República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020018823-9 A2

(22) Data do Depósito: 15/03/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 09/02/2021

(54) Título: MÉTODOS PARA APERFEIÇOAR VIABILIDADE DE CÉLULA EM UM BIORREATOR DE PRODUÇÃO

(51) Int. Cl.: G01N 33/50; C12M 1/34.

(30) Prioridade Unionista: 16/03/2018 US 62/644,339; 20/03/2018 US 62/645,755.

(71) Depositante(es): GENZYME CORPORATION.

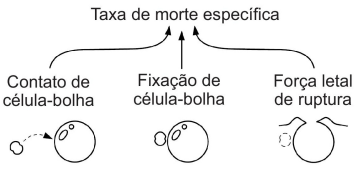
(72) Inventor(es): JONATHAN WANG; NEHA SHAH; JASON WALTHER; JIUYI LU; TIMOTHY JOHNSON; YUKUN REN; JEAN MCLARTY.

(86) Pedido PCT: PCT US2019022530 de 15/03/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/178508 de 19/09/2019

(85) Data da Fase Nacional: 15/09/2020

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a métodos para predizer o efeito de uma concentração de um sensibilizador sobre a viabilidade de célula em um biorreator de produção, métodos de aperfeiçoar a viabilidade de célula em um biorreator de produção, métodos de predizer a viabilidade de célula em um biorreator de produção, e métodos para cultivar uma célula em um biorreator de produção.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODOS PARA APERFEIÇOAR VIABILIDADE DE CÉLULA EM UM BIORREATOR DE PRODUÇÃO".**

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELATIVOS

[0001] Este pedido reivindica prioridade para o Pedido de Patente Provisória U.S. Número de Série 62/644.339 depositado em 16 de março de 2018, e Pedido de Patente Provisória U.S. Número de Série 62/645.755 depositado em 20 de março de 2018; o conteúdo inteiro de cada um destes pedidos está no presente documento incorporado por referência.

CAMPO DA TÉCNICA

[0002] Esta descrição é relativa a métodos para aperfeiçoar viabilidade de célula em um biorreator de produção e aos campos de biotecnologia e biologia de célula.

ANTECEDENTES

[0003] A intensificação de processo provê muitas vantagens para a produção de proteínas terapêuticas recombinantes. Uma das estratégias para intensificação de processo é manter altas densidades de células para aperfeiçoar a produção de proteína recombinante, o que ainda requer uma alta demanda de oxigênio. A aspersão de oxigênio em um biorreator de produção leva à espumação dentro do biorreator de produção. A espumação frequentemente ocorre em processos tanto de lote alimentado intensificado quanto de perfusão. Assim, agentes antiespumantes são usualmente adicionados nestes processos. No entanto, a adição e a acumulação de agentes antiespumantes podem fazer as células tornarem-se sensíveis ao cisalhamento, levando a uma morte de células aumentada.

[0004] Assim, existe uma necessidade de desenvolver um modelo para caracterizar condições de cultura de células aceitáveis em um biorreator de produção entre vários parâmetros de cultura de células,

por exemplo, cisalhamento, componentes de meios e aditivos, e concentração de antiespumante.

SUMÁRIO

[0005] A presente invenção está baseada, por exemplo, na descoberta que os métodos presentemente reivindicados que utilizam dados obtidos em recipiente de cultura de teste (por exemplo, um frasco de agitação com defletor) podem ser utilizados para precisamente predizer o efeito de uma concentração de um sensibilizador sobre a viabilidade de célula em um biorreator de produção, precisamente selecionar uma condição que é ótima para a viabilidade de célula em um biorreator de produção, predizer viabilidade de célula em um biorreator de produção, e precisamente identificar um conjunto de condições que pode ser utilizado para cultivar uma célula em um biorreator de produção.

[0006] Em um aspecto, a descrição está relacionada a métodos de predizer o efeito de uma concentração de um sensibilizador sobre viabilidade de célula em um biorreator de produção. Os métodos envolvem (a) determinar a viabilidade de célula sob uma pluralidade de condições de teste em um recipiente de cultura de teste, em que a pluralidade de condições de teste é definida por um conjunto de parâmetros; e (b) com base na viabilidade de célula no recipiente de cultura de teste sob a pluralidade de condições, predizer o efeito de uma concentração de um sensibilizador sobre viabilidade de célula em um biorreator de produção.

[0007] Em algumas modalidades, o conjunto de parâmetros compreende tensão de cisalhamento, concentração do sensibilizador, e concentração de um protetor.

[0008] Em algumas modalidades, a pluralidade de condições de teste é selecionada com base em rastreio fatorial total e/ou projeto de composto de centro inscrito.

[0009] Em algumas modalidades, o sensibilizador é um agente antiespumante.

[0010] Em algumas modalidades, o antiespumante é um antiespumante baseado em polidimetilsiloxano, ou simeticona.

[0011] Em algumas modalidades, o recipiente de cultura de teste tem um volume de aproximadamente 5 mL a aproximadamente 5 L, ou tem um volume de aproximadamente 10 mL a aproximadamente 500 mL. Em algumas modalidades, o recipiente de cultura de teste é um frasco de agitação com defletor.

[0012] Em algumas modalidades, o biorreator de produção tem um volume de aproximadamente 5 L a aproximadamente 20.000 L, ou tem um volume de aproximadamente 50 L a aproximadamente 10.000 L. Em algumas modalidades, o biorreator de produção é um biorreator de perfusão ou um biorreator de lote alimentado.

[0013] Em algumas modalidades, os métodos ainda compreendem cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma concentração do sensibilizador predita para ter uma taxa de morte de células específica menor do que 40% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

[0014] Em algumas modalidades, os métodos ainda compreendem cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma concentração do sensibilizador predita para ter uma taxa de morte de células específica menor do que 20% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

[0015] Em algumas modalidades, os métodos ainda compreendem cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma concentração do sensibilizador predita para resultar em uma produção de LDH específica de célula menor do que 150 nU/célula/dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

[0016] Em algumas modalidades, os métodos ainda compreendem

cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma concentração do sensibilizador predita para resultar em uma produção de LDH específica de célula menor do que 100 nU/célula/dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

[0017] Em algumas modalidades, os métodos ainda compreendem cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma concentração do sensibilizador predita para resultar em uma taxa de crescimento aparente maior do que 1% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

[0018] Em algumas modalidades, os métodos ainda compreendem cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma concentração do sensibilizador predita para resultar em uma taxa de crescimento aparente maior do que 5% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

[0019] Em algumas modalidades, a célula contém um ácido nucleico que codifica uma proteína terapêutica recombinante.

[0020] Em algumas modalidades, os métodos ainda compreendem coletar a proteína terapêutica recombinante. Em algumas modalidades, os métodos ainda compreendem purificar a proteína terapêutica recombinante. Em algumas modalidades, os métodos ainda compreendem formular a proteína terapêutica recombinante purificada.

[0021] Em algumas modalidades, a célula é uma bactéria, um fermento, ou uma célula de mamífero.

[0022] Em algumas modalidades, a viabilidade de célula é determinada medindo uma concentração de desidrogenase de ácido láctico (LDH) no recipiente de cultura de teste.

[0023] Em algumas modalidades, o recipiente de cultura de teste é um frasco de agitação com defletor e a pluralidade de condições de teste compreende um ou mais de:

(a) uma agitação rotativa de aproximadamente 125 RPM a aproximadamente 400 RPM;

(b) uma concentração do sensibilizador de aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 5000 ppm; e

(c) uma concentração de um protetor que é aproximadamente 1 g/L a aproximadamente 10 g/L.

[0024] Em algumas modalidades, o protetor é um poloxamer, uma poloxamina, ou um poliol plurônico.

[0025] Em algumas modalidades, o poloxamer é poloxamer-188, poloxamer-401, poloxamer-402, ou poloxamer-407.

[0026] Em algumas modalidades, a poloxamina é poloxamina-904 ou poloxamina-908.

[0027] Em outro aspecto, a descrição está relacionada a métodos de aperfeiçoar viabilidade de célula em um biorreator de produção. Os métodos envolvem

a) determinar a viabilidade de célula sob uma pluralidade de condições de teste em um recipiente de cultura de teste, em que a pluralidade de condições é definida por um conjunto de parâmetros;

(b) com base na viabilidade de célula no recipiente de cultura de teste sob a pluralidade de condições, selecionar uma condição que é ótima para a viabilidade de célula em um biorreator de produção; e

(c) cultivar uma célula no biorreator de produção sob a condição selecionada.

[0028] Em algumas modalidades, o conjunto de parâmetros compreende tensão de cisalhamento, concentração de um sensibilizador, e concentração de um protetor.

[0029] Em algumas modalidades, a pluralidade de condições de teste é selecionada com base em rastreio fatorial total e/ou projeto de composto de centro inscrito.

[0030] Em algumas modalidades, o sensibilizador é um agente antiespumante. Em algumas modalidades, o antiespumante é um antiespumante baseado em polidimetilsiloxano ou simeticona.

[0031] Em algumas modalidades, o recipiente de cultura de teste tem um volume de aproximadamente 5 mL a aproximadamente 5 L.

[0032] Em algumas modalidades, o recipiente de cultura de teste tem um volume de aproximadamente 10 mL a aproximadamente 500 mL. Em algumas modalidades, o recipiente de cultura de teste é um frasco de agitação com defletor.

[0033] Em algumas modalidades, o biorreator de produção tem um volume de aproximadamente 5 L a aproximadamente 20.000 L. Em algumas modalidades, o biorreator de produção tem um volume de aproximadamente 50 L a aproximadamente 10.000 L. Em algumas modalidades, o biorreator de produção é um biorreator de perfusão ou a biorreator de lote alimentado.

[0034] Em algumas modalidades, a etapa (c) resulta em uma taxa de morte de células específica menor do que 40% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção. Em algumas modalidades, a etapa (c) resulta em uma taxa de morte de células específica menor do que 20% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção. Em algumas modalidades, a etapa (c) resulta em uma produção de LDH específica de célula menor do que 150 nU/célula/dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção. Em algumas modalidades, a etapa (c) resulta em uma produção de LDH específica de célula menor do que 100 nU/célula/dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção. Em algumas modalidades, a etapa (c) resulta em uma taxa de crescimento aparente maior do que 1% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção. Em algumas modalidades, a etapa (c) resulta em uma taxa de crescimento aparente maior do que 5% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

[0035] Em algumas modalidades, a célula contém um ácido nucleico que codifica uma proteína terapêutica recombinante.

[0036] Em algumas modalidades, os métodos ainda compreendem coletar a proteína terapêutica recombinante. Em algumas modalidades, os métodos ainda compreendem purificar a proteína terapêutica recombinante. Em algumas modalidades, os métodos ainda compreendem formular a proteína terapêutica recombinante purificada.

[0037] Em algumas modalidades, a célula é uma bactéria, um fermento, ou uma célula de mamífero. Em algumas modalidades, a viabilidade de célula é determinada medindo uma concentração de desidrogenase de ácido láctico (LDH) no recipiente de cultura de teste.

[0038] Em algumas modalidades, o recipiente de cultura de teste é um frasco de agitação com defletor e a pluralidade de condições de teste compreende um ou mais de:

(a) uma agitação rotativa de aproximadamente 125 RPM a aproximadamente 400 RPM;

(b) a concentração de um sensibilizador de aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 5000 ppm; e

(c) a concentração de um protetor que é aproximadamente 1 g/L a aproximadamente 10 g/L.

[0039] Em algumas modalidades, o protetor é um poloxamer, uma poloxamina, ou um poliol plurônico. Em algumas modalidades, o poloxamer é poloxamer-188, poloxamer-401, poloxamer-402, ou poloxamer-407. Em algumas modalidades, a poloxamina é poloxamina-904 ou poloxamina-908.

[0040] Em outro aspecto, a descrição é relativa a métodos para predizer a viabilidade de célula em um biorreator de produção. Os métodos envolvem

(a) selecionar um conjunto de parâmetros que compreende pelo menos dois parâmetros;

(b) determinar a viabilidade de célula sob uma pluralidade de condições de teste como definida pelo conjunto de parâmetros em um recipiente de cultura de teste; e

(c) com base na viabilidade de célula no recipiente de cultura de teste sob a pluralidade de condições, predizer a viabilidade de célula no biorreator de produção.

[0041] Em algumas modalidades, o conjunto de parâmetros compreende tensão de cisalhamento, concentração de um sensibilizador, e concentração de um protetor.

[0042] Em algumas modalidades, a pluralidade de condições de teste é selecionada com base em rastreio fatorial total e/ou projeto de composto de centro inscrito.

[0043] Em algumas modalidades, o sensibilizador é um agente antiespumante.

[0044] Em algumas modalidades, o antiespumante é um antiespumante baseado em polidimetilsiloxano. Em algumas modalidades, o antiespumante é simeticona.

[0045] Em algumas modalidades, o recipiente de cultura de teste tem um volume de aproximadamente 5 mL a aproximadamente 5 L.

[0046] Em algumas modalidades, o recipiente de cultura de teste tem um volume de aproximadamente 10 mL a aproximadamente 500 mL.

[0047] Em algumas modalidades, o recipiente de cultura de teste é um frasco de agitação com defletor.

[0048] Em algumas modalidades, o biorreator de produção tem um volume de aproximadamente 5 L a aproximadamente 20.000 L, ou tem um volume de aproximadamente 50 L a aproximadamente 10.000 L.

[0049] Em algumas modalidades, o biorreator de produção é um biorreator de perfusão ou a biorreator de lote alimentado.

[0050] Em algumas modalidades, os métodos ainda compreendem

cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma condição predita para resultar em uma taxa de morte de células específica menor do que 40% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

[0051] Em algumas modalidades, os métodos ainda compreendem cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma condição predita para resultar em uma taxa de morte de células específica menor do que 20% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

[0052] Em algumas modalidades, os métodos ainda compreendem cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma condição predita para resultar em uma produção de LDH específica de célula menor do que 150 nU/célula/dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

[0053] Em algumas modalidades, os métodos ainda compreendem cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma condição predita para resultar em uma produção de LDH específica de célula menor do que 100 nU/célula/dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

[0054] Em algumas modalidades, os métodos ainda compreendem cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma condição predita para resultar em uma taxa de crescimento aparente maior do que 1% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

[0055] Em algumas modalidades, os métodos ainda compreendem cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma condição predita para resultar em uma taxa de crescimento aparente maior do que 5% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

[0056] Em algumas modalidades, a célula contém um ácido nucleico que codifica uma proteína terapêutica recombinante.

[0057] Em algumas modalidades, os métodos ainda compreendem coletar a proteína terapêutica recombinante. Em algumas modalidades, os métodos ainda compreendem purificar a proteína terapêutica recombinante. Em algumas modalidades, os métodos ainda compreendem formular a proteína terapêutica recombinante purificada.

[0058] Em algumas modalidades, a célula é uma bactéria, um fermento, ou uma célula de mamífero.

[0059] Em algumas modalidades, a viabilidade de célula é determinada medindo uma concentração de desidrogenase de ácido láctico (LDH) no recipiente de cultura de teste.

[0060] Em algumas modalidades, o recipiente de cultura de teste é um frasco de agitação com defletor e a pluralidade de condições de teste compreende um ou mais de:

(a) uma agitação rotativa de aproximadamente 125 RPM a aproximadamente 400 RPM;

(b) a concentração do sensibilizador de aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 5000 ppm; e

(c) a concentração de um protetor que é aproximadamente 1 g/L a aproximadamente 10 g/L.

[0061] Em algumas modalidades, o protetor é um poloxamer, uma poloxamina, ou um poliol plurônico. Em algumas modalidades, o poloxamer é poloxamer-188, poloxamer-401, poloxamer-402, ou poloxamer-407. Em algumas modalidades, a poloxamina é poloxamina-904 ou poloxamina-908.

[0062] Em outro aspecto, a descrição também provê métodos para cultivar uma célula em um biorreator de produção, que compreende cultivar uma célula em um meio de cultura líquido sob uma ou mais das seguintes condições:

a) o biorreator de produção tem uma P/V (W/m^3) de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 110,0 (por exemplo, de

aproximadamente 10,0 a aproximadamente 100,0, de aproximadamente 20,0 a aproximadamente 80,0, de aproximadamente 40,0 a aproximadamente 60,0, ou aproximadamente 6,0);

b) o biorreator de produção tem um volume de ar por volume de líquido por minuto (VVM) (min^{-1}) de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,10 (por exemplo, de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,08, de aproximadamente 0,04 a aproximadamente 0,06, ou aproximadamente 0,06);

c) o meio compreende um sensibilizador que tem uma concentração de aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 5000 ppm (por exemplo, de aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 4000 ppm, de aproximadamente 1000 ppm a aproximadamente 2000 ppm, ou aproximadamente 100 ppm); e

d) o meio de cultura líquido compreende um protetor que tem uma concentração que é de aproximadamente 1 g/L a aproximadamente 15 g/L (por exemplo, de aproximadamente 2 g/L a aproximadamente 10 g/L, de aproximadamente 3 g/L a aproximadamente 7 g/L, de aproximadamente 4 g/L a aproximadamente 6 g/L, ou aproximadamente 5 g/L).

[0063] Em algumas modalidades, o sensibilizador é um agente antiespumante.

[0064] Em algumas modalidades, o antiespumante é um antiespumante baseado em polidimetilsiloxano. Em algumas modalidades, o antiespumante é simeticona.

[0065] Em algumas modalidades, o protetor é um poloxamer, uma poloxamina, ou um poliol plurônico.

[0066] Em algumas modalidades, o poloxamer é poloxamer-188, poloxamer-401, poloxamer-402, ou poloxamer-407. Em algumas modalidades, a poloxamina é poloxamina-904 ou poloxamina-908.

[0067] Em algumas modalidades, o biorreator de produção tem um

volume de aproximadamente 5 L a aproximadamente 20.000 L. Em algumas modalidades, o biorreator de produção tem um volume de aproximadamente 50 L a aproximadamente 10.000 L. Em algumas modalidades, o biorreator de produção é um biorreator de perfusão ou a biorreator de lote alimentado.

[0068] Em algumas modalidades, os métodos resultam em uma taxa de morte de células específica menor do que 40% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção. Em algumas modalidades, os métodos resultam em uma taxa de morte de células específica menor do que 20% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção. Em algumas modalidades, os métodos resultam em uma produção de LDH específica de célula menor do que 150 nU/célula/dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção. Em algumas modalidades, os métodos resultam em uma produção de LDH específica de célula menor do que 100 nU/célula/dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção. Em algumas modalidades, os métodos resultam em uma taxa de crescimento aparente maior do que 1% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção. Em algumas modalidades, os métodos resultam em uma taxa de crescimento aparente maior do que 5% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

[0069] Em algumas modalidades, a célula contém um ácido nucleico que codifica uma proteína terapêutica recombinante.

[0070] Em algumas modalidades, os métodos ainda compreendem coletar a proteína terapêutica recombinante. Em algumas modalidades, os métodos ainda compreendem purificar a proteína terapêutica recombinante. Em algumas modalidades, os métodos ainda compreendem formular a proteína terapêutica recombinante purificada.

[0071] Em algumas modalidades, a célula é uma bactéria, um fermento, ou uma célula de mamífero. Em algumas modalidades, a

viabilidade de célula é determinada medindo uma concentração de desidrogenase de ácido láctico (LDH) no recipiente de cultura de teste.

[0072] Como no presente documento utilizado, a palavra "a" antes de um substantivo representa um ou mais do substantivo específico. Por exemplo, a frase "uma célula" representa "uma ou mais células".

[0073] O termo "protetor" significa um agente que diminui uma sensibilidade de célula (por exemplo, uma sensibilidade de célula de mamífero) à tensão de cisalhamento durante a cultivação em um recipiente (por exemplo, um recipiente de cultura de teste ou um biorreator de produção). Exemplos não limitantes de protetores incluem, por exemplo, poloxameros (por exemplo, poloxamer-188, poloxamer-401, poloxamer-402, e poloxamer-407), poloxaminas (por exemplo, poloxamina-904 ou poloxamina-908), e polióis plurônicos. Exemplos adicionais de protetores estão no presente documento descritos e são conhecidos na técnica.

[0074] O termo "sensibilizador" significa um agente que é adicionado a e/ou está presente em um meio de cultura líquido de uma cultura de células (por exemplo, uma cultura de células de mamífero) que aumenta a sensibilidade das células à tensão de cisalhamento durante a cultivação em um recipiente (por exemplo, um recipiente de cultura de teste ou a biorreator de produção). Exemplos não limitantes de sensibilizadores incluem antiespumantes (por exemplo, um antiespumante baseado em polidimetilsiloxano ou simeticona). Exemplos adicionais de sensibilizadores estão no presente documento descritos e são conhecidos na técnica.

[0075] O termo "célula de mamífero" significa qualquer célula de ou derivada de qualquer mamífero (por exemplo, um humano, um hamster, um rato, um macaco verde, uma ratazana, um porco, uma vaca, ou um coelho). Por exemplo, uma célula de mamífero pode ser uma célula imortalizada. Em algumas modalidades, a célula de mamífero é uma

célula diferenciada. Em algumas modalidades, a célula de mamífero é uma célula não diferenciada. Exemplos não limitantes de células de mamífero estão no presente documento descritos. Exemplos adicionais de células de mamífero são conhecidos na técnica.

[0076] O termo "cultivação" ou "cultivação de célula" significa a manutenção ou proliferação de uma célula de mamífero sob um conjunto controlado de condições físicas.

[0077] O termo "cultura de células" ou "cultivação de células" significa um meio de cultura líquido que contém uma pluralidade de células que é mantida ou proliferada sob um conjunto controlado de condições físicas.

[0078] O termo "meio de cultura líquido" significa um fluido que contem nutrientes suficientes para permitir uma célula (por exemplo, uma célula de mamífero) crescer ou proliferar in vitro. Por exemplo, um meio de cultura líquido pode conter um ou mais de: aminoácidos (por exemplo, 20 aminoácidos), uma purina (por exemplo, hipoxantina), uma pirimidina (por exemplo, timidina), colina, inositol, tiamina, ácido fólico, biotina, cálcio, niacinamida, piridoxina, riboflavina, timidina, cianocobalamina, piruvato, ácido lipoico, magnésio, glicose, sódio, potássio, ferro, cobre, zinco, e bicarbonato de sódio. Em algumas modalidades, um meio de cultura líquido pode conter soro de um mamífero. Em algumas modalidades, um meio de cultura líquido não contém soro ou outro extrato de um mamífero (um meio de cultura líquido definido). Em algumas modalidades, um meio de cultura líquido pode conter traços de metais, hormônio de crescimento de mamíferos e/ou um fator de crescimento de mamíferos. Outro exemplo de meio de cultura líquido é um meio mínimo (por exemplo, um meio que contém somente sais inorgânicos, uma fonte de carbono, e água). Exemplos não limitantes de meio de cultura líquido estão no presente documento descritos. Exemplos adicionais de meio de cultura líquido são

conhecidos na técnica e são comercialmente disponíveis. Um meio de cultura líquido pode conter qualquer densidade de células de mamífero. Por exemplo, como no presente documento utilizado, um volume de meio de cultura líquido removido de um biorreator pode estar substancialmente livre de células de mamífero.

[0079] O termo "meio de cultura líquido livre de componentes derivados de animais" significa um meio de cultura líquido que não contém quaisquer componentes (por exemplo, proteínas ou soro) derivados de um mamífero.

[0080] O termo "meio de cultura líquido livre de soro" significa um meio de cultura líquido que não contém um soro de mamífero.

[0081] O termo "meio de cultura líquido que contém soro" significa um meio de cultura líquido que contém um soro de mamífero.

[0082] O termo "meio de cultura líquido quimicamente definido" é um termo da técnica e significa um meio de cultura líquido no qual todos os componentes químicos são conhecidos. Por exemplo, um meio de cultura líquido quimicamente definido não contém soro bovino fetal, albumina de soro bovino ou albumina de soro humano, já que estas preparações tipicamente contêm uma mistura complexa de albuminas e lipídios.

[0083] O termo "meio de cultura líquido livre de proteína" significa um meio de cultura líquido que não contém qualquer proteína (por exemplo, qualquer proteína detectável).

[0084] O termo "biorreator de perfusão" significa um biorreator que contém uma pluralidade de células (por exemplo, células de mamífero) em um primeiro meio de cultura líquido, em que a cultivação de células presentes no biorreator inclui a remoção periódica ou contínua do primeiro meio de cultura líquido e ao mesmo tempo ou logo em seguida, adicionar substancialmente o mesmo volume de um segundo meio de cultura líquido ao biorreator. Em alguns exemplos, o segundo meio de

cultura líquido pode ser o mesmo que o primeiro meio de cultura líquido. Em alguns exemplos, existe uma mudança incremental (por exemplo, aumento ou diminuição) no volume do primeiro meio de cultura líquido removido e adicionado ao longo de períodos incrementais (por exemplo, um período de aproximadamente 24 horas, um período entre aproximadamente 1 minuto e aproximadamente 24 horas, ou um período maior do que 24 horas) durante o período de cultivação (por exemplo, a taxa de realimentação de meio de cultura em uma base diária). A fração de meio removido e substituído cada dia pode variar dependendo das células específicas sendo cultivadas, a densidade de semeadura inicial, e a densidade de célula em um tempo específico. "RV" ou "volume de reator" significa o volume do meio de cultura presente no início do processo de cultivação (por exemplo, o volume total do meio de cultura presente após a semeadura).

[0085] O termo "biorreator de lote alimentado" é um termo da técnica e significa um biorreator que contém uma pluralidade de células (por exemplo, células de mamífero) em um primeiro meio de cultura líquido, em que a cultivação de células presente no biorreator inclui a adição periódica ou contínua de um segundo meio de cultura líquido ao primeiro meio de cultura líquido sem remoção substancial ou significativa do primeiro meio de cultura líquido ou segundo meio de cultura líquido da cultura de células. O segundo meio de cultura líquido pode ser o mesmo que o primeiro meio de cultura líquido. Em alguns exemplos de cultura de lote alimentado, o segundo meio de cultura líquido é uma forma concentrada do primeiro meio de cultura líquido. Em alguns exemplos de cultura de lote alimentado, o segundo meio de cultura líquido é adicionado como um pó seco. Em alguns exemplos de cultura de lote alimentado, o segundo meio de cultura líquido é uma formulação completamente diferente se comparado com o primeiro meio de cultura líquido.

[0086] O termo "biorreator de lote alimentado concentrado" é um termo da técnica e significa um biorreator que contém uma pluralidade de células (por exemplo, células de mamífero) em um primeiro meio de cultura líquido, em que a cultivação das células presentes no biorreator inclui a adição periódica ou contínua de um segundo meio de cultura líquido ao primeiro meio de cultura líquido com remoção substancial ou significativa do primeiro meio de cultura líquido ou do segundo meio de cultura líquido da cultura de células, sem remover produto do biorreator. O segundo meio de cultura líquido pode ser o mesmo que o primeiro meio de cultura líquido. Em alguns exemplos de cultura de lote alimentado concentrada, o segundo meio de cultura líquido é uma forma concentrada do primeiro meio de cultura líquido. Em alguns exemplos de cultura de lote alimentado concentrada, o segundo meio de cultura líquido é adicionado como pó seco. Em alguns exemplos de cultura lote alimentado concentrada, o segundo meio de cultura líquido é uma formulação completamente diferente do primeiro meio de cultura líquido.

[0087] "Agitação rotativa" é um termo bem conhecido na técnica e refere-se ao movimento de um frasco de agitação em um modo geralmente circular, por exemplo, no sentido horário ou anti-horário, de modo a, por exemplo, aumentar a concentração de O2 dissolvido em um meio de cultura líquido contido no mesmo. A agitação pode ser executada utilizando qualquer método conhecido na arte, por exemplo, um instrumento que move o frasco de agitação em um movimento circular ou elipsoidal, tal como um agitador rotativo. Dispositivos exemplares que podem ser utilizados para executar a agitação rotativa estão no presente documento descritos. Exemplos adicionais de tais dispositivos são também conhecidos na técnica e estão comercialmente disponíveis.

[0088] O termo "frasco de agitação" significa um recipiente (por exemplo, um recipiente estéril) que pode conter um volume de meio de

cultura líquido que tem pelo menos uma superfície permeável ao gás (por exemplo, uma extremidade que tem um elemento permeável ao gás, por exemplo, uma membrana, o qual pode também atuar como uma barreira estéril) e/ou pelo menos uma tampa de ventilação, e pelo menos uma porção de sua forma é aproximadamente troncocônica. Por exemplo, um frasco de agitação pode ser um frasco de agitação com defletor ou um frasco de Erlenmeyer, ou qualquer sua versão modificada reconhecida na técnica.

[0089] O termo "biorreator de produção" é um termo da técnica e significa um biorreator de grande escala (por exemplo, que tem um volume interno acima de 5 L, 1.000 L, 5.000 L, 10.000 L, 20.000 L, 50.000 L, ou 100.000 L). Por exemplo, um biorreator de produção pode ser um biorreator de perfusão.

[0090] O termo "recipiente de cultura de teste" é um termo da técnica e significa um biorreator de pequena escala (por exemplo, relativo a um biorreator de produção) que tem um volume de aproximadamente 2 mL a aproximadamente 500 mL. Em alguns exemplos, a razão de altura e largura do recipiente de cultura de teste corresponde a aproximadamente a razão de altura e largura do biorreator de produção nos métodos no presente documento descritos. Em algumas modalidades, o recipiente de cultura de teste é um frasco de agitação (por exemplo, um frasco de agitação com defletor). Exemplos adicionais de um recipiente de cultura de teste estão no presente documento descritos e são conhecidos na técnica.

[0091] O termo "cultivação em lote" é um termo da técnica e significa um recipiente (por exemplo, biorreator) que contém uma pluralidade de células (por exemplo, células de mamífero) em um meio de cultura líquido, em que a cultivação das células presentes no recipiente (por exemplo, biorreator) não inclui a adição de uma quantidade substancial ou significativa de meio de cultura líquido fresco

à cultura de células e não inclui a remoção de uma quantidade substancial ou significativa de meio de cultura líquido da cultura de células durante a cultivação.

[0092] O termo "cultivação de lote alimentado" é um termo da técnica e significa um recipiente (por exemplo, um biorreator de produção) que inclui uma pluralidade de células (por exemplo, células de mamífero) em um meio de cultura líquido, em que a cultivação das células presente no recipiente (por exemplo, biorreator de produção) inclui a adição periódica ou contínua de meio de cultura líquido fresco ao recipiente sem uma remoção substancial ou significativa de meio de cultura líquido do recipiente durante a cultivação. O meio de cultura líquido fresco pode ser o mesmo que o meio de cultura líquido presente dentro do recipiente no início da cultivação. Em alguns exemplos de cultivação de lote alimentado, o meio de cultura líquido fresco é uma forma concentrada do meio de cultura líquido presente no recipiente no início da cultivação. Em alguns exemplos de cultura de lote alimentado, o meio de cultura fresco é adicionado como um pó seco. Em alguns exemplos de cultivação de lote alimentado, o meio de cultura fresco é uma formulação completamente diferente comparada com o meio de cultura líquido presente no recipiente no início da cultivação.

[0093] Os métodos no presente documento descritos proveem diversas vantagens. Por exemplo, estes podem alinhar diferentes escalas, predizer ∆parâmetros, e otimizar o espaço de projeto existente. Estes podem também aumentar a previsibilidade/alinhamento de desempenho através de escalas, criar modelos mais representativos em pequena escala, aumentar a robustez de processo, aperfeiçoar tolerância ao cisalhamento para intensificação de processo e prover orientação sobre adição de sensibilizador e protetor através de diferentes perfis de cisalhamento (Figura 12).

[0094] A menos que de outro modo definido, todos os termos

técnicos e científicos no presente documento utilizados têm o mesmo significado como comumente compreendido por alguém versado na técnica à qual esta invenção pertence. Métodos e materiais estão no presente documento descritos para utilização na presente invenção; outros métodos e materiais adequados conhecidos na técnica podem também ser utilizados. Os materiais, métodos, e exemplos são ilustrativos somente e não pretendem ser limitantes. Todas as publicações, pedidos de patente, patentes, sequências, entradas de banco de dados, e outras referências no presente documento mencionadas são incorporadas por referência em sua totalidade. Em caso de conflito, a presente especificação, incluindo as definições, controlará.

[0095] Outras características e vantagens da invenção serão aparente da descrição detalhada e Figuras seguintes, e das reivindicações.

DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0096] Figura 1 é um diagrama que mostra como bolhas em um meio de cultura de células podem causar a morte de células.

[0097] Figura 2 é um diagrama que ilustra a adição de antiespumante (um sensibilizador exemplar) que pode mover as condições de operação para fora do espaço de operação aceitável.

[0098] Figura 3 é um diagrama que mostra a relação entre a produção de desidrogenase de lactato (LDH) específica e taxa de morte de células.

[0099] Figura 4 é um diagrama que mostra a relação entre protetores, sensibilizadores, e agitação rotativa, e o impacto de protetores, sensibilizadores, e agitação sobre a produção de LDH específica em uma cultura de células.

[0100] Figura 5 é um diagrama que mostra que a produção de LDH específica é uma consequência de concentração de sensibilizador, concentração de protetor, e agitação rotativa (tensão de cisalhamento).

[0101] Figura 6 mostra um projeto fatorial total para os três parâmetros selecionados: concentração de sensibilizador, concentração de protetor, e agitação rotativa (tensão de cisalhamento). O painel superior mostra o projeto fatorial total (2^3), onde a resposta é a produção de LDH específica (taxa de morte) e os fatores são o cisalhamento, concentração de protetor, e concentração de sensibilizador. O painel médio mostra que a falha resultou em um valor extremo, existe uma grande faixa entre o ponto de falha versus o restante dos dados, o ponto de falha é difícil de modelar, e o valor extremo é excluído (região inoperável). O painel inferior mostra que os pontos centrais são fracamente preditos (indicação de curvatura, a resposta é provavelmente não linear, e aumentar RPM não escala linearmente).

[0102] Figura 7 é um diagrama que mostra projeto fatorial total combinado com projeto de composto de centro inscrito para os parâmetros selecionados de concentração de sensibilizador, concentração de protetor, e agitação rotativa (tensão de cisalhamento).

[0103] Figura 8 é um diagrama que mostra as vantagens do projeto fatorial total combinado com o projeto de composto de centro inscrito.

[0104] Figura 9 é um diagrama que ilustra que os métodos no presente documento descritos podem ser utilizados para identificar uma região de fraco desempenho (sombreamento claro) e uma região de falha de operação (sombreamento escuro).

[0105] Figura 10 é um diagrama que ilustra métodos de normalizar tensão de cisalhamento através de escala através de produção de LDH específica e métodos de previsão de efeitos de mudanças de parâmetros (Δparâmetro).

[0106] Figura 11 é um diagrama que ilustra como os modelos no presente documento descritos podem ser utilizados para otimizar as condições de operação de um biorreator de produção. Os dados

mostram que a condição de operação (retângulo cheio com quadrados abertos) correntemente funciona, mas pode ser adicionalmente otimizada (retângulo sombreado claro à direita da seta grande) (por exemplo, aumentar a faixa de concentração de tolerância de sensibilizador no processo e aperfeiçoar a resiliência para o recipiente espumar).

[0107] Figura 12 lista as capacidades e utilidades dos modelos no presente documento descritos. O modelo é capaz de alinhar diferentes escalas, predizer mudanças em parâmetros, e otimizar espaços de projeto existentes. O modelo também provê um aumento na previsibilidade/alinhamento de desempenho através de escalas (por exemplo, criar modelos de pequena escala mais representativos e aumentar a compreensão de cisalhamento através de escala no topo de metodologias tradicionais). O modelo também provê uma robustez de processo aumentada (por exemplo, tolerância ao cisalhamento aperfeiçoada para intensificação de processo e orientação aperfeiçoada sobre a adição de concentração de sensibilizador e concentração de protetor através de diferentes perfis de cisalhamento).

[0108] Figura 13A é um gráfico que compara os valores de produção de LDH específica observados nos recipientes de bancada testados contra os valores de produção de LDH específica preditos.

[0109] Figura 13B apresenta dados do experimento descrito no Exemplo 2.

[0110] Figura 13C lista os valores de produção de LDH específica observados com os valores preditos.

[0111] Figura 14 compara os efeitos observados de agentes antiespumantes sobre a produção de LDH específica e os efeitos preditos de agentes antiespumantes sobre a produção de LDH específica.

[0112] Figura 15A é um gráfico que compara os valores de

produção de LDH específica observados nos biorreatores de produção testados com os valores preditos.

[0113] Figura 15B lista os valores de produção de LDH específica observados nos biorreatores de produção testados com os valores preditos.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0114] Esta descrição refere-se a métodos de otimizar a intensificação de processo para a produção de proteínas ou polipeptídeos. Em um aspecto, a descrição está relacionada a um modelo de recipiente de cultura de teste de pequena escala (por exemplo, frasco de agitação com defletor) que pode caracterizar um espaço de operação como definido por vários parâmetros de operação, por exemplo, concentração de protetor (por exemplo, poloxamer-188), sensibilizador (por exemplo, antiespumante), tensão de cisalhamento (por exemplo, taxa de agitação ou taxa de aspersão de oxigênio), componentes de meios e aditivos, pH, e tempo etc. Especificamente, os métodos no presente documento descritos podem ser utilizados para predizer o efeito destes parâmetros de operação sobre o crescimento e viabilidade de cultura de células em um biorreator de produção. Propostas ortogonais foram utilizadas para correlacionar a tensão de cisalhamento entre modelos de pequena escala e escala maior, e o espaço de operação predito foi validado pelos dados na escala de bancada e na escala de produção.

[0115] Assim, providos no presente documento estão métodos de predizer o efeito de uma concentração de um sensibilizador sobre viabilidade de célula em um biorreator de produção, métodos de aperfeiçoar a viabilidade de célula em um biorreator de produção, métodos para predizer viabilidade de célula em um biorreator de produção, e métodos para cultivar uma célula em um biorreator de produção. Aspectos não limitantes destes métodos estão no presente documento descritos, e podem ser combinados sem limitação.

Intensificação de Processo

[0116] A intensificação de processo refere-se a aperfeiçoamentos em fabricação e processamento otimizando esquemas de operação existentes de modo que o processo de fabricação possa ser mais preciso e mais eficiente. Estes aperfeiçoamentos podem trazer várias vantagens, por exemplo, aumentando a biomassa, aperfeiçoando a produtividade volumétrica, otimizando a utilização de capacidade de instalações, reduzindo o custo de bens, mantendo ou aperfeiçoamento a consistência de qualidade de produto, reduzindo a pegada de instalações, e/ou reduzindo operações unitárias. No nível molecular, a intensificação de processo pode também envolver melhorar mistura, aperfeiçoar a cinética de reação, e/ou aumentar rendimentos e especificidade.

