L，約3.1 g/L-約4.1 g/L，約3.1 g/L-約4.0 g/L，

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

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

約4.2 g/L-約5.2 g/L, 約4.2 g/L-約5.1 g/L, 約4.2 g/L-約5.0 g/L, 約4.2 g/L-約4.9 g/L, 約4.2 g/L-約4.8 g/L, 約4.2 g/L-約4.7 g/L, 約4.2 g/L-約4.6 g/L, 約4.2 g/L-約4.5 g/L, 約4.2 g/L-約4.4 g/L, 約4.3 g/L-約6.0 g/L, 約4.3 g/L-約5.9 g/L, 約4.3 g/L-約5.8 g/L, 約4.3 g/L-約5.7 g/L, 約4.3 g/L-約5.6 g/L, 約4.3 g/L-約5.5 g/L, 約4.3 g/L-約5.4 g/L, 約4.3 g/L-約5.3 g/L, 約4.3 g/L-約5.2 g/L, 約4.3 g/L-約5.1 g/L, 約4.3 g/L-約5.0 g/L, 約4.3 g/L-約4.9 g/L, 約4.3 g/L-約4.8 g/L, 約4.3 g/L-約4.7 g/L, 約4.3 g/L-約4.6 g/L, 約4.3 g/L-約4.5 g/L, 約4.4 g/L-約6.0 g/L, 約4.4 g/L-約5.9 g/L, 約4.4 g/L-約5.8 g/L, 約4.4 g/L-約5.7 g/L, 約4.4 g/L-約5.6 g/L, 約4.4 g/L-約5.5 g/L, 約4.4 g/L-約5.4 g/L, 約4.4 g/L-約5.3 g/L, 約4.4 g/L-約5.2 g/L, 約4.4 g/L-約5.1 g/L, 約4.4 g/L-約5.0 g/L, 約4.4 g/L-約4.9 g/L, 約4.4 g/L-約4.8 g/L, 約4.4 g/L-約4.7 g/L, 約4.4 g/L-約4.6 g/L, 約4.5 g/L-約6.0 g/L, 約4.5 g/L-約5.9 g/L, 約4.5 g/L-約5.8 g/L, 約4.5 g/L-約5.7 g/L, 約4.5 g/L-約5.6 g/L, 約4.5 g/L-約5.5 g/L, 約4.5 g/L-約5.4 g/L, 約4.5 g/L-約5.3 g/L, 約4.5 g/L-約5.2 g/L, 約4.5 g/L-約5.1 g/L, 約4.5 g/L-約5.0 g/L, 約4.5 g/L-約4.9 g/L, 約4.5 g/L-約4.8 g/L, 約4.5 g/L-約4.7 g/L, 約4.6 g/L-約6.0 g/L, 約4.6 g/L-約5.9 g/L, 約4.6 g/L-約5.8 g/L, 約4.6 g/L-約5.7 g/L, 約4.6 g/L-約5.6 g/L, 約4.6 g/L-約5.5 g/L, 約4.6 g/L-約5.4 g/L, 約4.6 g/L-約5.3 g/L, 約4.6 g/L-約5.2 g/L, 約4.6 g/L-約5.1 g/L, 約4.6 g/L-約5.0 g/L, 約4.6 g/L-約4.9 g/L, 約4.6 g/L-約4.8 g/L, 約4.7 g/L-約6.0 g/L, 約4.7 g/L-約5.9 g/L, 約4.7 g/L-約5.8 g/L, 約4.7 g/L-約5.7 g/L, 約4.7 g/L-約5.6 g/L, 約4.7 g/L-約5.5 g/L, 約4.7 g/L-約5.4 g/L, 約4.7 g/L-約5.3 g/L, 約4.7 g/L-約5.2 g/L, 約4.7 g/L-約5.1 g/L, 約4.7 g/L-約5.0 g/L, 約4.7 g/L-約4.9 g/L, 約4.8 g/L-約6.0 g/L, 約4.8 g/L-約5.9 g/L, 約4.8 g/L-約5.8 g/L, 約4.8 g/L-約5.7 g/L, 約4.8 g/L-約5.6 g/L, 約4.8 g/L-約5.5 g/L, 約4.8 g/L-約5.4 g/L, 約4.8 g/L-約5.3 g/L, 約4.8 g/L-約5.2 g/L, 約4.8 g/L-約5.1 g/L, 約4.8 g/L-約5.0 g/L, 約4.9 g/L-約6.0 g/L, 約4.9 g/L-約5.9 g/L, 約4.9 g/L-約5.8 g/L, 約4.9 g/L-約5.7 g/L, 約4.9 g/L-約5.6 g/L, 約4.9 g/L-約5.5 g/L, 約4.9 g/L-約5.4 g/L, 約4.9 g/L-約5.3 g/L, 約4.9 g/L-約5.2 g/L, 約4.9 g/L-約5.1 g/L, 約5.0 g/L-約6.0 g/L, 約5.0 g/L-約5.9 g/L, 約5.0 g/L-約5.8 g/L, 約5.0 g/L-約5.7 g/L, 約5.0 g/L-約5.6 g/L, 約5.0 g/L-約5.5 g/L, 約5.0 g/L-約5.4 g/L, 約5.0 g/L-約5.3 g/L, 約5.0 g/L-約5.2 g/L, 約5.1 g/L-約6.0 g/L, 約5.1 g/L-約5.9 g/L, 約5.1 g/L-約5.8 g/L, 約5.1 g/L-約5.7 g/L, 約5.1 g/L-約5.6 g/L, 約5.1 g/L-約5.5 g/L, 約5.1 g/L-約5.4 g/L, 約5.1 g/L-約5.3 g/L, 約5.2 g/L-約6.0 g/L, 約5.2 g/L-約5.9 g/L, 約5.2 g/L-約5.8 g/L,

約5.2 g/L-約5.7 g/L, 約5.2 g/L-約5.6 g/L, 約5.2 g/L-約5.5 g/L, 約5.2 g/L-約5.4 g/L, 約5.3 g/L-約6.0 g/L, 約5.3 g/L-約5.9 g/L, 約5.3 g/L-約5.8 g/L, 約5.3 g/L-約5.7 g/L, 約5.3 g/L-約5.6 g/L, 約5.3 g/L-約5.5 g/L, 約5.4 g/L-約6.0 g/L, 約5.4 g/L-約5.9 g/L, 約5.4 g/L-約5.8 g/L, 約5.4 g/L-約5.7 g/L, 約5.4 g/L-約5.6 g/L, 約5.5 g/L-約6.0 g/L, 約5.5 g/L-約5.9 g/L, 約5.5 g/L-約5.8 g/L, 約5.5 g/L-約5.7 g/L, 約5.6 g/L-約6.0 g/L, 約5.6 g/L-約5.9 g/L, 約5.6 g/L-約5.8 g/L, 約5.7 g/L-約6.0 g/L, 約5.7 g/L-約5.9 g/L, 或約5.8 g/L-約6.0 g/L)。

本案所述的任何方法可包括當培養基中的活細胞密度為大於約 90×10^6 細胞/mL (例如, 大於約 91×10^6 細胞/mL, 大於約 92×10^6 細胞/mL, 大於約 93×10^6 細胞/mL, 大於約 94×10^6 細胞/mL, 大於約 95×10^6 細胞/mL, 大於約 96×10^6 細胞/mL, 大於約 97×10^6 細胞/mL, 大於約 98×10^6 細胞/mL, 大於約 99×10^6 細胞/mL, 大於約 100×10^6 細胞/mL, 大於約 101×10^6 細胞/mL, 大於約 102×10^6 細胞/mL, 大於約 103×10^6 細胞/mL, 大於約 104×10^6 細胞/mL, 大於約 105×10^6 細胞/mL, 大於約 106×10^6 細胞/mL, 大於約 107×10^6 細胞/mL, 大於約 108×10^6 細胞/mL, 大於約 109×10^6 細胞/mL, 大於約 110×10^6 細胞/mL, 大於約 111×10^6 細胞/mL, 大於約 112×10^6 細胞/mL, 大於約 113×10^6 細胞/mL, 大於約 114×10^6 細胞/mL, 大於約 115×10^6 細胞/mL, 大於約 116×10^6 細胞/mL, 大於約 117×10^6 細胞/mL, 大於約 118×10^6 細胞/mL, 大於約 119×10^6 細胞/mL, 或大於約 120×10^6 細胞/mL) 時, 將培養基中的poloxamer-188濃度增加到大於6.0 g/L (例如, 大於6.1 g/L, 大於6.2 g/L, 大於6.3 g/L, 大於6.4 g/L, 大於6.5 g/L, 大於6.6 g/L, 大於6.7 g/L, 大於6.8 g/L, 大於6.9 g/L, 大於7.0 g/L, 大於7.1 g/L, 大於7.2 g/L, 大於7.3 g/L, 大於7.4 g/L, 大於7.5 g/L, 大於7.6 g/L, 大於7.7 g/L, 大於7.8 g/L, 大於7.9 g/L, 大於8.0 g/L, 大於8.1 g/L, 大於8.2 g/L, 大於8.3 g/L, 大於8.4 g/L, 大於8.5 g/L, 大於8.6 g/L, 大於8.7 g/L, 大於8.8 g/L, 大於8.9 g/L, 大於9.0 g/L, 大於9.1 g/L, 大於9.2 g/L, 大於9.3 g/L, 大於9.4 g/L, 大於9.5 g/L, 大於9.6 g/L, 大於9.7 g/L, 大於9.8 g/L, 大於9.9 g/L, 大於10.0 g/L, 大於約10.1 g/L, 大於約10.2 g/L, 大於約10.3 g/L, 大於約10.4 g/L, 大於約10.5 g/L, 大於約10.6 g/L, 大於約10.7 g/L, 大於約10.8 g/L, 大於約10.9 g/L, 或大於約11.0 g/L) poloxamer-188。

在一些實施方案中, 所述方法包括: 當培養基中的活細胞密度為約 35×10^6 細胞/mL至約 60×10^6 細胞/mL (例如, 或本案所述的其間任何範圍) 時, 將培養基

中的poloxamer-188濃度增加到約1.8 g/L至約3.0 g/L (例如，本案所述的其間任何範圍)；當培養基中的活細胞濃度密度為約 60×10^6 細胞/mL至約 90×10^6 細胞/mL (例如，本案所述的其間任何範圍)時，將培養基中的poloxamer-188濃度增加到約3.0 g/L至約6.0 g/L (例如，本案所述的其間任何範圍)；和當培養基中的活細胞密度濃度為大於 90×10^6 細胞/mL (例如，本案所述的大於 90×10^6 細胞/mL的任何活細胞密度)時，將培養基中的poloxamer-188濃度增加到大於6.0 g/L (例如，本案所述的大於6.0 g/L的任何濃度)。本案所述的任何方法的一些實施方案還包括在培養過程中在一個或多個(例如，兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個、十個、十一個、十二個、十三個、十四個、十五個、十六個、十七個、十八個、十九個或二十個)時間點確定培養基中的活細胞密度。

Poloxamer-188對消泡劑比例

在本案所述的任何實施方案中，液體培養基包含消泡劑(例如，消泡劑-c)且所述培養基中消泡劑(g/L)與poloxamer-188 (g/L)的比例為約0.5%至約6.0% (例如，約0.5%-約5.5%，約0.5%-約5.0%，約0.5%-約4.5%，約0.5%-約4.0%，約0.5%-約3.5%，約0.5%-約3.0%，約0.5%-約2.5%，約0.5%-約2.0%，約0.5%-約1.5%，約0.5%-約1.0%，約1.0%-約6.0%，約1.0%-約5.5%，約1.0%-約5.0%，約1.0%-約4.5%，約1.0%-約4.0%，約1.0%-約3.5%，約1.0%-約3.0%，約1.0%-約2.5%，約1.0%-約2.0%，約1.0%-約1.5%，約2.0%-約6.0%，約2.0%-約5.5%，約2.0%-約5.0%，約2.0%-約4.5%，約2.0%-約4.0%，約2.0%-約3.5%，約2.0%-約3.0%，約2.0%-約2.5%，約2.5%-約6.0%，約2.5%-約5.5%，約2.5%-約5.0%，約2.5%-約4.5%，約2.5%-約4.0%，約2.5%-約3.5%，約2.5%-約3.0%，約3.0%-約6.0%，約3.0%-約5.5%，約3.0%-約5.0%，約3.0%-約4.5%，約3.0%-約4.0%，約3.0%-約3.5%，約3.5%-約6.0%，約3.5%-約5.5%，約3.5%-約5.0%，約3.5%-約4.5%，約3.5%-約4.0%，約4.0%-約6.0%，約4.0%-約5.5%，約4.0%-約5.0%，約4.0%-約4.5%，約4.5%-約6.0%，約4.5%-約5.5%，約4.5%-約5.0%，約5.0%-約6.0%，約5.0%-約5.5%，或約5.5%-約6.0%)。