[0117] A presente descrição é relativa à intensificação de processo para a produção de proteínas ou polipeptídeos (por exemplo, proteínas terapêuticas recombinantes, proteínas recombinantes, ou polipeptídeos recombinantes). Uma estratégia para aumentar a produção de proteína terapêutica recombinante ou polipeptídeo é aumentar as densidades de células. Altas densidades de células usualmente requerem alto consumo de oxigênio, e a aspersão de oxigênio requerida frequentemente leva a problemas de espumação (isto é, bolhas). Como mostrado na Figura 1, as bolhas podem levar à morte de células, por exemplo, através de contato de célula-bolha, fixação de célula-bolha ou força letal de ruptura de bolha. A Fórmula 1 mostra a relação entre a taxa de morte de células, aeração volumétrica e tamanho de bolha.

$$\text{Índice de Mortalidade} \propto \frac{(\text{Aceleração Volumétrica})}{(\text{Tamanho da bolha})^3}$$

(Fórmula 1)

[0118] Assim, agentes antiespumantes são frequentemente adicionados ao processo de cultura de células. No entanto, a adição e/ou acumulação de agentes antiespumantes podem causar um

impacto negativo sobre o desempenho de cultura de células (por exemplo, desempenho de cultura de células de mamífero). Em alguns casos, a adição e a acumulação de agentes antiespumantes pode levar a uma taxa de morte de células aumentada, especificamente na escala de produção (escala de biorreator de produção). Portanto, é importante avaliar os efeitos de parâmetros de operação ou mudanças nestes parâmetros de operação (por exemplo, agentes antiespumantes ou alguns outros parâmetros) na escala de produção (escala de biorreator de produção).

Sensibilizadores, Agitação e Protetores

[0119] Como é proibitivamente dispendioso testar os efeitos de vários parâmetros de operação na escala de produção (escala de biorreator de produção), experimentos piloto são usualmente executados em recipientes de cultura de teste (por exemplo, frascos de agitação, fermentadores de laboratório, ou fermentadores piloto) primeiro. Estes recipientes de cultura de teste podem ser operados para testar os efeitos de vários parâmetros, por exemplo, agitação, concentração de sensibilizador, concentração de protetor, temperatura, pH, composição de nutrientes, estratégia de carregamento e alimentação de biomassa em uma pequena escala, e correlacionar os efeitos observados com efeitos na escala de produção (escala de biorreator de produção). Em muitos métodos tradicionais, modelagem de potência/volume (P/V), coeficiente de transferência de massa volumétrica (kLa), velocidade de ponta, tempo de mistura, dinâmica de fluidos computacional (CFD) são frequentemente utilizadas para correlacionar os resultados em recipientes de cultura de teste com os efeitos na escala de produção (escala de biorreator de produção).

[0120] Entre estes vários parâmetros, os parâmetros de sensibilizador (por exemplo, concentração de sensibilizador) são especialmente difíceis de escalar. Em algumas modalidades de

qualquer um dos métodos no presente documento descritos, um sensibilizador pode ser um agente antiespumante (por exemplo, simeticona, emulsão de simeticona, ou um óleo baseado em polidimetilsiloxano (PDMS)). Uma descrição dos agentes antiespumantes pode ser encontrada, por exemplo, em Brečević et al. "Mechanism of antifoaming action of simethicone", J. Appl. Toxicol. 14(3):207-211, 1994; e Bergeron, et al. "Polydimethylsiloxane (PDMS)-based antifoams", Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 122(1-3):103-120, 1997; ambos os quais estão no presente documento incorporados por referência em sua totalidade.

[0121] Exemplos adicionais de sensibilizadores incluem, por exemplo, sensibilizadores baseados em óleo orgânico, sensibilizadores baseados em óleo de silicone, e sensibilizadores de mistura de líquido-sólido/emulsificados misturados (por exemplo, sílica pirogenada, antiespumantes de combinação de óleo). Um sensibilizador pode ser um agente de controle de espuma de silicone, por exemplo, Composto Antiespumante XIAMETER® ACP-0100, Composto Antiespumante XIAMETER® ACP-1500, Emulsão Antiespumante XIAMETER® AFE-1510, Emulsão Antiespumante XIAMETER® AFE-1520, Emulsão Antiespumante XIAMETER® AFE-1530, Composto Antiespumante XIAMETER® ACP-1400, Emulsão Antiespumante XIAMETER® AFE-0700, Antiespumante em Pó XIAMETER® ACP-1920, e Fluido de Silicone XIAMETER® PMX-200. Exemplos adicionais de sensibilizadores incluem emulsão de Antiespumante C Dow Corning®, Antiespumante 204 (Sigma Aldrich), Antiespumante A (Sigma Aldrich), emulsão de Antiespumante B (Sigma Aldrich), emulsão de Antiespumante C (Sigma Aldrich), Emulsão de Antiespumante Y-30 (Sigma Aldrich), Antiespumante O-30 (Sigma Aldrich), e Antiespumante SE-15 (Sigma Aldrich). Um exemplo não limitante de um sensibilizador de poliéter orgânico, não silicone baseado em polipropileno é o antiespumante 204.

Um exemplo não limitante de uma emulsão de simeticona é o Antiespumante EX-Cell. Exemplos não limitantes de antiespumantes sólido-líquido misturados incluem óleo de silicone (PDMS), composto A, CA modificado (MCA), emulsão A (EA), e análogo de EA (AEA) descritos em Marinova et al., Langmuir 17:2426-2436, 2001. Exemplos não limitantes de antiespumantes baseados em polodimetilsiloxano (PMSA) estão descritos em Bergeron et al., Colloids and Surfaces A: Physiochemical and Engineering Aspects 122:103-120, 1997.

[0122] Exemplos adicionais de sensibilizadores são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Rashmika et al., Biotechnol. Prog. 34(1):262-270, 2018.

[0123] Alguns outros parâmetros, por exemplo, deflexão, tamanho de frasco, agitação, também têm um impacto sobre a sensibilidade da célula ao cisalhamento. Devido às interações com outros parâmetros, estes parâmetros de sensibilizador (por exemplo, concentração de um agente antiespumante) frequentemente têm uma relação não linear no processo de escalagem, e não estão geometricamente relacionados através de diferentes escalas. Portanto, os modelos tradicionais são usualmente impotentes em termos de predizer os efeitos dos parâmetros de sensibilizador na escala de produção.

[0124] O que torna a predição ainda mais desafiadora é que o parâmetro de sensibilizador pode mudar no período de produção inteiro. Por exemplo, durante o processo de produção (por exemplo, a cultivação de uma célula em um biorreator de produção), a densidade de célula aumenta, e uma aspersão de oxigênio mais alta é requerida. Portanto, mais agentes antiespumantes são requeridos e são adicionados ao biorreator de produção. A concentração aumentada de agentes antiespumantes torna as células ainda mais sensíveis à tensão de cisalhamento, e move a condição de operação rapidamente para fora do espaço de operação aceitável (Figura 2).

[0125] Além disso, os protetores podem proteger as células da tensão de cisalhamento aumentada e são frequentemente adicionados ao meio de cultura líquido. A concentração de protetor aumentada pode ser necessária para mitigar os impactos negativos de sensibilizadores, mas a interação de protetores com outros parâmetros torna difícil determinar a quantidade exata de protetor que é necessária. Alguns protetores comuns incluem, por exemplo, poloxamer, poloxamina, e/ou poliol plurônico. Em algumas modalidades, o protetor é um poloxamer (por exemplo, poloxamer-188, poloxamer-401, poloxamer-402, ou poloxamer-407). Em algumas outras modalidades, o protetor é uma poloxamina (por exemplo, poloxamina-904 ou poloxamina-908). Em algumas modalidades adicionais, o protetor é um poliol plurônico (por exemplo, L-61, L-121, P-103, P-123, P-84, P-104, P-65, P-105, L-35, F-127, F-38, F-68, ou F-108) ou um poliol plurônico reverso (por exemplo, 25 R-2, 25 R-4, 25 R-5, 25 R-8, 10 R-5, ou 10 R-8). Uma descrição detalhada de protetores exemplares pode ser encontrada, por exemplo, em Moghimi et al., "Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine", Trends in Biotechnology 18(10):412-420, 2000; Murhammer et al., "Structural features of nonionic polyglycol polymer molecules responsible for the protective effect in sparged animal cell bioreactors", Biotecnologia Progress 6(2):142-148, 1990; Murhammer, "Poliol plurônicos, cell protection", Encyclopedia of Bioprocess Technology (1999); cada um dos quais está no presente documento incorporado por referência em sua totalidade.

Modelagem Baseada em Projeto Fatorial e Projeto de composto de centro

[0126] A descrição provê métodos de modelagem para capturar os efeitos (por exemplo, viabilidade de célula, taxa de morte de células, produção de proteína terapêutica recombinante, ou rendimento) de vários parâmetros de operação, por exemplo, protetores (componente

de meio/meio aditivo, por exemplo, plurônico), sensibilizadores (por exemplo, agentes antiespumantes), e tensão de cisalhamento (agitação) para os propósitos de otimizar os reatores em qualquer escala com base nos resultados de modelos de recipiente de cultura de teste.

[0127] Em um aspecto, os métodos no presente documento descritos podem ser utilizados para predizer viabilidade de célula em um biorreator de produção. Os métodos envolvem selecionar um conjunto de parâmetros que compreende pelo menos dois (por exemplo, três, quatro, cinco, ou seis) parâmetros; determinar a viabilidade de célula sob uma pluralidade de condições de teste como definida pelo conjunto de parâmetros em um recipiente de cultura de teste (por exemplo, qualquer um dos recipientes de cultura de teste no presente documento descritos); e com base na viabilidade de célula no recipiente de cultura de teste sob a pluralidade de condições, predizer a viabilidade de célula no biorreator de produção. Com base na predição, as condições com a viabilidade de célula aperfeiçoada podem ser identificadas. Também providos no presente documento estão métodos de predizer o efeito de uma concentração de um sensibilizador sobre viabilidade de célula em um biorreator de produção.

[0128] Os métodos envolvem determinar a viabilidade de célula sob uma pluralidade de condições de teste em um recipiente de cultura de teste, onde a pluralidade de condições de teste é definida por um conjunto de parâmetros; e com base na viabilidade de célula no recipiente de cultura de teste sob a pluralidade de condições, predizer o efeito de uma concentração de um sensibilizador sobre viabilidade de célula em um biorreator de produção.

[0129] O recipiente de cultura de teste pode ser um tubo rotativo (por exemplo tubo rotativo com defletor), um frasco (por exemplo, um frasco de agitação que tem um volume de aproximadamente 3 L) (por

exemplo, frasco de agitação com defletor), um fermentador de laboratório automatizado (Ambr 15 e Amber 250 de Sartorius), um fermentador de laboratório, ou um fermentador piloto. Em algumas modalidades, o recipiente de cultura de teste pode ter um volume menor do que 5 L, menor do que 3 L, menor do que 1L, menor do que 500 ml, ou menor do que 100 ml (por exemplo, menor do que 1 L, ou de 50 ml a 500 ml). Em algumas modalidades, o recipiente de cultura de teste tem um volume (um volume interno) de aproximadamente 5 mL a aproximadamente 5 L (por exemplo, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 500 mL, ou aproximadamente 2,5 L a aproximadamente 3,5 L). Por exemplo, um recipiente de cultura de teste pode ter um volume (um volume interno) de aproximadamente 5 mL a aproximadamente 5 L, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 2,5 L, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 2 L, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 1 L, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 450 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 350 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 200 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 150 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 100 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 80 mL, aproximadamente

5 mL a aproximadamente 60 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 50 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 40 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 30 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 25 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 20 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 15 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 10 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 5 L, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 2,5 L, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 2 L, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 1 L, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 450 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 350 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 200 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 150 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 100 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 80 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 60 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 50 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 40 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 30 mL,

aproximadamente 10 mL a aproximadamente 25 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 20 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 15 mL, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 5 L, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 2,5 L, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 2 L, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 1 L, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 450 mL, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 350 mL, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 200 mL, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 150 mL, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 100 mL, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 80 mL, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 60 mL, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 50 mL, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 40 mL, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 30 mL, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 25 mL, aproximadamente 15 mL a aproximadamente 20 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 5 L, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente

20 mL a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 2,5 L, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 2 L, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 1 L, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 450 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 350 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 200 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 150 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 100 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 80 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 60 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 50 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 40 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 30 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 25 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 5 L, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 2,5 L, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 2 L, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 1 L, aproximadamente

25 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 450 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 350 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 200 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 150 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 100 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 80 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 60 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 50 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 40 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 30 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 5 L, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 2,5 L, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 2 L, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 1 L, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 450 mL, aproximadamente 30 mL a

aproximadamente 400 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 350 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 200 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 150 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 100 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 80 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 60 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 50 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 40 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 5 L, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 2,5 L, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 2 L, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 1 L, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 450 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 350 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 200 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 150 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 100 mL, aproximadamente 40 mL a

aproximadamente 80 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 60 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 50 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 5 L, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 2,5 L, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 2 L, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 1 L, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 450 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 350 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 200 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 150 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 100 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 80 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 60 mL, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 5 L, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 2,5 L, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 2 L, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 1,5 L,

aproximadamente 60 mL a aproximadamente 1 L, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 450 mL, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 350 mL, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 200 mL, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 150 mL, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 100 mL, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 80 mL, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 5 L, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 2,5 L, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 2 L, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 1 L, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 450 mL, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 350 mL, aproximadamente 80 mL a

aproximadamente 300 mL, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 200 mL, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 150 mL, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 100 mL, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 5 L, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 2,5 L, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 2 L, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 1 L, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 450 mL, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 350 mL, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 200 mL, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 150 mL, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 5 L, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 2,5 L, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 2 L, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 1,5 L,

aproximadamente 150 mL a aproximadamente 1 L, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 450 mL, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 350 mL, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 200 mL, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 5 L, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 2,5 L, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 2 L, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 1 L, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 450 mL, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 350 mL, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 5 L, aproximadamente 250 mL a aproximadamente

4,5 L, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 2,5 L, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 2 L, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 1 L, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 450 mL, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 350 mL, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 5 L, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 2,5 L, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 2 L, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 1 L, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 450 mL, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 350 mL, aproximadamente 350 mL a

aproximadamente 5 L, aproximadamente 350 mL a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 350 mL a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 350 mL a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 350 mL a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 350 mL a aproximadamente 2,5 L, aproximadamente 350 mL a aproximadamente 2 L, aproximadamente 350 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 350 mL a aproximadamente 1 L, aproximadamente 350 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 350 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 350 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 350 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 350 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 350 mL a aproximadamente 450 mL, aproximadamente 350 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 400 mL a aproximadamente 5 L, aproximadamente 400 mL a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 400 mL a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 400 mL a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 400 mL a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 400 mL a aproximadamente 2,5 L, aproximadamente 400 mL a aproximadamente 2 L, aproximadamente 400 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 400 mL a aproximadamente 1 L, aproximadamente 400 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 400 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 400 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 400 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 400 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 400 mL a aproximadamente 450 mL, aproximadamente 450 mL a aproximadamente 5 L, aproximadamente 450 mL a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 450 mL a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 450 mL a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente

450 mL a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 450 mL a aproximadamente 2,5 L, aproximadamente 450 mL a aproximadamente 2 L, aproximadamente 450 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 450 mL a aproximadamente 1 L, aproximadamente 450 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 450 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 450 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 450 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 450 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 500 mL a aproximadamente 5 L, aproximadamente 500 mL a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 500 mL a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 500 mL a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 500 mL a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 500 mL a aproximadamente 2,5 L, aproximadamente 500 mL a aproximadamente 2 L, aproximadamente 500 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 500 mL a aproximadamente 1 L, aproximadamente 500 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 500 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 500 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 500 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 600 mL a aproximadamente 5 L, aproximadamente 600 mL a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 600 mL a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 600 mL a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 600 mL a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 600 mL a aproximadamente 2,5 L, aproximadamente 600 mL a aproximadamente 2 L, aproximadamente 600 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 600 mL a aproximadamente 1 L, aproximadamente 600 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 600 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 600 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 700 mL a

aproximadamente 5 L, aproximadamente 700 mL a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 700 mL a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 700 mL a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 700 mL a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 700 mL a aproximadamente 2,5 L, aproximadamente 700 mL a aproximadamente 2 L, aproximadamente 700 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 700 mL a aproximadamente 1 L, aproximadamente 700 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 700 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 800 mL a aproximadamente 5 L, aproximadamente 800 mL a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 800 mL a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 800 mL a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 800 mL a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 800 mL a aproximadamente 2,5 L, aproximadamente 800 mL a aproximadamente 2 L, aproximadamente 800 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 800 mL a aproximadamente 1 L, aproximadamente 800 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 900 mL a aproximadamente 5 L, aproximadamente 900 mL a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 900 mL a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 900 mL a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 900 mL a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 900 mL a aproximadamente 2,5 L, aproximadamente 900 mL a aproximadamente 2 L, aproximadamente 900 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 900 mL a aproximadamente 1 L, aproximadamente 1 L a aproximadamente 5 L, aproximadamente 1 L a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 1 L a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 1 L a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 1 L a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 1 L a aproximadamente 2,5 L, aproximadamente 1 L a aproximadamente 2 L, aproximadamente 1 L a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 1,5 L a

aproximadamente 5 L, aproximadamente 1,5 L a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 1,5 L a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 1,5 L a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 1,5 L a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 1,5 L a aproximadamente 2,5 L, aproximadamente 1,5 L a aproximadamente 2 L, aproximadamente 2 L a aproximadamente 5 L, aproximadamente 2 L a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 2 L a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 2 L a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 2 L a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 2 L a aproximadamente 2,5 L, aproximadamente 2,5 L a aproximadamente 5 L, aproximadamente 2,5 L a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 2,5 L a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 2,5 L a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 2,5 L a aproximadamente 3,0 L, aproximadamente 3,0 L a aproximadamente 5 L, aproximadamente 3,0 L a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 3,0 L a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 3,0 L a aproximadamente 3,5 L, aproximadamente 3,5 L a aproximadamente 5 L, aproximadamente 3,5 L a aproximadamente 4,5 L, aproximadamente 3,5 L a aproximadamente 4,0 L, aproximadamente 4,0 L a aproximadamente 5 L, aproximadamente 4,0 L a aproximadamente 4,5 L, ou aproximadamente 4,5 L a aproximadamente 5,0 L. Em algumas modalidades, a razão da altura para a largura do recipiente de cultura de teste é aproximadamente a mesma que a razão da altura para a largura do biorreator de produção.

[0130] Em algumas modalidades, o volume de meio de cultura líquido disposto dentro do recipiente de cultura de teste (durante a cultivação) pode variar de aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 1,4 L, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 1,3 L, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 1,2 L, aproximadamente

0,5 mL a aproximadamente 1,1 L, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 1,0 L, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 200 mL, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 150 mL, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 100 mL, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 80 mL, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 60 mL, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 50 mL, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 40 mL, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 30 mL, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 25 mL, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 20 mL, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 10 mL, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 5 mL, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 2,5 mL, aproximadamente 2,5 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 2,5 mL a aproximadamente 1,4 L, aproximadamente 2,5 mL a aproximadamente 1,3 L, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 1,2 L, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 1,1 L, aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 1,0 L, aproximadamente 2,5 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 2,5 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 2,5 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 2,5 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 2,5 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 2,5 mL a

aproximadamente 400 mL, aproximadamente 2,5 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 2,5 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 2,5 mL a aproximadamente 200 mL, aproximadamente 2,5 mL a aproximadamente 150 mL, aproximadamente 2,5 mL a aproximadamente 100 mL, aproximadamente 2,5 mL a aproximadamente 80 mL, aproximadamente 2,5 mL a aproximadamente 60 mL, aproximadamente 2,5 mL a aproximadamente 50 mL, aproximadamente 2,5 mL a aproximadamente 40 mL, aproximadamente 2,5 mL a aproximadamente 30 mL, aproximadamente 2,5 mL a aproximadamente 25 mL, aproximadamente 2,5 mL a aproximadamente 20 mL, aproximadamente 2,5 mL a aproximadamente 10 mL, aproximadamente 2,5 mL a aproximadamente 5 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 1,4 L, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 1,3 L, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 1,2 L, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 1,1 L, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 1,0 L, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 200 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 150 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 100 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 80 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 60 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 50 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 40 mL, aproximadamente 5 mL a

aproximadamente 30 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 25 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 20 mL, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 10 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 1,4 L, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 1,3 L, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 1,2 L, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 1,1 L, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 1,0 L, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 200 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 150 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 100 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 80 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 60 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 50 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 40 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 30 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 25 mL, aproximadamente 10 mL a aproximadamente 20 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 1,4 L, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 1,3 L, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 1,2 L, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 1,1 L, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 1,0 L, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 900 mL,

aproximadamente 20 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 200 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 150 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 100 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 80 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 60 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 50 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 40 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 30 mL, aproximadamente 20 mL a aproximadamente 25 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 1,4 L, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 1,3 L, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 1,2 L, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 1,1 L, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 1,0 L, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 200 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 150 mL, aproximadamente 25 mL a

aproximadamente 100 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 80 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 60 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 50 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 40 mL, aproximadamente 25 mL a aproximadamente 30 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 1,4 L, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 1,3 L, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 1,2 L, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 1,1 L, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 1,0 L, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 200 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 150 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 100 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 80 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 60 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 50 mL, aproximadamente 30 mL a aproximadamente 40 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 1,4 L, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 1,3 L, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 1,2 L, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 1,1 L, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 1,0 L, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 800 mL,

aproximadamente 40 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 200 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 150 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 100 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 80 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 60 mL, aproximadamente 40 mL a aproximadamente 50 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 1,4 L, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 1,3 L, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 1,2 L, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 1,1 L, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 1,0 L, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 200 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 150 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 100 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 80 mL, aproximadamente 50 mL a aproximadamente 60 mL, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 60 mL a aproximadamente

1,4 L, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 1,3 L, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 1,2 L, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 1,1 L, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 1,0 L, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 200 mL, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 150 mL, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 100 mL, aproximadamente 60 mL a aproximadamente 80 mL, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 1,4 L, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 1,3 L, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 1,2 L, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 1,1 L, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 1,0 L, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 200 mL, aproximadamente 80 mL a aproximadamente 150 mL, aproximadamente 80 mL a

aproximadamente 100 mL, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 1,4 L, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 1,3 L, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 1,2 L, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 1,1 L, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 1,0 L, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 200 mL, aproximadamente 100 mL a aproximadamente 150 mL, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 1,4 L, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 1,3 L, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 1,2 L, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 1,1 L, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 1,0 L, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 150 mL a aproximadamente 200 mL, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 200 mL a aproximadamente

1,4 L, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 1,3 L, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 1,2 L, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 1,1 L, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 1,0 L, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 200 mL a aproximadamente 250 mL, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 1,4 L, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 1,3 L, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 1,2 L, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 1,1 L, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 1,0 L, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 250 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 1,4 L, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 1,3 L, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 1,2 L, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 1,1 L, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 1,0 L, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 700 mL,

aproximadamente 300 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 400 mL, aproximadamente 400 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 400 mL a aproximadamente 1,4 L, aproximadamente 400 mL a aproximadamente 1,3 L, aproximadamente 400 mL a aproximadamente 1,2 L, aproximadamente 400 mL a aproximadamente 1,1 L, aproximadamente 400 mL a aproximadamente 1,0 L, aproximadamente 400 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 400 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 400 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 400 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 400 mL a aproximadamente 500 mL, aproximadamente 500 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 500 mL a aproximadamente 1,4 L, aproximadamente 500 mL a aproximadamente 1,3 L, aproximadamente 500 mL a aproximadamente 1,2 L, aproximadamente 500 mL a aproximadamente 1,1 L, aproximadamente 500 mL a aproximadamente 1,0 L, aproximadamente 500 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 500 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 500 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 500 mL a aproximadamente 600 mL, aproximadamente 600 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 600 mL a aproximadamente 1,4 L, aproximadamente 600 mL a aproximadamente 1,3 L, aproximadamente 600 mL a aproximadamente 1,2 L, aproximadamente 600 mL a aproximadamente 1,1 L, aproximadamente 600 mL a aproximadamente 1,0 L, aproximadamente 600 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 600 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 600 mL a aproximadamente 700 mL, aproximadamente 700 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 700 mL a aproximadamente

1,4 L, aproximadamente 700 mL a aproximadamente 1,3 L, aproximadamente 700 mL a aproximadamente 1,2 L, aproximadamente 700 mL a aproximadamente 1,1 L, aproximadamente 700 mL a aproximadamente 1,0 L, aproximadamente 700 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 700 mL a aproximadamente 800 mL, aproximadamente 800 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 800 mL a aproximadamente 1,4 L, aproximadamente 800 mL a aproximadamente 1,3 L, aproximadamente 800 mL a aproximadamente 1,2 L, aproximadamente 800 mL a aproximadamente 1,1 L, aproximadamente 800 mL a aproximadamente 1,0 L, aproximadamente 800 mL a aproximadamente 900 mL, aproximadamente 900 mL a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 900 mL a aproximadamente 1,4 L, aproximadamente 900 mL a aproximadamente 1,3 L, aproximadamente 900 mL a aproximadamente 1,2 L, aproximadamente 900 mL a aproximadamente 1,1 L, aproximadamente 900 mL a aproximadamente 1,0 L, aproximadamente 1,0 L a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 1,0 L a aproximadamente 1,4 L, aproximadamente 1,0 L a aproximadamente 1,3 L, aproximadamente 1,0 L a aproximadamente 1,2 L, aproximadamente 1,0 L a aproximadamente 1,1 L, aproximadamente 1,1 L a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 1,1 L a aproximadamente 1,4 L, aproximadamente 1,1 L a aproximadamente 1,3 L, aproximadamente 1,1 L a aproximadamente 1,2 L, aproximadamente 1,2 L a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 1,2 L a aproximadamente 1,4 L, aproximadamente 1,2 L a aproximadamente 1,3 L, aproximadamente 1,3 L a aproximadamente 1,5 L, aproximadamente 1,3 L a aproximadamente 1,4 L, ou aproximadamente 1,4 L a aproximadamente 1,5 L.

[0131] Em algumas modalidades, o recipiente de cultura de teste é um frasco de agitação, por exemplo, um frasco de agitação com defletor.

Um frasco de agitação pode ter um volume, por exemplo, de aproximadamente 250 mL a aproximadamente 300 mL, aproximadamente 300 mL a aproximadamente 400 mL, ou aproximadamente 400 mL a aproximadamente 500 mL. O frasco de agitação pode incluir pelo menos uma superfície permeável ao gás (por exemplo, pelo menos uma superfície que tem uma membrana permeável ao gás a qual pode também atuar como uma barreira estéril) e/ou pelo menos uma tampa ventilada. Um frasco de agitação pode ter sobre sua superfície externa uma estrutura que permite que o frasco de agitação seja estavelmente colocado dentro de uma incubadora de cultura de tecidos (por exemplo, uma incubadora rotativa).

[0132] A superfície interna do frasco de agitação pode ter pelo menos um revestimento (por exemplo, pelo menos um revestimento de gelatina, colágeno, poli-L-ornitina, poliestireno e laminina). Frascos de agitação exemplares que podem ser utilizados em qualquer um dos métodos no presente documento descritos podem ser adquiridos da Corning Inc. (Tewsbury, MA), Presens (Brondby, Denmark), Nalge-Nunc International (Rochester, NY). Frascos de agitação exemplares incluem frascos de agitação com defletor ou frascos de Erlenmeyer, ou quaisquer suas versões modificadas e conhecidas na técnica. Exemplos adicionais de frascos de agitação (por exemplo, diferentes formas e dimensões de frascos de agitação) e revestimentos de superfície interna de frascos de agitação são conhecidos na técnica e podem ser utilizados nos presentes métodos.

[0133] Em algumas modalidades, o recipiente de cultura de teste pode ter uma agitação rotativa de aproximadamente 125 RPM a aproximadamente 400 RPM (por exemplo, aproximadamente 150 RPM a aproximadamente 350 RPM, ou aproximadamente 200 RPM a aproximadamente 300 RPM). Por exemplo, o recipiente de cultura de teste pode ter uma agitação rotativa de aproximadamente 125 RPM a

aproximadamente 400 RPM, aproximadamente 125 RPM a
aproximadamente 380 RPM, aproximadamente 125 RPM a
aproximadamente 360 RPM, aproximadamente 125 RPM a
aproximadamente 340 RPM, aproximadamente 125 RPM a
aproximadamente 320 RPM, aproximadamente 125 RPM a
aproximadamente 300 RPM, aproximadamente 125 RPM a
aproximadamente 280 RPM, aproximadamente 125 RPM a
aproximadamente 260 RPM, aproximadamente 125 RPM a
aproximadamente 240 RPM, aproximadamente 125 RPM a
aproximadamente 220 RPM, aproximadamente 125 RPM a
aproximadamente 200 RPM, aproximadamente 125 RPM a
aproximadamente 180 RPM, aproximadamente 125 RPM a
aproximadamente 160 RPM, aproximadamente 125 RPM a
aproximadamente 140 RPM, aproximadamente 140 RPM a
aproximadamente 400 RPM, aproximadamente 140 RPM a
aproximadamente 380 RPM, aproximadamente 140 RPM a
aproximadamente 360 RPM, aproximadamente 140 RPM a
aproximadamente 340 RPM, aproximadamente 140 RPM a
aproximadamente 320 RPM, aproximadamente 140 RPM a
aproximadamente 300 RPM, aproximadamente 140 RPM a
aproximadamente 280 RPM, aproximadamente 140 RPM a
aproximadamente 260 RPM, aproximadamente 140 RPM a
aproximadamente 240 RPM, aproximadamente 140 RPM a
aproximadamente 220 RPM, aproximadamente 140 RPM a
aproximadamente 200 RPM, aproximadamente 140 RPM a
aproximadamente 180 RPM, aproximadamente 140 RPM a
aproximadamente 160 RPM, aproximadamente 160 RPM a
aproximadamente 400 RPM, aproximadamente 160 RPM a
aproximadamente 380 RPM, aproximadamente 160 RPM a
aproximadamente 360 RPM, aproximadamente 160 RPM a

aproximadamente 340 RPM, aproximadamente 160 RPM a
aproximadamente 320 RPM, aproximadamente 160 RPM a
aproximadamente 300 RPM, aproximadamente 160 RPM a
aproximadamente 280 RPM, aproximadamente 160 RPM a
aproximadamente 260 RPM, aproximadamente 160 RPM a
aproximadamente 240 RPM, aproximadamente 160 RPM a
aproximadamente 220 RPM, aproximadamente 160 RPM a
aproximadamente 200 RPM, aproximadamente 160 RPM a
aproximadamente 180 RPM, aproximadamente 180 RPM a
aproximadamente 400 RPM, aproximadamente 180 RPM a
aproximadamente 380 RPM, aproximadamente 180 RPM a
aproximadamente 360 RPM, aproximadamente 180 RPM a
aproximadamente 340 RPM, aproximadamente 180 RPM a
aproximadamente 320 RPM, aproximadamente 180 RPM a
aproximadamente 300 RPM, aproximadamente 180 RPM a
aproximadamente 280 RPM, aproximadamente 180 RPM a
aproximadamente 260 RPM, aproximadamente 180 RPM a
aproximadamente 240 RPM, aproximadamente 180 RPM a
aproximadamente 220 RPM, aproximadamente 180 RPM a
aproximadamente 200 RPM, aproximadamente 200 RPM a
aproximadamente 400 RPM, aproximadamente 200 RPM a
aproximadamente 380 RPM, aproximadamente 200 RPM a
aproximadamente 360 RPM, aproximadamente 200 RPM a
aproximadamente 340 RPM, aproximadamente 200 RPM a
aproximadamente 320 RPM, aproximadamente 200 RPM a
aproximadamente 300 RPM, aproximadamente 200 RPM a
aproximadamente 280 RPM, aproximadamente 200 RPM a
aproximadamente 260 RPM, aproximadamente 200 RPM a
aproximadamente 240 RPM, aproximadamente 200 RPM a
aproximadamente 220 RPM, aproximadamente 220 RPM a

aproximadamente 400 RPM, aproximadamente 220 RPM a
aproximadamente 380 RPM, aproximadamente 220 RPM a
aproximadamente 360 RPM, aproximadamente 220 RPM a
aproximadamente 340 RPM, aproximadamente 220 RPM a
aproximadamente 320 RPM, aproximadamente 220 RPM a
aproximadamente 300 RPM, aproximadamente 220 RPM a
aproximadamente 280 RPM, aproximadamente 220 RPM a
aproximadamente 260 RPM, aproximadamente 220 RPM a
aproximadamente 240 RPM, aproximadamente 240 RPM a
aproximadamente 400 RPM, aproximadamente 240 RPM a
aproximadamente 380 RPM, aproximadamente 240 RPM a
aproximadamente 360 RPM, aproximadamente 240 RPM a
aproximadamente 340 RPM, aproximadamente 240 RPM a
aproximadamente 320 RPM, aproximadamente 240 RPM a
aproximadamente 300 RPM, aproximadamente 240 RPM a
aproximadamente 280 RPM, aproximadamente 240 RPM a
aproximadamente 260 RPM, aproximadamente 260 RPM a
aproximadamente 400 RPM, aproximadamente 260 RPM a
aproximadamente 380 RPM, aproximadamente 260 RPM a
aproximadamente 360 RPM, aproximadamente 260 RPM a
aproximadamente 340 RPM, aproximadamente 260 RPM a
aproximadamente 320 RPM, aproximadamente 260 RPM a
aproximadamente 300 RPM, aproximadamente 260 RPM a
aproximadamente 280 RPM, aproximadamente 280 RPM a
aproximadamente 400 RPM, aproximadamente 280 RPM a
aproximadamente 380 RPM, aproximadamente 280 RPM a
aproximadamente 360 RPM, aproximadamente 280 RPM a
aproximadamente 340 RPM, aproximadamente 280 RPM a
aproximadamente 320 RPM, aproximadamente 280 RPM a
aproximadamente 300 RPM, aproximadamente 300 RPM a

aproximadamente 400 RPM, aproximadamente 300 RPM a aproximadamente 380 RPM, aproximadamente 300 RPM a aproximadamente 360 RPM, aproximadamente 300 RPM a aproximadamente 340 RPM, aproximadamente 300 RPM a aproximadamente 320 RPM, aproximadamente 320 RPM a aproximadamente 400 RPM, aproximadamente 320 RPM a aproximadamente 380 RPM, aproximadamente 320 RPM a aproximadamente 360 RPM, aproximadamente 320 RPM a aproximadamente 340 RPM, aproximadamente 340 RPM a aproximadamente 400 RPM, aproximadamente 340 RPM a aproximadamente 380 RPM, aproximadamente 340 RPM a aproximadamente 360 RPM, aproximadamente 360 RPM a aproximadamente 400 RPM, aproximadamente 360 RPM a aproximadamente 380 RPM, ou aproximadamente 380 RPM a aproximadamente 400 RPM.

[0134] Em algumas modalidades, a agitação rotativa do recipiente de cultura de teste pode ser executada utilizando uma incubadora rotativa com um diâmetro de lance (órbita) entre aproximadamente 25 mm a aproximadamente 50 mm. Em algumas modalidades, o recipiente de cultura de teste pode ter uma concentração de um sensibilizador de aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 5.000 ppm (por exemplo, aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 120 ppm, aproximadamente 30 ppm a aproximadamente 120 ppm, ou aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 100 ppm). Em algumas modalidades, o recipiente de cultura de teste pode ter um concentração de um sensibilizador (por exemplo, um antiespumante, por exemplo, qualquer um dos antiespumantes no presente documento descritos) de 0 ppm a aproximadamente 200 ppm, 0 ppm a aproximadamente 190 ppm, 0 ppm a aproximadamente 180 ppm, 0 ppm a aproximadamente 170 ppm, 0 ppm a aproximadamente 160 ppm, 0 ppm a

aproximadamente 150 ppm, 0 ppm a aproximadamente 140 ppm, 0 ppm a aproximadamente 130 ppm, 0 ppm a aproximadamente 120 ppm, 0 ppm a aproximadamente 110 ppm, 0 ppm a aproximadamente 100 ppm, 0 ppm, a aproximadamente 90 ppm, 0 ppm a aproximadamente 80 ppm, 0 ppm a aproximadamente 70 ppm, 0 ppm a aproximadamente 60 ppm, 0 ppm a aproximadamente 50 ppm, 0 ppm a aproximadamente 40 ppm, 0 ppm a aproximadamente 30 ppm, 0 ppm a aproximadamente 20 ppm, 0 ppm a aproximadamente 10 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 190 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 180 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 170 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 160 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 150 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 140 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 130 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 120 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 110 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 100 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 90 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 80 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 70 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 60 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 50 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 40 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 30 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 20 ppm, aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 190 ppm, aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 180 ppm, aproximadamente 20 ppm a

aproximadamente	170	ppm,	aproximadamente	20	ppm	a
aproximadamente	160	ppm,	aproximadamente	20	ppm	a
aproximadamente	150	ppm,	aproximadamente	20	ppm	a
aproximadamente	140	ppm,	aproximadamente	20	ppm	a
aproximadamente	130	ppm,	aproximadamente	20	ppm	a
aproximadamente	120	ppm,	aproximadamente	20	ppm	a
aproximadamente	110	ppm,	aproximadamente	20	ppm	a
aproximadamente	100	ppm,	aproximadamente	20	ppm	a
aproximadamente	90	ppm,	aproximadamente	20	ppm	a
aproximadamente	80	ppm,	aproximadamente	20	ppm	a
aproximadamente	70	ppm,	aproximadamente	20	ppm	a
aproximadamente	60	ppm,	aproximadamente	20	ppm	a
aproximadamente	50	ppm,	aproximadamente	20	ppm	a
aproximadamente	40	ppm,	aproximadamente	20	ppm	a
aproximadamente	30	ppm,	aproximadamente	30	ppm	a
aproximadamente	200	ppm,	aproximadamente	30	ppm	a
aproximadamente	190	ppm,	aproximadamente	30	ppm	a
aproximadamente	180	ppm,	aproximadamente	30	ppm	a
aproximadamente	170	ppm,	aproximadamente	30	ppm	a
aproximadamente	160	ppm,	aproximadamente	30	ppm	a
aproximadamente	150	ppm,	aproximadamente	30	ppm	a
aproximadamente	140	ppm,	aproximadamente	30	ppm	a
aproximadamente	130	ppm,	aproximadamente	30	ppm	a
aproximadamente	120	ppm,	aproximadamente	30	ppm	a
aproximadamente	110	ppm,	aproximadamente	30	ppm	a
aproximadamente	100	ppm,	aproximadamente	30	ppm	a
aproximadamente	90	ppm,	aproximadamente	30	ppm	a
aproximadamente	80	ppm,	aproximadamente	30	ppm	a
aproximadamente	70	ppm,	aproximadamente	30	ppm	a
aproximadamente	60	ppm,	aproximadamente	30	ppm	a

aproximadamente	50	ppm,	aproximadamente	30	ppm	a
aproximadamente	40	ppm,	aproximadamente	40	ppm	a
aproximadamente	200	ppm,	aproximadamente	40	ppm	a
aproximadamente	190	ppm,	aproximadamente	40	ppm	a
aproximadamente	180	ppm,	aproximadamente	40	ppm	a
aproximadamente	170	ppm,	aproximadamente	40	ppm	a
aproximadamente	160	ppm,	aproximadamente	40	ppm	a
aproximadamente	150	ppm,	aproximadamente	40	ppm	a
aproximadamente	140	ppm,	aproximadamente	40	ppm	a
aproximadamente	130	ppm,	aproximadamente	40	ppm	a
aproximadamente	120	ppm,	aproximadamente	40	ppm	a
aproximadamente	110	ppm,	aproximadamente	40	ppm	a
aproximadamente	100	ppm,	aproximadamente	40	ppm	a
aproximadamente	90	ppm,	aproximadamente	40	ppm	a
aproximadamente	80	ppm,	aproximadamente	40	ppm	a
aproximadamente	70	ppm,	aproximadamente	40	ppm	a
aproximadamente	60	ppm,	aproximadamente	40	ppm	a
aproximadamente	50	ppm,	aproximadamente	50	ppm	a
aproximadamente	200	ppm,	aproximadamente	50	ppm	a
aproximadamente	190	ppm,	aproximadamente	50	ppm	a
aproximadamente	180	ppm,	aproximadamente	50	ppm	a
aproximadamente	170	ppm,	aproximadamente	50	ppm	a
aproximadamente	160	ppm,	aproximadamente	50	ppm	a
aproximadamente	150	ppm,	aproximadamente	50	ppm	a
aproximadamente	140	ppm,	aproximadamente	50	ppm	a
aproximadamente	130	ppm,	aproximadamente	50	ppm	a
aproximadamente	120	ppm,	aproximadamente	50	ppm	a
aproximadamente	110	ppm,	aproximadamente	50	ppm	a
aproximadamente	100	ppm,	aproximadamente	50	ppm	a
aproximadamente	90	ppm,	aproximadamente	50	ppm	a

aproximadamente	80	ppm,	aproximadamente	50	ppm	a
aproximadamente	70	ppm,	aproximadamente	50	ppm	a
aproximadamente	60	ppm,	aproximadamente	60	ppm	a
aproximadamente	200	ppm,	aproximadamente	60	ppm	a
aproximadamente	190	ppm,	aproximadamente	60	ppm	a
aproximadamente	180	ppm,	aproximadamente	60	ppm	a
aproximadamente	170	ppm,	aproximadamente	60	ppm	a
aproximadamente	160	ppm,	aproximadamente	60	ppm	a
aproximadamente	150	ppm,	aproximadamente	60	ppm	a
aproximadamente	140	ppm,	aproximadamente	60	ppm	a
aproximadamente	130	ppm,	aproximadamente	60	ppm	a
aproximadamente	120	ppm,	aproximadamente	60	ppm	a
aproximadamente	110	ppm,	aproximadamente	60	ppm	a
aproximadamente	100	ppm,	aproximadamente	60	ppm	a
aproximadamente	90	ppm,	aproximadamente	60	ppm	a
aproximadamente	80	ppm,	aproximadamente	60	ppm	a
aproximadamente	70	ppm,	aproximadamente	70	ppm	a
aproximadamente	200	ppm,	aproximadamente	70	ppm	a
aproximadamente	190	ppm,	aproximadamente	70	ppm	a
aproximadamente	180	ppm,	aproximadamente	70	ppm	a
aproximadamente	170	ppm,	aproximadamente	70	ppm	a
aproximadamente	160	ppm,	aproximadamente	70	ppm	a
aproximadamente	150	ppm,	aproximadamente	70	ppm	a
aproximadamente	140	ppm,	aproximadamente	70	ppm	a
aproximadamente	130	ppm,	aproximadamente	70	ppm	a
aproximadamente	120	ppm,	aproximadamente	70	ppm	a
aproximadamente	110	ppm,	aproximadamente	70	ppm	a
aproximadamente	100	ppm,	aproximadamente	70	ppm	a
aproximadamente	90	ppm,	aproximadamente	70	ppm	a
aproximadamente	80	ppm,	aproximadamente	80	ppm	a

aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 190 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 180 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 170 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 160 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 150 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 140 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 130 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 120 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 110 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 100 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 90 ppm, aproximadamente 90 ppm a
aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 90 ppm a
aproximadamente 190 ppm, aproximadamente 90 ppm a
aproximadamente 180 ppm, aproximadamente 90 ppm a
aproximadamente 170 ppm, aproximadamente 90 ppm a
aproximadamente 160 ppm, aproximadamente 90 ppm a
aproximadamente 150 ppm, aproximadamente 90 ppm a
aproximadamente 140 ppm, aproximadamente 90 ppm a
aproximadamente 130 ppm, aproximadamente 90 ppm a
aproximadamente 120 ppm, aproximadamente 90 ppm a
aproximadamente 110 ppm, aproximadamente 90 ppm a
aproximadamente 100 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 190 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 180 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 170 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 160 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 150 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 140 ppm, aproximadamente 100 ppm a

aproximadamente 130 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 120 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 110 ppm, aproximadamente 110 ppm a
aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 110 ppm a
aproximadamente 190 ppm, aproximadamente 110 ppm a
aproximadamente 180 ppm, aproximadamente 110 ppm a
aproximadamente 170 ppm, aproximadamente 110 ppm a
aproximadamente 160 ppm, aproximadamente 110 ppm a
aproximadamente 150 ppm, aproximadamente 110 ppm a
aproximadamente 140 ppm, aproximadamente 110 ppm a
aproximadamente 130 ppm, aproximadamente 110 ppm a
aproximadamente 120 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 190 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 180 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 170 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 160 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 150 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 140 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 130 ppm, aproximadamente 130 ppm a
aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 130 ppm a
aproximadamente 190 ppm, aproximadamente 130 ppm a
aproximadamente 180 ppm, aproximadamente 130 ppm a
aproximadamente 170 ppm, aproximadamente 130 ppm a
aproximadamente 160 ppm, aproximadamente 130 ppm a
aproximadamente 150 ppm, aproximadamente 130 ppm a
aproximadamente 140 ppm, aproximadamente 140 ppm a
aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 140 ppm a
aproximadamente 190 ppm, aproximadamente 140 ppm a
aproximadamente 180 ppm, aproximadamente 140 ppm a

aproximadamente 170 ppm, aproximadamente 140 ppm a aproximadamente 160 ppm, aproximadamente 140 ppm a aproximadamente 150 ppm, aproximadamente 150 ppm a aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 150 ppm a aproximadamente 190 ppm, aproximadamente 150 ppm a aproximadamente 180 ppm, aproximadamente 150 ppm a aproximadamente 170 ppm, aproximadamente 150 ppm a aproximadamente 160 ppm, aproximadamente 160 ppm a aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 160 ppm a aproximadamente 190 ppm, aproximadamente 160 ppm a aproximadamente 180 ppm, aproximadamente 160 ppm a aproximadamente 170 ppm, aproximadamente 170 ppm a aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 170 ppm a aproximadamente 190 ppm, aproximadamente 170 ppm a aproximadamente 180 ppm, aproximadamente 180 ppm a aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 180 ppm a aproximadamente 190 ppm, ou aproximadamente 190 ppm a aproximadamente 200 ppm (onde o sensibilizador está presente em um meio de cultura líquido disposto dentro do recipiente de cultura de teste, por exemplo, por um período de tempo durante a cultivação).

[0135] Em algumas modalidades, o recipiente de cultura de teste pode ter uma concentração de um sensibilizador (por exemplo, um antiespumante, por exemplo, qualquer um dos antiespumantes no presente documento descritos) de 0 ppm a aproximadamente 5.000 ppm, 0 ppm a aproximadamente 4.500 ppm, 0 ppm a aproximadamente 4.000 ppm, 0 ppm a aproximadamente 3.500 ppm, 0 ppm a aproximadamente 3.000 ppm, 0 ppm a aproximadamente 2.500 ppm, 0 ppm a aproximadamente 2.000 ppm, 0 ppm a aproximadamente 1.500 ppm, 0 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, 0 ppm a aproximadamente 800 ppm, 0 ppm a aproximadamente 600 ppm, 0 ppm a

aproximadamente 500 ppm, 0 ppm a aproximadamente 450 ppm, 0 ppm a aproximadamente 400 ppm, 0 ppm a aproximadamente 350 ppm, 0 ppm a aproximadamente 300 ppm, 0 ppm a aproximadamente 250 ppm, 0 ppm a aproximadamente 200 ppm, 0 ppm a aproximadamente 150 ppm, 0 ppm a aproximadamente 140 ppm, 0 ppm a aproximadamente 120 ppm, 0 ppm a aproximadamente 100 ppm, 0 ppm a aproximadamente 80 ppm, 0 ppm a aproximadamente 60 ppm, 0 ppm a aproximadamente 50 ppm, 0 ppm a aproximadamente 40 ppm, 0 ppm a aproximadamente 30 ppm, 0 ppm a aproximadamente 20 ppm, 0 ppm a aproximadamente 10 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 4.500 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 4.000 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 3.500 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 3.000 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 2.500 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 2.000 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 1.500 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 800 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 600 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 500 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 450 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 400 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 350 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 300 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 250 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 150 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 140 ppm, aproximadamente 10 ppm a

aproximadamente 120 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 100 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 80 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 60 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 50 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 40 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 30 ppm, aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 20 ppm, aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 4.500 ppm, aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 4.000 ppm, aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 3.500 ppm, aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 3.000 ppm, aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 2.500 ppm, aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 2.000 ppm, aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 1.500 ppm, aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 800 ppm, aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 600 ppm, aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 500 ppm, aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 450 ppm, aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 400 ppm, aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 350 ppm, aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 300 ppm, aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 250 ppm, aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 150 ppm, aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 140 ppm, aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 120 ppm, aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 100 ppm, aproximadamente 20 ppm a

aproximadamente 80 ppm, aproximadamente 20 ppm a
aproximadamente 60 ppm, aproximadamente 20 ppm a
aproximadamente 50 ppm, aproximadamente 20 ppm a
aproximadamente 40 ppm, aproximadamente 20 ppm a
aproximadamente 30 ppm, aproximadamente 30 ppm a
aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 30 ppm a
aproximadamente 4.500 ppm, aproximadamente 30 ppm a
aproximadamente 4.000 ppm, aproximadamente 30 ppm a
aproximadamente 3.500 ppm, aproximadamente 30 ppm a
aproximadamente 3.000 ppm, aproximadamente 30 ppm a
aproximadamente 2.500 ppm, aproximadamente 30 ppm a
aproximadamente 2.000 ppm, aproximadamente 30 ppm a
aproximadamente 1.500 ppm, aproximadamente 30 ppm a
aproximadamente 1.000 ppm, aproximadamente 30 ppm a
aproximadamente 800 ppm, aproximadamente 30 ppm a
aproximadamente 600 ppm, aproximadamente 30 ppm a
aproximadamente 500 ppm, aproximadamente 30 ppm a
aproximadamente 450 ppm, aproximadamente 30 ppm a
aproximadamente 400 ppm, aproximadamente 30 ppm a
aproximadamente 350 ppm, aproximadamente 30 ppm a
aproximadamente 300 ppm, aproximadamente 30 ppm a
aproximadamente 250 ppm, aproximadamente 30 ppm a
aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 30 ppm a
aproximadamente 150 ppm, aproximadamente 30 ppm a
aproximadamente 140 ppm, aproximadamente 30 ppm a
aproximadamente 120 ppm, aproximadamente 30 ppm a
aproximadamente 100 ppm, aproximadamente 30 ppm a
aproximadamente 80 ppm, aproximadamente 30 ppm a
aproximadamente 60 ppm, aproximadamente 30 ppm a
aproximadamente 50 ppm, aproximadamente 30 ppm a

aproximadamente 40 ppm, aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 4.500 ppm, aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 4.000 ppm, aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 3.500 ppm, aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 3.000 ppm, aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 2.500 ppm, aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 2.000 ppm, aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 1.500 ppm, aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 800 ppm, aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 600 ppm, aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 500 ppm, aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 450 ppm, aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 400 ppm, aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 350 ppm, aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 300 ppm, aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 250 ppm, aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 150 ppm, aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 140 ppm, aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 120 ppm, aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 100 ppm, aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 80 ppm, aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 60 ppm, aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 50 ppm, aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 4.500 ppm, aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 4.000 ppm, aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 3.500 ppm, aproximadamente 50 ppm a

aproximadamente 3.000 ppm, aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 2.500 ppm, aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 2.000 ppm, aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 1.500 ppm, aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 800 ppm, aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 600 ppm, aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 500 ppm, aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 450 ppm, aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 400 ppm, aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 350 ppm, aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 300 ppm, aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 250 ppm, aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 150 ppm, aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 140 ppm, aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 120 ppm, aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 100 ppm, aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 80 ppm, aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 60 ppm, aproximadamente 60 ppm a aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 60 ppm a aproximadamente 4.500 ppm, aproximadamente 60 ppm a aproximadamente 4.000 ppm, aproximadamente 60 ppm a aproximadamente 3.500 ppm, aproximadamente 60 ppm a aproximadamente 3.000 ppm, aproximadamente 60 ppm a aproximadamente 2.500 ppm, aproximadamente 60 ppm a aproximadamente 2.000 ppm, aproximadamente 60 ppm a aproximadamente 1.500 ppm, aproximadamente 60 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, aproximadamente 60 ppm a aproximadamente 800 ppm, aproximadamente 60 ppm a

aproximadamente 600 ppm, aproximadamente 60 ppm a
aproximadamente 500 ppm, aproximadamente 60 ppm a
aproximadamente 450 ppm, aproximadamente 60 ppm a
aproximadamente 400 ppm, aproximadamente 60 ppm a
aproximadamente 350 ppm, aproximadamente 60 ppm a
aproximadamente 300 ppm, aproximadamente 60 ppm a
aproximadamente 250 ppm, aproximadamente 60 ppm a
aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 60 ppm a
aproximadamente 150 ppm, aproximadamente 60 ppm a
aproximadamente 140 ppm, aproximadamente 60 ppm a
aproximadamente 120 ppm, aproximadamente 60 ppm a
aproximadamente 100 ppm, aproximadamente 60 ppm a
aproximadamente 80 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 4.500 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 4.000 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 3.500 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 3.000 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 2.500 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 2.000 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 1.500 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 1.000 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 800 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 600 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 500 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 450 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 400 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 350 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 300 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 250 ppm, aproximadamente 80 ppm a

aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 150 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 140 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 120 ppm, aproximadamente 80 ppm a
aproximadamente 100 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 4.500 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 4.000 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 3.500 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 3.000 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 2.500 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 2.000 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 1.500 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 1.000 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 800 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 600 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 500 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 450 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 400 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 350 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 300 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 250 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 150 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 140 ppm, aproximadamente 100 ppm a
aproximadamente 120 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 4.500 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 4.000 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 3.500 ppm, aproximadamente 120 ppm a

aproximadamente 3.000 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 2.500 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 2.000 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 1.500 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 1.000 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 800 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 600 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 500 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 450 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 400 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 350 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 300 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 250 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 150 ppm, aproximadamente 120 ppm a
aproximadamente 140 ppm, aproximadamente 140 ppm a
aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 140 ppm a
aproximadamente 4.500 ppm, aproximadamente 140 ppm a
aproximadamente 4.000 ppm, aproximadamente 140 ppm a
aproximadamente 3.500 ppm, aproximadamente 140 ppm a
aproximadamente 3.000 ppm, aproximadamente 140 ppm a
aproximadamente 2.500 ppm, aproximadamente 140 ppm a
aproximadamente 2.000 ppm, aproximadamente 140 ppm a
aproximadamente 1.500 ppm, aproximadamente 140 ppm a
aproximadamente 1.000 ppm, aproximadamente 140 ppm a
aproximadamente 800 ppm, aproximadamente 140 ppm a
aproximadamente 600 ppm, aproximadamente 140 ppm a
aproximadamente 500 ppm, aproximadamente 140 ppm a
aproximadamente 450 ppm, aproximadamente 140 ppm a
aproximadamente 400 ppm, aproximadamente 140 ppm a

aproximadamente 350 ppm, aproximadamente 140 ppm a
aproximadamente 300 ppm, aproximadamente 140 ppm a
aproximadamente 250 ppm, aproximadamente 140 ppm a
aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 140 ppm a
aproximadamente 150 ppm, aproximadamente 150 ppm a
aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 150 ppm a
aproximadamente 4.500 ppm, aproximadamente 150 ppm a
aproximadamente 4.000 ppm, aproximadamente 150 ppm a
aproximadamente 3.500 ppm, aproximadamente 150 ppm a
aproximadamente 3.000 ppm, aproximadamente 150 ppm a
aproximadamente 2.500 ppm, aproximadamente 150 ppm a
aproximadamente 2.000 ppm, aproximadamente 150 ppm a
aproximadamente 1.500 ppm, aproximadamente 150 ppm a
aproximadamente 1.000 ppm, aproximadamente 150 ppm a
aproximadamente 800 ppm, aproximadamente 150 ppm a
aproximadamente 600 ppm, aproximadamente 150 ppm a
aproximadamente 500 ppm, aproximadamente 150 ppm a
aproximadamente 450 ppm, aproximadamente 150 ppm a
aproximadamente 400 ppm, aproximadamente 150 ppm a
aproximadamente 350 ppm, aproximadamente 150 ppm a
aproximadamente 300 ppm, aproximadamente 150 ppm a
aproximadamente 250 ppm, aproximadamente 150 ppm a
aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 200 ppm a
aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 200 ppm a
aproximadamente 4.500 ppm, aproximadamente 200 ppm a
aproximadamente 4.000 ppm, aproximadamente 200 ppm a
aproximadamente 3.500 ppm, aproximadamente 200 ppm a
aproximadamente 3.000 ppm, aproximadamente 200 ppm a
aproximadamente 2.500 ppm, aproximadamente 200 ppm a
aproximadamente 2.000 ppm, aproximadamente 200 ppm a

aproximadamente 1.500 ppm, aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 800 ppm, aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 600 ppm, aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 500 ppm, aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 450 ppm, aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 400 ppm, aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 350 ppm, aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 300 ppm, aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 250 ppm, aproximadamente 250 ppm a aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 250 ppm a aproximadamente 4.500 ppm, aproximadamente 250 ppm a aproximadamente 4.000 ppm, aproximadamente 250 ppm a aproximadamente 3.500 ppm, aproximadamente 250 ppm a aproximadamente 3.000 ppm, aproximadamente 250 ppm a aproximadamente 2.500 ppm, aproximadamente 250 ppm a aproximadamente 2.000 ppm, aproximadamente 250 ppm a aproximadamente 1.500 ppm, aproximadamente 250 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, aproximadamente 250 ppm a aproximadamente 800 ppm, aproximadamente 250 ppm a aproximadamente 600 ppm, aproximadamente 250 ppm a aproximadamente 500 ppm, aproximadamente 250 ppm a aproximadamente 450 ppm, aproximadamente 250 ppm a aproximadamente 400 ppm, aproximadamente 250 ppm a aproximadamente 350 ppm, aproximadamente 250 ppm a aproximadamente 300 ppm, aproximadamente 300 ppm a aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 300 ppm a aproximadamente 4.500 ppm, aproximadamente 300 ppm a aproximadamente 4.000 ppm, aproximadamente 300 ppm a aproximadamente 3.500 ppm, aproximadamente 300 ppm a

aproximadamente 3.000 ppm, aproximadamente 300 ppm a aproximadamente 2.500 ppm, aproximadamente 300 ppm a aproximadamente 2.000 ppm, aproximadamente 300 ppm a aproximadamente 1.500 ppm, aproximadamente 300 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, aproximadamente 300 ppm a aproximadamente 800 ppm, aproximadamente 300 ppm a aproximadamente 600 ppm, aproximadamente 300 ppm a aproximadamente 500 ppm, aproximadamente 300 ppm a aproximadamente 450 ppm, aproximadamente 300 ppm a aproximadamente 400 ppm, aproximadamente 300 ppm a aproximadamente 350 ppm, aproximadamente 350 ppm a aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 350 ppm a aproximadamente 4.500 ppm, aproximadamente 350 ppm a aproximadamente 4.000 ppm, aproximadamente 350 ppm a aproximadamente 3.500 ppm, aproximadamente 350 ppm a aproximadamente 3.000 ppm, aproximadamente 350 ppm a aproximadamente 2.500 ppm, aproximadamente 350 ppm a aproximadamente 2.000 ppm, aproximadamente 350 ppm a aproximadamente 1.500 ppm, aproximadamente 350 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, aproximadamente 350 ppm a aproximadamente 800 ppm, aproximadamente 350 ppm a aproximadamente 600 ppm, aproximadamente 350 ppm a aproximadamente 500 ppm, aproximadamente 350 ppm a aproximadamente 450 ppm, aproximadamente 350 ppm a aproximadamente 400 ppm, aproximadamente 400 ppm a aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 400 ppm a aproximadamente 4.500 ppm, aproximadamente 400 ppm a aproximadamente 4.000 ppm, aproximadamente 400 ppm a aproximadamente 3.500 ppm, aproximadamente 400 ppm a aproximadamente 3.000 ppm, aproximadamente 400 ppm a

aproximadamente 2.500 ppm, aproximadamente 400 ppm a aproximadamente 2.000 ppm, aproximadamente 400 ppm a aproximadamente 1.500 ppm, aproximadamente 400 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, aproximadamente 400 ppm a aproximadamente 800 ppm, aproximadamente 400 ppm a aproximadamente 600 ppm, aproximadamente 400 ppm a aproximadamente 500 ppm, aproximadamente 400 ppm a aproximadamente 450 ppm, aproximadamente 450 ppm a aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 450 ppm a aproximadamente 4.500 ppm, aproximadamente 450 ppm a aproximadamente 4.000 ppm, aproximadamente 450 ppm a aproximadamente 3.500 ppm, aproximadamente 450 ppm a aproximadamente 3.000 ppm, aproximadamente 450 ppm a aproximadamente 2.500 ppm, aproximadamente 450 ppm a aproximadamente 2.000 ppm, aproximadamente 450 ppm a aproximadamente 1.500 ppm, aproximadamente 450 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, aproximadamente 450 ppm a aproximadamente 800 ppm, aproximadamente 450 ppm a aproximadamente 600 ppm, aproximadamente 450 ppm a aproximadamente 500 ppm, aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 4.500 ppm, aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 4.000 ppm, aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 3.500 ppm, aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 3.000 ppm, aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 2.500 ppm, aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 2.000 ppm, aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 1.500 ppm, aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 800 ppm, aproximadamente 500 ppm a

aproximadamente 600 ppm, aproximadamente 600 ppm a aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 600 ppm a aproximadamente 4.500 ppm, aproximadamente 600 ppm a aproximadamente 4.000 ppm, aproximadamente 600 ppm a aproximadamente 3.500 ppm, aproximadamente 600 ppm a aproximadamente 3.000 ppm, aproximadamente 600 ppm a aproximadamente 2.500 ppm, aproximadamente 600 ppm a aproximadamente 2.000 ppm, aproximadamente 600 ppm a aproximadamente 1.500 ppm, aproximadamente 600 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, aproximadamente 600 ppm a aproximadamente 800 ppm, aproximadamente 800 ppm a aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 800 ppm a aproximadamente 4.500 ppm, aproximadamente 800 ppm a aproximadamente 4.000 ppm, aproximadamente 800 ppm a aproximadamente 3.500 ppm, aproximadamente 800 ppm a aproximadamente 3.000 ppm, aproximadamente 800 ppm a aproximadamente 2.500 ppm, aproximadamente 800 ppm a aproximadamente 2.000 ppm, aproximadamente 800 ppm a aproximadamente 1.500 ppm, aproximadamente 800 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, aproximadamente 1.000 ppm a aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 1.000 ppm a aproximadamente 4.500 ppm, aproximadamente 1.000 ppm a aproximadamente 4.000 ppm, aproximadamente 1.000 ppm a aproximadamente 3.500 ppm, aproximadamente 1.000 ppm a aproximadamente 3.000 ppm, aproximadamente 1.000 ppm a aproximadamente 2.500 ppm, aproximadamente 1.000 ppm a aproximadamente 2.000 ppm, aproximadamente 1.000 ppm a aproximadamente 1.500 ppm, aproximadamente 1.500 ppm a aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 1.500 ppm a aproximadamente 4.500 ppm, aproximadamente 1.500 ppm a

aproximadamente 4.000 ppm, aproximadamente 1.500 ppm a aproximadamente 3.500 ppm, aproximadamente 1.500 ppm a aproximadamente 3.000 ppm, aproximadamente 1.500 ppm a aproximadamente 2.500 ppm, aproximadamente 1.500 ppm a aproximadamente 2.000 ppm, aproximadamente 2.000 ppm a aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 2.000 ppm a aproximadamente 4.500 ppm, aproximadamente 2.000 ppm a aproximadamente 4.000 ppm, aproximadamente 2.000 ppm a aproximadamente 3.500 ppm, aproximadamente 2.000 ppm a aproximadamente 3.000 ppm, aproximadamente 2.500 ppm a aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 2.500 ppm a aproximadamente 4.500 ppm, aproximadamente 2.500 ppm a aproximadamente 4.000 ppm, aproximadamente 2.500 ppm a aproximadamente 3.500 ppm, aproximadamente 2.500 ppm a aproximadamente 3.000 ppm, aproximadamente 3.000 ppm a aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 3.000 ppm a aproximadamente 4.500 ppm, aproximadamente 3.000 ppm a aproximadamente 4.000 ppm, aproximadamente 3.000 ppm a aproximadamente 3.500 ppm, aproximadamente 3.500 ppm a aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 3.500 ppm a aproximadamente 4.500 ppm, aproximadamente 3.500 ppm a aproximadamente 4.000 ppm, aproximadamente 4.000 ppm a aproximadamente 5.000 ppm, aproximadamente 4.000 ppm a aproximadamente 4.500 ppm, ou aproximadamente 4.500 ppm a aproximadamente 5.000 ppm (onde o sensibilizador está presente em um meio de cultura líquido disposto dentro do recipiente de cultura de teste, por exemplo, por um período de tempo durante a cultivação).

[0136] Em algumas modalidades, o recipiente de cultura de teste pode ter uma concentração de um protetor que é aproximadamente 1

g/L a aproximadamente 10 g/L (por exemplo, de aproximadamente 2 g/L a aproximadamente 8 g/L, de aproximadamente 3 g/L a aproximadamente 7 g/L, de aproximadamente 4 g/L a aproximadamente 6 g/L, ou aproximadamente 5 g/L). Em algumas modalidades, o recipiente de cultura de teste pode ter uma concentração de um protetor (por exemplo, qualquer um dos protetores no presente documento descrito ou conhecidos na técnica) de aproximadamente 1,0 g/L a aproximadamente 10,0 g/L, aproximadamente 1,0 g/L a aproximadamente 9,5 g/L, aproximadamente 1,0 g/L a aproximadamente 9,0 g/L, aproximadamente 1,0 g/L a aproximadamente 8,5 g/L, aproximadamente 1,0 g/L a aproximadamente 8,0 g/L, aproximadamente 1,0 g/L a aproximadamente 7,5 g/L, aproximadamente 1,0 g/L a aproximadamente 7,0 g/L, aproximadamente 1,0 g/L a aproximadamente 6,5 g/L, aproximadamente 1,0 g/L a aproximadamente 6,0 g/L, aproximadamente 1,0 g/L a aproximadamente 5,5 g/L, aproximadamente 1,0 g/L a aproximadamente 5,0 g/L, aproximadamente 1,0 g/L a aproximadamente 4,5 g/L, aproximadamente 1,0 g/L a aproximadamente 4,0 g/L, aproximadamente 1,0 g/L a aproximadamente 3,5 g/L, aproximadamente 1,0 g/L a aproximadamente 3,0 g/L, aproximadamente 1,0 g/L a aproximadamente 2,5 g/L, aproximadamente 1,0 g/L a aproximadamente 2,0 g/L, aproximadamente 1,0 g/L a aproximadamente 1,5 g/L, aproximadamente 1,5 g/L a aproximadamente 10,0 g/L, aproximadamente 1,5 g/L a aproximadamente 9,5 g/L, aproximadamente 1,5 g/L a aproximadamente 9,0 g/L, aproximadamente 1,5 g/L a aproximadamente 8,5 g/L, aproximadamente 1,5 g/L a aproximadamente 8,0 g/L, aproximadamente 1,5 g/L a

aproximadamente	7,5	g/L,	aproximadamente	1,5	g/L	a
aproximadamente	7,0	g/L,	aproximadamente	1,5	g/L	a
aproximadamente	6,5	g/L,	aproximadamente	1,5	g/L	a
aproximadamente	6,0	g/L,	aproximadamente	1,5	g/L	a
aproximadamente	5,5	g/L,	aproximadamente	1,5	g/L	a
aproximadamente	5,0	g/L,	aproximadamente	1,5	g/L	a
aproximadamente	4,5	g/L,	aproximadamente	1,5	g/L	a
aproximadamente	4,0	g/L,	aproximadamente	1,5	g/L	a
aproximadamente	3,5	g/L,	aproximadamente	1,5	g/L	a
aproximadamente	3,0	g/L,	aproximadamente	1,5	g/L	a
aproximadamente	2,5	g/L,	aproximadamente	1,5	g/L	a
aproximadamente	2,0	g/L,	aproximadamente	2,0	g/L	a
aproximadamente	10,0	g/L,	aproximadamente	2,0	g/L	a
aproximadamente	9,5	g/L,	aproximadamente	2,0	g/L	a
aproximadamente	9,0	g/L,	aproximadamente	2,0	g/L	a
aproximadamente	8,5	g/L,	aproximadamente	2,0	g/L	a
aproximadamente	8,0	g/L,	aproximadamente	2,0	g/L	a
aproximadamente	7,5	g/L,	aproximadamente	2,0	g/L	a
aproximadamente	7,0	g/L,	aproximadamente	2,0	g/L	a
aproximadamente	6,5	g/L,	aproximadamente	2,0	g/L	a
aproximadamente	6,0	g/L,	aproximadamente	2,0	g/L	a
aproximadamente	5,5	g/L,	aproximadamente	2,0	g/L	a
aproximadamente	5,0	g/L,	aproximadamente	2,0	g/L	a
aproximadamente	4,5	g/L,	aproximadamente	2,0	g/L	a
aproximadamente	4,0	g/L,	aproximadamente	2,0	g/L	a
aproximadamente	3,5	g/L,	aproximadamente	2,0	g/L	a
aproximadamente	3,0	g/L,	aproximadamente	2,0	g/L	a
aproximadamente	2,5	g/L,	aproximadamente	2,5	g/L	a
aproximadamente	10,0	g/L,	aproximadamente	2,5	g/L	a
aproximadamente	9,5	g/L,	aproximadamente	2,5	g/L	a

aproximadamente	9,0	g/L,	aproximadamente	2,5	g/L	a
aproximadamente	8,5	g/L,	aproximadamente	2,5	g/L	a
aproximadamente	8,0	g/L,	aproximadamente	2,5	g/L	a
aproximadamente	7,5	g/L,	aproximadamente	2,5	g/L	a
aproximadamente	7,0	g/L,	aproximadamente	2,5	g/L	a
aproximadamente	6,5	g/L,	aproximadamente	2,5	g/L	a
aproximadamente	6,0	g/L,	aproximadamente	2,5	g/L	a
aproximadamente	5,5	g/L,	aproximadamente	2,5	g/L	a
aproximadamente	5,0	g/L,	aproximadamente	2,5	g/L	a
aproximadamente	4,5	g/L,	aproximadamente	2,5	g/L	a
aproximadamente	4,0	g/L,	aproximadamente	2,5	g/L	a
aproximadamente	3,5	g/L,	aproximadamente	2,5	g/L	a
aproximadamente	3,0	g/L,	aproximadamente	3,0	g/L	a
aproximadamente	10,0	g/L,	aproximadamente	3,0	g/L	a
aproximadamente	9,5	g/L,	aproximadamente	3,0	g/L	a
aproximadamente	9,0	g/L,	aproximadamente	3,0	g/L	a
aproximadamente	8,5	g/L,	aproximadamente	3,0	g/L	a
aproximadamente	8,0	g/L,	aproximadamente	3,0	g/L	a
aproximadamente	7,5	g/L,	aproximadamente	3,0	g/L	a
aproximadamente	7,0	g/L,	aproximadamente	3,0	g/L	a
aproximadamente	6,5	g/L,	aproximadamente	3,0	g/L	a
aproximadamente	6,0	g/L,	aproximadamente	3,0	g/L	a
aproximadamente	5,5	g/L,	aproximadamente	3,0	g/L	a
aproximadamente	5,0	g/L,	aproximadamente	3,0	g/L	a
aproximadamente	4,5	g/L,	aproximadamente	3,0	g/L	a
aproximadamente	4,0	g/L,	aproximadamente	3,0	g/L	a
aproximadamente	3,5	g/L,	aproximadamente	3,5	g/L	a
aproximadamente	10,0	g/L,	aproximadamente	3,5	g/L	a
aproximadamente	9,5	g/L,	aproximadamente	3,5	g/L	a
aproximadamente	9,0	g/L,	aproximadamente	3,5	g/L	a

aproximadamente	8,5	g/L,	aproximadamente	3,5	g/L	a
aproximadamente	8,0	g/L,	aproximadamente	3,5	g/L	a
aproximadamente	7,5	g/L,	aproximadamente	3,5	g/L	a
aproximadamente	7,0	g/L,	aproximadamente	3,5	g/L	a
aproximadamente	6,5	g/L,	aproximadamente	3,5	g/L	a
aproximadamente	6,0	g/L,	aproximadamente	3,5	g/L	a
aproximadamente	5,5	g/L,	aproximadamente	3,5	g/L	a
aproximadamente	5,0	g/L,	aproximadamente	3,5	g/L	a
aproximadamente	4,5	g/L,	aproximadamente	3,5	g/L	a
aproximadamente	4,0	g/L,	aproximadamente	4,0	g/L	a
aproximadamente	10,0	g/L,	aproximadamente	4,0	g/L	a
aproximadamente	9,5	g/L,	aproximadamente	4,0	g/L	a
aproximadamente	9,0	g/L,	aproximadamente	4,0	g/L	a
aproximadamente	8,5	g/L,	aproximadamente	4,0	g/L	a
aproximadamente	8,0	g/L,	aproximadamente	4,0	g/L	a
aproximadamente	7,5	g/L,	aproximadamente	4,0	g/L	a
aproximadamente	7,0	g/L,	aproximadamente	4,0	g/L	a
aproximadamente	6,5	g/L,	aproximadamente	4,0	g/L	a
aproximadamente	6,0	g/L,	aproximadamente	4,0	g/L	a
aproximadamente	5,5	g/L,	aproximadamente	4,0	g/L	a
aproximadamente	5,0	g/L,	aproximadamente	4,0	g/L	a
aproximadamente	4,5	g/L,	aproximadamente	4,5	g/L	a
aproximadamente	10,0	g/L,	aproximadamente	4,5	g/L	a
aproximadamente	9,5	g/L,	aproximadamente	4,5	g/L	a
aproximadamente	9,0	g/L,	aproximadamente	4,5	g/L	a
aproximadamente	8,5	g/L,	aproximadamente	4,5	g/L	a
aproximadamente	8,0	g/L,	aproximadamente	4,5	g/L	a
aproximadamente	7,5	g/L,	aproximadamente	4,5	g/L	a
aproximadamente	7,0	g/L,	aproximadamente	4,5	g/L	a
aproximadamente	6,5	g/L,	aproximadamente	4,5	g/L	a

aproximadamente 6,0 g/L, aproximadamente 4,5 g/L a
aproximadamente 5,5 g/L, aproximadamente 4,5 g/L a
aproximadamente 5,0 g/L, aproximadamente 5,0 g/L a
aproximadamente 10,0 g/L, aproximadamente 5,0 g/L a
aproximadamente 9,5 g/L, aproximadamente 5,0 g/L a
aproximadamente 9,0 g/L, aproximadamente 5,0 g/L a
aproximadamente 8,5 g/L, aproximadamente 5,0 g/L a
aproximadamente 8,0 g/L, aproximadamente 5,0 g/L a
aproximadamente 7,5 g/L, aproximadamente 5,0 g/L a
aproximadamente 7,0 g/L, aproximadamente 5,0 g/L a
aproximadamente 6,5 g/L, aproximadamente 5,0 g/L a
aproximadamente 6,0 g/L, aproximadamente 5,0 g/L a
aproximadamente 5,5 g/L, aproximadamente 5,5 g/L a
aproximadamente 10,0 g/L, aproximadamente 5,5 g/L a
aproximadamente 9,5 g/L, aproximadamente 5,5 g/L a
aproximadamente 9,0 g/L, aproximadamente 5,5 g/L a
aproximadamente 8,5 g/L, aproximadamente 5,5 g/L a
aproximadamente 8,0 g/L, aproximadamente 5,5 g/L a
aproximadamente 7,5 g/L, aproximadamente 5,5 g/L a
aproximadamente 7,0 g/L, aproximadamente 5,5 g/L a
aproximadamente 6,5 g/L, aproximadamente 5,5 g/L a
aproximadamente 6,0 g/L, aproximadamente 6,0 g/L a
aproximadamente 10,0 g/L, aproximadamente 6,0 g/L a
aproximadamente 9,5 g/L, aproximadamente 6,0 g/L a
aproximadamente 9,0 g/L, aproximadamente 6,0 g/L a
aproximadamente 8,5 g/L, aproximadamente 6,0 g/L a
aproximadamente 8,0 g/L, aproximadamente 6,0 g/L a
aproximadamente 7,5 g/L, aproximadamente 6,0 g/L a
aproximadamente 7,0 g/L, aproximadamente 6,0 g/L a
aproximadamente 6,5 g/L, aproximadamente 6,5 g/L a

aproximadamente 10,0 g/L, aproximadamente 6,5 g/L a aproximadamente 9,5 g/L, aproximadamente 6,5 g/L a aproximadamente 9,0 g/L, aproximadamente 6,5 g/L a aproximadamente 8,5 g/L, aproximadamente 6,5 g/L a aproximadamente 8,0 g/L, aproximadamente 6,5 g/L a aproximadamente 7,5 g/L, aproximadamente 6,5 g/L a aproximadamente 7,0 g/L, aproximadamente 7,0 g/L a aproximadamente 10,0 g/L, aproximadamente 7,0 g/L a aproximadamente 9,5 g/L, aproximadamente 7,0 g/L a aproximadamente 9,0 g/L, aproximadamente 7,0 g/L a aproximadamente 8,5 g/L, aproximadamente 7,0 g/L a aproximadamente 8,0 g/L, aproximadamente 7,0 g/L a aproximadamente 7,5 g/L, aproximadamente 7,5 g/L a aproximadamente 10,0 g/L, aproximadamente 7,5 g/L a aproximadamente 9,5 g/L, aproximadamente 7,5 g/L a aproximadamente 9,0 g/L, aproximadamente 7,5 g/L a aproximadamente 8,5 g/L, aproximadamente 7,5 g/L a aproximadamente 8,0 g/L, aproximadamente 8,0 g/L a aproximadamente 10,0 g/L, aproximadamente 8,0 g/L a aproximadamente 9,5 g/L, aproximadamente 8,0 g/L a aproximadamente 9,0 g/L, aproximadamente 8,0 g/L a aproximadamente 8,5 g/L, aproximadamente 8,5 g/L a aproximadamente 10,0 g/L, aproximadamente 8,5 g/L a aproximadamente 9,5 g/L, aproximadamente 8,5 g/L a aproximadamente 9,0 g/L, aproximadamente 9,0 g/L a aproximadamente 10,0 g/L, aproximadamente 9,0 g/L a aproximadamente 9,5 g/L, ou aproximadamente 9,5 g/L a aproximadamente 10,0 g/L (onde o protetor está presente em um meio de cultura líquido disposto dentro do recipiente de cultura de teste, por exemplo, por um período de tempo durante a cultivação).