培養基

液體培養基是本領域中已知的。所述液體培養基(例如，第一和/或第二液體培養基)可補充哺乳動物血清(例如，胎牛血清(fetal calf serum)和牛血清(bovine serum))，和/或生長激素或生長因子(例如，胰島素、運鐵蛋白和表皮生長因子)。

可替換地或此外，所述液體培養基(例如，第一和/或第二液體培養基)可為化學成分確定的液體培養基、無動物衍生組分的液體培養基、無血清液體培養基或含血清液體培養基。化學成分確定的液體培養基、無動物衍生組分的液體培養基、無血清液體培養基或含血清液體培養基的非限制性實例是商業上可得到的。

液體培養基通常含有能量源(例如，碳水化合物，如葡萄糖)、必需胺基酸(例如，二十個胺基酸加半胱氨酸的基本組)、維生素和/或以低濃度需要的其他有機化合物、遊離脂肪酸和/或痕量元素。如果需要，所述液體培養基(例如，第一和/或第二液體培養基)可補充，例如，哺乳動物激素或生長因子(例如，胰島素、運鐵蛋白或表皮生長因子)、鹽和緩沖劑(例如，鈣、鎂和磷酸鹽)、核苷和碱基(例如，腺苷、胸苷和次黃嘌呤)、蛋白質和組織水解物，和/或這些添加劑的任何組合。

可用於在本案所述的任何方法中培養細胞(例如，哺乳動物細胞)的多種不同的液體培養基是本領域中已知的。可用於本方法中的培養基組分包括但不限於化學成分確定的(CD)水解物，例如，CD腴、CD多肽(兩種或更多胺基酸)，和CD生長因子。液體培養基和培養基組分的另外的實例是本領域中已知的。

熟練專業人員會理解的是本案所述的第一液體培養基和第二或進料液體培養基可為相同類型的培養基或不同的培養基。

可將從細胞培養物獲得的液體培養基過濾或澄清以獲得基本上無細胞和/或病毒的液體培養基。用於過濾或澄清液體培養基以移出細胞的方法是本領域中已知的(例如，0.2- μm 過濾和使用交替的切線流(ATFTM)系統的過濾)。也可使用離心並移出其為基本上無細胞的液體培養基的上清，或通過允許細胞沉降至含有液體培養基的容器或生物反應器的重力底部並移出遠離沉降的重組細胞的液體培養基(所述液體培養基基本上無細胞)而從液體培養基移出哺乳動物細胞。

溫度

可在約31°C至約40°C的溫度進行培養哺乳動物細胞的步驟。熟練專業人員會理解的是可在培養步驟過程中在特定的時間點改變溫度，例如，以每小時或每天為基礎。例如，可在用細胞(例如，哺乳動物細胞)初始接種生物反應器後約一天、兩天、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，或約二十天或

更多天改變或變化(例如，增加或降低)溫度。例如，可將溫度上調(例如，多至或約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19，或多至或約20攝氏度的變化)。例如，可將溫度下調(例如，多至或約約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19，或多至或約20°C的變化)。

CO₂

本案所述的培養步驟可進一步包括將生物反應器中的液體培養基暴露於含有至多或約15% CO₂ (例如，至多或約14% CO₂、12% CO₂、10% CO₂、8% CO₂、6% CO₂、5% CO₂、4% CO₂、3% CO₂、2% CO₂，或至多或約1% CO₂)的氣氛。

重組蛋白

可通過本案提供的方法產生的重組蛋白的非限制性實例包括免疫球蛋白(包括輕鏈和重鏈免疫球蛋白、抗體、或抗體片段(例如，本案所述的任何抗體片段)、酶(例如，半乳糖苷酶(例如， α -半乳糖苷酶)、Myozyme或Cerezyme)、蛋白質(例如，人促紅細胞生成素(erythropoietin)、腫瘤壞死因子(TNF)、或幹擾素 α 或 β)、或免疫原性或抗原性蛋白或蛋白片段(例如，用於疫苗的蛋白)。重組蛋白可為工程改造的抗原結合多肽，其含有至少一個多功能重組蛋白支架(參見，例如，Gebauer等，*Current Opin. Chem. Biol.* 13:245-255, 2009；和，美國專利申請公開號2012/0164066 (通過提述以其整體並入本案)中描述的重組抗原結合蛋白)。作為抗體的重組蛋白的非限制性實例包括：帕尼單抗(panitumumab)、奧馬珠單抗(omalizumab)、阿巴伏單抗(abagovomab)、阿昔單抗(abciximab)、actoxumab、阿達木單抗(adalimumab)、阿德木單抗(adecatumumab)、阿非莫單抗(afelimomab)、afutuzumab、alacizumab、alacizumab、阿侖單抗(alemtuzumab)、alirocumab、阿妥莫單抗(altumomab)、amatuximab、amatuximab、anatumomab、安蘆珠單抗(anrukinzumab)、阿泊珠單抗(apolizumab)、阿西莫單抗(arcitumomab)、atinumab、托珠單抗(tocilizumab)、basilizumab、貝妥莫單抗(bectumomab)、貝利單抗(belimomab)、貝伐單抗(bevacizumab)、貝西索單抗(besilesomab)、bezlotoxumab、比西單抗(biciromab)、卡那奴單抗(canakinumab)、賽妥珠單抗(certolizumab)、西妥昔單抗(cetuximab)、西妥木單抗(cixutumumab)、達利珠單抗(daclizumab)、地諾單抗(denosumab)、denosumab、

依庫珠單抗(eculizumab)、依決洛單抗(edrecolomab)、依法利珠單抗(efalizumab)、依芬古單抗(efungumab)、依帕珠單抗(epratuzumab)、厄妥索單抗(ertumaxomab)、伊瑞西珠單抗(etaracizumab)、figitumumab、戈利木單抗(golimumab)、替伊莫單抗(ibritumomab tiuxetan)、伊戈伏單抗(igovomab)、imgatuzumab、英利昔單抗(infliximab)、伊諾莫單抗(inolimomab)、伊珠單抗(inotuzumab)、拉貝珠單抗(labetuzumab)、來金珠單抗(lebrikizumab)、moxetumomab、那他珠單抗(natalizumab)、奧濱尤妥珠單抗(obinutuzumab)、奧戈伏單抗(oregovomab)、帕利珠單抗(palivizumab)、帕尼單抗(panitumumab)、培妥珠單抗(pertuzumab)、蘭尼單抗(ranibizumab)、利妥昔單抗(rituximab)、托珠單抗(tocilizumab)、托西莫單抗(tositumomab)、tralokinumab、tucotuzumab、曲妥單抗(trastuzumab)、維妥珠單抗(veltuzumab)、紮妥木單抗(zalutumumab)和zatuximab。可通過本案所述的方法產生的重組抗體的另外的實例是本領域中已知的。可通過本方法產生的重組蛋白的另外的非限制性實例包括：阿葡糖苷酶 α (alglucosidase alfa)、拉羅尼酶(laronidase)、阿巴西普(abatacept)、加硫酶(galsulfase)、促黃體激素 α (lutropin alfa)、抗血友病因子(antihemophilic factor)、阿加糖苷酶 β (agalsidase beta)、幹擾素 β -1A (interferon beta-1a)、達貝泊汀 α (darbepoetin alfa)、替奈普酶(tenecteplase)、依那西普(etanercept)、凝血因子IX、促卵泡激素、幹擾素 β -1a、伊米昔酶(imiglucerase)、Dornase α 、依伯汀 α (epoetin alfa)、胰島素或胰島素類似物、美卡舍明(mecasermin)、因子VIII、因子VIIa、抗凝血酶III、蛋白C、人白蛋白、促紅細胞生成素、粒細胞集落刺激因子、粒細胞巨噬細胞集落刺激因子、白細胞介素-11、拉羅尼酶、idursuphase、galsulphase、 α -1-蛋白酶抑制劑、乳糖酶、腺苷脫氨酶、組織纖維蛋白溶酶原活化劑、促甲狀腺素 α (例如、Thyrogen®)和阿替普酶。可通過本方法產生的重組蛋白的另外的實例包括酸性 α 葡糖苷酶、阿葡糖苷酶 α 、阿葡糖苷酶 α (例如、Myozyme®和Lumizyme®)、 α -L-艾杜糖苷酶(例如、Aldurazyme®)、艾杜糖醛酸硫酸酯酶(iduronate sulfatase)、乙醯肝素N-硫酸酯酶(heparan N-sulfatase)、半乳糖6-硫酸酯酶、酸性 β 半乳糖苷酶、 β 葡糖醛酸酶、N-乙醯葡糖胺-1-磷酸轉移酶、 α -N-乙醯半乳糖氨酶(α -N-acetylgalactosaminidase)、酸性脂肪酶、溶酶體酸性神經醯胺酶(lysosomal acid ceramidase)、酸性鞘磷脂酶(acid sphingomyelinase)、 β 葡糖苷酶(例如、Cerezyme®和Ceredase®)、半乳糖神經醯胺酶(galactosylceramidase)、 α -半乳糖苷酶-A (例如、Fabrazyme®)、酸 β -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、神經氨酸酶、氨基己糖苷酶A和

氨基己糖苷酶B。

可通過從細胞(例如，哺乳動物細胞)移出或以其他方式物理地分離液體培養基而從液體培養基(例如，第一和/或第二液體培養基)回收分泌的、可溶的重組蛋白。用於從細胞(例如，哺乳動物細胞)移出液體培養基的多種不同的方法是本領域中已知的，包括，例如，離心、過濾、移液和/或抽吸。然後可使用多種生物化學技術包括多種層析術(例如，親和層析、分子篩層析、陽離子交換層析或陰離子交換層析)和/或過濾(例如，分子量截留過濾)而從液體培養基回收和進一步純化分泌的重組蛋白。

收集重組蛋白

一些實施方案還包括收集重組蛋白(例如，本案所述的任何重組蛋白)。在一些實例中，收集包括裂解哺乳動物細胞。在其他實例中，收集可包括從培養基中收集重組蛋白(例如，當進行灌注培養時，第一和第二液體培養基之一或兩者，或者當進行分批培養時第一液體培養基和進料液體培養基之一或兩者)。

在培養實現，例如，大於約 30×10^6 細胞/mL，大於約 32×10^6 細胞/mL，大於約 34×10^6 細胞/mL，大於約 36×10^6 細胞/mL，大於約 38×10^6 細胞/mL，大於約 40×10^6 細胞/mL，大於約 42×10^6 細胞/mL，大於約 44×10^6 細胞/mL，大於約 46×10^6 細胞/mL，大於約 48×10^6 細胞/mL，大於約 50×10^6 細胞/mL，大於約 52×10^6 細胞/mL，大於約 54×10^6 細胞/mL，大於約 56×10^6 細胞/mL，大於約 58×10^6 細胞/mL，大於約 60×10^6 細胞/mL，大於約 62×10^6 細胞/mL，大於約 64×10^6 細胞/mL，大於約 66×10^6 細胞/mL，大於約 68×10^6 細胞/mL，大於約 70×10^6 細胞/mL，大於約 72×10^6 細胞/mL，大於約 74×10^6 細胞/mL，大於約 76×10^6 細胞/mL，大於約 78×10^6 細胞/mL，大於約 80×10^6 細胞/mL，大於約 82×10^6 細胞/mL，大於約 84×10^6 細胞/mL，大於約 86×10^6 細胞/mL，大於約 88×10^6 細胞/mL，大於約 90×10^6 細胞/mL，大於約 92×10^6 細胞/mL，大於約 94×10^6 細胞/mL，大於約 96×10^6 細胞/mL，大於約 98×10^6 細胞/mL，大於約 100×10^6 細胞/mL，大於約 102×10^6 細胞/mL，大於約 104×10^6 細胞/mL，大於約 106×10^6 細胞/mL，大於約 108×10^6 細胞/mL，大於約 110×10^6 細胞/mL，大於約 112×10^6 細胞/mL，大於約 114×10^6 細胞/mL，大於約 116×10^6 細胞/mL，大於約 118×10^6 細胞/mL，大於約 120×10^6 細胞/mL，大於約 122×10^6 細胞/mL，大於約 124×10^6 細胞/mL，大於約 126×10^6 細胞/mL，大於約 128×10^6 細胞/mL，大於約 130×10^6 細胞/mL，大於約 132×10^6