[0137] O biorreator de produção pode ser um biorreator de perfusão, um biorreator de lote alimentado, ou um biorreator de lote alimentado concentrado. Em algumas modalidades, o biorreator de produção pode ter um volume de aproximadamente 5 L a aproximadamente 20.000 L (por exemplo, aproximadamente 50 L a aproximadamente 10.000 L). Em algumas modalidades, o biorreator de produção pode ter um volume de mais do que 5 L, mais do que 10 L, mais do que 50 L, mais do que 100 L, mais do que 1000 L, mais do que 2000 L, mais do que 5000 L, mais do que 20000 L, mais do que 100000 L, ou mais do que 150000 L (por exemplo, mais do que 1000 L). Em algumas modalidades, o biorreator de produção pode ter um volume de aproximadamente 5 L a aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 9.000 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 8.500 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 8.000 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 7.500 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 7.000 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 6.500 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 6.000 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 5.500 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 5.000 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 4.500 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 4.000 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 3.500 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 3.000 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 2.500 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 2.000 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 1.500 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente

1.000 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 900 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 800 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 700 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 600 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 500 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 400 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 300 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 250 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 200 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 150 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 100 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 80 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 60 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 50 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 25 L, aproximadamente 5 L a aproximadamente 10 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 9.000 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 8.500 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 8.000 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 7.500 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 7.000 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 6.500 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 6.000 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 5.500 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 5.000 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 4.500 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 4.000 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 3.500 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 3.000 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 2.500 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 2.000 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente

1.500 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 1.000 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 900 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 800 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 700 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 600 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 500 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 400 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 300 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 250 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 200 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 150 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 100 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 80 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 60 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 50 L, aproximadamente 10 L a aproximadamente 25 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 9.000 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 8.500 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 8.000 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 7.500 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 7.000 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 6.500 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 6.000 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 5.500 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 5.000 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 4.500 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 4.000 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 3.500 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 3.000 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 2.500 L, aproximadamente 25 L a

aproximadamente 2.000 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 1.500 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 1.000 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 900 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 800 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 700 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 600 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 500 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 400 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 300 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 250 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 200 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 150 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 100 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 80 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 60 L, aproximadamente 25 L a aproximadamente 50 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 9.000 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 8.500 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 8.000 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 7.500 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 7.000 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 6.500 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 6.000 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 5.500 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 5.000 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 4.500 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 4.000 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 3.500 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 3.000 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 2.500 L, aproximadamente

50 L a aproximadamente 2.000 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 1.500 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 1.000 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 900 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 800 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 700 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 600 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 500 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 400 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 300 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 250 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 200 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 150 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 100 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 80 L, aproximadamente 50 L a aproximadamente 60 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 9.000 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 8.500 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 8.000 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 7.500 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 7.000 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 6.500 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 6.000 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 5.500 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 5.000 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 4.500 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 4.000 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 3.500 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 3.000 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 2.500 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 2.000 L,

aproximadamente 60 L a aproximadamente 1.500 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 1.000 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 900 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 800 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 700 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 600 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 500 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 400 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 300 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 250 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 200 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 150 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 100 L, aproximadamente 60 L a aproximadamente 80 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 9.000 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 8.500 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 8.000 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 7.500 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 7.000 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 6.500 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 6.000 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 5.500 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 5.000 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 4.500 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 4.000 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 3.500 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 3.000 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 2.500 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 2.000 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 1.500 L, aproximadamente 80 L a

aproximadamente 1.000 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 900 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 800 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 700 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 600 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 500 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 400 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 300 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 250 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 200 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 150 L, aproximadamente 80 L a aproximadamente 100 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 9.000 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 8.500 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 8.000 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 7.500 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 7.000 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 6.500 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 6.000 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 5.500 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 5.000 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 4.500 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 4.000 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 3.500 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 3.000 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 2.500 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 2.000 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 1.500 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 1.000 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente

900 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 800 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 700 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 600 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 500 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 400 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 300 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 250 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 200 L, aproximadamente 100 L a aproximadamente 150 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 9.000 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 8.500 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 8.000 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 7.500 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 7.000 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 6.500 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 6.000 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 5.500 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 5.000 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 4.500 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 4.000 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 3.500 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 3.000 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 2.500 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 2.000 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 1.500 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 1.000 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 900 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 800 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 700 L, aproximadamente

150 L a aproximadamente 600 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 500 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 400 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 300 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 250 L, aproximadamente 150 L a aproximadamente 200 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 9.000 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 8.500 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 8.000 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 7.500 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 7.000 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 6.500 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 6.000 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 5.500 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 5.000 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 4.500 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 4.000 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 3.500 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 3.000 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 2.500 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 2.000 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 1.500 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 1.000 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 900 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 800 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 700 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 600 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 500 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 400 L, aproximadamente

200 L a aproximadamente 300 L, aproximadamente 200 L a aproximadamente 250 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 9.000 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 8.500 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 8.000 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 7.500 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 7.000 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 6.500 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 6.000 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 5.500 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 5.000 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 4.500 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 4.000 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 3.500 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 3.000 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 2.500 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 2.000 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 1.500 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 1.000 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 900 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 800 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 700 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 600 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 500 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 400 L, aproximadamente 250 L a aproximadamente 300 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 16.000 L,

aproximadamente 300 L a aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 9.000 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 8.500 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 8.000 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 7.500 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 7.000 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 6.500 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 6.000 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 5.500 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 5.000 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 4.500 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 4.000 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 3.500 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 3.000 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 2.500 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 2.000 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 1.500 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 1.000 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 900 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 800 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 700 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 600 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 500 L, aproximadamente 300 L a aproximadamente 400 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 9.000 L, aproximadamente 400 L a

aproximadamente 8.500 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 8.000 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 7.500 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 7.000 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 6.500 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 6.000 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 5.500 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 5.000 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 4.500 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 4.000 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 3.500 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 3.000 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 2.500 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 2.000 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 1.500 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 1.000 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 900 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 800 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 700 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 600 L, aproximadamente 400 L a aproximadamente 500 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 9.000 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 8.500 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 8.000 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 7.500 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 7.000 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 6.500 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 6.000 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 5.500 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 5.000 L,

aproximadamente 500 L a aproximadamente 4.500 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 4.000 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 3.500 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 3.000 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 2.500 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 2.000 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 1.500 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 1.000 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 900 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 800 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 700 L, aproximadamente 500 L a aproximadamente 600 L, aproximadamente 600 L a aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 600 L a aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 600 L a aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 600 L a aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 600 L a aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 600 L a aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 600 L a aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 600 L a aproximadamente 9.000 L, aproximadamente 600 L a aproximadamente 8.500 L, aproximadamente 600 L a aproximadamente 8.000 L, aproximadamente 600 L a aproximadamente 7.500 L, aproximadamente 600 L a aproximadamente 7.000 L, aproximadamente 600 L a aproximadamente 6.500 L, aproximadamente 600 L a aproximadamente 6.000 L, aproximadamente 600 L a aproximadamente 5.500 L, aproximadamente 600 L a aproximadamente 5.000 L, aproximadamente 600 L a aproximadamente 4.500 L, aproximadamente 600 L a aproximadamente 4.000 L, aproximadamente 600 L a aproximadamente 3.500 L, aproximadamente 600 L a aproximadamente 3.000 L, aproximadamente 600 L a aproximadamente 2.500 L, aproximadamente 600 L a aproximadamente 2.000 L, aproximadamente 600 L a aproximadamente 1.500 L, aproximadamente 600 L a aproximadamente 1.000 L,

aproximadamente 600 L a aproximadamente 900 L, aproximadamente 600 L a aproximadamente 800 L, aproximadamente 600 L a aproximadamente 700 L, aproximadamente 700 L a aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 700 L a aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 700 L a aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 700 L a aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 700 L a aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 700 L a aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 700 L a aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 700 L a aproximadamente 9.000 L, aproximadamente 700 L a aproximadamente 8.500 L, aproximadamente 700 L a aproximadamente 8.000 L, aproximadamente 700 L a aproximadamente 7.500 L, aproximadamente 700 L a aproximadamente 7.000 L, aproximadamente 700 L a aproximadamente 6.500 L, aproximadamente 700 L a aproximadamente 6.000 L, aproximadamente 700 L a aproximadamente 5.500 L, aproximadamente 700 L a aproximadamente 5.000 L, aproximadamente 700 L a aproximadamente 4.500 L, aproximadamente 700 L a aproximadamente 4.000 L, aproximadamente 700 L a aproximadamente 3.500 L, aproximadamente 700 L a aproximadamente 3.000 L, aproximadamente 700 L a aproximadamente 2.500 L, aproximadamente 700 L a aproximadamente 2.000 L, aproximadamente 700 L a aproximadamente 1.500 L, aproximadamente 700 L a aproximadamente 1.000 L, aproximadamente 700 L a aproximadamente 900 L, aproximadamente 700 L a aproximadamente 800 L, aproximadamente 800 L a aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 800 L a aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 800 L a aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 800 L a aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 800 L a aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 800 L a aproximadamente 10.000 L,

aproximadamente 800 L a aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 800 L a aproximadamente 9.000 L, aproximadamente 800 L a aproximadamente 8.500 L, aproximadamente 800 L a aproximadamente 8.000 L, aproximadamente 800 L a aproximadamente 7.500 L, aproximadamente 800 L a aproximadamente 7.000 L, aproximadamente 800 L a aproximadamente 6.500 L, aproximadamente 800 L a aproximadamente 6.000 L, aproximadamente 800 L a aproximadamente 5.500 L, aproximadamente 800 L a aproximadamente 5.000 L, aproximadamente 800 L a aproximadamente 4.500 L, aproximadamente 800 L a aproximadamente 4.000 L, aproximadamente 800 L a aproximadamente 3.500 L, aproximadamente 800 L a aproximadamente 3.000 L, aproximadamente 800 L a aproximadamente 2.500 L, aproximadamente 800 L a aproximadamente 2.000 L, aproximadamente 800 L a aproximadamente 1.500 L, aproximadamente 800 L a aproximadamente 1.000 L, aproximadamente 800 L a aproximadamente 900 L, aproximadamente 900 L a aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 900 L a aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 900 L a aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 900 L a aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 900 L a aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 900 L a aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 900 L a aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 900 L a aproximadamente 9.000 L, aproximadamente 900 L a aproximadamente 8.500 L, aproximadamente 900 L a aproximadamente 8.000 L, aproximadamente 900 L a aproximadamente 7.500 L, aproximadamente 900 L a aproximadamente 7.000 L, aproximadamente 900 L a aproximadamente 6.500 L, aproximadamente 900 L a aproximadamente 6.000 L, aproximadamente 900 L a aproximadamente 5.500 L, aproximadamente 900 L a aproximadamente 5.000 L, aproximadamente 900 L a aproximadamente 4.500 L, aproximadamente

900 L a aproximadamente 4.000 L, aproximadamente 900 L a aproximadamente 3.500 L, aproximadamente 900 L a aproximadamente 3.000 L, aproximadamente 900 L a aproximadamente 2.500 L, aproximadamente 900 L a aproximadamente 2.000 L, aproximadamente 900 L a aproximadamente 1.500 L, aproximadamente 900 L a aproximadamente 1.000 L, aproximadamente 1.000 L a aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 1.000 L a aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 1.000 L a aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 1.000 L a aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 1.000 L a aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 1.000 L a aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 1.000 L a aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 1.000 L a aproximadamente 9.000 L, aproximadamente 1.000 L a aproximadamente 8.500 L, aproximadamente 1.000 L a aproximadamente 8.000 L, aproximadamente 1.000 L a aproximadamente 7.500 L, aproximadamente 1.000 L a aproximadamente 7.000 L, aproximadamente 1.000 L a aproximadamente 6.500 L, aproximadamente 1.000 L a aproximadamente 6.000 L, aproximadamente 1.000 L a aproximadamente 5.500 L, aproximadamente 1.000 L a aproximadamente 5.000 L, aproximadamente 1.000 L a aproximadamente 4.500 L, aproximadamente 1.000 L a aproximadamente 4.000 L, aproximadamente 1.000 L a aproximadamente 3.500 L, aproximadamente 1.000 L a aproximadamente 3.000 L, aproximadamente 1.000 L a aproximadamente 2.500 L, aproximadamente 1.000 L a aproximadamente 2.000 L, aproximadamente 1.000 L a aproximadamente 1.500 L, aproximadamente 1.500 L a aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 1.500 L a

aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 1.500 L a
aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 1.500 L a
aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 1.500 L a
aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 1.500 L a
aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 1.500 L a
aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 1.500 L a
aproximadamente 9.000 L, aproximadamente 1.500 L a
aproximadamente 8.500 L, aproximadamente 1.500 L a
aproximadamente 8.000 L, aproximadamente 1.500 L a
aproximadamente 7.500 L, aproximadamente 1.500 L a
aproximadamente 7.000 L, aproximadamente 1.500 L a
aproximadamente 6.500 L, aproximadamente 1.500 L a
aproximadamente 6.000 L, aproximadamente 1.500 L a
aproximadamente 5.500 L, aproximadamente 1.500 L a
aproximadamente 5.000 L, aproximadamente 1.500 L a
aproximadamente 4.500 L, aproximadamente 1.500 L a
aproximadamente 4.000 L, aproximadamente 1.500 L a
aproximadamente 3.500 L, aproximadamente 1.500 L a
aproximadamente 3.000 L, aproximadamente 1.500 L a
aproximadamente 2.500 L, aproximadamente 1.500 L a
aproximadamente 2.000 L, aproximadamente 2.000 L a
aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 2.000 L a
aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 2.000 L a
aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 2.000 L a
aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 2.000 L a
aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 2.000 L a
aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 2.000 L a
aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 2.000 L a
aproximadamente 9.000 L, aproximadamente 2.000 L a
aproximadamente 8.500 L, aproximadamente 2.000 L a

aproximadamente	8.000	L,	aproximadamente	2.000	L	a
aproximadamente	7.500	L,	aproximadamente	2.000	L	a
aproximadamente	7.000	L,	aproximadamente	2.000	L	a
aproximadamente	6.500	L,	aproximadamente	2.000	L	a
aproximadamente	6.000	L,	aproximadamente	2.000	L	a
aproximadamente	5.500	L,	aproximadamente	2.000	L	a
aproximadamente	5.000	L,	aproximadamente	2.000	L	a
aproximadamente	4.500	L,	aproximadamente	2.000	L	a
aproximadamente	4.000	L,	aproximadamente	2.000	L	a
aproximadamente	3.500	L,	aproximadamente	2.000	L	a
aproximadamente	3.000	L,	aproximadamente	2.000	L	a
aproximadamente	2.500	L,	aproximadamente	2.500	L	a
aproximadamente	20.000	L,	aproximadamente	2.500	L	a
aproximadamente	18.000	L,	aproximadamente	2.500	L	a
aproximadamente	16.000	L,	aproximadamente	2.500	L	a
aproximadamente	14.000	L,	aproximadamente	2.500	L	a
aproximadamente	12.000	L,	aproximadamente	2.500	L	a
aproximadamente	10.000	L,	aproximadamente	2.500	L	a
aproximadamente	9.500	L,	aproximadamente	2.500	L	a
aproximadamente	9.000	L,	aproximadamente	2.500	L	a
aproximadamente	8.500	L,	aproximadamente	2.500	L	a
aproximadamente	8.000	L,	aproximadamente	2.500	L	a
aproximadamente	7.500	L,	aproximadamente	2.500	L	a
aproximadamente	7.000	L,	aproximadamente	2.500	L	a
aproximadamente	6.500	L,	aproximadamente	2.500	L	a
aproximadamente	6.000	L,	aproximadamente	2.500	L	a
aproximadamente	5.500	L,	aproximadamente	2.500	L	a
aproximadamente	5.000	L,	aproximadamente	2.500	L	a
aproximadamente	4.500	L,	aproximadamente	2.500	L	a
aproximadamente	4.000	L,	aproximadamente	2.500	L	a

aproximadamente	3.500	L,	aproximadamente	2.500	L	a
aproximadamente	3.000	L,	aproximadamente	3.000	L	a
aproximadamente	20.000	L,	aproximadamente	3.000	L	a
aproximadamente	18.000	L,	aproximadamente	3.000	L	a
aproximadamente	16.000	L,	aproximadamente	3.000	L	a
aproximadamente	14.000	L,	aproximadamente	3.000	L	a
aproximadamente	12.000	L,	aproximadamente	3.000	L	a
aproximadamente	10.000	L,	aproximadamente	3.000	L	a
aproximadamente	9.500	L,	aproximadamente	3.000	L	a
aproximadamente	9.000	L,	aproximadamente	3.000	L	a
aproximadamente	8.500	L,	aproximadamente	3.000	L	a
aproximadamente	8.000	L,	aproximadamente	3.000	L	a
aproximadamente	7.500	L,	aproximadamente	3.000	L	a
aproximadamente	7.000	L,	aproximadamente	3.000	L	a
aproximadamente	6.500	L,	aproximadamente	3.000	L	a
aproximadamente	6.000	L,	aproximadamente	3.000	L	a
aproximadamente	5.500	L,	aproximadamente	3.000	L	a
aproximadamente	5.000	L,	aproximadamente	3.000	L	a
aproximadamente	4.500	L,	aproximadamente	3.000	L	a
aproximadamente	4.000	L,	aproximadamente	3.000	L	a
aproximadamente	3.500	L,	aproximadamente	3.500	L	a
aproximadamente	20.000	L,	aproximadamente	3.500	L	a
aproximadamente	18.000	L,	aproximadamente	3.500	L	a
aproximadamente	16.000	L,	aproximadamente	3.500	L	a
aproximadamente	14.000	L,	aproximadamente	3.500	L	a
aproximadamente	12.000	L,	aproximadamente	3.500	L	a
aproximadamente	10.000	L,	aproximadamente	3.500	L	a
aproximadamente	9.500	L,	aproximadamente	3.500	L	a
aproximadamente	9.000	L,	aproximadamente	3.500	L	a
aproximadamente	8.500	L,	aproximadamente	3.500	L	a

aproximadamente	8.000	L,	aproximadamente	3.500	L	a
aproximadamente	7.500	L,	aproximadamente	3.500	L	a
aproximadamente	7.000	L,	aproximadamente	3.500	L	a
aproximadamente	6.500	L,	aproximadamente	3.500	L	a
aproximadamente	6.000	L,	aproximadamente	3.500	L	a
aproximadamente	5.500	L,	aproximadamente	3.500	L	a
aproximadamente	5.000	L,	aproximadamente	3.500	L	a
aproximadamente	4.500	L,	aproximadamente	3.500	L	a
aproximadamente	4.000	L,	aproximadamente	4.000	L	a
aproximadamente	20.000	L,	aproximadamente	4.000	L	a
aproximadamente	18.000	L,	aproximadamente	4.000	L	a
aproximadamente	16.000	L,	aproximadamente	4.000	L	a
aproximadamente	14.000	L,	aproximadamente	4.000	L	a
aproximadamente	12.000	L,	aproximadamente	4.000	L	a
aproximadamente	10.000	L,	aproximadamente	4.000	L	a
aproximadamente	9.500	L,	aproximadamente	4.000	L	a
aproximadamente	9.000	L,	aproximadamente	4.000	L	a
aproximadamente	8.500	L,	aproximadamente	4.000	L	a
aproximadamente	8.000	L,	aproximadamente	4.000	L	a
aproximadamente	7.500	L,	aproximadamente	4.000	L	a
aproximadamente	7.000	L,	aproximadamente	4.000	L	a
aproximadamente	6.500	L,	aproximadamente	4.000	L	a
aproximadamente	6.000	L,	aproximadamente	4.000	L	a
aproximadamente	5.500	L,	aproximadamente	4.000	L	a
aproximadamente	5.000	L,	aproximadamente	4.000	L	a
aproximadamente	4.500	L,	aproximadamente	4.500	L	a
aproximadamente	20.000	L,	aproximadamente	4.500	L	a
aproximadamente	18.000	L,	aproximadamente	4.500	L	a
aproximadamente	16.000	L,	aproximadamente	4.500	L	a
aproximadamente	14.000	L,	aproximadamente	4.500	L	a

aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 4.500 L a
aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 4.500 L a
aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 4.500 L a
aproximadamente 9.000 L, aproximadamente 4.500 L a
aproximadamente 8.500 L, aproximadamente 4.500 L a
aproximadamente 8.000 L, aproximadamente 4.500 L a
aproximadamente 7.500 L, aproximadamente 4.500 L a
aproximadamente 7.000 L, aproximadamente 4.500 L a
aproximadamente 6.500 L, aproximadamente 4.500 L a
aproximadamente 6.000 L, aproximadamente 4.500 L a
aproximadamente 5.500 L, aproximadamente 4.500 L a
aproximadamente 5.000 L, aproximadamente 5.000 L a
aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 5.000 L a
aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 5.000 L a
aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 5.000 L a
aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 5.000 L a
aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 5.000 L a
aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 5.000 L a
aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 5.000 L a
aproximadamente 9.000 L, aproximadamente 5.000 L a
aproximadamente 8.500 L, aproximadamente 5.000 L a
aproximadamente 8.000 L, aproximadamente 5.000 L a
aproximadamente 7.500 L, aproximadamente 5.000 L a
aproximadamente 7.000 L, aproximadamente 5.000 L a
aproximadamente 6.500 L, aproximadamente 5.000 L a
aproximadamente 6.000 L, aproximadamente 5.000 L a
aproximadamente 5.500 L, aproximadamente 5.500 L a
aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 5.500 L a
aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 5.500 L a
aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 5.500 L a

aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 5.500 L a
aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 5.500 L a
aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 5.500 L a
aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 5.500 L a
aproximadamente 9.000 L, aproximadamente 5.500 L a
aproximadamente 8.500 L, aproximadamente 5.500 L a
aproximadamente 8.000 L, aproximadamente 5.500 L a
aproximadamente 7.500 L, aproximadamente 5.500 L a
aproximadamente 7.000 L, aproximadamente 5.500 L a
aproximadamente 6.500 L, aproximadamente 5.500 L a
aproximadamente 6.000 L, aproximadamente 6.000 L a
aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 6.000 L a
aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 6.000 L a
aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 6.000 L a
aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 6.000 L a
aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 6.000 L a
aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 6.000 L a
aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 6.000 L a
aproximadamente 9.000 L, aproximadamente 6.000 L a
aproximadamente 8.500 L, aproximadamente 6.000 L a
aproximadamente 8.000 L, aproximadamente 6.000 L a
aproximadamente 7.500 L, aproximadamente 6.000 L a
aproximadamente 7.000 L, aproximadamente 6.000 L a
aproximadamente 6.500 L, aproximadamente 6.500 L a
aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 6.500 L a
aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 6.500 L a
aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 6.500 L a
aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 6.500 L a
aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 6.500 L a
aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 6.500 L a

aproximadamente	9.500	L,	aproximadamente	6.500	L	a
aproximadamente	9.000	L,	aproximadamente	6.500	L	a
aproximadamente	8.500	L,	aproximadamente	6.500	L	a
aproximadamente	8.000	L,	aproximadamente	6.500	L	a
aproximadamente	7.500	L,	aproximadamente	6.500	L	a
aproximadamente	7.000	L,	aproximadamente	7.000	L	a
aproximadamente	20.000	L,	aproximadamente	7.000	L	a
aproximadamente	18.000	L,	aproximadamente	7.000	L	a
aproximadamente	16.000	L,	aproximadamente	7.000	L	a
aproximadamente	14.000	L,	aproximadamente	7.000	L	a
aproximadamente	12.000	L,	aproximadamente	7.000	L	a
aproximadamente	10.000	L,	aproximadamente	7.000	L	a
aproximadamente	9.500	L,	aproximadamente	7.000	L	a
aproximadamente	9.000	L,	aproximadamente	7.000	L	a
aproximadamente	8.500	L,	aproximadamente	7.000	L	a
aproximadamente	8.000	L,	aproximadamente	7.000	L	a
aproximadamente	7.500	L,	aproximadamente	7.500	L	a
aproximadamente	20.000	L,	aproximadamente	7.500	L	a
aproximadamente	18.000	L,	aproximadamente	7.500	L	a
aproximadamente	16.000	L,	aproximadamente	7.500	L	a
aproximadamente	14.000	L,	aproximadamente	7.500	L	a
aproximadamente	12.000	L,	aproximadamente	7.500	L	a
aproximadamente	10.000	L,	aproximadamente	7.500	L	a
aproximadamente	9.500	L,	aproximadamente	7.500	L	a
aproximadamente	9.000	L,	aproximadamente	7.500	L	a
aproximadamente	8.500	L,	aproximadamente	7.500	L	a
aproximadamente	8.000	L,	aproximadamente	8.000	L	a
aproximadamente	20.000	L,	aproximadamente	8.000	L	a
aproximadamente	18.000	L,	aproximadamente	8.000	L	a
aproximadamente	16.000	L,	aproximadamente	8.000	L	a

aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 8.000 L a
aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 8.000 L a
aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 8.000 L a
aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 8.000 L a
aproximadamente 9.000 L, aproximadamente 8.000 L a
aproximadamente 8.500 L, aproximadamente 8.500 L a
aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 8.500 L a
aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 8.500 L a
aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 8.500 L a
aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 8.500 L a
aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 8.500 L a
aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 8.500 L a
aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 8.500 L a
aproximadamente 9.000 L, aproximadamente 9.000 L a
aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 9.000 L a
aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 9.000 L a
aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 9.000 L a
aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 9.000 L a
aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 9.000 L a
aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 9.000 L a
aproximadamente 9.500 L, aproximadamente 9.500 L a
aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 9.500 L a
aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 9.500 L a
aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 9.500 L a
aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 9.500 L a
aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 9.500 L a
aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 10.000 L a
aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 10.000 L a
aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 10.000 L a
aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 10.000 L a

aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 10.000 L a aproximadamente 12.000 L, aproximadamente 12.000 L a aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 12.000 L a aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 12.000 L a aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 12.000 L a aproximadamente 14.000 L, aproximadamente 14.000 L a aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 14.000 L a aproximadamente 18.000 L, aproximadamente 14.000 L a aproximadamente 16.000 L, aproximadamente 16.000 L a aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 16.000 L a aproximadamente 18.000 L, ou aproximadamente 18.000 L a aproximadamente 20.000 L.

[0138] Em algumas modalidades, os parâmetros de operação podem ser quaisquer parâmetros que são relativos à viabilidade de célula ou morte de células (por exemplo, tensão de cisalhamento, concentração de um sensibilizador, concentração de um protetor, temperatura, pH, composição de nutriente, estratégia de carregamento e alimentação de biomassa). A viabilidade de célula ou taxa de morte de células pode ser medida utilizando células que podem expressar desidrogenase de lactato (LDH). Quando uma célula que pode expressar LDH morre, o LDH em uma célula é liberado dentro do meio de cultura líquido. Assim, a viabilidade da célula ou a taxa de morte de células pode ser medida ortogonalmente com LDH, e é proporcional à produção de LDH específica (sLDHp) (Figura 3).

[0139] A Figura 4 mostra como plurônico (por exemplo, protetores), sensibilizador, e cisalhamento (por exemplo, agitação) podem afetar a produção de LDH específica. Como mostrado na Figura 4, os protetores podem diminuir a fixação de célula-bolha e aumentar a durabilidade de célula, assim mantendo uma alta viabilidade célula e protegendo as células da morte. Em contraste, os sensibilizadores podem aumentar as

fixações de célula-bolha e diminuir a durabilidade da célula, assim diminuindo a viabilidade de célula. Como estes parâmetros são interconectados uns com os outros, é frequentemente muito difícil predizer os efeitos de sensibilizadores, agitação, e/ou protetores por modelos tradicionais.

[0140] A Figura 5 mostra que a produção de LDH específica no modelo de pequena escala é uma função de concentração de sensibilizador, concentração de protetor, e agitação. Devido à interação entre estes parâmetros, a produção de LDH específica usualmente não tem uma relação linear com qualquer destes parâmetros. Os efeitos destes parâmetros sobre a produção de LDH específica podem ser determinados por projeto fatorial, por exemplo, projeto fatorial total, ou projeto fatorial fracionário.

[0141] O projeto fatorial envolve executar experimentos sob um conjunto de condições, e as condições são definida por um conjunto de parâmetros (por exemplo, parâmetros de operação). No conjunto de condições, cada parâmetro pode ter dois ou mais níveis. O propósito de projeto fatorial é estudar os efeitos principais e os efeitos de interação entre diferentes parâmetros (por exemplo, concentração de sensibilizador, concentração de protetor, e agitação). O termo "projeto fatorial total" refere-se a um projeto de experimento que inclui todas as possíveis combinações de diferentes níveis através de todos os parâmetros. Por exemplo, com três parâmetros (isto é, fatores) cada um tomando dois níveis, um projeto fatorial total terá 8 combinações no total, e é usualmente denominado um projeto fatorial 2^3 (Figura 6). Em contraste, o termo "projetos fatoriais fracionários" refere-se a projetos experimentais que consistem em um subconjunto (fração) cuidadosamente escolhido das execuções experimentais de um projeto fatorial total. O subconjunto é escolhido de modo a explorar o princípio de dispersão de efeitos para expor informações sobre as características

mais importantes do problema estudado, enquanto utilizando uma fração do esforço de um projeto fatorial total em termos de execuções e recursos experimentais. Executando projeto fatorial, a região inoperável (por exemplo, a combinação de valores de parâmetros que fazem a operação falhar) pode ser identificada. O projeto fatorial é conhecido na técnica, e está descrito, por exemplo, em Box, G. E.; Hunter, W. G.; Hunter, J. S. (2005). Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery (2nd ed.). Wiley. ISBN 0-471-71813-0; Vicente, Gemma, et al. "Application of the factorial design of experiments and response surface methodology to optimize biodiesel production". Industrial crops and products 8.1 (1998): 29-35; Vandervoort, Jo, and Annick Ludwig. "Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study". International journal of pharmaceutics 238.1-2 (2002): 77-92; cada um dos quais está no presente documento incorporado por referência em sua totalidade.

[0142] Em um projeto fatorial típico, os pontos centrais (por exemplo, regiões de interesse) são frequentemente mal preditos. Assim, em algumas modalidades, o projeto fatorial pode ser utilizado em combinação com projeto de composto de centro (por exemplo, projeto de composto de centro inscrito, projeto de composto de centro circunscrito, ou projeto de composto de centro de face) (Figura 7). Um projeto de composto de centro é um projeto experimental que contém um projeto fatorial ou fatorial fracionário incorporado com pontos centrais que é aumentado com um grupo de pontos axiais que permite uma estimativa de curvatura. O projeto de composto é conhecido na técnica, e uma descrição detalhada referente ao projeto de composto de centro pode ser encontrada, por exemplo, em Box, G. E.; Hunter, W. G.; Hunter, J. S. (2005). Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery (2nd ed.). Wiley. ISBN 0-471-71813-0; Ahmadi, M., et al. "Application of the central composite design and response surface

methodology to the advanced treatment of olive oil processing wastewater using Fenton's peroxidation". Journal of Hazardous Materials 123.1-3 (2005): 187-195; cada um dos quais está no presente documento incorporado por referência em sua totalidade.

[0143] Em algumas modalidades, as condições de teste são selecionadas com base em rastreio fatorial total e projeto de composto de centro (por exemplo, projeto de composto de centro inscrito). Combinando o rastreio fatorial total e projeto de composto de centro, as condições de teste selecionadas podem maximizar as regiões de interesse e minimizar regiões de falha potencial (Figura 8 e Figura 9).

[0144] Os resultados do experimento destas condições de teste em recipientes de cultura de teste proveem um contorno estimado que ilustra a relação entre os parâmetros selecionados. Uma vez que o contorno do modelo de pequena escala foi determinado, o modelo de pequena escala pode ser utilizado para predizer os valores faltantes. Por exemplo, com o conhecimento de concentração de antiespumante ou tensão de cisalhamento, este pode predizer quanto plurônico é requerido para as operações. Esta relação é determinada correlacionando a taxa de crescimento de célula e taxas de morte através de diferentes escalas (por exemplo, pequena escala, bancada, produção, etc.).

[0145] Em algumas modalidades, o contorno estimado do modelo de pequena escala pode ser utilizado para coincidir os pontos de dados coletados em uma diferente escala (por exemplo, a escala de produção). Como a concentração de sensibilizador e protetores é conhecida, é possível determinar a tensão de cisalhamento no modelo de pequena escala que corresponde à tensão de cisalhamento no biorreator de produção do contorno (Figura 10). Com base na tensão de cisalhamento que corresponde à tensão de cisalhamento no biorreator de produção e a concentração de sensibilizador, o efeito de mudança

de concentração de protetor (Δ[Protetor]) pode ser determinado do contorno estimado (Figura 11). Por exemplo, como mostrado na Figura 11, o ponto esquerdo distante (círculo), o ponto central esquerdo (círculo), o ponto central direito (círculo), e o ponto direito distante (círculo) todos têm a mesma tensão de cisalhamento e concentração de sensibilizador. A região sombreada é um espaço inoperável. Aumentando a concentração de protetor (do ponto central direito (círculo) para o ponto direito distante (círculo), com uma seta apresentada entre estes dois pontos), a faixa aceitável de concentração de sensibilizador pode ser aumentada, levando a uma melhor resiliência ao sensibilizador.

[0146] Assim, em algumas modalidades, o modelo como no presente documento descrito pode ser utilizado para determinar efeitos interativos entre diferentes parâmetros. Os modelos tradicionais usualmente estudam o efeito de cada parâmetro individualmente. Os modelos como no presente documento descritos podem estudar os efeitos de três parâmetros de uma só vez, ao invés do efeito de cada parâmetro individualmente. Assim, este modelo no presente documento descrito pode predizer onde o desempenho de cultura de células esperado será se qualquer único parâmetro for mudado.

[0147] Ainda, estes parâmetros de escalagem tradicionais usualmente não proveem predições de desempenho de cultura de células. O modelo no presente documento descrito pode predizer uma faixa de operação com melhor orientação, o que leva a uma chance de falha mais baixa quando movendo para uma escala de produção, e este provê a capacidade de escalar uma vez que outros parâmetros tradicionais tenham sido atendidos (P/V, velocidade de ponta, tempo de mistura, K_La).

[0148] Em algumas outras modalidades, os modelos como no presente documento descritos podem ser utilizados para estabelecer

um espaço de projeto de operação para reatores em qualquer escala dado qualquer parâmetro individual ou combinação de parâmetros (por exemplo, plurônico, antiespumante, e cisalhamento). O modelo pode ser utilizado para determinar a quantidade máxima de agentes antiespumantes que a cultura de células pode tolerar antes da falha para uma dada condição de cisalhamento.

[0149] Em algumas modalidades, o modelo pode ser utilizado para determinar a quantidade máxima de agentes antiespumantes que a concentração de plurônico pode sustentar antes de perder sua eficácia para uma dada condição de cisalhamento.

[0150] Em algumas modalidades, o modelo pode ser utilizado para testar diferentes tipos de agentes antiespumantes (antiespumante C, antiespumante autoclavado, antiespumantes irradiados, etc.) contra diferentes plurônicos.

[0151] Em algumas modalidades, o modelo pode ser independente de faixa de densidade da célula, e não precisa aplicar somente a culturas de perfusão intensificada, já que este utiliza LDH para normalizar através de escalas.

[0152] Em algumas modalidades, o modelo pode também testar concentrações de antiespumante ou com adição absoluta (um bolo de 1 vez no início) ou adição diária.

[0153] Em algumas modalidades, o modelo pode ser utilizado para testar a cinética atrás da desativação de antiespumante e seu impacto na cultura de células.

Células

[0154] Os métodos no presente documento providos podem ser utilizados para cultivar uma variedade de diferentes células (por exemplo, células de mamífero, células de bactéria, e células de fermento).

[0155] Exemplos não limitantes de células de bactéria incluem E.

coli, Clostridium difficile, Clostridium sporogenes, Clostridium beijerinkii, e Clostridium acetobutylicum. Células de bactéria comercialmente disponíveis exemplares que podem ser utilizadas em qualquer um dos métodos no presente documento descritos incluem BL21(DE3) (Novagen), BL21(DE3)-pLysS (Novagen), BL21 Star-pLysS (Invitrogen), BL21-SI (Invitrogen), BL21-AI (Invitrogen), Tuner (Novagen), Tuner pLysS (Novagen), Origami (Novagen), Origami D (Novagen), Origami B pLysS (Novagen), Rosetta (Novagen), Rosetta pLysS (Novagen), Rosetta-gami-pLysS (Novagen), BL21 CodonPlus (Stratagene), AD494 (Novagen), BL21trxB (Novagen), HMS174 (Novagen), NovaBlue (DE3) (Novagen), BLR (Novagen), C41(DE3) (Lucigen), C43(DE3) (Lucigen), Lemo21(DE3) (New England BioLabs), SHuffle T7 (New England BioLabs), ArticExpress (Agilent Technologies), e Artic Express (DE3) (Agilent Technologies).

[0156] Exemplos não limitantes de células de fermento incluem: S. cerevisiae, S. exiguus, e Pichia pastoris. Exemplos adicionais de células de fermento que podem ser utilizadas em qualquer um dos métodos no presente documento descritos incluem aquelas do gênero Saccharomyces, Pichia, Kluyveromyces, Hansenula e Yarrowia. Exemplos adicionais de células de fermento que podem ser utilizadas em qualquer um dos métodos no presente documento descritos estão descritos em Nielsen, Methods in Enzymology 536:133-147, 2014.