細胞/mL，大於約 134×10^6 細胞/mL，大於約 136×10^6 細胞/mL，大於約 138×10^6 細胞/mL，大於約 140×10^6 細胞/mL，大於約 142×10^6 細胞/mL，大於約 144×10^6 細胞/mL，大於約 146×10^6 細胞/mL，大於約 148×10^6 細胞/mL，大於約 150×10^6 細胞/mL，大於約 152×10^6 細胞/mL，大於約 154×10^6 細胞/mL，大於約 156×10^6 細胞/mL，大於約 158×10^6 細胞/mL，大於約 160×10^6 細胞/mL，大於約 162×10^6 細胞/mL，大於約 164×10^6 細胞/mL，大於約 166×10^6 細胞/mL，大於約 168×10^6 細胞/mL，大於約 170×10^6 細胞/mL，大於約 172×10^6 細胞/mL，大於約 174×10^6 細胞/mL，大於約 176×10^6 細胞/mL，大於約 178×10^6 細胞/mL，大於約 180×10^6 細胞/mL，大於約 182×10^6 細胞/mL，大於約 184×10^6 細胞/mL，大於約 186×10^6 細胞/mL，大於約 188×10^6 細胞/mL，大於約 190×10^6 細胞/mL，大於約 192×10^6 細胞/mL，大於約 194×10^6 細胞/mL，大於約 196×10^6 細胞/mL，大於約 198×10^6 細胞/mL，或者大於約 200×10^6 細胞/mL)的活細胞密度後可進行收集。

配製重組蛋白

本案所述的任何方法的一些實施方案還包括將重組蛋白(例如，收集的重組蛋白)配製成藥物組合物的步驟。例如，配製可包括將藥學上可接受的賦形劑添加至重組蛋白(例如，收集的重組蛋白)。配製可包括將藥學上可接受的賦形劑與重組蛋白(例如，收集的重組蛋白)混合。藥物可接受的賦形劑(例如，非天然存在的藥物可接受的賦形劑)的實例是本領域已知的。在一些實施方案中，重組蛋白(例如，收集的重組蛋白)經配製用於靜脈內、動脈內、皮下、腹膜內、或肌內施用。

實施例

實施例1. 增加的Poloxamer-188濃度對於產生分泌的重組抗體的灌注細胞培養的作用

進行這組實驗以測試增加的Poloxamer-188濃度對於包含含有編碼重組抗體的核酸的哺乳動物細胞的灌注細胞培養中的細胞生長和重組抗體產生的作用。在這些實驗中，進行第一灌注細胞培養操作，其使用在整個培養期中含有1.8 g/L的CD-CHO培養基，並進行第二灌注細胞培養操作，其使用在培養期中含有增加的poloxamer-188濃度的CD-CHO培養基(在培養期中從1.8 g/L增加至6.8 g/L poloxamer-188)。對於每個細胞培養操作，在培養的12天到33天以4反應器體積

(RV)/天的速率進行灌注，在培養的33天到63天轉換至6 RV/天的速率，並在培養的63天到72天轉換至7 RV/天的速率。使用CD-CHO 培養基進行第二細胞培養操作，所述CD-CHO培養基在培養的0天到14天含有1.8 g/L poloxamer-188，在培養的15天到34天含有2.8 g/L poloxamer-188，在培養的35天到39天含有3.8 g/L poloxamer-188，在培養的40天到56天含有4.8 g/L poloxamer-188，且在培養的57天到72天含有5.8 g/L poloxamer-188。

對於第一和第二灌注培養兩者使用已知方法每天確定活細胞密度、比生長速率、活細胞的百分數、體積生產率和比生產速率。

數據顯示通過在培養中建立大於1.8 g/L的Poloxamer-188濃度實現了超過 100×10^6 細胞/mL的活細胞密度(圖1)。相反，在培養基中僅使用1.8 g/L poloxamer-188的第一細胞培養操作僅實現了 50×10^6 細胞/mL的活細胞密度(圖1)。第二細胞培養操作的數據還顯示：甚至當細胞培養物具有大於 100×10^6 細胞/mL的活細胞密度時，在培養中建立大於1.8 g/L的Poloxamer-188濃度導致穩固的比生長速率(圖2)。圖3中的數據還顯示：與在整個培養期中使用含有1.8 g/L poloxamer-188的培養基的灌注細胞培養操作相比，在培養中建立大於1.8 g/L的Poloxamer-188濃度導致高而且穩定的活細胞百分數(在整個培養期中高於80%)(圖3)。

圖4和5中的數據還顯示：以在培養期中含有增加的poloxamer-188濃度(從1.8 g/L增加至6.8 g/L poloxamer-188)的培養基進行的第二灌注細胞培養操作分別具有高的體積生產速率(大於3 g/L/d)和高的比生產速率(15 pg/細胞/天至42 pg/細胞/天)。

實施例2. 增加的Poloxamer-188濃度對於液體培養基中重組抗體的穩定性的作用

進行一組實驗以確定增加的Poloxamer-188濃度是否會抑制在從細胞培養物收獲後的澄清的液體培養基中存在的重組蛋白的降解。在這些實驗中，進行與實施例1中所述的第二灌注細胞培養操作相似的灌注細胞培養操作，只是在培養實現6.8 g/L的poloxamer-188濃度後，將培養中的Poloxamer-188濃度降低至3.95 g/L poloxamer-188，然後再次降低至3.0 g/L poloxamer-188。在這些實驗中，在如下時間點從培養物移出液體培養基的兩個或三個樣品：當培養物含有6.8 g/L

poloxamer-188時的第一時間點，當培養物含有3.95 g/L poloxamer-188時的第二時間點，和當培養物含有3.0 g/L poloxamer-188時的第三時間點。從每個時間點收集的一個樣品存儲在4°C，從每個時間點收集的一個樣品在存儲於4°C之前在室溫溫育7天，且對於第二和第三時間點中的每個，對樣品補充poloxamer-188以在各樣品中實現6.8 g/L的poloxamer-188濃度，然後將各樣品在存儲於4°C之前在室溫溫育9天。所得的未處理的和處理的樣品在4-20% Bis-Tris凝膠上跑膠並用考馬斯藍(Coomassie Blue)染色。

圖6中的數據顯示：含有6.8 g/L、3.95 g/L或3.0 g/L poloxamer-188的未處理的樣品都顯示相似的產物穩定性(泳道1、2和3)。數據還令人驚訝地顯示：含有6.8 g/L poloxamer-188的樣品在於室溫溫育7天後不顯示大量的降解，而含有3.0 g/L或3.95 g/L poloxamer-188的樣品兩者在相同的溫育後顯示可檢測的降解(圖6；泳道1a、2a和3a)。數據還證明：將poloxamer-188添加至含有低poloxamer-188的樣品不改進產物穩定性(圖6；泳道2b和3b)。這些數據顯示：在培養中使用大於1.8 g/L的poloxamer-188濃度可減少或抑制培養物中重組蛋白的降解，並指示：poloxamer-188可通過提供更健康的細胞培養而實現此效果。

實施例3. 噴霧器孔類型和孔徑對於實現對於細胞培養物生長和產率(Productivity)的有益作用所需的Poloxamer-188量的作用

進行一組實驗以測試噴霧器孔類型和孔徑對於在灌注細胞培養中實現有益的生長和產率性質所需的Poloxamer-188量的作用。在這些實驗中，使用不同的噴霧器進行不同的灌注細胞培養操作：具有20 μm 的孔徑的燒結孔的噴霧器(1反應器)；具有200 μm 的孔徑的鑽孔的噴霧器(2反應器)；或具有500 μm 的孔徑的鑽孔的噴霧器(1反應器)。各灌注培養初始使用含有1.8 g/L poloxamer-188的CD CHO培養基，並以漸增的增量將poloxamer-188添加至培養物以維持細胞存活率並使細胞裂解根據需要最小化。使用已知方法在培養期過程中的不同時間點進行各細胞培養的活細胞密度、比生長速率、比乳酸脫氫酶產生速率、活細胞百分數、體積生產速率和有氧葡萄糖消耗(的測定)。

數據顯示：培養物中3.8 g/L的poloxamer-188濃度能夠在使用具有500 μm 的孔徑的鑽孔的噴霧器進行的灌注細胞培養操作中維持活細胞密度，培養物中4.8 g/L的poloxamer-188濃度能夠在使用具有200 μm 的孔徑的鑽孔的噴霧器進行的

灌注細胞培養操作中維持活細胞密度，且培養物中5.8 g/L的poloxamer-188濃度能夠在使用具有20 μm 的孔徑的燒結孔的噴霧器進行的灌注細胞培養操作中維持活細胞密度(圖7)。

數據還顯示：對於使用3.8 g/L poloxamer-188和具有500 μm 的孔徑的鑽孔的噴霧器進行的灌注細胞培養操作，使用4.8 g/L poloxamer-188和具有200 μm 的孔徑的燒結孔的噴霧器進行的灌注細胞培養操作，和使用5.8 g/L poloxamer-188和具有20 μm 的孔徑的燒結孔的噴霧器進行的灌注細胞培養操作實現了相似的比生長速率(圖8)、比乳糖脫氫酶生產速率(圖9和11)、活細胞百分數(圖10)、體積生產速率(圖12)和有氧葡萄糖消耗速率(圖13)。

數據顯示：當poloxamer-188以大於1.8 g/L的濃度存在於培養物中時，所有測試的噴霧器可用於實現 60×10^6 細胞/mL的活細胞密度。例如，在如下中實現了大於 60×10^6 細胞/mL的活細胞密度：通過在培養物中使用2.8 g/L poloxamer-188使用具有1 mm的孔徑的鑽孔的噴霧器的灌注細胞培養操作，通過在培養物中使用3.8 g/L poloxamer-188使用具有500 μm 的孔徑的鑽孔的噴霧器的灌注細胞培養操作，通過在培養物中使用4.8 g/L poloxamer-188使用具有200 μm 的孔徑的鑽孔的噴霧器的灌注細胞培養操作，通過在培養物中使用3.8 g/L poloxamer-188使用具有100 μm 的孔徑的燒結孔的噴霧器的灌注細胞培養操作，和通過在培養物中使用5.8 g/L poloxamer-188使用具有20 μm 的孔徑的燒結孔的噴霧器的灌注細胞培養操作。數據指示孔徑越小，需要越多的poloxamer-188以維持健康的培養。

實施例4. 噴霧器孔類型、孔徑和消泡劑對Poloxamer-188比例對於灌注培養細胞生長的作用

進行另外的一組實驗以確定在培養中使用具有不同孔類型和孔徑的噴霧器和不同的消泡劑對poloxamer-188比例的灌注培養中的穩態細胞生長(下表1中所示)。

表1中的數據顯示：較小的孔徑要求：需要將較多的消泡劑-c添加至培養物以減輕泡沫的生成，隨著噴霧速率增加需要另外的消泡劑-c，且消泡劑-c對poloxamer-188的最佳比例可為0-5% (例如，約1%至約3%)。

表1. 測試的灌注培養實現的穩態活細胞密度

Exp	噴霧器 類型	穩態活 細胞密 度 (10e ⁶ 細胞 /mL)	另外的普 蘭尼 克 (Pluronic) (g/L) (CD-CHO = 1.8 g/L)	消泡劑 添加速 率 (ppm/ 天)	消泡劑 添加對 總普 蘭尼 克 比例(%/ 天)	噴霧器 速率(氣 體體積/ 分鐘對 反應器 的體積)	消泡劑 添加對 噴霧速 率比例 (ppm)	灌 注 速 率 (RV/ 天)
2	20 μm 鑽孔	60	4	43	0.7	0.03	1	4
1	100 μm 燒結	110	4	160	2.8	0.43	0.26	6
2	200 μm 鑽孔	60	3	77-116	1.6 – 2.4	0.16 – 0.19	0.33 – 0.42	4
2	500 μm 鑽孔	60	2	69	1.8	0.15	0.32	4
1	1 mm 鑽孔	65	1	64	2.3	0.69	0.06	4

實施例5. 消泡劑-C對Poloxamer-188比例對於分批細胞培養操作中的細胞生長的作用

進行了一組實驗以測試消泡劑-c對poloxamer-188比例對於使用CD-CHO培養基的分批搖瓶細胞培養操作中的細胞生長的作用，所述CD-CHO培養基含有0%消泡劑-c對poloxamer-188比例、5.6%消泡劑-c對poloxamer-188比例、11.1%消泡劑-c對poloxamer-188比例、27.8%消泡劑-c對poloxamer-188比例或55.6%消泡劑-c對poloxamer-188比例。對搖瓶細胞培養物加擋板以被動地生成氣泡以刺激生物反應器。使用已知方法在培養期中每天確定每個細胞培養操作中的活細胞密度和比乳酸脫氫酶生產速率。

數據顯示：較低的消泡劑-c對poloxamer-188比例顯示改進的活細胞密度(圖14)和較低的比乳酸脫氫酶生產速率(圖15)。這些數據進一步表明培養中消泡劑-c對poloxamer-188的最佳比例為0-小於約5% (例如，約1%-約3%)。

其他實施方案

可以理解的是雖然以結合其詳細描述描述了本發明，但上述描述意欲說明而

不是限制本發明的範圍，所述範圍由所附請求項的範圍限定。其他的方面、優勢和修飾均在所附請求項的範圍之內。

申請專利範圍

1. 一種培養哺乳動物細胞的方法，該方法包括：

提供培養系統，其包含容器、配置於該容器內的液體培養基和配置在該容器內的噴霧器，該噴霧器包含多個孔，該等孔經配置以將氣體通過該噴霧器分配入該液體培養基；及

在該培養系統中在足夠於該系統中產生重組蛋白的條件和氣體流速下灌注培養包含編碼該重組蛋白的核酸之哺乳動物細胞，其中該培養基包含的 poloxamer-188 濃度係基於孔徑及孔類型選擇，且其中：

(i)當該孔類型為鑽孔且該孔徑為 750 μm 至 1.5 mm 時，選擇的 poloxamer-188 濃度為 2.3 g/L 至 3.3 g/L；

(ii)當該孔類型為鑽孔且該孔徑為 250 μm 至 750 μm 時，選擇的 poloxamer-188 濃度為 3.3 g/L 至 4.3 g/L；

(iii)當該孔類型為鑽孔且該孔徑為 1 μm 至 250 μm 時，選擇的 poloxamer-188 濃度高於 4.3 g/L；

(iv)當該孔類型為燒結孔且該孔徑大於 150 μm 時，選擇的 poloxamer-188 濃度為 1.8 g/L 至 3.3 g/L；

(v)當該孔類型為燒結孔且該孔徑為 80 μm 至 150 μm 時，選擇的 poloxamer-188 濃度為 3.3 g/L 至 4.3 g/L；或

(vi)當該孔類型為燒結孔且該孔徑為 1 μm 至 80 μm 時，選擇的 poloxamer-188 濃度高於 4.5 g/L。

2. 如請求項 1 的方法，其中所選擇的 poloxamer-188 濃度藉由如下達到：在該培養步驟前將 poloxamer-188 添加至該培養基和/或在該培養步驟過程中將 poloxamer-188 添加至該培養基。

3. 如請求項 1 的方法，其中該孔類型為鑽孔，該孔徑為 750 μm 至 1.5 mm，且選擇的 poloxamer-188 濃度為 2.3 g/L 至 3.3 g/L。

4. 如請求項 3 的方法，其中該孔類型為鑽孔，該孔徑為 900 μm 至 1.1 mm，且選擇的 poloxamer-188 濃度為 2.5 g/L 至 3.1 g/L。

5. 如請求項 1 的方法，其中該孔類型為鑽孔，該孔徑為 250 μm 至 750 μm ，且

選擇的 poloxamer-188 濃度為 3.3 g/L 至 4.3 g/L。

6. 如請求項 5 的方法，其中該孔類型為鑽孔，該孔徑為 400 μm 至 600 μm ，且選擇的 poloxamer-188 濃度為 3.5 g/L 至 4.1 g/L。
7. 如請求項 1 的方法，其中該孔類型為鑽孔，該孔徑為 1 μm 至 250 μm ，且選擇的 poloxamer-188 濃度高於 4.3 g/L。
8. 如請求項 7 的方法，其中該孔類型為鑽孔，該孔徑為 1 μm 至 200 μm ，且選擇的 poloxamer-188 濃度高於 4.3 g/L。
9. 如請求項 8 的方法，其中該孔類型為鑽孔，該孔徑為 160 μm 至 190 μm ，且選擇的 poloxamer-188 濃度高於 4.3 g/L。
10. 如請求項 9 的方法，其中該孔類型為鑽孔，該孔徑為 170 μm 至 180 μm 時，且選擇的 poloxamer-188 濃度高於 4.3 g/L。
11. 如請求項 7 至 10 中任一項的方法，其中選擇的 poloxamer-188 濃度高於 5.0 g/L。
12. 如請求項 11 的方法，其中選擇的 poloxamer-188 濃度高於 6.0 g/L。
13. 如請求項 12 的方法，其中選擇的 poloxamer-188 濃度高於 8.0 g/L。
14. 如請求項 13 的方法，其中選擇的 poloxamer-188 濃度高於 10.0 g/L。
15. 如請求項 1 的方法，其中該孔類型為燒結孔，該孔徑大於 150 μm ，且選擇的 poloxamer-188 濃度為 1.8 g/L 至 3.3 g/L。
16. 如請求項 1 的方法，其中該孔類型為燒結孔，該孔徑為 80 μm 至 150 μm ，且選擇濃度為介於 3.3 g/L 至 4.3 g/L 的 poloxamer-188。
17. 如請求項 1 的方法，其中該孔類型為燒結孔，該孔徑為 90 μm 至 110 μm ，且選擇的 poloxamer-188 濃度為 3.5 g/L 至 4.1 g/L。
18. 如請求項 1 的方法，其中該孔類型為燒結孔，該孔徑為 1 μm 至 80 μm ，且選擇的 poloxamer-188 濃度高於 4.5 g/L。
19. 如請求項 18 的方法，其中選擇的 poloxamer-188 濃度高於 5.0 g/L。
20. 如請求項 19 的方法，其中選擇的 poloxamer-188 濃度高於 6.0 g/L。
21. 如請求項 20 的方法，其中選擇的 poloxamer-188 濃度高於 8.0 g/L。
22. 如請求項 21 的方法，其中選擇的 poloxamer-188 濃度高於 10.0 g/L。
23. 如請求項 1 至 10 項中任一項的方法，其中該灌注培養包括：

在攪拌下培育包含第一液體培養基的培養系統且在介於 32°C 至 40°C 的溫度進行至少 7 天的培養期；及

在培養期的首個 48 至 96 小時之後，連續地或周期地移出第一體積的第一液體培養基並向第一液體培養基添加第二體積的第二液體培養基。

24. 如請求項 23 的方法，其中第二液體培養基係包含濃度高於第一液體培養基中 poloxamer-188 的濃度之 poloxamer-188。
25. 如請求項 23 的方法，其中第二液體培養基包含所選擇的 poloxamer-188 濃度。
26. 如請求項 23 的方法，其進一步包括：
從哺乳動物細胞內部、從第一液體培養基或第二液體培養基、或其任何組合收集該重組蛋白。
27. 如請求項 26 的方法，其進一步包括將收集的重組蛋白配製成藥物組合物。
28. 如請求項 1 的方法，其中該容器為灌注生物反應器。
29. 如請求項 28 的方法，其中該灌注生物反應器具有介於 1.5 L 至 25,000 L 的體積。
30. 如請求項 23 的方法，其中該培養期係大於 10 天。
31. 如請求項 23 的方法，其中移出第一體積的第一液體培養基和添加第二體積的第二液體培養基是連續進行的。
32. 如請求項 23 的方法，其中移出第一體積的第一液體培養基和添加第二體積的第二液體培養基是周期性進行的。
33. 如請求項 23 的方法，其中移出的第一體積的第一液體培養基和添加的第二體積的第二液體培養基隨時間增加。
34. 如請求項 23 的方法，其中該第一液體培養基和/或該第二液體培養基係選自由以下組成之群組：化學成分確定的液體培養基、無血清液體培養基、含有血清的液體培養基、無動物衍生組分的液體培養基、和無蛋白的培養基。
35. 如請求項 23 的方法，其中在時間期的首個 48 至 96 小時後，在每 24-小時時間中，移出的第一體積的第一液體培養基和添加的第二體積的第二液體培養基係為第一液體培養基體積或容器體積的 0.3x 至 10x。
36. 如請求項 1 至 10 中任一項的方法，其中該哺乳動物細胞為中國倉鼠卵巢