[0157] Exemplos não limitantes de células de mamífero que podem ser cultivadas utilizando qualquer um dos métodos no presente documento descritos incluem: células de ovário de hamster chinês (CHO) (por exemplo, células CHO DG44, células CHO-K1s, e células CHO-DXB11), Sp2.0, células de mieloma (por exemplo, NS/0), células B, células de hibridoma, células T, células de rim embriônico humano (HEK) (por exemplo, HEK 293E e HEK 293F), células epiteliais de rim de macaco verde africano células (Vero), e células epiteliais de rim

Madin-Darby Canine (Cocker Spaniel) células (MDCK). Células de mamífero adicionais que podem ser cultivadas utilizando os métodos no presente documento descritos são conhecidas na técnica. Em exemplos não limitantes de qualquer um dos métodos no presente documento descritos, a concentração de células de mamífero presentes em um recipiente de cultura de teste e/ou um biorreator de produção no início de cultivação é aproximadamente 0,1 x 10^6 células/mL a aproximadamente 10 x 10^6 células/mL (por exemplo, aproximadamente 0,1 x 10^6 células/mL a aproximadamente 9 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,1 x 10^6 células/mL a aproximadamente 8 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,1 x 10^6 células/mL a aproximadamente 7 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,1 x 10^6 células/mL a aproximadamente 6 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,1 x 10^6 células/mL a aproximadamente 5 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,1 x 10^6 células/mL a aproximadamente 4 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,1 x 10^6 células/mL a aproximadamente 3 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,1 x 10^6 células/mL a aproximadamente 2 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,1 x 10^6 células/mL a aproximadamente 1,5 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,1 x 10^6 células/mL a aproximadamente 1,0 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,1 x 10^6 células/mL a aproximadamente 0,8 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,1 x 10^6 células/mL a aproximadamente 0,5 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,1 x 10^6 células/mL a aproximadamente 0,3 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,2 x 10^6 células/mL a aproximadamente 10 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,2 x 10^6 células/mL a aproximadamente 9 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,2 x 10^6 células/mL a aproximadamente 8 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,2 x 10^6 células/mL a aproximadamente 7 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,2 x 10^6 células/mL a aproximadamente 6 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,2 x 10^6 células/mL a

aproximadamente 5 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,2 x 10^6 células/mL a aproximadamente 4 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,2 x 10^6 células/mL a aproximadamente 3 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,2 x 10^6 células/mL a aproximadamente 2 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,2 x 10^6 células/mL a aproximadamente 1,5 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,2 x 10^6 células/mL a aproximadamente 1,0 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,2 x 10^6 células/mL a aproximadamente 0,8 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,2 x 10^6 células/mL a aproximadamente 0,5 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,3 x 10^6 células/mL a aproximadamente 10 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,3 x 10^6 células/mL a aproximadamente 9 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,3 x 10^6 células/mL a aproximadamente 8 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,3 x 10^6 células/mL a aproximadamente 7 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,3 x 10^6 células/mL a aproximadamente 6 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,3 x 10^6 células/mL a aproximadamente 5 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,3 x 10^6 células/mL a aproximadamente 4 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,3 x 10^6 células/mL a aproximadamente 3 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,3 x 10^6 células/mL a aproximadamente 2 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,3 x 10^6 células/mL a aproximadamente 1,5 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,3 x 10^6 células/mL a aproximadamente 1,0 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,3 x 10^6 células/mL a aproximadamente 0,8 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,3 x 10^6 células/mL a aproximadamente 0,5 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,5 x 10^6 células/mL a aproximadamente 10 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,5 x 10^6 células/mL a aproximadamente 9 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,5 x 10^6 células/mL a aproximadamente 8 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,5 x 10^6 células/mL a aproximadamente 7 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,5 x 10^6 células/mL a

aproximadamente 6 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,5 x 10^6 células/mL a aproximadamente 5 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,5 x 10^6 células/mL a aproximadamente 4 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,5 x 10^6 células/mL a aproximadamente 3 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,5 x 10^6 células/mL a aproximadamente 2 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,5 x 10^6 células/mL a aproximadamente 1,5 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,5 x 10^6 células/mL a aproximadamente 1,0 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,5 x 10^6 células/mL a aproximadamente 0,8 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,8 x 10^6 células/mL a aproximadamente 10 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,8 x 10^6 células/mL a aproximadamente 9 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,8 x 10^6 células/mL a aproximadamente 8 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,8 x 10^6 células/mL a aproximadamente 7 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,8 x 10^6 células/mL a aproximadamente 6 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,8 x 10^6 células/mL a aproximadamente 5 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,8 x 10^6 células/mL a aproximadamente 4 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,8 x 10^6 células/mL a aproximadamente 3 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,8 x 10^6 células/mL a aproximadamente 2 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,8 x 10^6 células/mL a aproximadamente 1,5 x 10^6 células/mL, aproximadamente 0,8 x 10^6 células/mL a aproximadamente 1,0 x 10^6 células/mL, aproximadamente 1,0 x 10^6 células/mL a aproximadamente 10 x 10^6 células/mL, aproximadamente 1,0 x 10^6 células/mL a aproximadamente 9 x 10^6 células/mL, aproximadamente 1,0 x 10^6 células/mL a aproximadamente 8 x 10^6 células/mL, aproximadamente 1,0 x 10^6 células/mL a aproximadamente 7 x 10^6 células/mL, aproximadamente 1,0 x 10^6 células/mL a aproximadamente 6 x 10^6 células/mL, aproximadamente 1,0 x 10^6 células/mL a aproximadamente 5 x 10^6 células/mL, aproximadamente 1,0 x 10^6 células/mL a

aproximadamente 4 x 10^6 células/mL, aproximadamente 1,0 x 10^6 células/mL a aproximadamente 3 x 10^6 células/mL, aproximadamente 1,0 x 10^6 células/mL a aproximadamente 2 x 10^6 células/mL, aproximadamente 1,0 x 10^6 células/mL a aproximadamente 1,5 x 10^6 células/mL, aproximadamente 1,5 x 10^6 células/mL a aproximadamente 10 x 10^6 células/mL, aproximadamente 1,5 x 10^6 células/mL a aproximadamente 9 x 10^6 células/mL, aproximadamente 1,5 x 10^6 células/mL a aproximadamente 8 x 10^6 células/mL, aproximadamente 1,5 x 10^6 células/mL a aproximadamente 7 x 10^6 células/mL, aproximadamente 1,5 x 10^6 células/mL a aproximadamente 6 x 10^6 células/mL, aproximadamente 1,5 x 10^6 células/mL a aproximadamente 5 x 10^6 células/mL, aproximadamente 1,5 x 10^6 células/mL a aproximadamente 4 x 10^6 células/mL, aproximadamente 1,5 x 10^6 células/mL a aproximadamente 3 x 10^6 células/mL, aproximadamente 1,5 x 10^6 células/mL a aproximadamente 2 x 10^6 células/mL, aproximadamente 2 x 10^6 células/mL a aproximadamente 10 x 10^6 células/mL, aproximadamente 2 x 10^6 células/mL a aproximadamente 9 x 10^6 células/mL, aproximadamente 2 x 10^6 células/mL a aproximadamente 8 x 10^6 células/mL, aproximadamente 2 x 10^6 células/mL a aproximadamente 7 x 10^6 células/mL, aproximadamente 2 x 10^6 células/mL a aproximadamente 6 x 10^6 células/mL, aproximadamente 2 x 10^6 células/mL a aproximadamente 5 x 10^6 células/mL, aproximadamente 2 x 10^6 células/mL a aproximadamente 4 x 10^6 células/mL, aproximadamente 2 x 10^6 células/mL a aproximadamente 3 x 10^6 células/mL, aproximadamente 3 x 10^6 células/mL a aproximadamente 10 x 10^6 células/mL, aproximadamente 3 x 10^6 células/mL a aproximadamente 9 x 10^6 células/mL, aproximadamente 3 x 10^6 células/mL a aproximadamente 8 x 10^6 células/mL, aproximadamente 3 x 10^6 células/mL a aproximadamente 7 x 10^6 células/mL, aproximadamente 3 x 10^6 células/mL a

aproximadamente 6 x 10^6 células/mL, aproximadamente 3 x 10^6 células/mL a aproximadamente 5 x 10^6 células/mL, aproximadamente 3 x 10^6 células/mL a aproximadamente 4 x 10^6 células/mL, aproximadamente 4 x 10^6 células/mL a aproximadamente 10 x 10^6 células/mL, aproximadamente 4 x 10^6 células/mL a aproximadamente 9 x 10^6 células/mL, aproximadamente 4 x 10^6 células/mL a aproximadamente 8 x 10^6 células/mL, aproximadamente 4 x 10^6 células/mL a aproximadamente 7 x 10^6 células/mL, aproximadamente 4 x 10^6 células/mL a aproximadamente 6 x 10^6 células/mL, aproximadamente 4 x 10^6 células/mL a aproximadamente 5 x 10^6 células/mL, aproximadamente 5 x 10^6 células/mL a aproximadamente 10 x 10^6 células/mL, aproximadamente 5 x 10^6 células/mL a aproximadamente 9 x 10^6 células/mL, aproximadamente 5 x 10^6 células/mL a aproximadamente 8 x 10^6 células/mL, aproximadamente 5 x 10^6 células/mL a aproximadamente 7 x 10^6 células/mL, aproximadamente 5 x 10^6 células/mL a aproximadamente 6 x 10^6 células/mL, aproximadamente 6 x 10^6 células/mL a aproximadamente 10 x 10^6 células/mL, aproximadamente 6 x 10^6 células/mL a aproximadamente 9 x 10^6 células/mL, aproximadamente 6 x 10^6 células/mL a aproximadamente 8 x 10^6 células/mL, aproximadamente 6 x 10^6 células/mL a aproximadamente 7 x 10^6 células/mL, aproximadamente 7 x 10^6 células/mL a aproximadamente 10 x 10^6 células/mL, aproximadamente 7 x 10^6 células/mL a aproximadamente 9 x 10^6 células/mL, aproximadamente 7 x 10^6 células/mL a aproximadamente 8 x 10^6 células/mL, aproximadamente 8 x 10^6 células/mL a aproximadamente 10 x 10^6 células/mL, aproximadamente 8 x 10^6 células/mL a aproximadamente 9 x 10^6 células/mL, ou aproximadamente 9 x 10^6 células/mL a aproximadamente 10 x 10^6 células/mL).

[0158] A célula (por exemplo, célula de mamífero) pode conter um

ácido nucleico recombinante (por exemplo, um ácido nucleico estavelmente integrado no genoma da célula) que codifica uma proteína terapêutica recombinante (por exemplo, uma proteína terapêutica recombinante que é secretada pela célula). Exemplos não limitantes de proteína terapêutica recombinantes estão no presente documento descritos e são conhecidos na técnica.

Proteínas Terapêuticas Recombinantes

[0159] Uma proteína terapêutica recombinante pode ser uma proteína secretada que é liberada pela célula (por exemplo, célula de mamífero) dentro do meio de cultura líquido da cultura de células. Por exemplo, uma sequência de ácido nucleico que codifica uma proteína recombinante solúvel pode conter uma sequência que codifica um peptídeo de sinal de secreção no terminal N ou C da proteína recombinante, a qual é clivada por uma enzima presente na célula (por exemplo, célula de mamífero), e subsequentemente liberada dentro do meio de cultura líquido de uma cultura de células. Em outros casos, a proteína recombinante é uma proteína solúvel que não é secretada, e a proteína recombinante é recuperada de dentro da célula (por exemplo, célula de mamífero).

[0160] Exemplos não limitantes de proteínas recombinantes incluem imunoglobulinas (incluindo imunoglobulinas de cadeia leve e pesada, anticorpos, ou fragmentos de anticorpos (por exemplo, qualquer um dos fragmentos de anticorpos no presente documento descritos), enzimas (por exemplo, uma galactosidase (por exemplo, uma alfa-galactosidase), Miozima, ou Cerezima), proteínas (por exemplo, eritropoietina humana, fator de necrose tumoral (TNF), ou um interferon alfa ou beta), ou proteínas ou fragmentos de proteínas imunogênicas ou antigênicas (por exemplo, proteínas para utilização em uma vacina). Algumas modalidades, a proteína recombinante é um polipeptídeo de ligação ao antígeno projetado que contém pelo menos

um esqueleto de proteína recombinante multifuncional (ver, por exemplo, as proteínas de ligação ao antígeno recombinante descritas em Gebauer et al., Current Opin. Chem. Biol. 13:245-255, 2009; e Publicação de Pedido de Patente U.S. Número 2012/0164066 (no presente documento incorporados por referência em sua totalidade)). Exemplos não limitantes de proteínas recombinantes que são anticorpos incluem: panitumumab, omalizumab, abagovomab, abciximab, actoxumab, adalimumab, adecatumumab, afelimomab, afutuzumab, alacizumab, alacizumab, alemtuzumab, alirocumab, altumomab, amatuximab, anatumomab, apolizumab, atinumab, tocilizumab, basilizimab, bectumomab, belimumab, bevacizumab, biciromab, canakinumab, cetuximab, daclizumab, densumab, eculizumab, edrecolomab, efalizumab, efungumab, ertumaxomab, etaracizumab, golimumab, infliximab, natalizumab, palivizumab, panitumumab, pertuzumab, ranibizumab, rituximab, tocilizumab, e trastuzumab. Exemplos adicionais de anticorpos terapêuticos são conhecidos na técnica. Exemplos não limitantes adicionais de proteínas recombinantes incluem: alglucosidase alfa, laronidase, abatacept, galsulfase, lutropina alfa, fator antihemofílico, agalsidase beta, interferon beta-1a, darbepoetina alfa, tenecteplase, etanercept, fator de coagulação IX, hormônio de estimulação de folículo, interferon beta-1a, imiglucerase, dornase alfa, epoetina alfa, e alteplase.

[0161] Uma proteína recombinante solúvel secretada pode ser recuperada do meio de cultura líquido. Uma variedade de diferentes métodos para remover o meio de cultura líquido de células (por exemplo, células de mamífero) é conhecida na técnica, incluindo, por exemplo, centrifugação, filtração, pipetagem e/ou aspiração. A proteína recombinante secretada pode então ser recuperada e adicionalmente purificada do meio de cultura líquido utilizando uma variedade de técnicas bioquímicas que incluem vários tipos de cromatografia (por

exemplo, cromatografia de afinidade, cromatografia de peneira molecular, cromatografia de troca de cátions ou cromatografia de troca de ânions) e/ou filtração (por exemplo, filtração de corte de peso molecular).

[0162] Para recuperar uma proteína recombinante intracelular, a célula (por exemplo, célula de mamífero) pode ser lisada. Uma ampla variedade de métodos para lisar células (por exemplo, células de mamífero) é conhecida na técnica, incluindo, por exemplo, sonicação e/ou detergente, enzimática, e/ou lise química. Uma proteína recombinante pode ser purificada de um lisado de célula (por exemplo, um lisado de célula de mamífero) utilizando uma variedade de métodos bioquímicos conhecidos na técnica, tipicamente iniciando com uma etapa de centrifugação para remover os detritos celulares, e então uma ou mais etapas adicionais (por exemplo, um ou mais tipos de cromatografia (por exemplo, cromatografia de afinidade, cromatografia de peneira molecular, cromatografia de troca cátions, ou cromatografia de troca ânions) e/ou filtração (por exemplo, filtração de corte de peso molecular)).

[0163] Em algumas modalidades, a proteína recombinante recuperada é pelo menos ou aproximadamente 50% pura por peso, por exemplo, pelo menos ou aproximadamente 55% pura por peso, pelo menos 60% pura por peso, pelo menos 65% pura por peso, pelo menos 70% pura por peso, pelo menos 75% pura por peso, pelo menos 80% pura por peso, pelo menos 85% pura por peso, pelo menos 90% pura por peso, pelo menos 95% pura por peso, pelo menos 96% pura por peso, pelo menos 97% pura por peso, pelo menos 98% pura por peso, ou pelo menos ou aproximadamente 99% pura por peso, ou maior do que 99% pura por peso.

[0164] Em algumas modalidades, a proteína recombinante recuperada é uma proteína terapêutica humana recombinante que tem

uma ou mais diferentes propriedades biofísicas se comparada com a mesma proteína nativa em um humano (por exemplo, diferenças no tipo ou quantidade de glicosilação, diferenças em fosforilação, diferenças em acilação, diferenças em metalação ou estequiometria de metal, e/ou diferenças em ligação do cofator).

[0165] Também no presente documento provida está uma proteína terapêutica recombinante produzida por qualquer um dos métodos no presente documento descritos.

Meios de Cultura Líquidos

[0166] Os meios de cultura líquidos são conhecidos na técnica. O meio de cultura líquido pode ser suplementado com um soro de mamífero (por exemplo, soro de bezerro fetal e soro bovino), e/ou um hormônio de crescimento ou fator de crescimento (por exemplo, insulina, transferrina e fator de crescimento epidérmico). Alternativamente ou além disso, o meio de cultura líquido pode ser um meio de cultura líquido quimicamente definido, um meio de cultura líquido livre de componentes de animais, um meio de cultura líquido livre de componente derivado de animal, o meio de cultura líquido livre de soro, ou um meio de cultura líquido que contém soro. Exemplos não limitantes de meios de cultura líquidos definidos quimicamente, meios de cultura líquidos livres de componentes derivados de animal, meios de cultura líquidos livres de soro e meios de cultura líquidos que contêm soro são comercialmente disponíveis.

[0167] Um meio de cultura líquido tipicamente contém uma fonte de energia (por exemplo, um carboidrato, tal como glicose), aminoácidos essenciais (por exemplo, o conjunto básico de vinte aminoácidos mais cisteína), vitaminas e/ou outros compostos orgânicos requeridos em baixas concentrações, ácidos graxos livres, e/ou elementos de traços. O meio de cultura líquido pode, se desejado, ser suplementado com, por exemplo, um hormônio de mamíferos ou fator de crescimento (por

exemplo, insulina, transferrina, ou fator de crescimento epidérmico), sais e tamponadores (por exemplo, sais de cálcio, magnésio e fosfato), nucleosídeos e bases (por exemplo, adenosina, timidina, e hipoxantina), proteínas e hidrolisados de tecidos, e/ou qualquer combinação destes ou outros aditivos.

[0168] Exemplos não limitantes de meios de cultura líquidos que são especificamente úteis nos métodos presentemente descritos incluem, por exemplo, CD CHO, Opti CHO, e Forti CHO (todos disponíveis de Life Technologies; Grand Island, NY), Hycell CHO medium (Thermo Fisher Scientific, Inc.; Waltham, MA), Ex-cell CD CHO Fusion medium (Sigma-Aldrich Co.; St. Louis, MO), e PowerCHO medium (Lonza Group, Ltd.; Basel, Switzerland). Componentes de meio que também podem ser úteis nos presentes métodos incluem, mas não estão limitados a, hidrolisados quimicamente definidos (CD), por exemplo, CD peptona, CD polipeptídios (dois ou mais aminoácidos), e fatores de crescimento CD. Exemplos adicionais de meio de cultura de tecido líquido e componentes de meio são conhecidos na técnica.

Cultivação de Perfusão

[0169] A cultivação de uma célula pode ser executada utilizando cultivação de perfusão. Cultivar em perfusão uma célula (por exemplo, uma célula de mamífero) em um recipiente inclui a remoção do recipiente de um primeiro volume de um primeiro meio de cultura líquido (por exemplo, que contém qualquer concentração de células de mamífero, por exemplo, um primeiro volume de um primeiro meio de cultura líquido que é substancialmente livre de células), e adicionar ao primeiro meio de cultura líquido um segundo volume de um segundo meio de cultura líquido. A remoção e adição podem ser executadas simultaneamente ou sequencialmente, ou uma combinação das duas. Ainda, a remoção e adição podem ser executadas continuamente (por exemplo, em uma taxa que remove e substitui um volume entre 0,1% e

800% (por exemplo, entre 1% e 700%, entre 1% e 600%, entre 1% e 500%, entre 1% e 400%, entre 1% e 350%, entre 1% e 300%, entre 1% e 250%, entre 1% e 100%, entre 100% e 200%, entre 5% e 150%, entre 10% e 50%, entre 15% e 40%, entre 8% e 80%, e entre 4% e 30%) do volume do recipiente ou do volume de primeiro meio de cultura líquido ao longo de qualquer dado período de tempo (por exemplo, ao longo de um período de 24 horas, ao longo de um período de tempo incremental de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas, ou ao longo de um período de tempo incremental maior do que 24 horas)) ou periodicamente (por exemplo, uma vez cada terceiro dia, uma vez em dias alternados, uma vez por dia, duas vezes por dia, três vezes por dia, quatro vezes por dia, ou cinco vezes por dia), ou qualquer sua combinação. Onde executado periodicamente, o volume que é removido ou substituído (por exemplo, dentro de aproximadamente um período de 24 horas, dentro de um período de tempo incremental de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas, ou dentro de um período de tempo incremental maior do que 24 horas) pode ser, por exemplo, entre 0,1% e 800% (por exemplo, entre 1% e 700%, entre 1% e 600%, entre 1% e 500%, entre 1% e 400%, entre 1% e 300%, entre 1% e 200%, entre 1% e 100%, entre 100% e 200%, entre 5% e 150%, entre 10% e 50%, entre 15% e 40%, entre 8% e 80%, e entre 4% e 30%) do volume do recipiente ou do volume do primeiro meio de cultura líquido. O primeiro volume do primeiro meio de cultura líquido removido e o segundo volume do segundo meio de cultura líquido adicionado podem em alguns casos ser mantidos aproximadamente os mesmos ao longo de cada período de 24 horas (ou, alternativamente, um período de tempo incremental de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas ou um período de tempo incremental maior do que 24 horas) ao longo do período de cultivação inteiro ou parcial. Como é conhecido na técnica, a taxa na qual o primeiro volume do primeiro meio de cultura

líquido é removido (volume/unidade de tempo) e a taxa na qual o segundo volume do segundo meio de cultura líquido é adicionado (volume/unidade de tempo) podem ser variadas. A taxa na qual o primeiro volume do primeiro meio de cultura líquido é removido (volume/unidade de tempo) e a taxa na qual o segundo volume do segundo meio de cultura líquido é adicionado (volume/unidade de tempo) podem ser aproximadamente as mesmas ou podem ser diferentes.

[0170] Alternativamente, o volume removido e adicionado pode mudar (por exemplo, gradualmente aumentar) ao longo de cada período de 24 horas (ou alternativamente, um período de tempo incremental entre 1 hora e aproximadamente 24 horas ou um período de tempo incremental maior do que 24 horas) durante o período de cultivação. Por exemplo, o volume do primeiro meio de cultura líquido removido e o volume do segundo meio de cultura líquido adicionado dentro de cada período de 24 horas (ou alternativamente, um período de tempo incremental entre aproximadamente 1 hora e aproximadamente de 24 horas ou um período de tempo incremental maior do que 24 horas) ao longo do período de cultivação pode ser aumentado (por exemplo, gradualmente ou através de incrementos escalonados) ao longo do período de cultivação de um volume que é entre 0,5% a aproximadamente 20% do volume de recipiente ou do volume do primeiro meio de cultura líquido a aproximadamente 25% a aproximadamente 150% do volume de recipiente ou do volume do primeiro meio de cultura líquido.

[0171] Praticantes experientes apreciarão que o primeiro meio de cultura líquido e o segundo meio de cultura líquido podem ser o mesmo tipo de meio. Em outros casos, o primeiro meio de cultura líquido e o segundo meio de cultura líquido podem ser diferentes.

[0172] O primeiro volume do primeiro meio de cultura líquido pode

ser removido, por exemplo, por um sistema mecânico que pode remover o primeiro volume do primeiro meio de cultura líquido do recipiente (por exemplo, o primeiro volume do primeiro meio de cultura líquido que é substancialmente livre de células do biorreator). Alternativamente ou além disso, o primeiro volume do primeiro meio de cultura líquido pode ser removido por infiltração ou fluxo de gravidade do primeiro volume do primeiro meio de cultura líquido através de uma membrana estéril com um corte de peso molecular que exclui a célula (por exemplo, célula de mamífero).

[0173] O segundo volume do segundo meio de cultura líquido pode ser adicionado ao primeiro meio de cultura líquido em um modo automatizado, por exemplo, por uma bomba de perfusão.

[0174] Em alguns casos, a remoção do primeiro volume do primeiro meio de cultura líquido (por exemplo, um primeiro volume do primeiro meio de cultura líquido que é substancialmente livre de células de mamífero) e adição ao primeiro meio de cultura líquido um segundo volume do segundo meio de cultura líquido não ocorre dentro de pelo menos uma hora (por exemplo, dentro de duas horas, dentro de 3 horas, dentro de 4 horas, dentro de 5 horas, dentro de 6 horas, dentro de 7 horas, dentro de 8 horas, dentro de 9 horas , dentro de 10 horas, dentro de 12 horas, dentro de 14 horas, dentro de 16 horas, dentro de 18 horas, dentro de 24 horas, dentro de 36 horas, dentro de 48 horas, dentro de 72 horas, dentro de 96 horas, ou após 96 horas) da semeadura do recipiente com uma célula (por exemplo, uma célula de mamífero).

Cultivação de Lote Alimentado

[0175] A cultivação de uma célula (por exemplo, uma célula de mamífero) pode ser executada utilizando cultivação de lote alimentado. A cultivação de lote alimentado de uma célula (por exemplo, uma célula de mamífero) inclui, ao longo da maior parte do período de cultivação, a adição (por exemplo, adição periódica ou contínua) a um primeiro meio

de cultura líquido de um segundo volume de um segundo meio de cultura líquido. A adição do segundo meio de cultura líquido pode ser executada continuamente (por exemplo, em uma taxa que adiciona um volume entre 0,1% e 300% (por exemplo, entre 1% e 250%, entre 1% e 100%, entre 100% e 200%, entre 5% e 150%, entre 10% e 50%, entre 15% e 40%, entre 8% e 80%, e entre 4% e 30%) do volume do recipiente ou do volume do primeiro meio de cultura líquido ao longo de qualquer dado período de tempo (por exemplo, ao longo de um período de 24 horas, ao longo de um período de tempo incremental de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas, ou ao longo de um período de tempo incremental maior do que 24 horas)) ou periodicamente (por exemplo, uma vez a cada terceiro dia, uma vez a cada dia alternado, uma vez ao dia, duas vezes ao dia, três vezes ao dia, quatro vezes ao dia, ou cinco vezes ao dia), ou qualquer sua combinação. Onde executado periodicamente, o volume que é adicionado (por exemplo, dentro de aproximadamente um período de 24 horas, dentro de um período de tempo incremental de aproximadamente uma hora a aproximadamente 24 horas, ou dentro de um período de tempo incremental maior do que 24 horas) pode ser, por exemplo, entre 0,1% e 300% (por exemplo, entre 1% e 200%, entre 1% e 100%, entre 100% e 200%, entre 5% e 150%, entre 10% e 50%, entre 15% e 40%, entre 8% e 80%, e entre 4% e 30%) do volume do recipiente ou do volume do primeiro meio de cultura líquido. O segundo volume do segundo meio de cultura líquido adicionado pode em alguns casos ser mantido aproximadamente o mesmo ao longo de cada período de 24 horas (ou, alternativamente, um período de tempo incremental de aproximadamente uma hora a aproximadamente 24 horas ou um período de tempo incremental maior do que 24 horas) ao longo do período de cultivação inteiro ou parcial. Como é conhecido na técnica, a taxa na qual o segundo volume do segundo meio de cultura líquido é

adicionado (volume/unidade de tempo) pode ser variada sobre o período de cultivação inteiro ou parcial. Por exemplo, o volume do segundo meio de cultura líquido adicionado pode mudar (por exemplo, gradualmente aumentar) ao longo de cada período de 24 horas (ou alternativamente, um período de tempo incremental entre uma hora e aproximadamente 24 horas ou um período de tempo incremental maior do que 24 horas) durante o período de cultivação. Por exemplo o volume do segundo meio de cultura líquido adicionado dentro de cada período de 24 horas (ou alternativamente, um período de tempo incremental entre aproximadamente uma hora e acima de 24 horas ou um período de tempo incremental maior do que 24 horas) ao longo do período de cultivação pode ser aumentado (por exemplo, gradualmente ou através de incrementos escalonados) ao longo do período de cultivação de um volume que é entre 0,5% a aproximadamente 20% do volume de recipiente ou do volume do primeiro meio de cultura líquido para aproximadamente 25% a aproximadamente 150% do volume de recipiente ou do volume do primeiro meio de cultura líquido. A taxa na qual o segundo volume do segundo meio de cultura líquido é adicionado (volume/unidade de tempo) pode ser aproximadamente a mesma ao longo do período de cultivação inteiro ou parcial.

[0176] Praticantes experientes apreciarão que o primeiro meio de cultura líquido e o segundo meio de cultura líquido podem ser o mesmo tipo de meio. Em outros casos, o primeiro meio de cultura líquido e o segundo meio de cultura líquido podem ser diferentes.

[0177] O volume do segundo meio de cultura líquido pode ser adicionado ao primeiro meio de cultura líquido em um modo automatizado, por exemplo, por uma bomba de perfusão.

[0178] Em alguns casos, adicionar ao primeiro meio de cultura líquido um segundo volume do segundo meio de cultura líquido não ocorre dentro de pelo menos uma hora (por exemplo, dentro de 2 horas,

dentro de 3 horas, dentro de 4 horas, dentro de 5 horas, dentro de 6 horas, dentro de 7 horas, dentro de 8 horas, dentro de 9 horas, dentro de 10 horas, dentro de 12 horas, dentro de 14 horas, dentro de 16 horas, dentro de 18 horas, dentro de 24 horas, dentro de 36 horas, dentro de 48 horas, dentro de 72 horas, dentro de 96 horas, ou após 96 horas) da semeadura do recipiente com uma célula (por exemplo, uma célula de mamífero). O meio de cultura de células em culturas de lote alimentado é tipicamente colhido no final do período de cultura e utilizado em qualquer um dos processos no presente documento descritos, no entanto, o meio de cultura de células em culturas de lote alimentado pode também ser colhido em um ou mais pontos no tempo durante um período de cultivação e utilizado em qualquer um dos processos no presente documento descritos.

[0179] Praticantes experientes apreciarão que qualquer um dos vários parâmetros de cultura (por exemplo, recipientes, volumes, taxas ou frequências de substituição de volumes de cultura, frequências de agitação, temperaturas, meios, e concentrações de CO_2) podem ser utilizados em qualquer combinação para executar estes métodos.

Temperatura

[0180] A cultivação pode ser executada a uma temperatura de 32°C a aproximadamente 39°C, por exemplo, aproximadamente 32°C a aproximadamente 37°C. Praticantes experientes apreciarão que a temperatura pode ser mudada em ponto(s) no tempo específico(s) no método de cultivação (por exemplo, durante um ou mais do primeiro período de tempo, do segundo período de tempo, e do terceiro período de tempo), por exemplo, em uma base horária ou diária. Por exemplo, a temperatura pode ser mudada ou deslocada (por exemplo, aumentada ou diminuída) em aproximadamente um dia, dois dias, três dias, quatro dias, cinco dias, seis dias, sete dias, oito dias, nove dias, dez dias, onze dias, doze dias, quatorze dias, quinze dias, dezesseis dias, dezessete

dias, dezoito dias, dezenove dias, ou aproximadamente vinte dias ou mais após a semeadura inicial do frasco de agitação com a célula de mamífero) ou em qualquer ponto no tempo dentro do primeiro, segundo, e/ou terceiro períodos de tempo no presente documento descritos. Por exemplo, a temperatura pode ser deslocada para cima (por exemplo, uma mudança de até ou aproximadamente 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, ou 10,0°C). Por exemplo, a temperatura pode ser deslocada para baixo (por exemplo, uma mudança de até ou aproximadamente 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, ou 10°C).

CO_2

[0181] A cultivação pode incluir incubar uma cultura de células em uma atmosfera que contém no máximo ou aproximadamente 1% a 15% CO_2 (por exemplo, no máximo ou aproximadamente 14% CO_2, 12% CO_2, 10% CO_2, 8% CO_2, 6% CO_2, 5% CO_2, 4% CO_2, 3% CO_2, 2% CO_2, ou no máximo ou aproximadamente 1% CO_2). A cultivação pode incluir incubar uma cultura de células em uma atmosfera umidificada (por exemplo, pelo menos ou aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 85%, 80%, 85%, 90%, ou pelo menos ou aproximadamente 95% de umidade, ou aproximadamente 100% de umidade).

Medição de Viabilidade de Célula

[0182] Uma variedade de métodos e ensaios que podem ser utilizados para determinar a viabilidade de célula de uma cultura de células (por exemplo, uma cultura de células de mamífero) são conhecidos na técnica. Por exemplo, desidrogenase de lactato (LDH) pode ser detectado em um meio de cultura líquido de uma cultura de células. Kits comerciais para detecção de LDH em um meio de cultura líquido de uma cultura de células são conhecidos na técnica.

[0183] Uma variedade de diferentes corantes os quais são excluídos por células viáveis, mas seletivamente captados por células não viáveis são utilizados para determinar a viabilidade de célula. Exemplos não limitantes destes corantes incluem iodeto de propídio, azul de tripano, e 7-aminoactinomicina D. A viabilidade das células é determinada visualizando ou de outro modo detectando a coloração das células após incubação com o corante.

[0184] Ensaios adicionais para determinar a viabilidade de célula de uma cultura de células incluem a detecção de atividade mitocondrial ou atividade de caspase nas células (por exemplo, Resazurin e Formazan). Métodos adicionais para determinar a viabilidade de célula em uma cultura de células são conhecidos na técnica.

Métodos de Predizer o Efeito de uma Concentração de um Sensibilizador Sobre Viabilidade de Célula em um Biorreator de Produção

[0185] Providos no presente documento estão métodos de predizer o efeito de uma concentração de um sensibilizador (por exemplo, qualquer um dos sensibilizadores no presente documento descrito ou conhecidos na técnica) sobre viabilidade de célula em um biorreator de produção que inclui: (a) determinar a viabilidade de célula sob uma pluralidade de condições de teste em um recipiente de cultura de teste (por exemplo, qualquer um dos recipientes de cultura de teste no presente documento descritos), onde a pluralidade de condições de teste é definida por um conjunto de parâmetros; e (b) com base na viabilidade de célula no recipiente de cultura de teste sob a pluralidade de condições, predizer o efeito de uma concentração de um sensibilizador sobre viabilidade de célula em um biorreator de produção (por exemplo, qualquer um dos biorreatores de produção no presente documento descritos).

[0186] Em algumas modalidades, o conjunto de parâmetros inclui,

consiste, ou consiste essencialmente em tensão de cisalhamento, concentração do sensibilizador, e concentração de um protetor (por exemplo, qualquer um dos protetores no presente documento descritos). Em algumas modalidades destes métodos, a pluralidade de condições de teste é selecionada com base em rastreio fatorial total e/ou projeto de composto de centro inscrito. Em algumas modalidades de qualquer destes métodos, o sensibilizador é um antiespumante (por exemplo, um antiespumante baseado em polidimetilsiloxano, simeticona, ou qualquer outro antiespumante no presente documento descrito ou conhecido na técnica).

[0187] Em algumas modalidades, o recipiente de cultura de teste (por exemplo, qualquer um dos recipientes de cultura de teste exemplares no presente documento descritos ou conhecidos na técnica) tem um volume de aproximadamente 5 mL a aproximadamente 5 L (ou qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas). Em algumas modalidades, o recipiente de cultura de teste é um frasco de agitação, por exemplo, um frasco de agitação com defletor.

[0188] Em algumas modalidades, o biorreator de produção (por exemplo, qualquer um dos biorreatores de produção exemplares no presente documento descritos ou conhecidos na técnica) tem um volume de aproximadamente 5 L a aproximadamente 20.000 L (ou qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas). Em alguns exemplos, o biorreator de produção é um biorreator de perfusão. Em outros exemplos, o biorreator de produção é um biorreator de lote alimentado.

[0189] A taxa de morte de células específica como no presente documento descrita é definida pela fórmula abaixo:

Taxa de morte de células específica = (produção de LDH específica)/(conteúdo de LDH por célula).