(CHO)細胞、人胚胎腎(HEK)細胞、NSO 細胞、幼倉鼠腎(BHK)細胞、PerC6 細胞、Vero 細胞、或 HT-1080 細胞系。

37. 如請求項 1 至 10 中任一項的方法，其中該重組蛋白為免疫球蛋白、酶、生長因子、蛋白片段、或工程改造的蛋白。

圖式

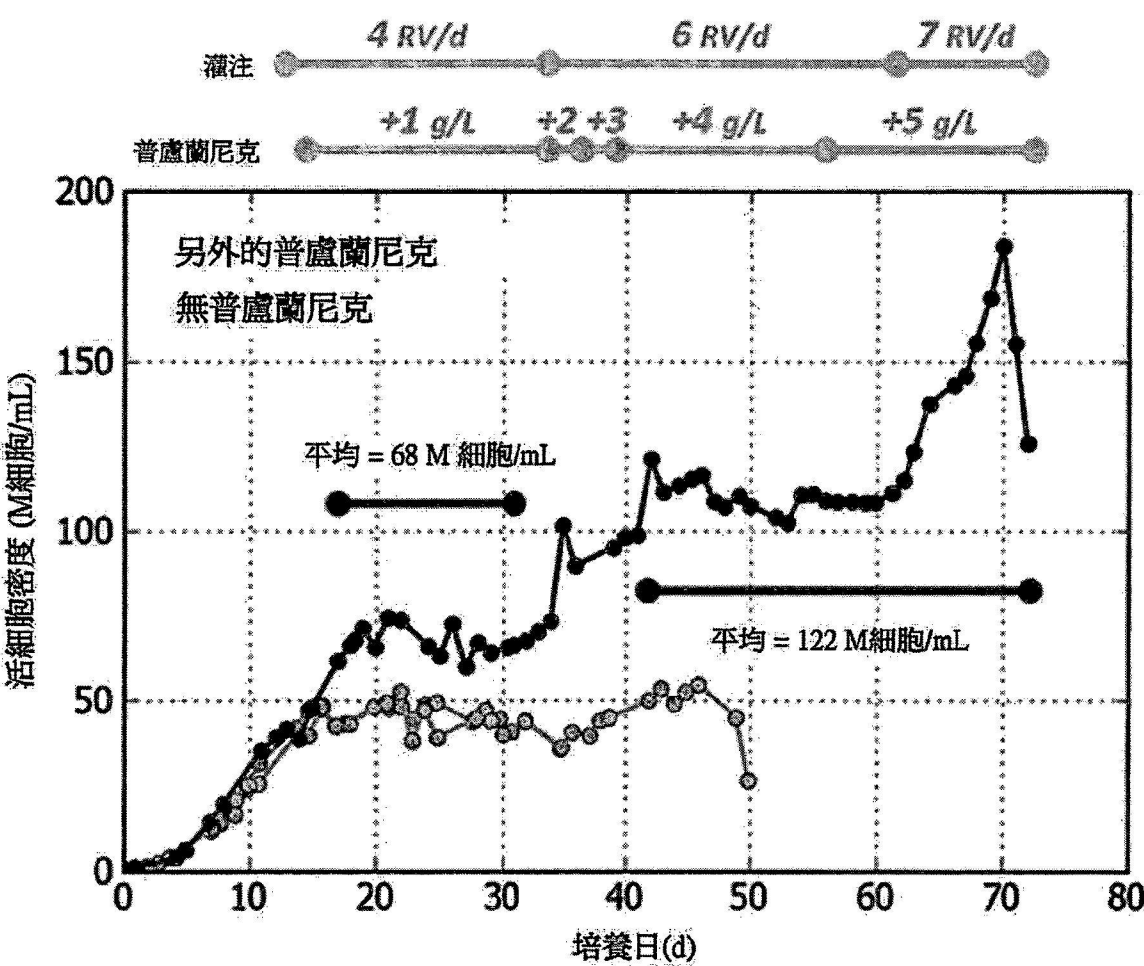


圖 1

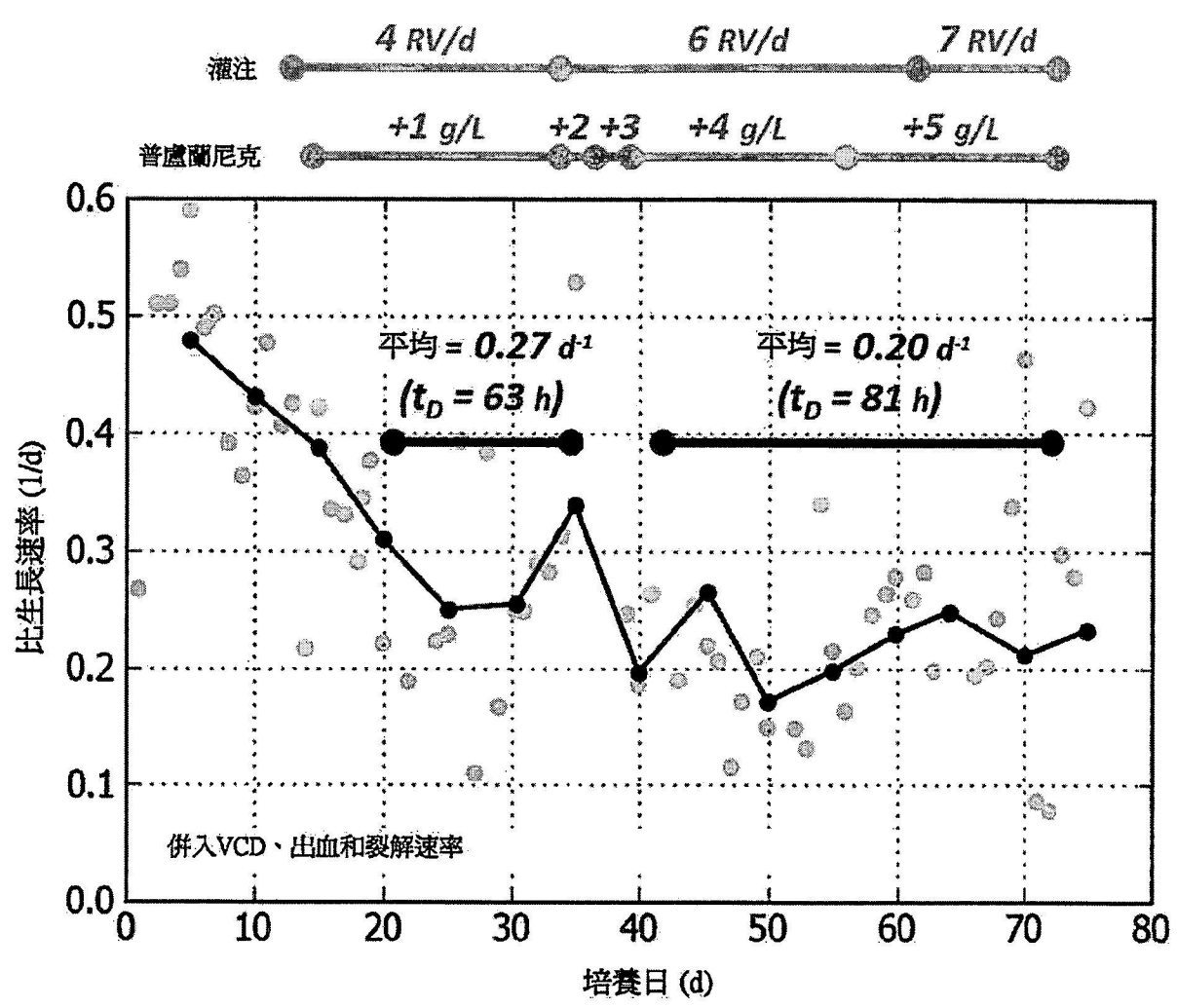


圖 2

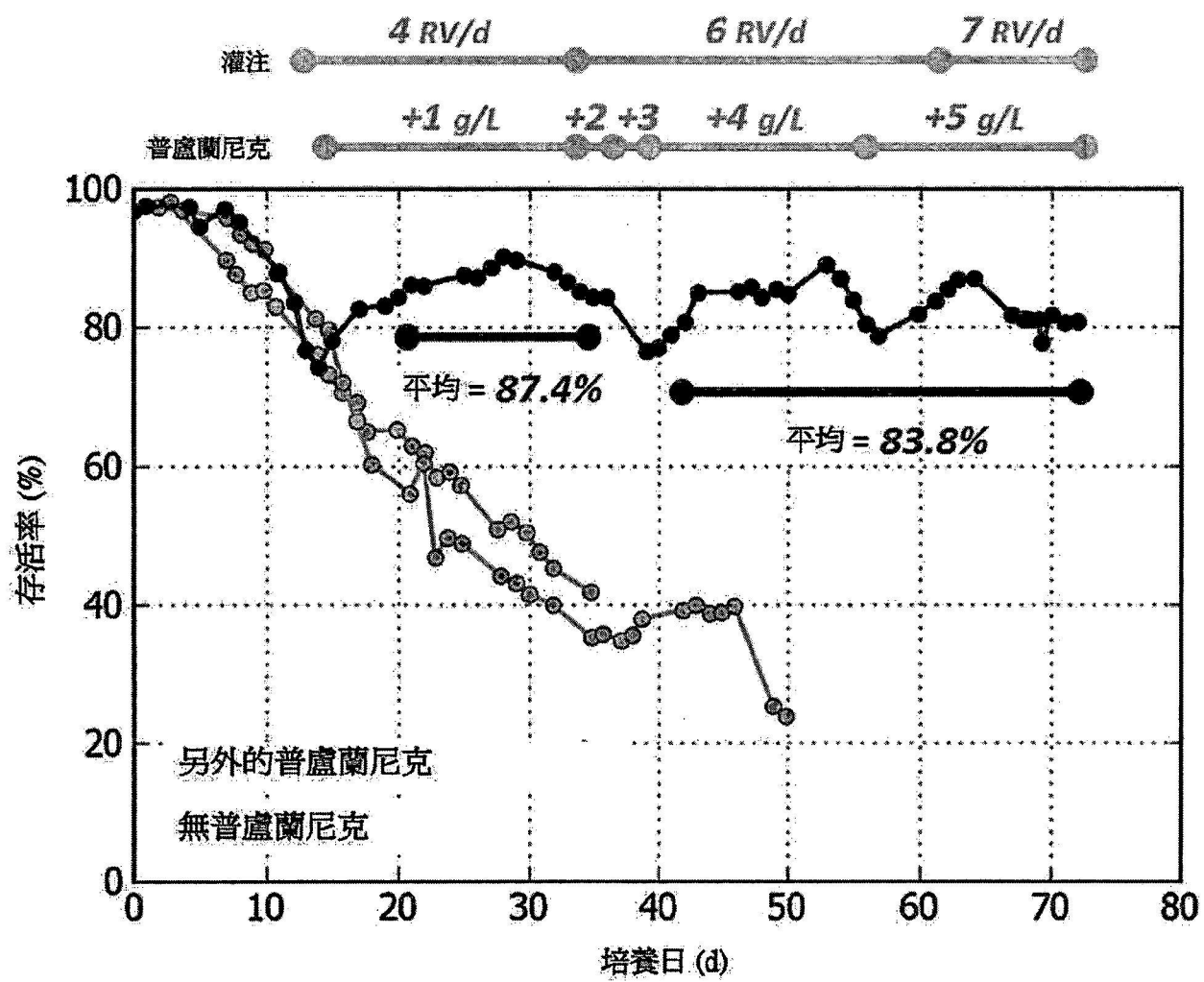


圖 3

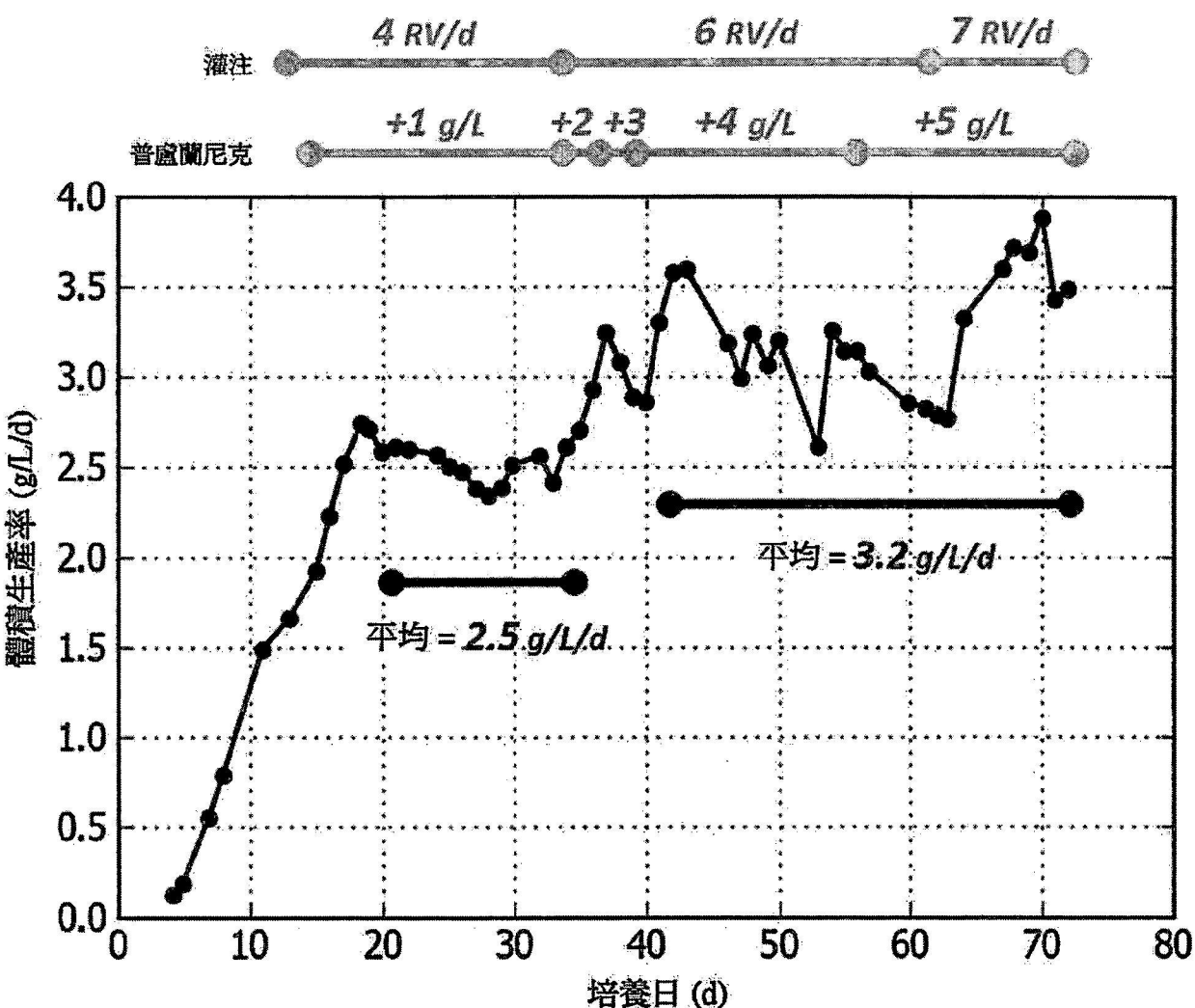


圖 4

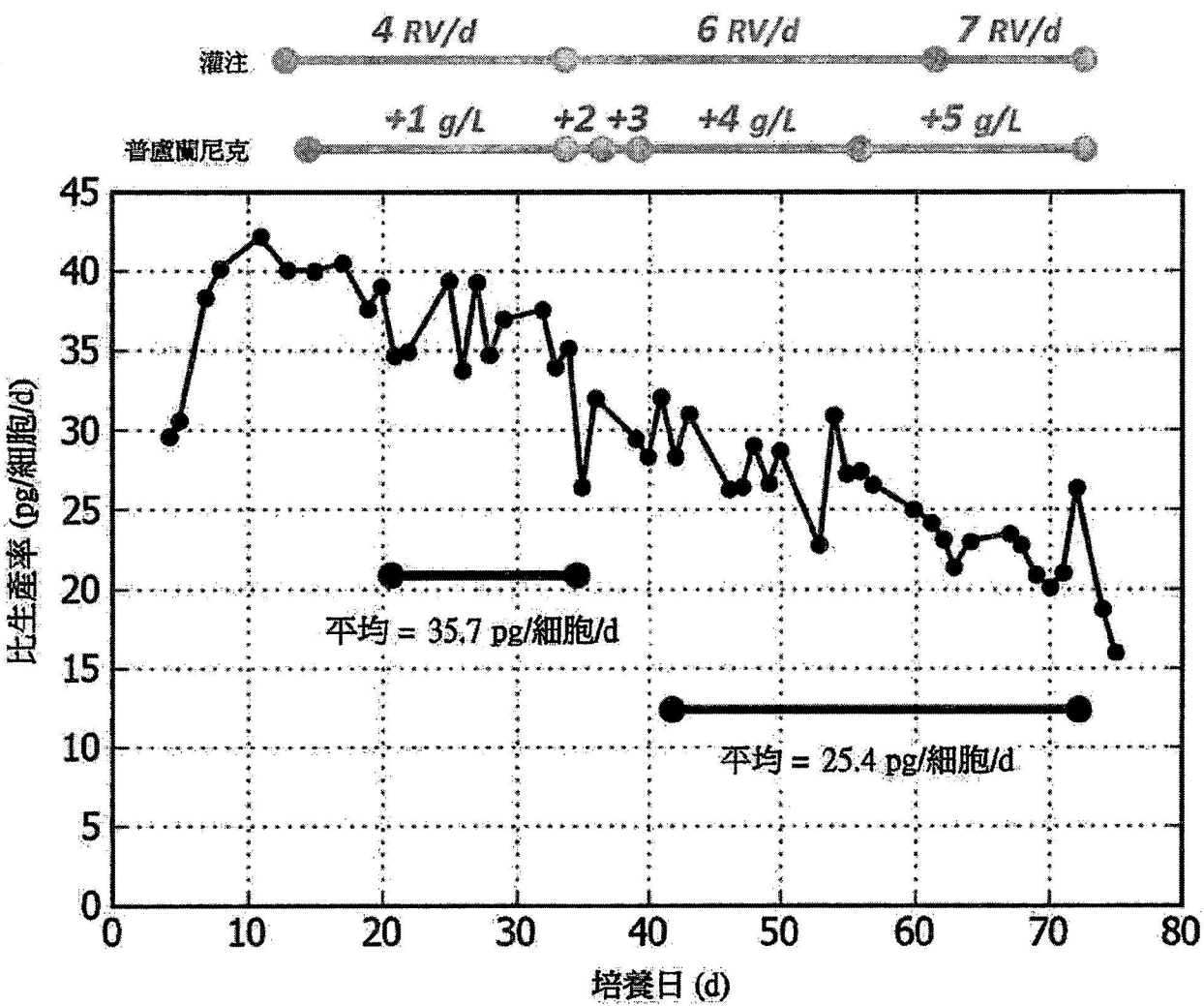


圖 5

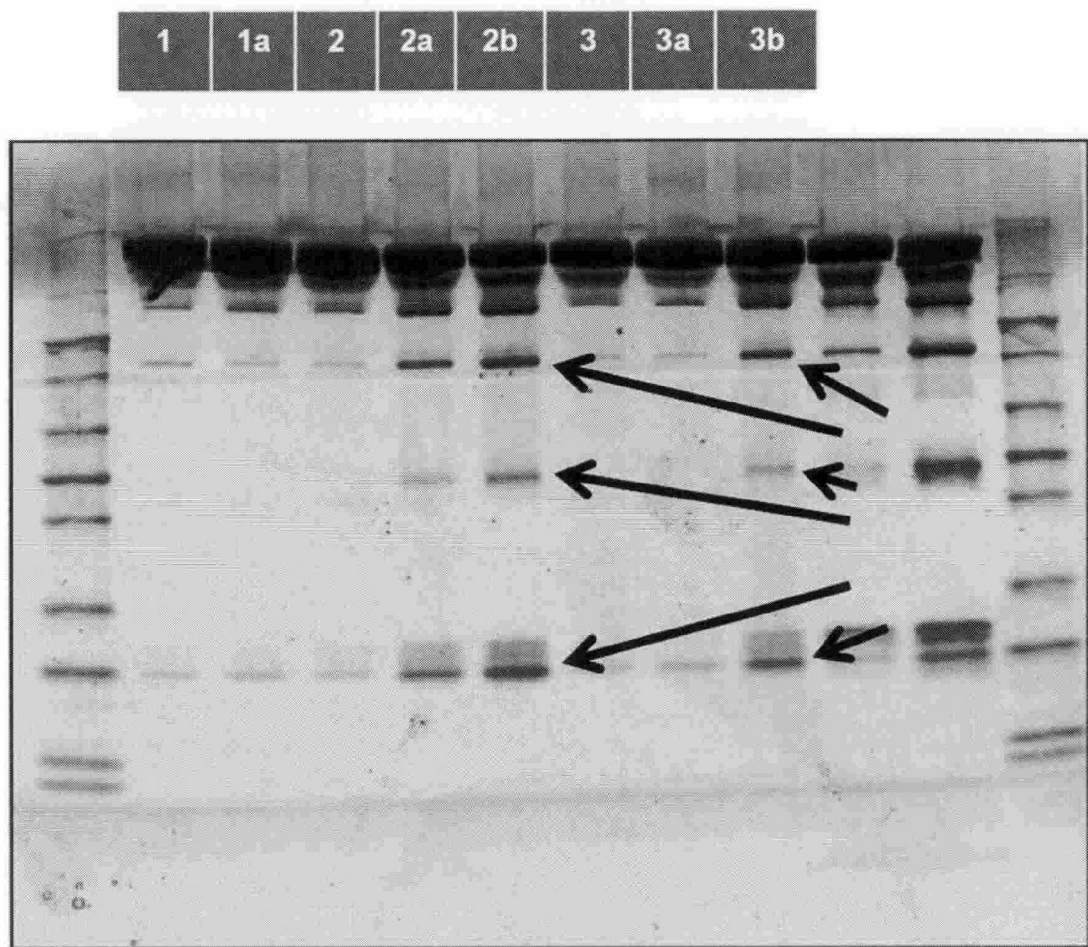


圖 6