[0190] Algumas modalidades destes métodos ainda incluem cultivar

uma célula (por exemplo, qualquer uma das células no presente documento descritas) no biorreator de produção utilizando uma concentração do sensibilizador predita para ter uma taxa de morte de células específica menor do que 40% por dia, menor do que 39% por dia, menor do que 38% por dia, menor do que 37% por dia, menor do que 36% por dia, menor do que 35% por dia, menor do que 34% por dia, menor do que 33% por dia, menor do que 32% por dia, menor do que 31% por dia, menor do que 30% por dia, menor do que 29% por dia, menor do que 28% por dia, menor do que 27% por dia, menor do que 26% por dia, menor do que 25% por dia, menor do que 24% por dia, menor do que 23% por dia, menor do que 22% por dia, menor do que 21% por dia, menor do que 20% por dia, menor do que 19% por dia, menor do que 18% por dia, menor do que 17% por dia, menor do que 16% por dia, menor do que 15% por dia, menor do que 14% por dia, menor do que 13% por dia, menor do que 12% por dia, menor do que 11% por dia, menor do que 10% por dia, menor do que 9% por dia, menor do que 8% por dia, menor do que 7% por dia, menor do que 6% por dia, menor do que 5% por dia, menor do que 4% por dia, menor do que 3% por dia, menor do que 2% por dia, ou menor do que 1% por dia, durante a cultivação da célula (por exemplo, qualquer uma das células no presente documento descritas) no biorreator de produção. Algumas modalidades de qualquer um dos métodos no presente documento descritos ainda incluem cultivar uma célula (por exemplo, qualquer uma das células no presente documento descritas) no biorreator de produção utilizando uma concentração do sensibilizador predita para ter uma taxa de morte de células específica de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 0,1% a aproximadamente 38% por dia, aproximadamente 0,1% a aproximadamente 36% por dia, aproximadamente 0,1% a aproximadamente 34% por dia, aproximadamente 0,1% a

aproximadamente 32% por dia, aproximadamente 0,1% a
aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 0,1% a
aproximadamente 28% por dia, aproximadamente 0,1% a
aproximadamente 26% por dia, aproximadamente 0,1% a
aproximadamente 24% por dia, aproximadamente 0,1% a
aproximadamente 22% por dia, aproximadamente 0,1% a
aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 0,1% a
aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 0,1% a
aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 0,1% a
aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 0,1% a
aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 0,1% a
aproximadamente 10% por dia, aproximadamente 0,1% a
aproximadamente 8% por dia, aproximadamente 0,1% a
aproximadamente 6% por dia, aproximadamente 0,1% a
aproximadamente 5% por dia, aproximadamente 0,1% a
aproximadamente 4,5% por dia, aproximadamente 0,1% a
aproximadamente 4,0% por dia, aproximadamente 0,1% a
aproximadamente 3,5% por dia, aproximadamente 0,1% a
aproximadamente 3,0% por dia, aproximadamente 0,1% a
aproximadamente 2,5% por dia, aproximadamente 0,1% a
aproximadamente 2,0% por dia, aproximadamente 0,1% a
aproximadamente 1,5% por dia, aproximadamente 0,1% a
aproximadamente 1,0% por dia, aproximadamente 0,1% a
aproximadamente 0,5% por dia, aproximadamente 0,5% a
aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 0,5% a
aproximadamente 38% por dia, aproximadamente 0,5% a
aproximadamente 36% por dia, aproximadamente 0,5% a
aproximadamente 34% por dia, aproximadamente 0,5% a
aproximadamente 32% por dia, aproximadamente 0,5% a
aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 0,5% a

aproximadamente 28% por dia, aproximadamente 0,5% a
aproximadamente 26% por dia, aproximadamente 0,5% a
aproximadamente 24% por dia, aproximadamente 0,5% a
aproximadamente 22% por dia, aproximadamente 0,5% a
aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 0,5% a
aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 0,5% a
aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 0,5% a
aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 0,5% a
aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 0,5% a
aproximadamente 10% por dia, aproximadamente 0,5% a
aproximadamente 8% por dia, aproximadamente 0,5% a
aproximadamente 6% por dia, aproximadamente 0,5% a
aproximadamente 5% por dia, aproximadamente 0,5% a
aproximadamente 4,5% por dia, aproximadamente 0,5% a
aproximadamente 4,0% por dia, aproximadamente 0,5% a
aproximadamente 3,5% por dia, aproximadamente 0,5% a
aproximadamente 3,0% por dia, aproximadamente 0,5% a
aproximadamente 2,5% por dia, aproximadamente 0,5% a
aproximadamente 2,0% por dia, aproximadamente 0,5% a
aproximadamente 1,5% por dia, aproximadamente 0,5% a
aproximadamente 1,0% por dia, aproximadamente 1,0% a
aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 1,0% a
aproximadamente 38% por dia, aproximadamente 1,0% a
aproximadamente 36% por dia, aproximadamente 1,0% a
aproximadamente 34% por dia, aproximadamente 1,0% a
aproximadamente 32% por dia, aproximadamente 1,0% a
aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 1,0% a
aproximadamente 28% por dia, aproximadamente 1,0% a
aproximadamente 26% por dia, aproximadamente 1,0% a
aproximadamente 24% por dia, aproximadamente 1,0% a

aproximadamente 22% por dia, aproximadamente 1,0% a
aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 1,0% a
aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 1,0% a
aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 1,0% a
aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 1,0% a
aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 1,0% a
aproximadamente 10% por dia, aproximadamente 1,0% a
aproximadamente 8% por dia, aproximadamente 1,0% a
aproximadamente 6% por dia, aproximadamente 1,0% a
aproximadamente 5% por dia, aproximadamente 1,0% a
aproximadamente 4,5% por dia, aproximadamente 1,0% a
aproximadamente 4,0% por dia, aproximadamente 1,0% a
aproximadamente 3,5% por dia, aproximadamente 1,0% a
aproximadamente 3,0% por dia, aproximadamente 1,0% a
aproximadamente 2,5% por dia, aproximadamente 1,0% a
aproximadamente 2,0% por dia, aproximadamente 1,0% a
aproximadamente 1,5% por dia, aproximadamente 1,5% a
aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 1,5% a
aproximadamente 38% por dia, aproximadamente 1,5% a
aproximadamente 36% por dia, aproximadamente 1,5% a
aproximadamente 34% por dia, aproximadamente 1,5% a
aproximadamente 32% por dia, aproximadamente 1,5% a
aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 1,5% a
aproximadamente 28% por dia, aproximadamente 1,5% a
aproximadamente 26% por dia, aproximadamente 1,5% a
aproximadamente 24% por dia, aproximadamente 1,5% a
aproximadamente 22% por dia, aproximadamente 1,5% a
aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 1,5% a
aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 1,5% a
aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 1,5% a

aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 1,5% a
aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 1,5% a
aproximadamente 10% por dia, aproximadamente 1,5% a
aproximadamente 8% por dia, aproximadamente 1,5% a
aproximadamente 6% por dia, aproximadamente 1,5% a
aproximadamente 5% por dia, aproximadamente 1,5% a
aproximadamente 4,5% por dia, aproximadamente 1,5% a
aproximadamente 4,0% por dia, aproximadamente 1,5% a
aproximadamente 3,5% por dia, aproximadamente 1,5% a
aproximadamente 3,0% por dia, aproximadamente 1,5% a
aproximadamente 2,5% por dia, aproximadamente 1,5% a
aproximadamente 2,0% por dia, aproximadamente 2,0% a
aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 2,0% a
aproximadamente 38% por dia, aproximadamente 2,0% a
aproximadamente 36% por dia, aproximadamente 2,0% a
aproximadamente 34% por dia, aproximadamente 2,0% a
aproximadamente 32% por dia, aproximadamente 2,0% a
aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 2,0% a
aproximadamente 28% por dia, aproximadamente 2,0% a
aproximadamente 26% por dia, aproximadamente 2,0% a
aproximadamente 24% por dia, aproximadamente 2,0% a
aproximadamente 22% por dia, aproximadamente 2,0% a
aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 2,0% a
aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 2,0% a
aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 2,0% a
aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 2,0% a
aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 2,0% a
aproximadamente 10% por dia, aproximadamente 2,0% a
aproximadamente 8% por dia, aproximadamente 2,0% a
aproximadamente 6% por dia, aproximadamente 2,0% a

aproximadamente 5% por dia, aproximadamente 2,0% a
aproximadamente 4,5% por dia, aproximadamente 2,0% a
aproximadamente 4,0% por dia, aproximadamente 2,0% a
aproximadamente 3,5% por dia, aproximadamente 2,0% a
aproximadamente 3,0% por dia, aproximadamente 2,0% a
aproximadamente 2,5% por dia, aproximadamente 2,5% a
aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 2,5% a
aproximadamente 38% por dia, aproximadamente 2,5% a
aproximadamente 36% por dia, aproximadamente 2,5% a
aproximadamente 34% por dia, aproximadamente 2,5% a
aproximadamente 32% por dia, aproximadamente 2,5% a
aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 2,5% a
aproximadamente 28% por dia, aproximadamente 2,5% a
aproximadamente 26% por dia, aproximadamente 2,5% a
aproximadamente 24% por dia, aproximadamente 2,5% a
aproximadamente 22% por dia, aproximadamente 2,5% a
aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 2,5% a
aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 2,5% a
aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 2,5% a
aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 2,5% a
aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 2,5% a
aproximadamente 10% por dia, aproximadamente 2,5% a
aproximadamente 8% por dia, aproximadamente 2,5% a
aproximadamente 6% por dia, aproximadamente 2,5% a
aproximadamente 5% por dia, aproximadamente 2,5% a
aproximadamente 4,5% por dia, aproximadamente 2,5% a
aproximadamente 4,0% por dia, aproximadamente 2,5% a
aproximadamente 3,5% por dia, aproximadamente 2,5% a
aproximadamente 3,0% por dia, aproximadamente 3,0% a
aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 3,0% a

aproximadamente 38% por dia, aproximadamente 3,0% a
aproximadamente 36% por dia, aproximadamente 3,0% a
aproximadamente 34% por dia, aproximadamente 3,0% a
aproximadamente 32% por dia, aproximadamente 3,0% a
aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 3,0% a
aproximadamente 28% por dia, aproximadamente 3,0% a
aproximadamente 26% por dia, aproximadamente 3,0% a
aproximadamente 24% por dia, aproximadamente 3,0% a
aproximadamente 22% por dia, aproximadamente 3,0% a
aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 3,0% a
aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 3,0% a
aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 3,0% a
aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 3,0% a
aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 3,0% a
aproximadamente 10% por dia, aproximadamente 3,0% a
aproximadamente 8% por dia, aproximadamente 3,0% a
aproximadamente 6% por dia, aproximadamente 3,0% a
aproximadamente 5% por dia, aproximadamente 3,0% a
aproximadamente 4,5% por dia, aproximadamente 3,0% a
aproximadamente 4,0% por dia, aproximadamente 3,0% a
aproximadamente 3,5% por dia, aproximadamente 3,5% a
aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 3,5% a
aproximadamente 38% por dia, aproximadamente 3,5% a
aproximadamente 36% por dia, aproximadamente 3,5% a
aproximadamente 34% por dia, aproximadamente 3,5% a
aproximadamente 32% por dia, aproximadamente 3,5% a
aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 3,5% a
aproximadamente 28% por dia, aproximadamente 3,5% a
aproximadamente 26% por dia, aproximadamente 3,5% a
aproximadamente 24% por dia, aproximadamente 3,5% a

aproximadamente 22% por dia, aproximadamente 3,5% a
aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 3,5% a
aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 3,5% a
aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 3,5% a
aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 3,5% a
aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 3,5% a
aproximadamente 10% por dia, aproximadamente 3,5% a
aproximadamente 8% por dia, aproximadamente 3,5% a
aproximadamente 6% por dia, aproximadamente 3,5% a
aproximadamente 5% por dia, aproximadamente 3,5% a
aproximadamente 4,5% por dia, aproximadamente 3,5% a
aproximadamente 4,0% por dia, aproximadamente 4,0% a
aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 4,0% a
aproximadamente 38% por dia, aproximadamente 4,0% a
aproximadamente 36% por dia, aproximadamente 4,0% a
aproximadamente 34% por dia, aproximadamente 4,0% a
aproximadamente 32% por dia, aproximadamente 4,0% a
aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 4,0% a
aproximadamente 28% por dia, aproximadamente 4,0% a
aproximadamente 26% por dia, aproximadamente 4,0% a
aproximadamente 24% por dia, aproximadamente 4,0% a
aproximadamente 22% por dia, aproximadamente 4,0% a
aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 4,0% a
aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 4,0% a
aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 4,0% a
aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 4,0% a
aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 4,0% a
aproximadamente 10% por dia, aproximadamente 4,0% a
aproximadamente 8% por dia, aproximadamente 4,0% a
aproximadamente 6% por dia, aproximadamente 4,0% a

aproximadamente 5% por dia, aproximadamente 4,0% a
aproximadamente 4,5% por dia, aproximadamente 4,5% a
aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 4,5% a
aproximadamente 38% por dia, aproximadamente 4,5% a
aproximadamente 36% por dia, aproximadamente 4,5% a
aproximadamente 34% por dia, aproximadamente 4,5% a
aproximadamente 32% por dia, aproximadamente 4,5% a
aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 4,5% a
aproximadamente 28% por dia, aproximadamente 4,5% a
aproximadamente 26% por dia, aproximadamente 4,5% a
aproximadamente 24% por dia, aproximadamente 4,5% a
aproximadamente 22% por dia, aproximadamente 4,5% a
aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 4,5% a
aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 4,5% a
aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 4,5% a
aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 4,5% a
aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 4,5% a
aproximadamente 10% por dia, aproximadamente 4,5% a
aproximadamente 8% por dia, aproximadamente 4,5% a
aproximadamente 6% por dia, aproximadamente 4,5% a
aproximadamente 5% por dia, aproximadamente 5% a
aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 5% a
aproximadamente 38% por dia, aproximadamente 5% a
aproximadamente 36% por dia, aproximadamente 5% a
aproximadamente 34% por dia, aproximadamente 5% a
aproximadamente 32% por dia, aproximadamente 5% a
aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 5% a
aproximadamente 28% por dia, aproximadamente 5% a
aproximadamente 26% por dia, aproximadamente 5% a
aproximadamente 24% por dia, aproximadamente 5% a

aproximadamente 22% por dia, aproximadamente 5% a
aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 5% a
aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 5% a
aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 5% a
aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 5% a
aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 5% a
aproximadamente 10% por dia, aproximadamente 5% a
aproximadamente 8% por dia, aproximadamente 5% a
aproximadamente 6% por dia, aproximadamente 6% a
aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 6% a
aproximadamente 38% por dia, aproximadamente 6% a
aproximadamente 36% por dia, aproximadamente 6% a
aproximadamente 34% por dia, aproximadamente 6% a
aproximadamente 32% por dia, aproximadamente 6% a
aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 6% a
aproximadamente 28% por dia, aproximadamente 6% a
aproximadamente 26% por dia, aproximadamente 6% a
aproximadamente 24% por dia, aproximadamente 6% a
aproximadamente 22% por dia, aproximadamente 6% a
aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 6% a
aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 6% a
aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 6% a
aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 6% a
aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 6% a
aproximadamente 10% por dia, aproximadamente 6% a
aproximadamente 8% por dia, aproximadamente 8% a
aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 8% a
aproximadamente 38% por dia, aproximadamente 8% a
aproximadamente 36% por dia, aproximadamente 8% a
aproximadamente 34% por dia, aproximadamente 8% a

aproximadamente 32% por dia, aproximadamente 8% a
aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 8% a
aproximadamente 28% por dia, aproximadamente 8% a
aproximadamente 26% por dia, aproximadamente 8% a
aproximadamente 24% por dia, aproximadamente 8% a
aproximadamente 22% por dia, aproximadamente 8% a
aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 8% a
aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 8% a
aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 8% a
aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 8% a
aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 8% a
aproximadamente 10% por dia, aproximadamente 10% a
aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 10% a
aproximadamente 38% por dia, aproximadamente 10% a
aproximadamente 36% por dia, aproximadamente 10% a
aproximadamente 34% por dia, aproximadamente 10% a
aproximadamente 32% por dia, aproximadamente 10% a
aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 10% a
aproximadamente 28% por dia, aproximadamente 10% a
aproximadamente 26% por dia, aproximadamente 10% a
aproximadamente 24% por dia, aproximadamente 10% a
aproximadamente 22% por dia, aproximadamente 10% a
aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 10% a
aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 10% a
aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 10% a
aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 10% a
aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 12% a
aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 12% a
aproximadamente 38% por dia, aproximadamente 12% a
aproximadamente 36% por dia, aproximadamente 12% a

aproximadamente 34% por dia, aproximadamente 12% a
aproximadamente 32% por dia, aproximadamente 12% a
aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 12% a
aproximadamente 28% por dia, aproximadamente 12% a
aproximadamente 26% por dia, aproximadamente 12% a
aproximadamente 24% por dia, aproximadamente 12% a
aproximadamente 22% por dia, aproximadamente 12% a
aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 12% a
aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 12% a
aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 12% a
aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 14% a
aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 14% a
aproximadamente 38% por dia, aproximadamente 14% a
aproximadamente 36% por dia, aproximadamente 14% a
aproximadamente 34% por dia, aproximadamente 14% a
aproximadamente 32% por dia, aproximadamente 14% a
aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 14% a
aproximadamente 28% por dia, aproximadamente 14% a
aproximadamente 26% por dia, aproximadamente 14% a
aproximadamente 24% por dia, aproximadamente 14% a
aproximadamente 22% por dia, aproximadamente 14% a
aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 14% a
aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 14% a
aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 16% a
aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 16% a
aproximadamente 38% por dia, aproximadamente 16% a
aproximadamente 36% por dia, aproximadamente 16% a
aproximadamente 34% por dia, aproximadamente 16% a
aproximadamente 32% por dia, aproximadamente 16% a
aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 16% a

aproximadamente 28% por dia, aproximadamente 16% a
aproximadamente 26% por dia, aproximadamente 16% a
aproximadamente 24% por dia, aproximadamente 16% a
aproximadamente 22% por dia, aproximadamente 16% a
aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 16% a
aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 18% a
aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 18% a
aproximadamente 38% por dia, aproximadamente 18% a
aproximadamente 36% por dia, aproximadamente 18% a
aproximadamente 34% por dia, aproximadamente 18% a
aproximadamente 32% por dia, aproximadamente 18% a
aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 18% a
aproximadamente 28% por dia, aproximadamente 18% a
aproximadamente 26% por dia, aproximadamente 18% a
aproximadamente 24% por dia, aproximadamente 18% a
aproximadamente 22% por dia, aproximadamente 18% a
aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 20% a
aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 20% a
aproximadamente 38% por dia, aproximadamente 20% a
aproximadamente 36% por dia, aproximadamente 20% a
aproximadamente 34% por dia, aproximadamente 20% a
aproximadamente 32% por dia, aproximadamente 20% a
aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 20% a
aproximadamente 28% por dia, aproximadamente 20% a
aproximadamente 26% por dia, aproximadamente 20% a
aproximadamente 24% por dia, aproximadamente 20% a
aproximadamente 22% por dia, aproximadamente 22% a
aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 22% a
aproximadamente 38% por dia, aproximadamente 22% a
aproximadamente 36% por dia, aproximadamente 22% a

aproximadamente 34% por dia, aproximadamente 22% a
aproximadamente 32% por dia, aproximadamente 22% a
aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 22% a
aproximadamente 28% por dia, aproximadamente 22% a
aproximadamente 26% por dia, aproximadamente 22% a
aproximadamente 24% por dia, aproximadamente 24% a
aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 24% a
aproximadamente 38% por dia, aproximadamente 24% a
aproximadamente 36% por dia, aproximadamente 24% a
aproximadamente 34% por dia, aproximadamente 24% a
aproximadamente 32% por dia, aproximadamente 24% a
aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 24% a
aproximadamente 28% por dia, aproximadamente 24% a
aproximadamente 26% por dia, aproximadamente 26% a
aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 26% a
aproximadamente 38% por dia, aproximadamente 26% a
aproximadamente 36% por dia, aproximadamente 26% a
aproximadamente 34% por dia, aproximadamente 26% a
aproximadamente 32% por dia, aproximadamente 26% a
aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 26% a
aproximadamente 28% por dia, aproximadamente 28% a
aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 28% a
aproximadamente 38% por dia, aproximadamente 28% a
aproximadamente 36% por dia, aproximadamente 28% a
aproximadamente 34% por dia, aproximadamente 28% a
aproximadamente 32% por dia, aproximadamente 28% a
aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 30% a
aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 30% a
aproximadamente 38% por dia, aproximadamente 30% a
aproximadamente 36% por dia, aproximadamente 30% a

aproximadamente 34% por dia, aproximadamente 30% a aproximadamente 32% por dia, aproximadamente 32% a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 32% a aproximadamente 38% por dia, aproximadamente 32% a aproximadamente 36% por dia, aproximadamente 32% a aproximadamente 34% por dia, aproximadamente 34% a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 34% a aproximadamente 38% por dia, aproximadamente 34% a aproximadamente 36% por dia, aproximadamente 36% a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 36% a aproximadamente 38% por dia, ou aproximadamente 38% a aproximadamente 40% por dia, durante a cultivação da célula (por exemplo, qualquer uma das células no presente documento descritas) no biorreator de produção.

[0191] Algumas modalidades destes métodos ainda incluem cultivar uma célula (por exemplo, qualquer uma das células no presente documento descritas) no biorreator de produção (por exemplo, qualquer um dos biorreatores de produção no presente documento descrito) utilizando uma concentração do sensibilizador predita para resultar em uma produção de LDH específica de célula menor do que 150 nU/célula/dia, menor do que 145 nU/célula/dia, menor do que 140 nU/célula/dia, menor do que 135 nU/célula/dia, menor do que 130 nU/célula/dia, menor do que 125 nU/célula/dia, menor do que 120 nU/célula/dia, menor do que 115 nU/célula/dia, menor do que 150 nU/célula/dia, menor do que 110 nU/célula/dia, menor do que 105 nU/célula/dia, menor do que 100 nU/célula/dia, menor do que 95 nU/célula/dia, menor do que 90 nU/célula/dia, menor do que 85 nU/célula/dia, menor do que 80 nU/célula/dia, menor do que 75 nU/célula/dia, menor do que 70 nU/célula/dia, menor do que 65 nU/célula/dia, menor do que 60 nU/célula/dia, menor do que 55

nU/célula/dia, menor do que 50 nU/célula/dia, menor do que 45 nU/célula/dia, menor do que 45 nU/célula/dia, menor do que 40 nU/célula/dia¸ menor do que 35 nU/célula/dia, menor do que 30 nU/célula/dia, menor do que 25 nU/célula/dia, menor do que 20 nU/célula/dia, menor do que 15 nU/célula/dia, menor do que 10 nU/célula/dia, menor do que 5 nU/célula/dia, ou menor do que menor do que 1 nU/célula/dia, durante a cultivação da célula no biorreator de produção. Algumas modalidades destes métodos ainda incluem cultivar uma célula (por exemplo, qualquer uma das células no presente documento descritas) no biorreator de produção (por exemplo, qualquer um dos biorreatores de produção no presente documento descrito) utilizando uma concentração do sensibilizador predita para resultar em uma produção de LDH específica de célula de aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia, aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 140 nU/célula/dia, aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 130 nU/célula/dia, aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 120 nU/célula/dia, aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 110 nU/célula/dia, aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 100 nU/célula/dia, aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 95 nU/célula/dia, aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 90 nU/célula/dia, aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 85 nU/célula/dia, aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 80 nU/célula/dia, aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 75 nU/célula/dia, aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 70 nU/célula/dia, aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 65 nU/célula/dia, aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 60 nU/célula/dia, aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente

55 nU/célula/dia, aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 50 nU/célula/dia, aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 45 nU/célula/dia, aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 40 nU/célula/dia, aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 35 nU/célula/dia, aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 30 nU/célula/dia, aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 25 nU/célula/dia, aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 20 nU/célula/dia, aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 15 nU/célula/dia, aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 10 nU/célula/dia, aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 5 nU/célula/dia, aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 2,5 nU/célula/dia, aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 1,0 nU/célula/dia, aproximadamente 1,0 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia, aproximadamente 1,0 nU/célula/dia a aproximadamente 140 nU/célula/dia, aproximadamente 1,0 nU/célula/dia a aproximadamente 130 nU/célula/dia, aproximadamente 1,0 nU/célula/dia a aproximadamente 120 nU/célula/dia, aproximadamente 1,0 nU/célula/dia a aproximadamente 110 nU/célula/dia, aproximadamente 1,0 nU/célula/dia a aproximadamente 100 nU/célula/dia, aproximadamente 1,0 nU/célula/dia a aproximadamente 95 nU/célula/dia, aproximadamente 1,0 nU/célula/dia a aproximadamente 90 nU/célula/dia, aproximadamente 1,0 nU/célula/dia a aproximadamente 85 nU/célula/dia, aproximadamente 1,0 nU/célula/dia a aproximadamente 80 nU/célula/dia, aproximadamente 1,0 nU/célula/dia a aproximadamente 75 nU/célula/dia, aproximadamente 1,0 nU/célula/dia a aproximadamente 70 nU/célula/dia, aproximadamente 1,0 nU/célula/dia a aproximadamente 65 nU/célula/dia, aproximadamente 1,0 nU/célula/dia

a aproximadamente 60 nU/célula/dia, aproximadamente 1,0 nU/célula/dia a aproximadamente 55 nU/célula/dia, aproximadamente 1,0 nU/célula/dia a aproximadamente 50 nU/célula/dia, aproximadamente 1,0 nU/célula/dia a aproximadamente 45 nU/célula/dia, aproximadamente 1,0 nU/célula/dia a aproximadamente 40 nU/célula/dia, aproximadamente 1,0 nU/célula/dia a aproximadamente 35 nU/célula/dia, aproximadamente 1,0 nU/célula/dia a aproximadamente 30 nU/célula/dia, aproximadamente 1,0 nU/célula/dia a aproximadamente 25 nU/célula/dia, aproximadamente 1,0 nU/célula/dia a aproximadamente 20 nU/célula/dia, aproximadamente 1,0 nU/célula/dia a aproximadamente 15 nU/célula/dia, aproximadamente 1,0 nU/célula/dia a aproximadamente 10 nU/célula/dia, aproximadamente 1,0 nU/célula/dia a aproximadamente 5 nU/célula/dia, aproximadamente 1,0 nU/célula/dia a aproximadamente 2,5 nU/célula/dia, aproximadamente 2,5 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia, aproximadamente 2,5 nU/célula/dia a aproximadamente 140 nU/célula/dia, aproximadamente 2,5 nU/célula/dia a aproximadamente 130 nU/célula/dia, aproximadamente 2,5 nU/célula/dia a aproximadamente 120 nU/célula/dia, aproximadamente 2,5 nU/célula/dia a aproximadamente 110 nU/célula/dia, aproximadamente 2,5 nU/célula/dia a aproximadamente 100 nU/célula/dia, aproximadamente 2,5 nU/célula/dia a aproximadamente 95 nU/célula/dia, aproximadamente 2,5 nU/célula/dia a aproximadamente 90 nU/célula/dia, aproximadamente 2,5 nU/célula/dia a aproximadamente 85 nU/célula/dia, aproximadamente 2,5 nU/célula/dia a aproximadamente 80 nU/célula/dia, aproximadamente 2,5 nU/célula/dia a aproximadamente 75 nU/célula/dia, aproximadamente 2,5 nU/célula/dia a aproximadamente 70 nU/célula/dia, aproximadamente 2,5 nU/célula/dia a aproximadamente 65 nU/célula/dia,

aproximadamente 2,5 nU/célula/dia a aproximadamente 60 nU/célula/dia, aproximadamente 2,5 nU/célula/dia a aproximadamente 55 nU/célula/dia, aproximadamente 2,5 nU/célula/dia a aproximadamente 50 nU/célula/dia, aproximadamente 2,5 nU/célula/dia a aproximadamente 45 nU/célula/dia, aproximadamente 2,5 nU/célula/dia a aproximadamente 40 nU/célula/dia, aproximadamente 2,5 nU/célula/dia a aproximadamente 35 nU/célula/dia, aproximadamente 2,5 nU/célula/dia a aproximadamente 30 nU/célula/dia, aproximadamente 2,5 nU/célula/dia a aproximadamente 25 nU/célula/dia, aproximadamente 2,5 nU/célula/dia a aproximadamente 20 nU/célula/dia, aproximadamente 2,5 nU/célula/dia a aproximadamente 15 nU/célula/dia, aproximadamente 2,5 nU/célula/dia a aproximadamente 10 nU/célula/dia, aproximadamente 2,5 nU/célula/dia a aproximadamente 5 nU/célula/dia, aproximadamente 5 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia, aproximadamente 5 nU/célula/dia a aproximadamente 140 nU/célula/dia, aproximadamente 5 nU/célula/dia a aproximadamente 130 nU/célula/dia, aproximadamente 5 nU/célula/dia a aproximadamente 120 nU/célula/dia, aproximadamente 5 nU/célula/dia a aproximadamente 110 nU/célula/dia, aproximadamente 5 nU/célula/dia a aproximadamente 100 nU/célula/dia, aproximadamente 5 nU/célula/dia a aproximadamente 95 nU/célula/dia, aproximadamente 5 nU/célula/dia a aproximadamente 90 nU/célula/dia, aproximadamente 5 nU/célula/dia a aproximadamente 85 nU/célula/dia, aproximadamente 5 nU/célula/dia a aproximadamente 80 nU/célula/dia, aproximadamente 5 nU/célula/dia a aproximadamente 75 nU/célula/dia, aproximadamente 5 nU/célula/dia a aproximadamente 70 nU/célula/dia, aproximadamente 5 nU/célula/dia a aproximadamente 65 nU/célula/dia, aproximadamente 5 nU/célula/dia a aproximadamente 60 nU/célula/dia, aproximadamente 5 nU/célula/dia a aproximadamente 55 nU/célula/dia, aproximadamente

5 nU/célula/dia a aproximadamente 50 nU/célula/dia, aproximadamente 5 nU/célula/dia a aproximadamente 45 nU/célula/dia, aproximadamente 5 nU/célula/dia a aproximadamente 40 nU/célula/dia, aproximadamente 5 nU/célula/dia a aproximadamente 35 nU/célula/dia, aproximadamente 5 nU/célula/dia a aproximadamente 30 nU/célula/dia, aproximadamente 5 nU/célula/dia a aproximadamente 25 nU/célula/dia, aproximadamente 5 nU/célula/dia a aproximadamente 20 nU/célula/dia, aproximadamente 5 nU/célula/dia a aproximadamente 15 nU/célula/dia, aproximadamente 5 nU/célula/dia a aproximadamente 10 nU/célula/dia, aproximadamente 10 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia, aproximadamente 10 nU/célula/dia a aproximadamente 140 nU/célula/dia, aproximadamente 10 nU/célula/dia a aproximadamente 130 nU/célula/dia, aproximadamente 10 nU/célula/dia a aproximadamente 120 nU/célula/dia, aproximadamente 10 nU/célula/dia a aproximadamente 110 nU/célula/dia, aproximadamente 10 nU/célula/dia a aproximadamente 100 nU/célula/dia, aproximadamente 10 nU/célula/dia a aproximadamente 95 nU/célula/dia, aproximadamente 10 nU/célula/dia a aproximadamente 90 nU/célula/dia, aproximadamente 10 nU/célula/dia a aproximadamente 85 nU/célula/dia, aproximadamente 10 nU/célula/dia a aproximadamente 80 nU/célula/dia, aproximadamente 10 nU/célula/dia a aproximadamente 75 nU/célula/dia, aproximadamente 10 nU/célula/dia a aproximadamente 70 nU/célula/dia, aproximadamente 10 nU/célula/dia a aproximadamente 65 nU/célula/dia, aproximadamente 10 nU/célula/dia a aproximadamente 60 nU/célula/dia, aproximadamente 10 nU/célula/dia a aproximadamente 55 nU/célula/dia, aproximadamente 10 nU/célula/dia a aproximadamente 50 nU/célula/dia, aproximadamente 10 nU/célula/dia a aproximadamente 45 nU/célula/dia, aproximadamente 10 nU/célula/dia a aproximadamente 40 nU/célula/dia,

aproximadamente 10 nU/célula/dia a aproximadamente 35 nU/célula/dia, aproximadamente 10 nU/célula/dia a aproximadamente 30 nU/célula/dia, aproximadamente 10 nU/célula/dia a aproximadamente 25 nU/célula/dia, aproximadamente 10 nU/célula/dia a aproximadamente 20 nU/célula/dia, aproximadamente 10 nU/célula/dia a aproximadamente 15 nU/célula/dia, aproximadamente 15 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia, aproximadamente 15 nU/célula/dia a aproximadamente 140 nU/célula/dia, aproximadamente 15 nU/célula/dia a aproximadamente 130 nU/célula/dia, aproximadamente 15 nU/célula/dia a aproximadamente 120 nU/célula/dia, aproximadamente 15 nU/célula/dia a aproximadamente 110 nU/célula/dia, aproximadamente 15 nU/célula/dia a aproximadamente 100 nU/célula/dia, aproximadamente 15 nU/célula/dia a aproximadamente 95 nU/célula/dia, aproximadamente 15 nU/célula/dia a aproximadamente 90 nU/célula/dia, aproximadamente 15 nU/célula/dia a aproximadamente 85 nU/célula/dia, aproximadamente 15 nU/célula/dia a aproximadamente 80 nU/célula/dia, aproximadamente 15 nU/célula/dia a aproximadamente 75 nU/célula/dia, aproximadamente 15 nU/célula/dia a aproximadamente 70 nU/célula/dia, aproximadamente 15 nU/célula/dia a aproximadamente 65 nU/célula/dia, aproximadamente 15 nU/célula/dia a aproximadamente 60 nU/célula/dia, aproximadamente 15 nU/célula/dia a aproximadamente 55 nU/célula/dia, aproximadamente 15 nU/célula/dia a aproximadamente 50 nU/célula/dia, aproximadamente 15 nU/célula/dia a aproximadamente 45 nU/célula/dia, aproximadamente 15 nU/célula/dia a aproximadamente 40 nU/célula/dia, aproximadamente 15 nU/célula/dia a aproximadamente 35 nU/célula/dia, aproximadamente 15 nU/célula/dia a aproximadamente 30 nU/célula/dia, aproximadamente 15 nU/célula/dia a

aproximadamente 25 nU/célula/dia, aproximadamente 15 nU/célula/dia a aproximadamente 20 nU/célula/dia, aproximadamente 20 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia, aproximadamente 20 nU/célula/dia a aproximadamente 140 nU/célula/dia, aproximadamente 20 nU/célula/dia a aproximadamente 130 nU/célula/dia, aproximadamente 20 nU/célula/dia a aproximadamente 120 nU/célula/dia, aproximadamente 20 nU/célula/dia a aproximadamente 110 nU/célula/dia, aproximadamente 20 nU/célula/dia a aproximadamente 100 nU/célula/dia, aproximadamente 20 nU/célula/dia a aproximadamente 95 nU/célula/dia, aproximadamente 20 nU/célula/dia a aproximadamente 90 nU/célula/dia, aproximadamente 20 nU/célula/dia a aproximadamente 85 nU/célula/dia, aproximadamente 20 nU/célula/dia a aproximadamente 80 nU/célula/dia, aproximadamente 20 nU/célula/dia a aproximadamente 75 nU/célula/dia, aproximadamente 20 nU/célula/dia a aproximadamente 70 nU/célula/dia, aproximadamente 20 nU/célula/dia a aproximadamente 65 nU/célula/dia, aproximadamente 20 nU/célula/dia a aproximadamente 60 nU/célula/dia, aproximadamente 20 nU/célula/dia a aproximadamente 55 nU/célula/dia, aproximadamente 20 nU/célula/dia a aproximadamente 50 nU/célula/dia, aproximadamente 20 nU/célula/dia a aproximadamente 45 nU/célula/dia, aproximadamente 20 nU/célula/dia a aproximadamente 40 nU/célula/dia, aproximadamente 20 nU/célula/dia a aproximadamente 35 nU/célula/dia, aproximadamente 20 nU/célula/dia a aproximadamente 30 nU/célula/dia, aproximadamente 20 nU/célula/dia a aproximadamente 25 nU/célula/dia, aproximadamente 25 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia, aproximadamente 25 nU/célula/dia a aproximadamente 140 nU/célula/dia, aproximadamente 25 nU/célula/dia a aproximadamente 130 nU/célula/dia,

aproximadamente 25 nU/célula/dia a aproximadamente 120 nU/célula/dia, aproximadamente 25 nU/célula/dia a aproximadamente 110 nU/célula/dia, aproximadamente 25 nU/célula/dia a aproximadamente 100 nU/célula/dia, aproximadamente 25 nU/célula/dia a aproximadamente 95 nU/célula/dia, aproximadamente 25 nU/célula/dia a aproximadamente 90 nU/célula/dia, aproximadamente 25 nU/célula/dia a aproximadamente 85 nU/célula/dia, aproximadamente 25 nU/célula/dia a aproximadamente 80 nU/célula/dia, aproximadamente 25 nU/célula/dia a aproximadamente 75 nU/célula/dia, aproximadamente 25 nU/célula/dia a aproximadamente 70 nU/célula/dia, aproximadamente 25 nU/célula/dia a aproximadamente 65 nU/célula/dia, aproximadamente 25 nU/célula/dia a aproximadamente 60 nU/célula/dia, aproximadamente 25 nU/célula/dia a aproximadamente 55 nU/célula/dia, aproximadamente 25 nU/célula/dia a aproximadamente 50 nU/célula/dia, aproximadamente 25 nU/célula/dia a aproximadamente 45 nU/célula/dia, aproximadamente 25 nU/célula/dia a aproximadamente 40 nU/célula/dia, aproximadamente 25 nU/célula/dia a aproximadamente 35 nU/célula/dia, aproximadamente 25 nU/célula/dia a aproximadamente 30 nU/célula/dia, aproximadamente 30 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia, aproximadamente 30 nU/célula/dia a aproximadamente 140 nU/célula/dia, aproximadamente 30 nU/célula/dia a aproximadamente 130 nU/célula/dia, aproximadamente 30 nU/célula/dia a aproximadamente 120 nU/célula/dia, aproximadamente 30 nU/célula/dia a aproximadamente 110 nU/célula/dia, aproximadamente 30 nU/célula/dia a aproximadamente 100 nU/célula/dia, aproximadamente 30 nU/célula/dia a aproximadamente 95 nU/célula/dia, aproximadamente 30 nU/célula/dia a aproximadamente 90 nU/célula/dia, aproximadamente 30 nU/célula/dia

a aproximadamente 85 nU/célula/dia, aproximadamente 30 nU/célula/dia a aproximadamente 80 nU/célula/dia, aproximadamente 30 nU/célula/dia a aproximadamente 75 nU/célula/dia, aproximadamente 30 nU/célula/dia a aproximadamente 70 nU/célula/dia, aproximadamente 30 nU/célula/dia a aproximadamente 65 nU/célula/dia, aproximadamente 30 nU/célula/dia a aproximadamente 60 nU/célula/dia, aproximadamente 30 nU/célula/dia a aproximadamente 55 nU/célula/dia, aproximadamente 30 nU/célula/dia a aproximadamente 50 nU/célula/dia, aproximadamente 30 nU/célula/dia a aproximadamente 45 nU/célula/dia, aproximadamente 30 nU/célula/dia a aproximadamente 40 nU/célula/dia, aproximadamente 30 nU/célula/dia a aproximadamente 35 nU/célula/dia, aproximadamente 35 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia, aproximadamente 35 nU/célula/dia a aproximadamente 140 nU/célula/dia, aproximadamente 35 nU/célula/dia a aproximadamente 130 nU/célula/dia, aproximadamente 35 nU/célula/dia a aproximadamente 120 nU/célula/dia, aproximadamente 35 nU/célula/dia a aproximadamente 110 nU/célula/dia, aproximadamente 35 nU/célula/dia a aproximadamente 100 nU/célula/dia, aproximadamente 35 nU/célula/dia a aproximadamente 95 nU/célula/dia, aproximadamente 35 nU/célula/dia a aproximadamente 90 nU/célula/dia, aproximadamente 35 nU/célula/dia a aproximadamente 85 nU/célula/dia, aproximadamente 35 nU/célula/dia a aproximadamente 80 nU/célula/dia, aproximadamente 35 nU/célula/dia a aproximadamente 75 nU/célula/dia, aproximadamente 35 nU/célula/dia a aproximadamente 70 nU/célula/dia, aproximadamente 35 nU/célula/dia a aproximadamente 65 nU/célula/dia, aproximadamente 35 nU/célula/dia a aproximadamente 60 nU/célula/dia, aproximadamente 35 nU/célula/dia a aproximadamente 55

nU/célula/dia, aproximadamente 35 nU/célula/dia a aproximadamente 50 nU/célula/dia, aproximadamente 35 nU/célula/dia a aproximadamente 45 nU/célula/dia, aproximadamente 35 nU/célula/dia a aproximadamente 40 nU/célula/dia, aproximadamente 40 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia, aproximadamente 40 nU/célula/dia a aproximadamente 140 nU/célula/dia, aproximadamente 40 nU/célula/dia a aproximadamente 130 nU/célula/dia, aproximadamente 40 nU/célula/dia a aproximadamente 120 nU/célula/dia, aproximadamente 40 nU/célula/dia a aproximadamente 110 nU/célula/dia, aproximadamente 40 nU/célula/dia a aproximadamente 100 nU/célula/dia, aproximadamente 40 nU/célula/dia a aproximadamente 95 nU/célula/dia, aproximadamente 40 nU/célula/dia a aproximadamente 90 nU/célula/dia, aproximadamente 40 nU/célula/dia a aproximadamente 85 nU/célula/dia, aproximadamente 40 nU/célula/dia a aproximadamente 80 nU/célula/dia, aproximadamente 40 nU/célula/dia a aproximadamente 75 nU/célula/dia, aproximadamente 40 nU/célula/dia a aproximadamente 70 nU/célula/dia, aproximadamente 40 nU/célula/dia a aproximadamente 65 nU/célula/dia, aproximadamente 40 nU/célula/dia a aproximadamente 60 nU/célula/dia, aproximadamente 40 nU/célula/dia a aproximadamente 55 nU/célula/dia, aproximadamente 40 nU/célula/dia a aproximadamente 50 nU/célula/dia, aproximadamente 40 nU/célula/dia a aproximadamente 45 nU/célula/dia, aproximadamente 45 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia, aproximadamente 45 nU/célula/dia a aproximadamente 140 nU/célula/dia, aproximadamente 45 nU/célula/dia a aproximadamente 130 nU/célula/dia, aproximadamente 45 nU/célula/dia a aproximadamente 120 nU/célula/dia, aproximadamente 45 nU/célula/dia a aproximadamente 110 nU/célula/dia, aproximadamente 45