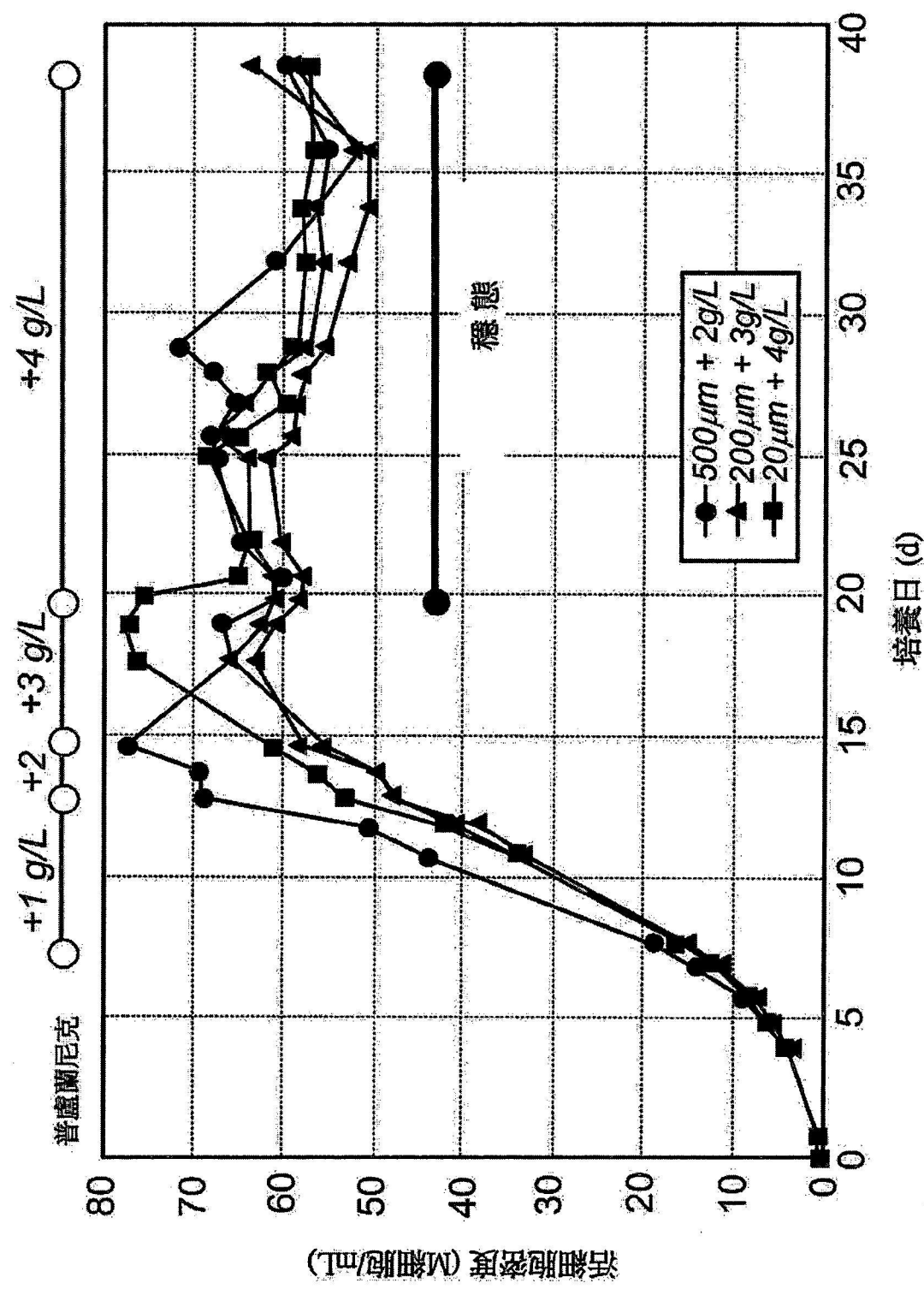


圖 7

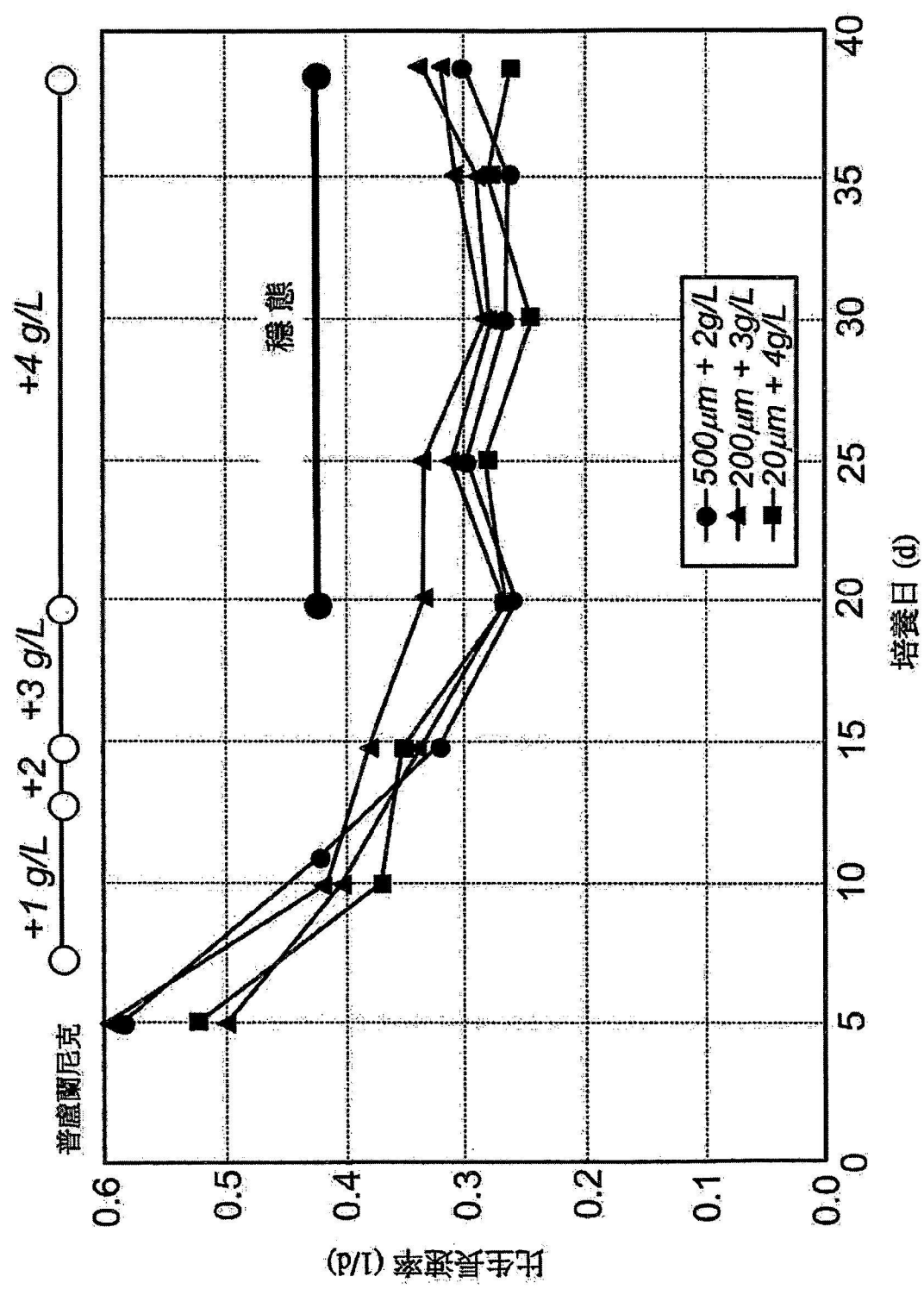


圖 8

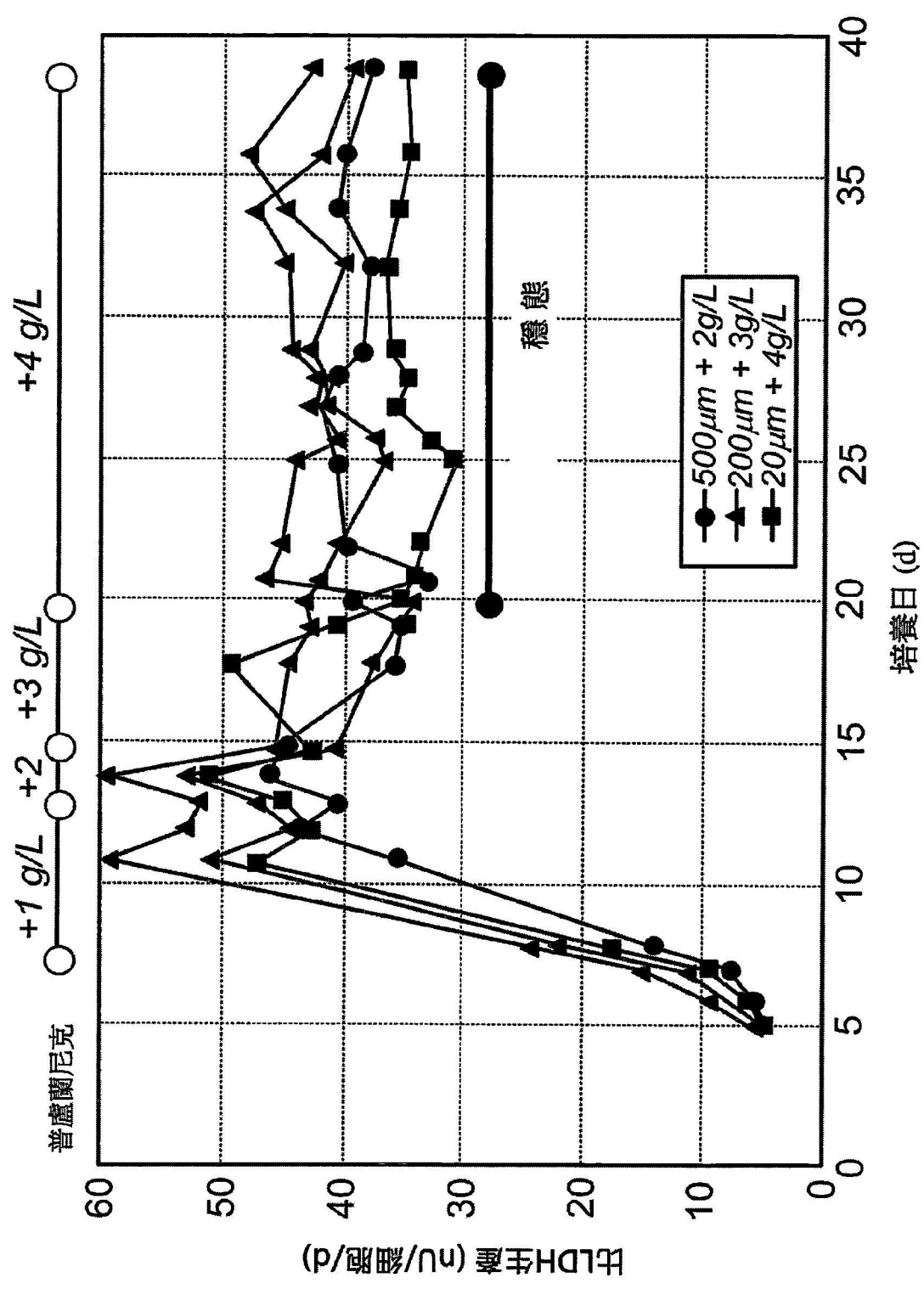


圖 9

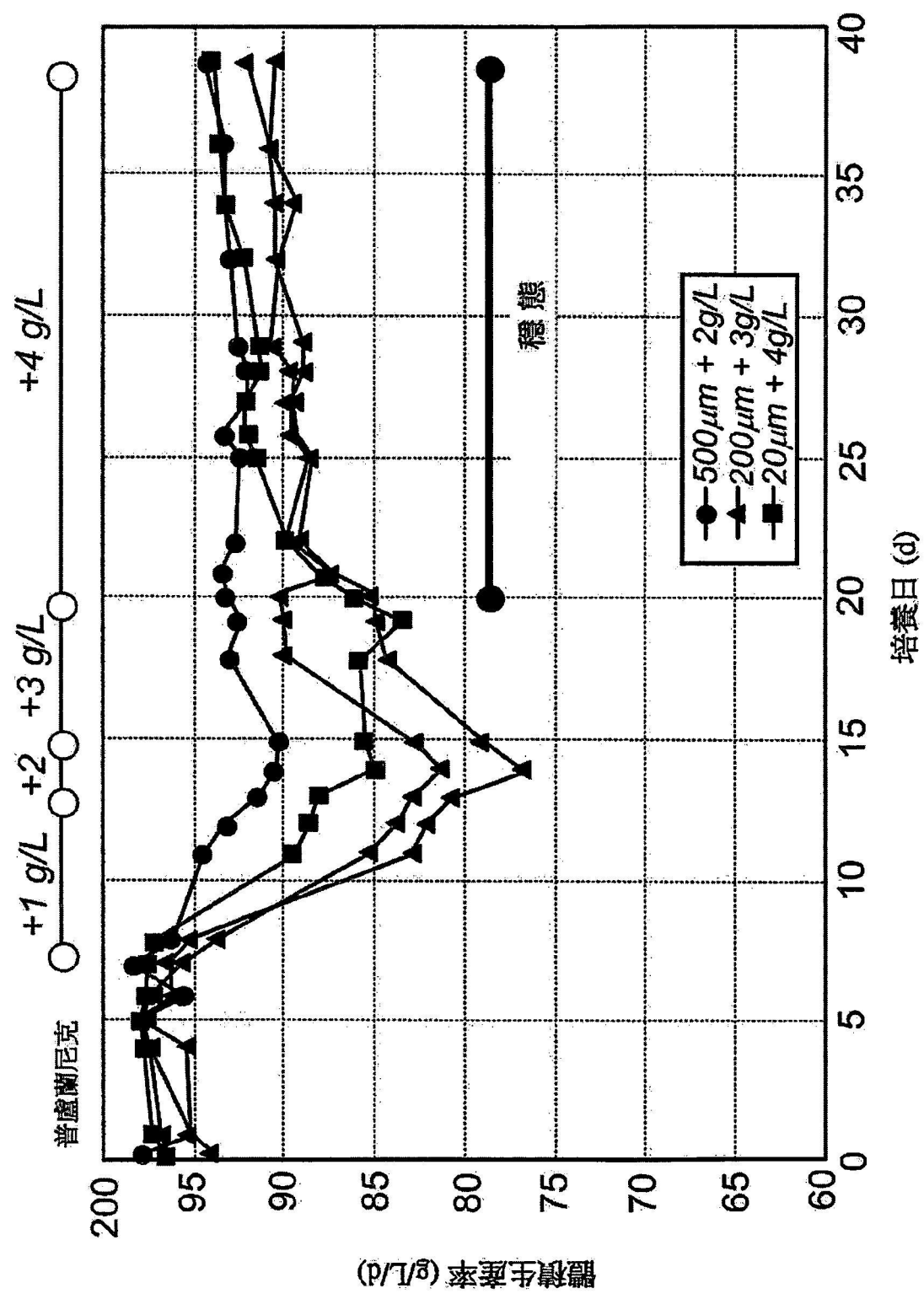


圖 10

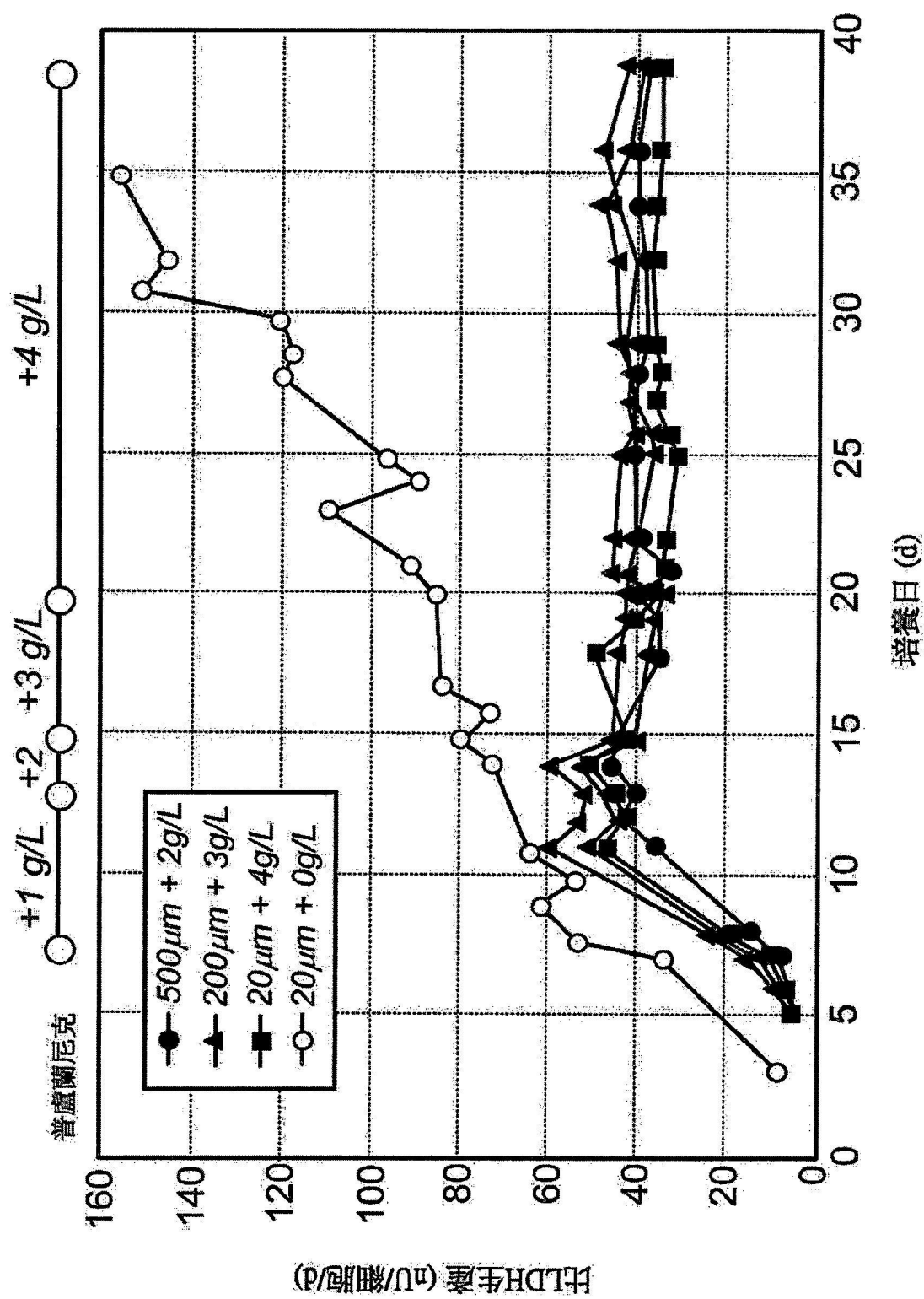


圖 11

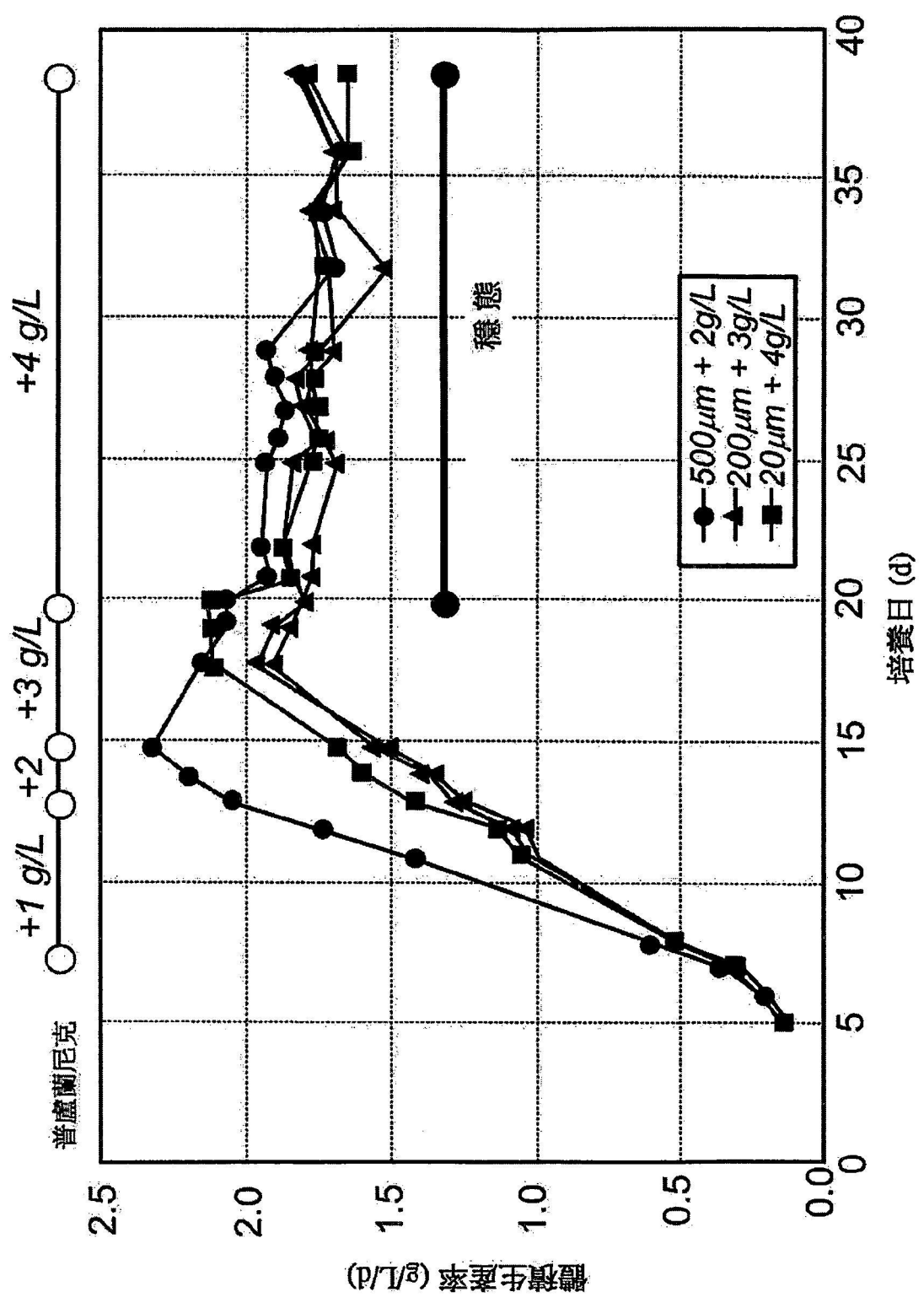


圖 12

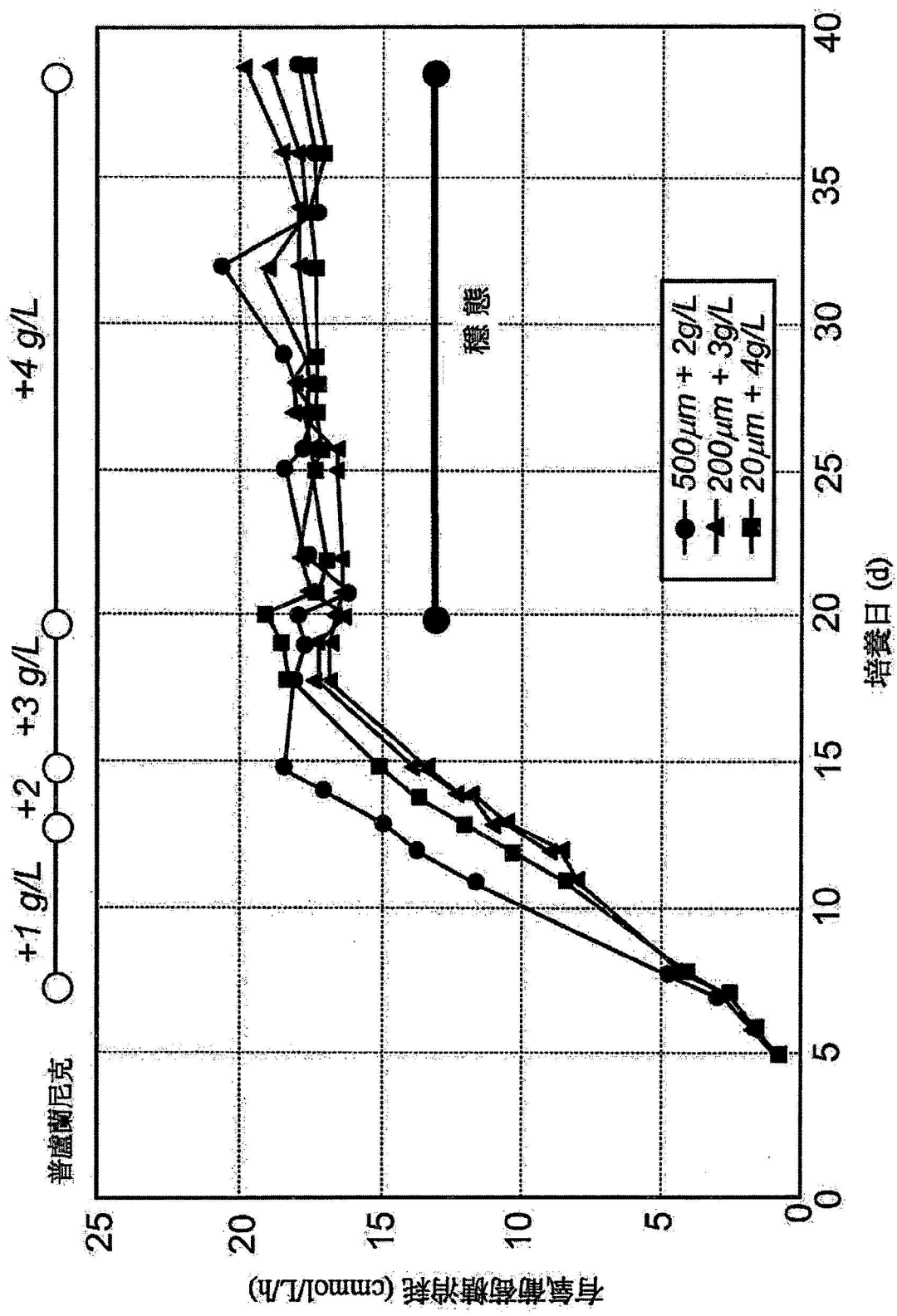


圖 13

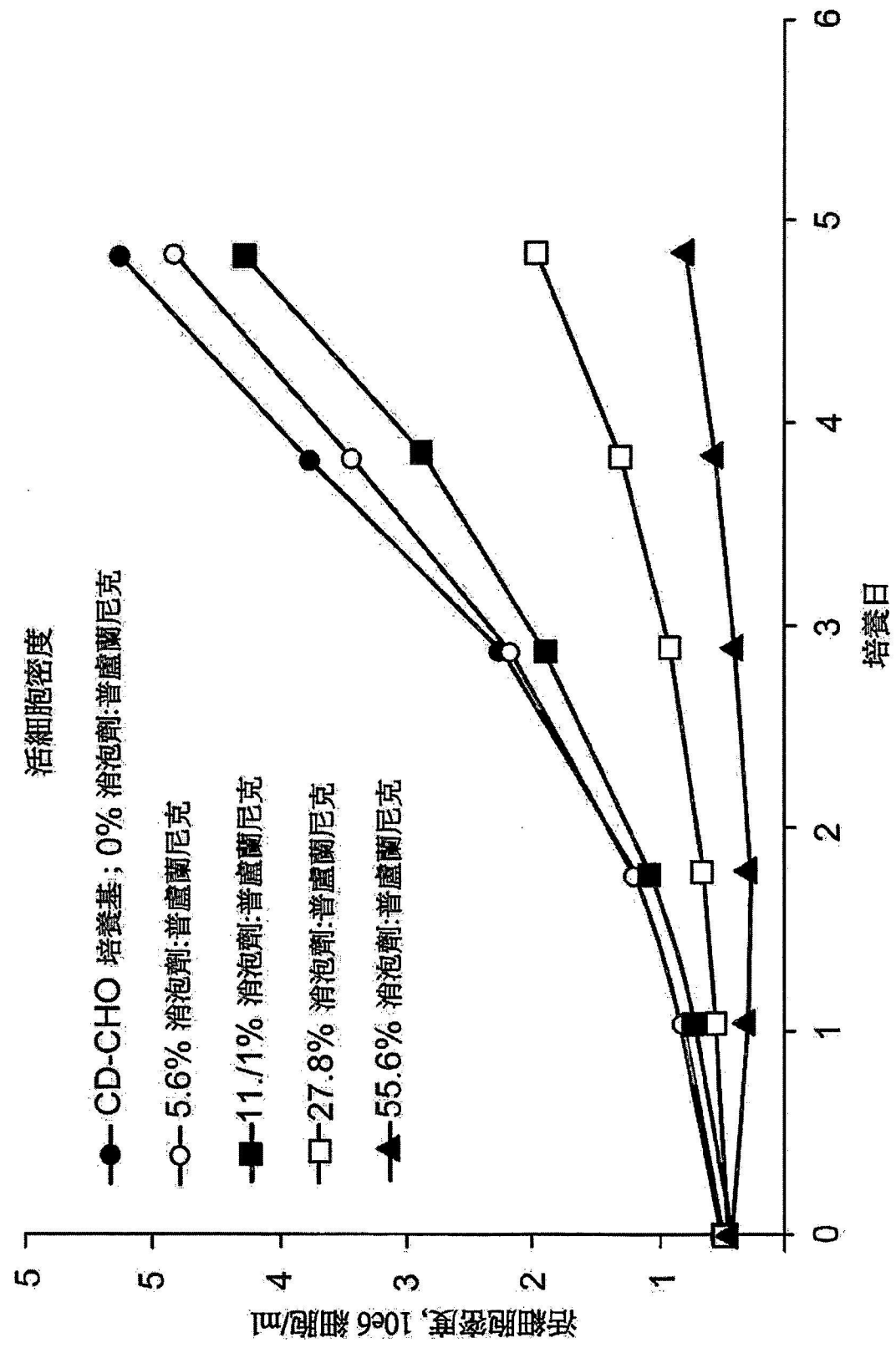


圖 14

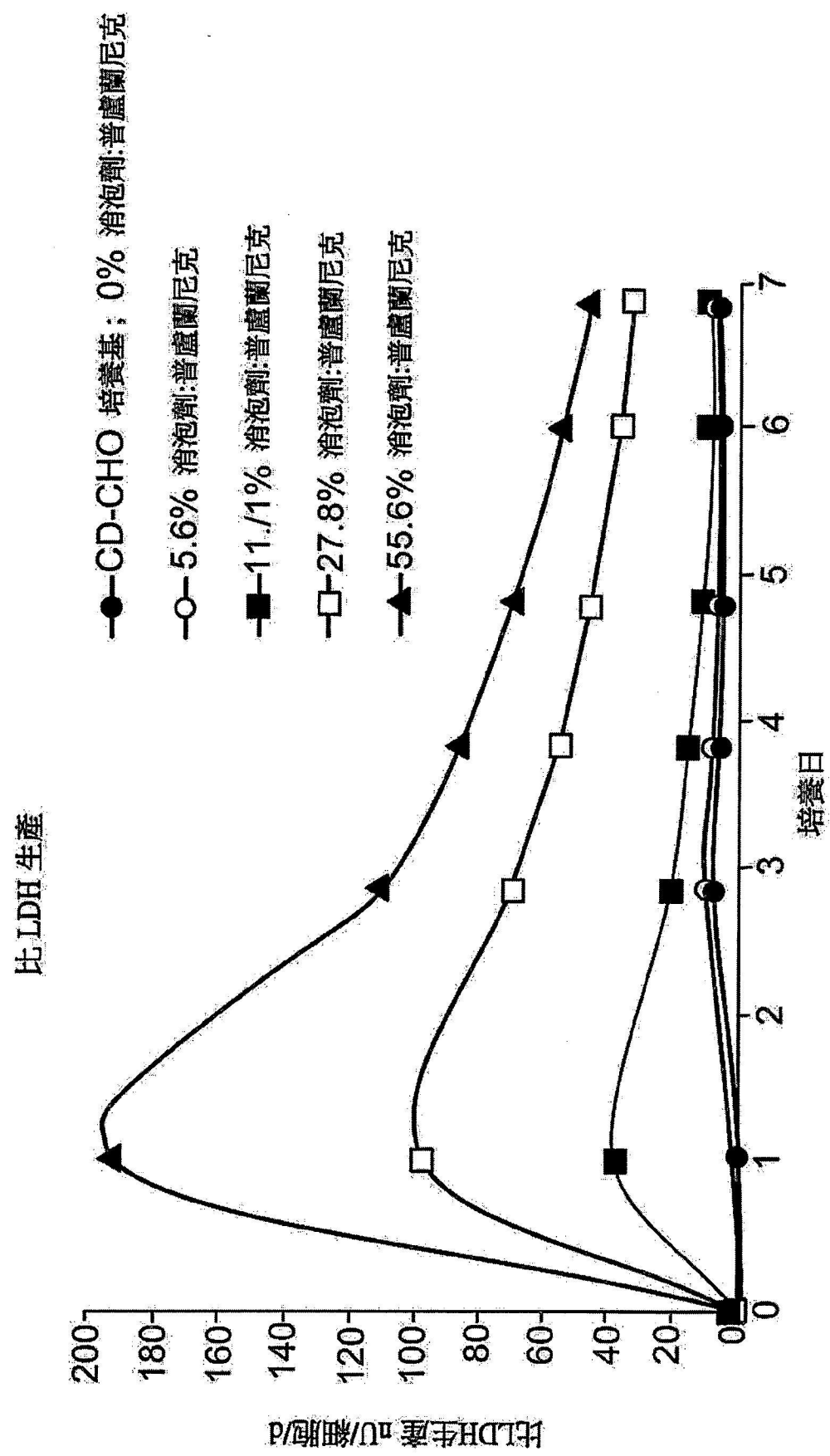


圖 15