nU/célula/dia a aproximadamente 100 nU/célula/dia, aproximadamente 45 nU/célula/dia a aproximadamente 95 nU/célula/dia, aproximadamente 45 nU/célula/dia a aproximadamente 90 nU/célula/dia, aproximadamente 45 nU/célula/dia a aproximadamente 85 nU/célula/dia, aproximadamente 45 nU/célula/dia a aproximadamente 80 nU/célula/dia, aproximadamente 45 nU/célula/dia a aproximadamente 75 nU/célula/dia, aproximadamente 45 nU/célula/dia a aproximadamente 70 nU/célula/dia, aproximadamente 45 nU/célula/dia a aproximadamente 65 nU/célula/dia, aproximadamente 45 nU/célula/dia a aproximadamente 60 nU/célula/dia, aproximadamente 45 nU/célula/dia a aproximadamente 55 nU/célula/dia, aproximadamente 45 nU/célula/dia a aproximadamente 50 nU/célula/dia, aproximadamente 50 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia, aproximadamente 50 nU/célula/dia a aproximadamente 140 nU/célula/dia, aproximadamente 50 nU/célula/dia a aproximadamente 130 nU/célula/dia, aproximadamente 50 nU/célula/dia a aproximadamente 120 nU/célula/dia, aproximadamente 50 nU/célula/dia a aproximadamente 110 nU/célula/dia, aproximadamente 50 nU/célula/dia a aproximadamente 100 nU/célula/dia, aproximadamente 50 nU/célula/dia a aproximadamente 95 nU/célula/dia, aproximadamente 50 nU/célula/dia a aproximadamente 90 nU/célula/dia, aproximadamente 50 nU/célula/dia a aproximadamente 85 nU/célula/dia, aproximadamente 50 nU/célula/dia a aproximadamente 80 nU/célula/dia, aproximadamente 50 nU/célula/dia a aproximadamente 75 nU/célula/dia, aproximadamente 50 nU/célula/dia a aproximadamente 70 nU/célula/dia, aproximadamente 50 nU/célula/dia a aproximadamente 65 nU/célula/dia, aproximadamente 50 nU/célula/dia a aproximadamente 60 nU/célula/dia, aproximadamente 50 nU/célula/dia a aproximadamente 55

nU/célula/dia, aproximadamente 55 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia, aproximadamente 55 nU/célula/dia a aproximadamente 140 nU/célula/dia, aproximadamente 55 nU/célula/dia a aproximadamente 130 nU/célula/dia, aproximadamente 55 nU/célula/dia a aproximadamente 120 nU/célula/dia, aproximadamente 55 nU/célula/dia a aproximadamente 110 nU/célula/dia, aproximadamente 55 nU/célula/dia a aproximadamente 100 nU/célula/dia, aproximadamente 55 nU/célula/dia a aproximadamente 95 nU/célula/dia, aproximadamente 55 nU/célula/dia a aproximadamente 90 nU/célula/dia, aproximadamente 55 nU/célula/dia a aproximadamente 85 nU/célula/dia, aproximadamente 55 nU/célula/dia a aproximadamente 80 nU/célula/dia, aproximadamente 55 nU/célula/dia a aproximadamente 75 nU/célula/dia, aproximadamente 55 nU/célula/dia a aproximadamente 70 nU/célula/dia, aproximadamente 55 nU/célula/dia a aproximadamente 65 nU/célula/dia, aproximadamente 55 nU/célula/dia a aproximadamente 60 nU/célula/dia, aproximadamente 60 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia, aproximadamente 60 nU/célula/dia a aproximadamente 140 nU/célula/dia, aproximadamente 60 nU/célula/dia a aproximadamente 130 nU/célula/dia, aproximadamente 60 nU/célula/dia a aproximadamente 120 nU/célula/dia, aproximadamente 60 nU/célula/dia a aproximadamente 110 nU/célula/dia, aproximadamente 60 nU/célula/dia a aproximadamente 100 nU/célula/dia, aproximadamente 60 nU/célula/dia a aproximadamente 95 nU/célula/dia, aproximadamente 60 nU/célula/dia a aproximadamente 90 nU/célula/dia, aproximadamente 60 nU/célula/dia a aproximadamente 85 nU/célula/dia, aproximadamente 60 nU/célula/dia a aproximadamente 80 nU/célula/dia, aproximadamente 60 nU/célula/dia a aproximadamente 75 nU/célula/dia, aproximadamente 60

nU/célula/dia a aproximadamente 70 nU/célula/dia, aproximadamente 60 nU/célula/dia a aproximadamente 65 nU/célula/dia, aproximadamente 65 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia, aproximadamente 65 nU/célula/dia a aproximadamente 140 nU/célula/dia, aproximadamente 65 nU/célula/dia a aproximadamente 130 nU/célula/dia, aproximadamente 65 nU/célula/dia a aproximadamente 120 nU/célula/dia, aproximadamente 65 nU/célula/dia a aproximadamente 110 nU/célula/dia, aproximadamente 65 nU/célula/dia a aproximadamente 100 nU/célula/dia, aproximadamente 65 nU/célula/dia a aproximadamente 95 nU/célula/dia, aproximadamente 65 nU/célula/dia a aproximadamente 90 nU/célula/dia, aproximadamente 65 nU/célula/dia a aproximadamente 85 nU/célula/dia, aproximadamente 65 nU/célula/dia a aproximadamente 80 nU/célula/dia, aproximadamente 65 nU/célula/dia a aproximadamente 75 nU/célula/dia, aproximadamente 65 nU/célula/dia a aproximadamente 70 nU/célula/dia, aproximadamente 70 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia, aproximadamente 70 nU/célula/dia a aproximadamente 140 nU/célula/dia, aproximadamente 70 nU/célula/dia a aproximadamente 130 nU/célula/dia, aproximadamente 70 nU/célula/dia a aproximadamente 120 nU/célula/dia, aproximadamente 70 nU/célula/dia a aproximadamente 110 nU/célula/dia, aproximadamente 70 nU/célula/dia a aproximadamente 100 nU/célula/dia, aproximadamente 70 nU/célula/dia a aproximadamente 95 nU/célula/dia, aproximadamente 70 nU/célula/dia a aproximadamente 90 nU/célula/dia, aproximadamente 70 nU/célula/dia a aproximadamente 85 nU/célula/dia, aproximadamente 70 nU/célula/dia a aproximadamente 80 nU/célula/dia, aproximadamente 70 nU/célula/dia a aproximadamente 75 nU/célula/dia, aproximadamente 75 nU/célula/dia a aproximadamente

150 nU/célula/dia, aproximadamente 75 nU/célula/dia a aproximadamente 140 nU/célula/dia, aproximadamente 75 nU/célula/dia a aproximadamente 130 nU/célula/dia, aproximadamente 75 nU/célula/dia a aproximadamente 120 nU/célula/dia, aproximadamente 75 nU/célula/dia a aproximadamente 110 nU/célula/dia, aproximadamente 75 nU/célula/dia a aproximadamente 100 nU/célula/dia, aproximadamente 75 nU/célula/dia a aproximadamente 95 nU/célula/dia, aproximadamente 75 nU/célula/dia a aproximadamente 90 nU/célula/dia, aproximadamente 75 nU/célula/dia a aproximadamente 85 nU/célula/dia, aproximadamente 75 nU/célula/dia a aproximadamente 80 nU/célula/dia, aproximadamente 80 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia, aproximadamente 80 nU/célula/dia a aproximadamente 140 nU/célula/dia, aproximadamente 80 nU/célula/dia a aproximadamente 130 nU/célula/dia, aproximadamente 80 nU/célula/dia a aproximadamente 120 nU/célula/dia, aproximadamente 80 nU/célula/dia a aproximadamente 110 nU/célula/dia, aproximadamente 80 nU/célula/dia a aproximadamente 100 nU/célula/dia, aproximadamente 80 nU/célula/dia a aproximadamente 95 nU/célula/dia, aproximadamente 80 nU/célula/dia a aproximadamente 90 nU/célula/dia, aproximadamente 80 nU/célula/dia a aproximadamente 85 nU/célula/dia, aproximadamente 85 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia, aproximadamente 85 nU/célula/dia a aproximadamente 140 nU/célula/dia, aproximadamente 85 nU/célula/dia a aproximadamente 130 nU/célula/dia, aproximadamente 85 nU/célula/dia a aproximadamente 120 nU/célula/dia, aproximadamente 85 nU/célula/dia a aproximadamente 110 nU/célula/dia, aproximadamente 85 nU/célula/dia a aproximadamente 100 nU/célula/dia, aproximadamente 85 nU/célula/dia a aproximadamente 95 nU/célula/dia,

aproximadamente 85 nU/célula/dia a aproximadamente 90 nU/célula/dia, aproximadamente 90 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia, aproximadamente 90 nU/célula/dia a aproximadamente 140 nU/célula/dia, aproximadamente 90 nU/célula/dia a aproximadamente 130 nU/célula/dia, aproximadamente 90 nU/célula/dia a aproximadamente 120 nU/célula/dia, aproximadamente 90 nU/célula/dia a aproximadamente 110 nU/célula/dia, aproximadamente 90 nU/célula/dia a aproximadamente 100 nU/célula/dia, aproximadamente 90 nU/célula/dia a aproximadamente 95 nU/célula/dia, aproximadamente 95 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia, aproximadamente 95 nU/célula/dia a aproximadamente 140 nU/célula/dia, aproximadamente 95 nU/célula/dia a aproximadamente 130 nU/célula/dia, aproximadamente 95 nU/célula/dia a aproximadamente 120 nU/célula/dia, aproximadamente 95 nU/célula/dia a aproximadamente 110 nU/célula/dia, aproximadamente 95 nU/célula/dia a aproximadamente 100 nU/célula/dia, aproximadamente 100 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia, aproximadamente 100 nU/célula/dia a aproximadamente 140 nU/célula/dia, aproximadamente 100 nU/célula/dia a aproximadamente 130 nU/célula/dia, aproximadamente 100 nU/célula/dia a aproximadamente 120 nU/célula/dia, aproximadamente 100 nU/célula/dia a aproximadamente 110 nU/célula/dia, aproximadamente 110 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia, aproximadamente 110 nU/célula/dia a aproximadamente 140 nU/célula/dia, aproximadamente 110 nU/célula/dia a aproximadamente 130 nU/célula/dia, aproximadamente 110 nU/célula/dia a aproximadamente 120 nU/célula/dia, aproximadamente 120 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia, aproximadamente 120 nU/célula/dia a aproximadamente 140 nU/célula/dia, aproximadamente

120 nU/célula/dia a aproximadamente 130 nU/célula/dia, aproximadamente 130 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia, aproximadamente 130 nU/célula/dia a aproximadamente 140 nU/célula/dia, ou aproximadamente 140 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia, durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

[0192] A taxa de crescimento é o cálculo de crescimento composto, a qual pode ser determinada utilizando a equação abaixo.

$$\text{Densidade de célula final} = \text{Densidade inicial} \times e^{kt},$$

onde k é a constante de crescimento e t é o tempo em dias.

[0193] A taxa de crescimento aparente é a soma da taxa de morte calculada somada à taxa de crescimento.

[0194] Algumas modalidades de qualquer um dos métodos no presente documento descritos ainda incluem cultivar uma célula (por exemplo, qualquer uma das células no presente documento descritas) no biorreator de produção (por exemplo, qualquer um dos biorreatores de produção no presente documento descrito) utilizando uma concentração do sensibilizador predita para resultar em uma taxa de crescimento aparente maior do que 1% por dia, maior do que 1,5% por dia, maior do que 2% por dia, maior do que 2,5% por dia, maior do que 3% por dia, maior do que 3,5% por dia, maior do que 4,0% por dia, maior do que 4,5% por dia, maior do que 5,0% por dia, maior do que 5,5% por dia, maior do que 6,0% por dia, maior do que 6,5% por dia, maior do que 7,0% por dia, maior do que 7,5% por dia, maior do que 8,0% por dia, maior do que 8,5% por dia, maior do que 9,0% por dia, maior do que 9,5% por dia, maior do que 10,0% por dia, maior do que 10,5% por dia, maior do que 11,0% por dia, maior do que 11,5% por dia, maior do que 12,0% por dia, maior do que 12,5% por dia, maior do que 13,0% por dia, maior do que 13,5% por dia, maior do que 14,0% por dia, maior do que 14,5% por dia, maior do que 15,0% por dia, maior do que 16% por dia,

maior do que 17% por dia, maior do que 18% por dia, maior do que 19% por dia, maior do que 20% por dia, maior do que 21% por dia, maior do que 22% por dia, maior do que 23% por dia, maior do que 24% por dia, maior do que 25% por dia, maior do que 30% por dia, maior do que 35% por dia, maior do que 40% por dia, maior do que 45% por dia, maior do que 50% por dia, maior do que 55% por dia, maior do que 60% por dia, maior do que 65% por dia, maior do que 70% por dia, maior do que 75% por dia, maior do que 80% por dia, maior do que 85% por dia, maior do que 90% por dia, maior do que 95% por dia, maior do que 100% por dia, maior do que 105% por dia, maior do que 110% por dia, maior do que 115% por dia, maior do que 120% por dia, maior do que 125% por dia, maior do que 130% por dia, maior do que 135% por dia, maior do que 140% por dia, maior do que 145% por dia, ou maior do que 150% por dia, durante a cultivação da célula no biorreator de produção. Algumas modalidades de qualquer um dos métodos no presente documento descritos ainda incluem cultivar uma célula (por exemplo, qualquer uma das células no presente documento descritas) no biorreator de produção (por exemplo, qualquer um dos biorreatores de produção no presente documento descritos) utilizando uma concentração do sensibilizador predita para resultar em uma taxa de crescimento aparente de aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 150% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 100% por dia,

aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 50% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 45% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 35% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 25% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 10% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 9,0% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 8,0% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 7,0% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 6,0% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 5,0% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 4,5% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 4,0% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 3,5% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 3,0% por dia,

aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 2,5% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 2,0% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 1,5% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 1,0% por dia, aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 0,5% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 50% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 45% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 35% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 25% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 20% por dia,

aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 10% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 9,0% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 8,0% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 7,0% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 6,0% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 5,0% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 4,5% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 4,0% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 3,5% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 3,0% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 2,5% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 2,0% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 1,5% por dia, aproximadamente 0,5% por dia a aproximadamente 1,0% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 85% por dia,

aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 50% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 45% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 35% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 25% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 10% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 9,0% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 8,0% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 7,0% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 6,0% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 5,0% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 4,5% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 4,0% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 3,5% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 3,0% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 2,5% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 2,0% por dia, aproximadamente 1,0% por dia a aproximadamente 1,5% por dia,

aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 50% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 45% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 35% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 25% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 10% por dia,

aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 9,0% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 8,0% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 7,0% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 6,0% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 5,0% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 4,5% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 4,0% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 3,5% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 3,0% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 2,5% por dia, aproximadamente 1,5% por dia a aproximadamente 2,0% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 50% por dia,

aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 45% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 35% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 25% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 10% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 9,0% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 8,0% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 7,0% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 6,0% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 5,0% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 4,5% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 4,0% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 3,5% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 3,0% por dia, aproximadamente 2,0% por dia a aproximadamente 2,5% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 100% por dia,

aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 50% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 45% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 35% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 25% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 10% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 9,0% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 8,0% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 7,0% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 6,0% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 5,0% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 4,5% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 4,0% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 3,5% por dia, aproximadamente 2,5% por dia a aproximadamente 3,0% por dia,

aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 50% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 45% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 35% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 25% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 10% por dia,

aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 9,0% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 8,0% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 7,0% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 6,0% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 5,0% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 4,5% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 4,0% por dia, aproximadamente 3,0% por dia a aproximadamente 3,5% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 50% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 45% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 35% por dia,

aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 25% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 10% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 9,0% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 8,0% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 7,0% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 6,0% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 5,0% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 4,5% por dia, aproximadamente 3,5% por dia a aproximadamente 4,0% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 70% por dia,

aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 50% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 45% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 35% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 25% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 10% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 9,0% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 8,0% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 7,0% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 6,0% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 5,0% por dia, aproximadamente 4,0% por dia a aproximadamente 4,5% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 100% por dia,

aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 50% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 45% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 35% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 25% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 10% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 9,0% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 8,0% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 7,0% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 6,0% por dia, aproximadamente 4,5% por dia a aproximadamente 5,0% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 125% por dia,

aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 50% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 45% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 35% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 25% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 10% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 9,0% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 8,0% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 7,0% por dia, aproximadamente 5,0% por dia a aproximadamente 6,0% por dia,

aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 50% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 45% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 35% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 25% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 10% por dia,

aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 9,0% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 8,0% por dia, aproximadamente 6,0% por dia a aproximadamente 7,0% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 50% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 45% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 35% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 25% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 16% por dia,

aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 10% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 9,0% por dia, aproximadamente 7,0% por dia a aproximadamente 8,0% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 50% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 45% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 35% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 25% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 20% por dia,

aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 10% por dia, aproximadamente 8,0% por dia a aproximadamente 9,0% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 50% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 45% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 35% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 25% por dia,

aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 9,0% por dia a aproximadamente 10% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 50% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 45% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 35% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 25% por dia,

aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 10% por dia a aproximadamente 12% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 50% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 45% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 35% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 25% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 20% por dia,

aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 16% por dia, aproximadamente 12% por dia a aproximadamente 14% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 50% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 45% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 35% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 25% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 14% por dia a aproximadamente 16% por dia,

aproximadamente 16% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 16% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 16% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 16% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 16% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 16% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 16% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 16% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 16% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 16% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 16% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 16% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 16% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 16% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 16% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 16% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 16% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 16% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 16% por dia a aproximadamente 50% por dia, aproximadamente 16% por dia a aproximadamente 45% por dia, aproximadamente 16% por dia a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 16% por dia a aproximadamente 35% por dia, aproximadamente 16% por dia a aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 16% por dia a aproximadamente 25% por dia, aproximadamente 16% por dia a aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 16% por dia a aproximadamente 18% por dia, aproximadamente 18% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 18% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 18% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 18% por dia a aproximadamente 125% por dia,

aproximadamente 18% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 18% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 18% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 18% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 18% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 18% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 18% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 18% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 18% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 18% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 18% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 18% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 18% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 18% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 18% por dia a aproximadamente 50% por dia, aproximadamente 18% por dia a aproximadamente 45% por dia, aproximadamente 18% por dia a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 18% por dia a aproximadamente 35% por dia, aproximadamente 18% por dia a aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 18% por dia a aproximadamente 25% por dia, aproximadamente 18% por dia a aproximadamente 20% por dia, aproximadamente 20% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 20% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 20% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 20% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 20% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 20% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 20% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 20% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 20% por dia a aproximadamente 100% por dia,

aproximadamente 20% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 20% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 20% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 20% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 20% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 20% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 20% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 20% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 20% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 20% por dia a aproximadamente 50% por dia, aproximadamente 20% por dia a aproximadamente 45% por dia, aproximadamente 20% por dia a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 20% por dia a aproximadamente 35% por dia, aproximadamente 20% por dia a aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 20% por dia a aproximadamente 25% por dia, aproximadamente 25% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 25% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 25% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 25% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 25% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 25% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 25% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 25% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 25% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 25% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 25% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 25% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 25% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 25% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 25% por dia a aproximadamente 70% por dia,

aproximadamente 25% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 25% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 25% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 25% por dia a aproximadamente 50% por dia, aproximadamente 25% por dia a aproximadamente 45% por dia, aproximadamente 25% por dia a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 25% por dia a aproximadamente 35% por dia, aproximadamente 25% por dia a aproximadamente 30% por dia, aproximadamente 30% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 30% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 30% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 30% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 30% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 30% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 30% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 30% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 30% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 30% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 30% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 30% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 30% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 30% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 30% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 30% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 30% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 30% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 30% por dia a aproximadamente 50% por dia, aproximadamente 30% por dia a aproximadamente 45% por dia, aproximadamente 30% por dia a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 30% por dia a aproximadamente 35% por dia,

aproximadamente 35% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 35% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 35% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 35% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 35% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 35% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 35% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 35% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 35% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 35% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 35% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 35% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 35% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 35% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 35% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 35% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 35% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 35% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 35% por dia a aproximadamente 50% por dia, aproximadamente 35% por dia a aproximadamente 45% por dia, aproximadamente 35% por dia a aproximadamente 40% por dia, aproximadamente 40% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 40% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 40% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 40% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 40% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 40% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 40% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 40% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 40% por dia a aproximadamente 100% por dia,

aproximadamente 40% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 40% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 40% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 40% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 40% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 40% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 40% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 40% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 40% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 40% por dia a aproximadamente 50% por dia, aproximadamente 40% por dia a aproximadamente 45% por dia, aproximadamente 45% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 45% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 45% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 45% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 45% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 45% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 45% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 45% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 45% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 45% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 45% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 45% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 45% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 45% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 45% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 45% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 45% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 45% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 45% por dia a aproximadamente 50% por dia,

aproximadamente 50% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 50% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 50% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 50% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 50% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 50% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 50% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 50% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 50% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 50% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 50% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 50% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 50% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 50% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 50% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 50% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 50% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 50% por dia a aproximadamente 55% por dia, aproximadamente 55% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 55% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 55% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 55% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 55% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 55% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 55% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 55% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 55% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 55% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 55% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 55% por dia a aproximadamente 85% por dia,

aproximadamente 55% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 55% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 55% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 55% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 55% por dia a aproximadamente 60% por dia, aproximadamente 60% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 60% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 60% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 60% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 60% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 60% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 650% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 60% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 60% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 60% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 60% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 60% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 60% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 60% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 60% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 60% por dia a aproximadamente 65% por dia, aproximadamente 65% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 65% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 65% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 65% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 65% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 65% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 65% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 65% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 65% por dia a aproximadamente 100% por dia,

aproximadamente 65% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 65% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 65% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 65% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 65% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 65% por dia a aproximadamente 70% por dia, aproximadamente 70% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 70% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 70% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 70% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 70% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 70% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 70% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 70% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 70% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 70% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 70% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 70% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 70% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 70% por dia a aproximadamente 75% por dia, aproximadamente 75% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 75% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 75% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 75% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 75% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 75% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 75% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 75% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 75% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 75% por dia a aproximadamente 95% por dia,

aproximadamente 75% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 75% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 75% por dia a aproximadamente 80% por dia, aproximadamente 80% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 80% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 80% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 80% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 80% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 80% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 80% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 80% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 80% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 80% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 80% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 80% por dia a aproximadamente 85% por dia, aproximadamente 85% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 85% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 85% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 85% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 85% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 85% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 85% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 85% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 85% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 85% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 85% por dia a aproximadamente 90% por dia, aproximadamente 90% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 90% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 90% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 90% por dia a aproximadamente 125% por dia,

aproximadamente 90% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 90% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 90% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 90% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 90% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 90% por dia a aproximadamente 95% por dia, aproximadamente 95% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 95% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 95% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 95% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 95% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 95% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 95% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 95% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 95% por dia a aproximadamente 100% por dia, aproximadamente 100% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 100% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 100% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 100% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 100% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 100% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 100% por dia a aproximadamente 110% por dia, aproximadamente 100% por dia a aproximadamente 105% por dia, aproximadamente 105% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 105% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 105% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 105% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 105% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 105% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 105% por dia a aproximadamente 110% por dia,

aproximadamente 110% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 110% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 110% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 110% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 110% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 110% por dia a aproximadamente 115% por dia, aproximadamente 115% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 115% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 115% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 115% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 115% por dia a aproximadamente 120% por dia, aproximadamente 120% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 120% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 120% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 120% por dia a aproximadamente 125% por dia, aproximadamente 125% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 125% por dia a aproximadamente 135% por dia, aproximadamente 125% por dia a aproximadamente 130% por dia, aproximadamente 130% por dia a aproximadamente 140% por dia, aproximadamente 130% por dia a aproximadamente 135% por dia, ou aproximadamente 135% por dia a aproximadamente 140% por dia, durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

[0195] Em algumas modalidades destes métodos, a célula contém um ácido nucleico que codifica uma proteína terapêutica recombinante. Algumas modalidades destes métodos ainda incluem

coletar ou recuperar a proteína terapêutica recombinante.

[0196] Algumas modalidades destes métodos ainda incluem purificar a proteína terapêutica recombinante. Algumas modalidades destes métodos ainda incluem formular a proteína terapêutica recombinante purificada.

[0197] Em algumas modalidades destes métodos, a célula é uma bactéria (por exemplo, qualquer uma das bactérias exemplares no presente documento descritas ou conhecidas na técnica), um fermento (por exemplo, qualquer uma das células de fermento exemplares no presente documento descritas ou conhecidas na técnica), ou uma célula de mamífero (por exemplo, qualquer uma das células de mamífero exemplares no presente documento descritas ou conhecidas na técnica).

[0198] Em algumas modalidades destes métodos, a viabilidade de célula é determinada medindo uma concentração de desidrogenase de ácido láctico (LDH) no recipiente de cultura de teste.

[0199] Em algumas modalidades, o recipiente de cultura de teste é um frasco de agitação com defletor (por exemplo, qualquer um dos frascos de agitação com defletor no presente documento descritos ou conhecidos na técnica) e a pluralidade de condições de teste inclui uma ou mais de: (a) uma agitação rotativa de aproximadamente 125 RPM a aproximadamente 400 RPM (ou qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas); (b) uma concentração do sensibilizador (por exemplo, qualquer um dos sensibilizadores no presente documento descritos ou conhecidos na técnica) de aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 120 ppm (ou qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas); e (c) uma concentração de um protetor (por exemplo, qualquer um dos protetores no presente documento descritos ou conhecidos na técnica) que é aproximadamente 1 g/L a aproximadamente 10 g/L (ou qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas). Em algumas modalidades, o protetor é um poloxamer (por exemplo, poloxamer-188, poloxamer-401, poloxamer-402, ou poloxamer-407), uma poloxamina (por exemplo, poloxamina-904 ou poloxamina-908), ou um poliol plurônico.

Métodos de Aperfeiçoar Viabilidade de Célula em um Biorreator de Produção

[0200] Também no presente documento providos estão métodos de aperfeiçoar viabilidade de célula em um biorreator de produção (por exemplo, qualquer um dos biorreatores de produção no presente documento descrito) que incluem: (a) determinar a viabilidade de célula sob uma pluralidade de condições de teste em um recipiente de cultura de teste, onde a pluralidade de condições é definida por um conjunto de parâmetros; (b) com base na viabilidade de célula no recipiente de cultura de teste sob a pluralidade de condições, selecionar uma condição que é ótima para a viabilidade de célula em um biorreator de produção; e (c) cultivar uma célula no biorreator de produção sob a condição selecionada.

[0201] Em algumas modalidades destes métodos, o conjunto de parâmetros compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em tensão de cisalhamento, concentração de um sensibilizador (por exemplo, qualquer um dos sensibilizadores no presente documento descritos ou conhecidos na técnica), e concentração de um protetor (por exemplo, qualquer um dos protetores no presente documento descritos ou conhecidos na técnica). Em algumas modalidades destes métodos, a pluralidade de condições de teste é selecionada com base em rastreio fatorial total e/ou projeto de composto de centro inscrito. Em algumas modalidades destes métodos, o sensibilizador é um antiespumante (por exemplo, um antiespumante baseado em polidimetilsiloxano, simeticona, ou qualquer outro antiespumante no presente documento descrito ou conhecido na técnica).

[0202] Em algumas modalidades destes métodos, o recipiente de cultura de teste (por exemplo, qualquer um dos recipientes de cultura de teste no presente documento descritos ou conhecidos na técnica) tem um volume de aproximadamente 5 mL a aproximadamente 5 L (ou

qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas). Em algumas modalidades destes métodos, o recipiente de cultura de teste é um frasco de agitação, por exemplo, um frasco de agitação com defletor (por exemplo, qualquer um dos frascos de agitação com defletor no presente documento descritos ou conhecidos na técnica).

[0203] Em algumas modalidades destes métodos, o biorreator de produção (por exemplo, qualquer um dos biorreatores de produção no presente documento descritos) tem um volume de aproximadamente 5 L a aproximadamente 20.000 L (ou qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas). Em alguns exemplos, o biorreator de produção é um biorreator de perfusão. Em outros exemplos, o biorreator de produção é um biorreator de lote alimentado.

[0204] Em algumas modalidades, a etapa (c) resulta em uma taxa de morte de células específica menor do que 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, ou 40% por dia, durante a cultivação das células no biorreator de produção. Em algumas modalidades, a etapa (c) resulta em uma taxa de morte de células específica de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 40% por dia (ou qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas) durante a cultivação das células no biorreator de produção.

[0205] Em algumas modalidades, a etapa (c) resulta em uma produção de LDH específica de célula menor do que 150 nU/célula/dia, menor do que 145 nU/célula/dia, menor do que 140 nU/célula/dia, menor do que 135 nU/célula/dia, menor do que 130 nU/célula/dia, menor do que 125 nU/célula/dia, menor do que 120 nU/célula/dia, menor do que 115 nU/célula/dia, menor do que 150 nU/célula/dia, menor do que 110 nU/célula/dia, menor do que 105 nU/célula/dia, menor do que 100

nU/célula/dia, menor do que 95 nU/célula/dia, menor do que 90 nU/célula/dia, menor do que 85 nU/célula/dia, menor do que 80 nU/célula/dia, menor do que 75 nU/célula/dia, menor do que 70 nU/célula/dia, menor do que 65 nU/célula/dia, menor do que 60 nU/célula/dia, menor do que 55 nU/célula/dia, menor do que 50 nU/célula/dia, menor do que 45 nU/célula/dia, menor do que 45 nU/célula/dia, menor do que 40 nU/célula/dia, menor do que 35 nU/célula/dia, menor do que 30 nU/célula/dia, menor do que 25 nU/célula/dia, menor do que 20 nU/célula/dia, menor do que 15 nU/célula/dia, menor do que 10 nU/célula/dia, menor do que 5 nU/célula/dia, ou menor do que menor do que 1 nU/célula/dia, durante a cultivação da célula no biorreator de produção. Em algumas modalidades destes métodos, a etapa (c) resulta em uma produção de LDH específica de célula de aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia (ou qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas) durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

[0206] Em algumas modalidades, a etapa (c) resulta em uma taxa de crescimento aparente maior do que 1% por dia, maior do que 1,5% por dia, maior do que 2% por dia, maior do que 2,5% por dia, maior do que 3% por dia, maior do que 3,5% por dia, maior do que 4,0% por dia, maior do que 4,5% por dia, maior do que 5,0% por dia, maior do que 5,5% por dia, maior do que 6,0% por dia, maior do que 6,5% por dia, maior do que 7,0% por dia, maior do que 7,5% por dia, maior do que 8,0% por dia, maior do que 8,5% por dia, maior do que 9,0% por dia, maior do que 9,5% por dia, maior do que 10,0% por dia, maior do que 10,5% por dia, maior do que 11,0% por dia, maior do que 11,5% por dia, maior do que 12,0% por dia, maior do que 12,5% por dia, maior do que 13,0% por dia, maior do que 13,5% por dia, maior do que 14,0% por dia, maior do que 14,5% por dia, maior do que 15,0% por dia, maior do que

16% por dia, maior do que 17% por dia, maior do que 18% por dia, maior do que 19% por dia, maior do que 20% por dia, maior do que 21% por dia, maior do que 22% por dia, maior do que 23% por dia, maior do que 24% por dia, maior do que 25% por dia, maior do que 30% por dia, maior do que 35% por dia, maior do que 40% por dia, maior do que 45% por dia, maior do que 50% por dia, maior do que 55% por dia, maior do que 60% por dia, maior do que 65% por dia, maior do que 70% por dia, maior do que 75% por dia, maior do que 80% por dia, maior do que 85% por dia, maior do que 90% por dia, maior do que 95% por dia, maior do que 100% por dia, maior do que 105% por dia, maior do que 110% por dia, maior do que 115% por dia, maior do que 120% por dia, maior do que 125% por dia, maior do que 130% por dia, maior do que 135% por dia, maior do que 140% por dia, maior do que 145% por dia, ou maior do que 150% por dia, durante a cultivação da célula no biorreator de produção. Em algumas modalidades destes métodos, a etapa (c) resulta em uma taxa de crescimento aparente de aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 150% por dia (ou qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas) durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

[0207] Em algumas modalidades destes métodos, a célula (por exemplo, qualquer uma das células no presente documento descritas) contém um ácido nucleico que codifica uma proteína terapêutica recombinante (por exemplo, qualquer uma das proteínas terapêuticas recombinantes no presente documento descritas). Algumas modalidades destes métodos ainda incluem coletar ou recuperar a proteína terapêutica recombinante. Algumas modalidades destes métodos ainda incluem purificar a proteína terapêutica recombinante. Algumas modalidades destes métodos ainda incluem formular a proteína terapêutica recombinante purificada. Em algumas modalidades destes métodos, a célula é uma bactéria (por exemplo, qualquer uma

das bactérias exemplares no presente documento descritas ou conhecidas na técnica), uma célula de fermento (por exemplo, qualquer uma das células de fermento exemplares no presente documento descritas ou conhecidas na técnica), ou uma célula de mamífero (por exemplo, qualquer uma das células de mamífero exemplares no presente documento descritas ou conhecidas na técnica).

[0208] Em algumas modalidades destes métodos, a viabilidade de célula é determinada medindo uma concentração de desidrogenase de ácido láctico (LDH) no recipiente de cultura de teste. Em algumas modalidades destes métodos, o recipiente de cultura de teste é um frasco de agitação com defletor e a pluralidade de condições de teste inclui (ou consiste) em uma ou mais (por exemplo, duas ou três) de: (a) uma agitação rotativa de aproximadamente 125 RPM a aproximadamente 400 RPM (ou qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas); (b) uma concentração de um sensibilizador (por exemplo, qualquer um dos sensibilizadores no presente documento descritos ou conhecidos na técnica) de aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 120 ppm (ou qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas); e (c) uma concentração de um protetor (por exemplo, qualquer um dos protetores no presente documento descritos ou conhecidos na técnica) que é aproximadamente 1 g/L a aproximadamente 10 g/L (ou qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas). Em algumas modalidades destes métodos, o protetor é um poloxamer (por exemplo, poloxamer-188, poloxamer-401, poloxamer-402, ou poloxamer-407), uma poloxamina (por exemplo, poloxamina-904 ou poloxamina-908), ou um poliol plurônico.

Métodos Para Predizer a Viabilidade de Célula em um Biorreator de Produção

[0209] Também providos no presente documento estão métodos de

predizer a viabilidade de célula em um biorreator de produção (por exemplo, qualquer um dos biorreatores de produção no presente documento descritos) que incluem: (a) selecionar um conjunto de parâmetros que compreende pelo menos dois parâmetros (por exemplo, 2, 3, 4, 5, ou 6); (b) determinar a viabilidade de célula sob uma pluralidade de condições de teste como definida pelo conjunto de parâmetros em um recipiente de cultura de teste (por exemplo, qualquer um dos recipientes de cultura de teste no presente documento descritos); e (c) com base na viabilidade de célula no recipiente de cultura de teste sob a pluralidade de condições, predizer a viabilidade de célula no biorreator de produção.

[0210] Em algumas modalidades destes métodos, o conjunto de parâmetros compreende, consiste essencialmente em, ou consiste em tensão de cisalhamento, concentração de um sensibilizador (por exemplo, qualquer um dos sensibilizador exemplares no presente documento descritos ou conhecidos na técnica), e concentração de um protetor (por exemplo, qualquer um dos protetores no presente documento descritos ou conhecidos na técnica). Em algumas modalidades destes métodos, a pluralidade de condições de teste é selecionada com base em rastreio fatorial total e/ou projeto de composto de centro inscrito.

[0211] E m algumas modalidades destes métodos, o sensibilizador é um antiespumante (por exemplo, um antiespumante baseado em polidimetilsiloxano, simeticona, ou qualquer outro antiespumante no presente documento descrito ou conhecido na técnica).

[0212] Em algumas modalidades destes métodos, o recipiente de cultura de teste (por exemplo, qualquer um dos recipientes de cultura de teste no presente documento descritos ou conhecidos na técnica) tem um volume de aproximadamente 5 mL a aproximadamente 5 L (ou qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento

descritas). Em algumas modalidades destes métodos, o recipiente de cultura de teste é um frasco de agitação, por exemplo, um frasco de agitação com defletor (por exemplo, qualquer um dos frascos de agitação com defletor no presente documento descritos ou conhecidos na técnica).

[0213] Em algumas modalidades destes métodos, o biorreator de produção (por exemplo, qualquer um dos biorreatores de produção no presente documento descritos) tem um volume de aproximadamente 5 L a aproximadamente 20.000 L (ou qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas). Em alguns exemplos, o biorreator de produção é um biorreator de perfusão. Em outros exemplos, o biorreator de produção é um biorreator de lote alimentado.

[0214] Algumas modalidades destes métodos ainda incluem cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma condição predita para resultar em uma taxa de morte de células específica menor do que 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, ou 40% por dia, durante a cultivação das células no biorreator de produção. Algumas modalidades destes métodos ainda incluem cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma condição predita para resultar em uma taxa de morte de células específica de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 40% por dia (ou qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas) durante a cultivação das células no biorreator de produção.

[0215] Algumas modalidades destes métodos ainda incluem cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma condição predita para resultar em uma produção de LDH específica de célula menor do que 150 nU/célula/dia, menor do que 145 nU/célula/dia, menor do que 140 nU/célula/dia, menor do que 135 nU/célula/dia, menor do que 130

nU/célula/dia, menor do que 125 nU/célula/dia, menor do que 120 nU/célula/dia, menor do que 115 nU/célula/dia, menor do que 150 nU/célula/dia, menor do que 110 nU/célula/dia, menor do que 105 nU/célula/dia, menor do que 100 nU/célula/dia, menor do que 95 nU/célula/dia, menor do que 90 nU/célula/dia, menor do que 85 nU/célula/dia, menor do que 80 nU/célula/dia, menor do que 75 nU/célula/dia, menor do que 70 nU/célula/dia, menor do que 65 nU/célula/dia, menor do que 60 nU/célula/dia, menor do que 55 nU/célula/dia, menor do que 50 nU/célula/dia, menor do que 45 nU/célula/dia, menor do que 45 nU/célula/dia, menor do que 40 nU/célula/dia¸ menor do que 35 nU/célula/dia, menor do que 30 nU/célula/dia, menor do que 25 nU/célula/dia, menor do que 20 nU/célula/dia, menor do que 15 nU/célula/dia, menor do que 10 nU/célula/dia, menor do que 5 nU/célula/dia, ou menor do que menor do que 1 nU/célula/dia, durante a cultivação da célula no biorreator de produção. Algumas modalidades destes métodos ainda incluem cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma condição predita para resultar em uma produção de LDH específica de célula de aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia (ou qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas) durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

[0216] Algumas modalidades destes métodos ainda incluem cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma condição predita para resultar em uma taxa de crescimento aparente maior do que 1% por dia, maior do que 1,5% por dia, maior do que 2% por dia, maior do que 2,5% por dia, maior do que 3% por dia, maior do que 3,5% por dia, maior do que 4,0% por dia, maior do que 4,5% por dia, maior do que 5,0% por dia, maior do que 5,5% por dia, maior do que 6,0% por dia, maior do que 6,5% por dia, maior do que 7,0% por dia, maior do que

7,5% por dia, maior do que 8,0% por dia, maior do que 8,5% por dia, maior do que 9,0% por dia, maior do que 9,5% por dia, maior do que 10,0% por dia, maior do que 10,5% por dia, maior do que 11,0% por dia, maior do que 11,5% por dia, maior do que 12,0% por dia, maior do que 12,5% por dia, maior do que 13,0% por dia, maior do que 13,5% por dia, maior do que 14,0% por dia, maior do que 14,5% por dia, maior do que 15,0% por dia, maior do que 16% por dia, maior do que 17% por dia, maior do que 18% por dia, maior do que 19% por dia, maior do que 20% por dia, maior do que 21% por dia, maior do que 22% por dia, maior do que 23% por dia, maior do que 24% por dia, maior do que 25% por dia, maior do que 30% por dia, maior do que 35% por dia, maior do que 40% por dia, maior do que 45% por dia, maior do que 50% por dia, maior do que 55% por dia, maior do que 60% por dia, maior do que 65% por dia, maior do que 70% por dia, maior do que 75% por dia, maior do que 80% por dia, maior do que 85% por dia, maior do que 90% por dia, maior do que 95% por dia, maior do que 100% por dia, maior do que 105% por dia, maior do que 110% por dia, maior do que 115% por dia, maior do que 120% por dia, maior do que 125% por dia, maior do que 130% por dia, maior do que 135% por dia, maior do que 140% por dia, maior do que 145% por dia, ou maior do que 150% por dia, durante a cultivação da célula no biorreator de produção. Algumas modalidades destes métodos ainda incluem cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma condição predita para resultar em uma taxa de crescimento aparente de aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 150% por dia (ou qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas) durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

[0217] Em algumas modalidades destes métodos, a célula (por exemplo, qualquer uma das células no presente documento descritas) contém um ácido nucleico que codifica uma proteína terapêutica

recombinante (por exemplo, qualquer uma das proteínas terapêuticas recombinantes no presente documento descritas). Algumas modalidades destes métodos ainda incluem coletar ou recuperar a proteína terapêutica recombinante. Algumas modalidades destes métodos ainda incluem purificar a proteína terapêutica recombinante. Algumas modalidades destes métodos ainda incluem formular a proteína terapêutica recombinante purificada. Em algumas modalidades destes métodos, a célula é uma bactéria (por exemplo, qualquer uma das bactérias exemplares no presente documento descritas ou conhecidas na técnica), uma célula de fermento (por exemplo, qualquer uma das células de fermento exemplares no presente documento descritas ou conhecidas na técnica), ou uma célula de mamífero (por exemplo, qualquer uma das células de mamífero exemplares no presente documento descritas ou conhecidas na técnica).

[0218] Em algumas modalidades destes métodos, a viabilidade de célula é determinada medindo uma concentração de desidrogenase de ácido láctico (LDH) no recipiente de cultura de teste. Em algumas modalidades destes métodos, o recipiente de cultura de teste é um frasco de agitação com defletor e a pluralidade de condições de teste inclui (ou consiste) uma ou mais (por exemplo, duas ou três) de: (a) uma agitação rotativa de aproximadamente 125 RPM a aproximadamente 400 RPM (ou qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas); (b) uma concentração de um sensibilizador (por exemplo, qualquer um dos sensibilizadores no presente documento descritos ou conhecidos na técnica) de aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 120 ppm (ou qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas); e (c) uma concentração de um protetor (por exemplo, qualquer um dos protetores no presente documento descritos ou conhecidos na técnica) que é aproximadamente 1 g/L a aproximadamente 10 g/L (ou qualquer uma

das subfaixas desta faixa no presente documento descritas). Em algumas modalidades destes métodos, o protetor é um poloxamer (por exemplo, poloxamer-188, poloxamer-401, poloxamer-402, ou poloxamer-407), uma poloxamina (por exemplo, poloxamina-904 ou poloxamina-908), ou um poliol plurônico.

Métodos para Cultivar uma Célula em um Biorreator de Produção

[0219] Também providos no presente documento estão métodos de cultivar uma célula (por exemplo, qualquer uma das células no presente documento descritas) em um biorreator de produção que inclui cultivar a célula em um meio de cultura líquido sob uma ou mais (por exemplo, duas, três, ou quatro) das seguintes:

(a) o biorreator de produção tem uma P/V (W/m^3) de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 110 (por exemplo, de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 7,0, de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 6,0, de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0, ou aproximadamente 6,0) (por exemplo, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 110, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 95, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 90, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 85, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 80, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 75, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 70, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 65, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 60, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 55, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 50, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 45, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 40, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 35, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 30, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 25, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 20, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 18, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 16, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 14, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 12, aproximadamente 1,0 a

aproximadamente 10, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 9,0, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 8,0, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 7,0, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 6,0, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 5,0, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 4,0, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 3,0, a aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,0, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 110, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 95, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 90, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 85, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 80, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 75, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 70, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 65, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 60, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 55, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 50, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 45, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 40, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 35, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 30, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 25, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 20, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 18, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 16, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 14, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 12, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 10, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 9,0, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 8,0, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 7,0, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 6,0, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 5,0, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 4,0, aproximadamente 2,0 a aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 110, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 95, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 90, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 85, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 80, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 75, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 70, aproximadamente 3,0 a

aproximadamente 65, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 60, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 55, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 50, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 45, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 40, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 35, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 30, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 25, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 20, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 18, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 16, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 14, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 12, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 10, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 9,0, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 8,0, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 7,0, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 6,0, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 5,0, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 110, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 95, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 90, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 85, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 80, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 75, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 70, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 65, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 60, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 55, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 50, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 45, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 40, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 35, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 30, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 25, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 20, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 18, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 16, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 14, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 12, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 10, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 9,0, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 8,0, aproximadamente 4,0 a

aproximadamente 7,0, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 6,0, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 110, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 95, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 90, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 85, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 80, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 75, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 70, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 65, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 60, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 55, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 50, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 45, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 40, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 35, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 30, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 25, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 20, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 18, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 16, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 14, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 12, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 10, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 9,0, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,0 a aproximadamente 110, aproximadamente 6,0 a aproximadamente 95, aproximadamente 6,0 a aproximadamente 90, aproximadamente 6,0 a aproximadamente 85, aproximadamente 6,0 a aproximadamente 80, aproximadamente 6,0 a aproximadamente 75, aproximadamente 6,0 a aproximadamente 70, aproximadamente 6,0 a aproximadamente 65, aproximadamente 6,0 a aproximadamente 60, aproximadamente 6,0 a aproximadamente 55, aproximadamente 6,0 a aproximadamente 50, aproximadamente 6,0 a aproximadamente 45, aproximadamente 6,0 a aproximadamente 40, aproximadamente 6,0 a aproximadamente 35, aproximadamente 6,0 a aproximadamente 30, aproximadamente 6,0 a aproximadamente 25, aproximadamente 6,0 a

aproximadamente 20, aproximadamente 6,0 a aproximadamente 18, aproximadamente 6,0 a aproximadamente 16, aproximadamente 6,0 a aproximadamente 14, aproximadamente 6,0 a aproximadamente 12, aproximadamente 6,0 a aproximadamente 10, aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,0, aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0, aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,0 a aproximadamente 110, aproximadamente 7,0 a aproximadamente 95, aproximadamente 7,0 a aproximadamente 90, aproximadamente 7,0 a aproximadamente 85, aproximadamente 7,0 a aproximadamente 80, aproximadamente 7,0 a aproximadamente 75, aproximadamente 7,0 a aproximadamente 70, aproximadamente 7,0 a aproximadamente 65, aproximadamente 7,0 a aproximadamente 60, aproximadamente 7,0 a aproximadamente 55, aproximadamente 7,0 a aproximadamente 50, aproximadamente 7,0 a aproximadamente 45, aproximadamente 7,0 a aproximadamente 40, aproximadamente 7,0 a aproximadamente 35, aproximadamente 7,0 a aproximadamente 30, aproximadamente 7,0 a aproximadamente 25, aproximadamente 7,0 a aproximadamente 20, aproximadamente 7,0 a aproximadamente 18, aproximadamente 7,0 a aproximadamente 16, aproximadamente 7,0 a aproximadamente 14, aproximadamente 7,0 a aproximadamente 12, aproximadamente 7,0 a aproximadamente 10, aproximadamente 7,0 a aproximadamente 9,0, aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,0, aproximadamente 8,0 a aproximadamente 110, aproximadamente 8,0 a aproximadamente 95, aproximadamente 8,0 a aproximadamente 90, aproximadamente 8,0 a aproximadamente 85, aproximadamente 8,0 a aproximadamente 80, aproximadamente 8,0 a aproximadamente 75, aproximadamente 8,0 a aproximadamente 70, aproximadamente 8,0 a aproximadamente 65, aproximadamente 8,0 a aproximadamente 60, aproximadamente 8,0 a aproximadamente 55, aproximadamente 8,0 a aproximadamente 50, aproximadamente 8,0 a aproximadamente 45, aproximadamente 8,0 a

aproximadamente 40, aproximadamente 8,0 a aproximadamente 35, aproximadamente 8,0 a aproximadamente 30, aproximadamente 8,0 a aproximadamente 25, aproximadamente 8,0 a aproximadamente 20, aproximadamente 8,0 a aproximadamente 18, aproximadamente 8,0 a aproximadamente 16, aproximadamente 8,0 a aproximadamente 14, aproximadamente 8,0 a aproximadamente 12, aproximadamente 8,0 a aproximadamente 10, aproximadamente 8,0 a aproximadamente 9,0, aproximadamente 9,0 a aproximadamente 110, aproximadamente 9,0 a aproximadamente 95, aproximadamente 9,0 a aproximadamente 90, aproximadamente 9,0 a aproximadamente 85, aproximadamente 9,0 a aproximadamente 80, aproximadamente 9,0 a aproximadamente 75, aproximadamente 9,0 a aproximadamente 70, aproximadamente 9,0 a aproximadamente 65, aproximadamente 9,0 a aproximadamente 60, aproximadamente 9,0 a aproximadamente 55, aproximadamente 9,0 a aproximadamente 50, aproximadamente 9,0 a aproximadamente 45, aproximadamente 9,0 a aproximadamente 40, aproximadamente 9,0 a aproximadamente 35, aproximadamente 9,0 a aproximadamente 30, aproximadamente 9,0 a aproximadamente 25, aproximadamente 9,0 a aproximadamente 20, aproximadamente 9,0 a aproximadamente 18, aproximadamente 9,0 a aproximadamente 16, aproximadamente 9,0 a aproximadamente 14, aproximadamente 9,0 a aproximadamente 12, aproximadamente 9,0 a aproximadamente 10, aproximadamente 10 a aproximadamente 110, aproximadamente 10 a aproximadamente 95, aproximadamente 10 a aproximadamente 90, aproximadamente 10 a aproximadamente 85, aproximadamente 10 a aproximadamente 80, aproximadamente 10 a aproximadamente 75, aproximadamente 10 a aproximadamente 70, aproximadamente 10 a aproximadamente 65, aproximadamente 10 a aproximadamente 60, aproximadamente 10 a aproximadamente 55, aproximadamente 10 a aproximadamente 50, aproximadamente 10 a aproximadamente 45, aproximadamente 10 a

aproximadamente 40, aproximadamente 10 a aproximadamente 35, aproximadamente 10 a aproximadamente 30, aproximadamente 10 a aproximadamente 25, aproximadamente 10 a aproximadamente 20, aproximadamente 10 a aproximadamente 18, aproximadamente 10 a aproximadamente 16, aproximadamente 10 a aproximadamente 14, aproximadamente 10 a aproximadamente 12, aproximadamente 12 a aproximadamente 110, aproximadamente 12 a aproximadamente 95, aproximadamente 12 a aproximadamente 90, aproximadamente 12 a aproximadamente 85, aproximadamente 12 a aproximadamente 80, aproximadamente 12 a aproximadamente 75, aproximadamente 12 a aproximadamente 70, aproximadamente 12 a aproximadamente 65, aproximadamente 12 a aproximadamente 60, aproximadamente 12 a aproximadamente 55, aproximadamente 12 a aproximadamente 50, aproximadamente 12 a aproximadamente 45, aproximadamente 12 a aproximadamente 40, aproximadamente 12 a aproximadamente 35, aproximadamente 12 a aproximadamente 30, aproximadamente 12 a aproximadamente 25, aproximadamente 12 a aproximadamente 20, aproximadamente 12 a aproximadamente 18, aproximadamente 12 a aproximadamente 16, aproximadamente 12 a aproximadamente 14, aproximadamente 14 a aproximadamente 110, aproximadamente 14 a aproximadamente 95, aproximadamente 14 a aproximadamente 90, aproximadamente 14 a aproximadamente 85, aproximadamente 14 a aproximadamente 80, aproximadamente 14 a aproximadamente 75, aproximadamente 14 a aproximadamente 70, aproximadamente 14 a aproximadamente 65, aproximadamente 14 a aproximadamente 60, aproximadamente 14 a aproximadamente 55, aproximadamente 14 a aproximadamente 50, aproximadamente 14 a aproximadamente 45, aproximadamente 14 a aproximadamente 40, aproximadamente 14 a aproximadamente 35, aproximadamente 14 a aproximadamente 30, aproximadamente 14 a aproximadamente 25, aproximadamente 14 a

aproximadamente 20, aproximadamente 14 a aproximadamente 18, aproximadamente 14 a aproximadamente 16, aproximadamente 16 a aproximadamente 110, aproximadamente 16 a aproximadamente 95, aproximadamente 16 a aproximadamente 90, aproximadamente 16 a aproximadamente 85, aproximadamente 16 a aproximadamente 80, aproximadamente 16 a aproximadamente 75, aproximadamente 16 a aproximadamente 70, aproximadamente 16 a aproximadamente 65, aproximadamente 16 a aproximadamente 60, aproximadamente 16 a aproximadamente 55, aproximadamente 16 a aproximadamente 50, aproximadamente 16 a aproximadamente 45, aproximadamente 16 a aproximadamente 40, aproximadamente 16 a aproximadamente 35, aproximadamente 16 a aproximadamente 30, aproximadamente 16 a aproximadamente 25, aproximadamente 16 a aproximadamente 20, aproximadamente 16 a aproximadamente 18, aproximadamente 18 a aproximadamente 110, aproximadamente 18 a aproximadamente 95, aproximadamente 18 a aproximadamente 90, aproximadamente 18 a aproximadamente 85, aproximadamente 18 a aproximadamente 80, aproximadamente 18 a aproximadamente 75, aproximadamente 18 a aproximadamente 70, aproximadamente 18 a aproximadamente 65, aproximadamente 18 a aproximadamente 60, aproximadamente 18 a aproximadamente 55, aproximadamente 18 a aproximadamente 50, aproximadamente 18 a aproximadamente 45, aproximadamente 18 a aproximadamente 40, aproximadamente 18 a aproximadamente 35, aproximadamente 18 a aproximadamente 30, aproximadamente 18 a aproximadamente 25, aproximadamente 18 a aproximadamente 20, aproximadamente 20 a aproximadamente 110, aproximadamente 20 a aproximadamente 95, aproximadamente 20 a aproximadamente 90, aproximadamente 20 a aproximadamente 85, aproximadamente 20 a aproximadamente 80, aproximadamente 20 a aproximadamente 75, aproximadamente 20 a aproximadamente 70, aproximadamente 20 a

aproximadamente 65, aproximadamente 20 a aproximadamente 60, aproximadamente 20 a aproximadamente 55, aproximadamente 20 a aproximadamente 50, aproximadamente 20 a aproximadamente 45, aproximadamente 20 a aproximadamente 40, aproximadamente 20 a aproximadamente 35, aproximadamente 20 a aproximadamente 30, aproximadamente 20 a aproximadamente 25, aproximadamente 25 a aproximadamente 110, aproximadamente 25 a aproximadamente 95, aproximadamente 25 a aproximadamente 90, aproximadamente 25 a aproximadamente 85, aproximadamente 25 a aproximadamente 80, aproximadamente 25 a aproximadamente 75, aproximadamente 25 a aproximadamente 70, aproximadamente 25 a aproximadamente 65, aproximadamente 25 a aproximadamente 60, aproximadamente 25 a aproximadamente 55, aproximadamente 25 a aproximadamente 50, aproximadamente 25 a aproximadamente 45, aproximadamente 25 a aproximadamente 40, aproximadamente 25 a aproximadamente 35, aproximadamente 25 a aproximadamente 30, aproximadamente 30 a aproximadamente 110, aproximadamente 30 a aproximadamente 95, aproximadamente 30 a aproximadamente 90, aproximadamente 30 a aproximadamente 85, aproximadamente 30 a aproximadamente 80, aproximadamente 30 a aproximadamente 75, aproximadamente 30 a aproximadamente 70, aproximadamente 30 a aproximadamente 65, aproximadamente 30 a aproximadamente 60, aproximadamente 30 a aproximadamente 55, aproximadamente 30 a aproximadamente 50, aproximadamente 30 a aproximadamente 45, aproximadamente 30 a aproximadamente 40, aproximadamente 30 a aproximadamente 35, aproximadamente 35 a aproximadamente 110, aproximadamente 35 a aproximadamente 95, aproximadamente 35 a aproximadamente 90, aproximadamente 35 a aproximadamente 85, aproximadamente 35 a aproximadamente 80, aproximadamente 35 a aproximadamente 75, aproximadamente 35 a aproximadamente 70, aproximadamente 35 a

aproximadamente 65, aproximadamente 35 a aproximadamente 60, aproximadamente 35 a aproximadamente 55, aproximadamente 35 a aproximadamente 50, aproximadamente 35 a aproximadamente 45, aproximadamente 35 a aproximadamente 40, aproximadamente 40 a aproximadamente 110, aproximadamente 40 a aproximadamente 95, aproximadamente 40 a aproximadamente 90, aproximadamente 40 a aproximadamente 85, aproximadamente 40 a aproximadamente 80, aproximadamente 40 a aproximadamente 75, aproximadamente 40 a aproximadamente 70, aproximadamente 40 a aproximadamente 65, aproximadamente 40 a aproximadamente 60, aproximadamente 40 a aproximadamente 55, aproximadamente 40 a aproximadamente 50, aproximadamente 40 a aproximadamente 45, aproximadamente 45 a aproximadamente 110, aproximadamente 45 a aproximadamente 95, aproximadamente 45 a aproximadamente 90, aproximadamente 45 a aproximadamente 85, aproximadamente 45 a aproximadamente 80, aproximadamente 45 a aproximadamente 75, aproximadamente 45 a aproximadamente 70, aproximadamente 45 a aproximadamente 65, aproximadamente 45 a aproximadamente 60, aproximadamente 45 a aproximadamente 55, aproximadamente 45 a aproximadamente 50, aproximadamente 50 a aproximadamente 110, aproximadamente 50 a aproximadamente 95, aproximadamente 50 a aproximadamente 90, aproximadamente 50 a aproximadamente 85, aproximadamente 50 a aproximadamente 80, aproximadamente 50 a aproximadamente 75, aproximadamente 50 a aproximadamente 70, aproximadamente 50 a aproximadamente 65, aproximadamente 50 a aproximadamente 60, aproximadamente 50 a aproximadamente 55, aproximadamente 55 a aproximadamente 110, aproximadamente 55 a aproximadamente 95, aproximadamente 55 a aproximadamente 90, aproximadamente 55 a aproximadamente 85, aproximadamente 55 a aproximadamente 80, aproximadamente 55 a aproximadamente 75, aproximadamente 55 a

aproximadamente 70, aproximadamente 55 a aproximadamente 65, aproximadamente 55 a aproximadamente 60, aproximadamente 60 a aproximadamente 110, aproximadamente 60 a aproximadamente 95, aproximadamente 60 a aproximadamente 90, aproximadamente 60 a aproximadamente 85, aproximadamente 60 a aproximadamente 80, aproximadamente 60 a aproximadamente 75, aproximadamente 60 a aproximadamente 70, aproximadamente 60 a aproximadamente 65, aproximadamente 65 a aproximadamente 110, aproximadamente 65 a aproximadamente 95, aproximadamente 65 a aproximadamente 90, aproximadamente 65 a aproximadamente 85, aproximadamente 65 a aproximadamente 80, aproximadamente 65 a aproximadamente 75, aproximadamente 65 a aproximadamente 70, aproximadamente 70 a aproximadamente 110, aproximadamente 70 a aproximadamente 95, aproximadamente 70 a aproximadamente 90, aproximadamente 70 a aproximadamente 85, aproximadamente 70 a aproximadamente 80, aproximadamente 70 a aproximadamente 75, aproximadamente 75 a aproximadamente 110, aproximadamente 75 a aproximadamente 95, aproximadamente 75 a aproximadamente 90, aproximadamente 75 a aproximadamente 85, aproximadamente 75 a aproximadamente 80, aproximadamente 80 a aproximadamente 110, aproximadamente 80 a aproximadamente 95, aproximadamente 80 a aproximadamente 90, aproximadamente 80 a aproximadamente 85, aproximadamente 85 a aproximadamente 110, aproximadamente 85 a aproximadamente 95, aproximadamente 85 a aproximadamente 90, aproximadamente 90 a aproximadamente 110, aproximadamente 90 a aproximadamente 95, aproximadamente 95 a aproximadamente 110, aproximadamente 95 a aproximadamente 105, aproximadamente 95 a aproximadamente 100, aproximadamente 100 a aproximadamente 110, aproximadamente 100 a aproximadamente 105, ou aproximadamente 105 a aproximadamente 110);

(b) o biorreator de produção tem um volume de ar por volume de líquido por minuto (VVM) (min^{-1}) de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,10 (por exemplo, de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,08, de aproximadamente 0,04 a aproximadamente 0,06, ou aproximadamente 0,06) (por exemplo, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,10, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,09, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,08, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,07, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,06, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,05, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,04, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,03, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,02, aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,10, aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,09, aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,08, aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,07, aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,06, aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,05, aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,04, aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,03, aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,10, aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,09, aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,08, aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,07, aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,06, aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,05, aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,04, aproximadamente 0,04 a aproximadamente 0,10, aproximadamente 0,04 a aproximadamente 0,09, aproximadamente 0,04 a aproximadamente 0,08, aproximadamente 0,04 a aproximadamente 0,07, aproximadamente 0,04 a aproximadamente 0,06, aproximadamente 0,04 a aproximadamente 0,05, aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,10, aproximadamente 0,05 a aproximadamente

0,09, aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,08, aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,07, aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,06, aproximadamente 0,06 a aproximadamente 0,10, aproximadamente 0,06 a aproximadamente 0,09, aproximadamente 0,06 a aproximadamente 0,08, aproximadamente 0,06 a aproximadamente 0,07, aproximadamente 0,07 a aproximadamente 0,10, aproximadamente 0,07 a aproximadamente 0,09, aproximadamente 0,07 a aproximadamente 0,08, aproximadamente 0,08 a aproximadamente 0,10, aproximadamente 0,08 a aproximadamente 0,09, ou aproximadamente 0,09 a aproximadamente 0,10);

(c) o meio compreende um sensibilizador (por exemplo, qualquer um dos sensibilizadores no presente documento descritos ou conhecidos na técnica) que tem uma concentração de aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 5.000 ppm (ou qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas); e

(d) o meio de cultura líquido compreende um protetor (por exemplo, qualquer um dos protetores no presente documento descritos ou conhecidos na técnica) que tem uma concentração que é de aproximadamente 1 g/L a aproximadamente 15 g/L (por exemplo, qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas, por exemplo, aproximadamente 1 g/L a aproximadamente 15 g/L, aproximadamente 1 g/L a aproximadamente 14 g/L, aproximadamente 1 g/L a aproximadamente 13 g/L, aproximadamente 1 g/L a aproximadamente 12 g/L, aproximadamente 1 g/L a aproximadamente 11 g/L, aproximadamente 2 g/L a aproximadamente 15 g/L, aproximadamente 2 g/L a aproximadamente 14 g/L, aproximadamente 2 g/L a aproximadamente 13 g/L, aproximadamente 2 g/L a aproximadamente 12 g/L, aproximadamente 2 g/L a aproximadamente 11 g/L, aproximadamente 3 g/L a aproximadamente

15 g/L, aproximadamente 3 g/L a aproximadamente 14 g/L, aproximadamente 3 g/L a aproximadamente 13 g/L, aproximadamente 3 g/L a aproximadamente 12 g/L, aproximadamente 3 g/L a aproximadamente 11 g/L, aproximadamente 4 g/L a aproximadamente 15 g/L, aproximadamente 4 g/L a aproximadamente 14 g/L, aproximadamente 4 g/L a aproximadamente 13 g/L, aproximadamente 4 g/L a aproximadamente 12 g/L, aproximadamente 4 g/L a aproximadamente 11 g/L, aproximadamente 5 g/L a aproximadamente 15 g/L, aproximadamente 5 g/L a aproximadamente 14 g/L, aproximadamente 5 g/L a aproximadamente 13 g/L, aproximadamente 5 g/L a aproximadamente 12 g/L, aproximadamente 5 g/L a aproximadamente 11 g/L, aproximadamente 6 g/L a aproximadamente 15 g/L, aproximadamente 6 g/L a aproximadamente 14 g/L, aproximadamente 6 g/L a aproximadamente 13 g/L, aproximadamente 6 g/L a aproximadamente 12 g/L, aproximadamente 6 g/L a aproximadamente 11 g/L, aproximadamente 7 g/L a aproximadamente 15 g/L, aproximadamente 7 g/L a aproximadamente 14 g/L, aproximadamente 7 g/L a aproximadamente 13 g/L, aproximadamente 7 g/L a aproximadamente 12 g/L, aproximadamente 7 g/L a aproximadamente 11 g/L, aproximadamente 8 g/L a aproximadamente 15 g/L, aproximadamente 8 g/L a aproximadamente 14 g/L, aproximadamente 8 g/L a aproximadamente 13 g/L, aproximadamente 8 g/L a aproximadamente 12 g/L, aproximadamente 8 g/L a aproximadamente 11 g/L, aproximadamente 9 g/L a aproximadamente 15 g/L, aproximadamente 9 g/L a aproximadamente 14 g/L, aproximadamente 9 g/L a aproximadamente 13 g/L, aproximadamente 9 g/L a aproximadamente 12 g/L, aproximadamente 9 g/L a aproximadamente 11 g/L, aproximadamente 10 g/L a aproximadamente 15 g/L, aproximadamente 10 g/L a aproximadamente 14 g/L, aproximadamente 10 g/L a aproximadamente 13 g/L, aproximadamente

10 g/L a aproximadamente 12 g/L, aproximadamente 10 g/L a aproximadamente 11 g/L, aproximadamente 11 g/L a aproximadamente 15 g/L, aproximadamente 11 g/L a aproximadamente 14 g/L, aproximadamente 11 g/L a aproximadamente 13 g/L, aproximadamente 11 g/L a aproximadamente 12 g/L, aproximadamente 12 g/L a aproximadamente 15 g/L, aproximadamente 12 g/L a aproximadamente 14 g/L, aproximadamente 12 g/L a aproximadamente 13 g/L, aproximadamente 13 g/L a aproximadamente 15 g/L, aproximadamente 13 g/L a aproximadamente 14 g/L, ou aproximadamente 14 g/L a aproximadamente 15 g/L).

[0220] Sob as condições otimizadas, a taxa de morte de células específica pode ser menor do que ou predita ser menor do que 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, ou 40% por dia. Sob condições otimizadas, a taxa de morte de células específica pode ser aproximadamente 0,1% a aproximadamente 40% (ou qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas).

[0221] Em algumas modalidades, a viabilidade de célula pode ser determinada medindo a concentração de desidrogenase de ácido láctico (LDH). A produção de LDH específica de célula (nU/célula/dia) pode ser menor do que ou predita ser menor do que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, ou 200 (por exemplo, 150). Em algumas modalidades, a produção de LDH (nU/célula/dia) pode ser aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 (por exemplo, qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas, por exemplo, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 190, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 180, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 170,

aproximadamente 0,1 a aproximadamente 160, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 200, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 190, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 180, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 170, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 160, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 200, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 190, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 180, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 170, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 160, aproximadamente 2,5 a aproximadamente 200, aproximadamente 2,5 a aproximadamente 190, aproximadamente 2,5 a aproximadamente 180, aproximadamente 2,5 a aproximadamente 170, aproximadamente 2,5 a aproximadamente 160, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 200, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 190, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 180, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 170, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 160, aproximadamente 10 a aproximadamente 200, aproximadamente 10 a aproximadamente 190, aproximadamente 10 a aproximadamente 180, aproximadamente 10 a aproximadamente 170, aproximadamente 10 a aproximadamente 160, aproximadamente 20 a aproximadamente 200, aproximadamente 20 a aproximadamente 190, aproximadamente 20 a aproximadamente 180, aproximadamente 20 a aproximadamente 170, aproximadamente 20 a aproximadamente 160, aproximadamente 30 a aproximadamente 200, aproximadamente 30 a aproximadamente 190, aproximadamente 30 a aproximadamente 180, aproximadamente 30 a aproximadamente 170, aproximadamente 30 a aproximadamente 160, aproximadamente 40 a aproximadamente 200, aproximadamente 40 a aproximadamente 190, aproximadamente 40 a aproximadamente 180, aproximadamente 40 a aproximadamente 170, aproximadamente 40 a aproximadamente 160, aproximadamente 50 a aproximadamente 200, aproximadamente 50 a aproximadamente 190, aproximadamente 50 a aproximadamente 180, aproximadamente 50 a aproximadamente 170,

aproximadamente 50 a aproximadamente 160, aproximadamente 60 a aproximadamente 200, aproximadamente 60 a aproximadamente 190, aproximadamente 60 a aproximadamente 180, aproximadamente 60 a aproximadamente 170, aproximadamente 60 a aproximadamente 160, aproximadamente 70 a aproximadamente 200, aproximadamente 70 a aproximadamente 190, aproximadamente 70 a aproximadamente 180, aproximadamente 70 a aproximadamente 170, aproximadamente 70 a aproximadamente 160, aproximadamente 80 a aproximadamente 200, aproximadamente 80 a aproximadamente 190, aproximadamente 80 a aproximadamente 180, aproximadamente 80 a aproximadamente 170, aproximadamente 80 a aproximadamente 160, aproximadamente 90 a aproximadamente 200, aproximadamente 90 a aproximadamente 190, aproximadamente 90 a aproximadamente 180, aproximadamente 90 a aproximadamente 170, aproximadamente 90 a aproximadamente 160, aproximadamente 100 a aproximadamente 200, aproximadamente 100 a aproximadamente 190, aproximadamente 100 a aproximadamente 180, aproximadamente 100 a aproximadamente 170, aproximadamente 100 a aproximadamente 160, aproximadamente 110 a aproximadamente 200, aproximadamente 110 a aproximadamente 190, aproximadamente 110 a aproximadamente 180, aproximadamente 110 a aproximadamente 170, aproximadamente 110 a aproximadamente 160, aproximadamente 120 a aproximadamente 200, aproximadamente 120 a aproximadamente 190, aproximadamente 120 a aproximadamente 180, aproximadamente 120 a aproximadamente 170, aproximadamente 120 a aproximadamente 160, aproximadamente 130 a aproximadamente 200, aproximadamente 130 a aproximadamente 190, aproximadamente 130 a aproximadamente 180, aproximadamente 130 a aproximadamente 170, aproximadamente 130 a aproximadamente 160, aproximadamente 140 a aproximadamente 200, aproximadamente 140 a aproximadamente 190, aproximadamente 140

a aproximadamente 180, aproximadamente 140 a aproximadamente 170, aproximadamente 140 a aproximadamente 160, aproximadamente 150 a aproximadamente 200, aproximadamente 150 a aproximadamente 190, aproximadamente 150 a aproximadamente 180, aproximadamente 150 a aproximadamente 170, aproximadamente 150 a aproximadamente 160, aproximadamente 160 a aproximadamente 200, aproximadamente 160 a aproximadamente 190, aproximadamente 160 a aproximadamente 180, aproximadamente 160 a aproximadamente 170, aproximadamente 170 a aproximadamente 200, aproximadamente 170 a aproximadamente 190, aproximadamente 170 a aproximadamente 180, aproximadamente 180 a aproximadamente 200, aproximadamente 180 a aproximadamente 190, ou aproximadamente 190 a aproximadamente 200).

[0222] Em algumas modalidades, a taxa de crescimento aparente pode ser mais do que ou predita ser maior do que 1% por dia, maior do que 1,5% por dia, maior do que 2% por dia, maior do que 2,5% por dia, maior do que 3% por dia, maior do que 3,5% por dia, maior do que 4,0% por dia, maior do que 4,5% por dia, maior do que 5,0% por dia, maior do que 5,5% por dia, maior do que 6,0% por dia, maior do que 6,5% por dia, maior do que 7,0% por dia, maior do que 7,5% por dia, maior do que 8,0% por dia, maior do que 8,5% por dia, maior do que 9,0% por dia, maior do que 9,5% por dia, maior do que 10,0% por dia, maior do que 10,5% por dia, maior do que 11,0% por dia, maior do que 11,5% por dia, maior do que 12,0% por dia, maior do que 12,5% por dia, maior do que 13,0% por dia, maior do que 13,5% por dia, maior do que 14,0% por dia, maior do que 14,5% por dia, maior do que 15,0% por dia, maior do que 16% por dia, maior do que 17% por dia, maior do que 18% por dia, maior do que 19% por dia, maior do que 20% por dia, maior do que 21% por dia, maior do que 22% por dia, maior do que 23% por dia, maior do que 24% por dia, maior do que 25% por dia, maior do que 30% por dia, maior

do que 35% por dia, maior do que 40% por dia, maior do que 45% por dia, maior do que 50% por dia, maior do que 55% por dia, maior do que 60% por dia, maior do que 65% por dia, maior do que 70% por dia, maior do que 75% por dia, maior do que 80% por dia, maior do que 85% por dia, maior do que 90% por dia, maior do que 95% por dia, maior do que 100% por dia, maior do que 105% por dia, maior do que 110% por dia, maior do que 115% por dia, maior do que 120% por dia, maior do que 125% por dia, maior do que 130% por dia, maior do que 135% por dia, maior do que 140% por dia, maior do que 145% por dia, ou maior do que 150% por dia. Em algumas modalidades, a taxa de crescimento aparente pode ser aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 150% por dia (por exemplo, qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas, por exemplo, aproximadamente 0,1% a aproximadamente 48%, aproximadamente 0,1% a aproximadamente 46%, aproximadamente 0,1% a aproximadamente 44%, aproximadamente 0,1% a aproximadamente 42%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 50%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 48%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 46%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 44%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 42%, aproximadamente 1,0% a aproximadamente 50%, aproximadamente 1,0% a aproximadamente 48%, aproximadamente 1,0% a aproximadamente 46%, aproximadamente 1,0% a aproximadamente 44%, aproximadamente 1,0% a aproximadamente 42%, aproximadamente 2,0% a aproximadamente 50%, aproximadamente 2,0% a aproximadamente 48%, aproximadamente 2,0% a aproximadamente 46%, aproximadamente 2,0% a aproximadamente 44%, aproximadamente 2,0% a aproximadamente 42%, aproximadamente 4,0% a aproximadamente 50%, aproximadamente 4,0% a aproximadamente 48%, aproximadamente 4,0% a aproximadamente

46%, aproximadamente 4,0% a aproximadamente 44%, aproximadamente 4,0% a aproximadamente 42%, aproximadamente 6,0% a aproximadamente 50%, aproximadamente 6,0% a aproximadamente 48%, aproximadamente 6,0% a aproximadamente 46%, aproximadamente 6,0% a aproximadamente 44%, aproximadamente 6,0% a aproximadamente 42%, aproximadamente 8,0% a aproximadamente 50%, aproximadamente 8,0% a aproximadamente 48%, aproximadamente 8,0% a aproximadamente 46%, aproximadamente 8,0% a aproximadamente 44%, aproximadamente 8,0% a aproximadamente 42%, aproximadamente 10% a aproximadamente 50%, aproximadamente 10% a aproximadamente 48%, aproximadamente 10% a aproximadamente 46%, aproximadamente 10% a aproximadamente 44%, aproximadamente 10% a aproximadamente 42%, aproximadamente 12% a aproximadamente 50%, aproximadamente 12% a aproximadamente 48%, aproximadamente 12% a aproximadamente 46%, aproximadamente 12% a aproximadamente 44%, aproximadamente 12% a aproximadamente 42%, aproximadamente 14% a aproximadamente 50%, aproximadamente 14% a aproximadamente 48%, aproximadamente 14% a aproximadamente 46%, aproximadamente 14% a aproximadamente 44%, aproximadamente 14% a aproximadamente 42%, aproximadamente 16% a aproximadamente 50%, aproximadamente 16% a aproximadamente 48%, aproximadamente 16% a aproximadamente 46%, aproximadamente 16% a aproximadamente 44%, aproximadamente 16% a aproximadamente 42%, aproximadamente 18% a aproximadamente 50%, aproximadamente 18% a aproximadamente 48%, aproximadamente 18% a aproximadamente 46%, aproximadamente 18% a aproximadamente 44%, aproximadamente 18% a aproximadamente 42%, aproximadamente

20% a aproximadamente 50%, aproximadamente 20% a aproximadamente 48%, aproximadamente 20% a aproximadamente 46%, aproximadamente 20% a aproximadamente 44%, aproximadamente 20% a aproximadamente 42%, aproximadamente 22% a aproximadamente 50%, aproximadamente 22% a aproximadamente 48%, aproximadamente 22% a aproximadamente 46%, aproximadamente 22% a aproximadamente 44%, aproximadamente 22% a aproximadamente 42%, aproximadamente 24% a aproximadamente 50%, aproximadamente 24% a aproximadamente 48%, aproximadamente 24% a aproximadamente 46%, aproximadamente 24% a aproximadamente 44%, aproximadamente 24% a aproximadamente 42%, aproximadamente 26% a aproximadamente 50%, aproximadamente 26% a aproximadamente 48%, aproximadamente 26% a aproximadamente 46%, aproximadamente 26% a aproximadamente 44%, aproximadamente 26% a aproximadamente 42%, aproximadamente 28% a aproximadamente 50%, aproximadamente 28% a aproximadamente 48%, aproximadamente 28% a aproximadamente 46%, aproximadamente 28% a aproximadamente 44%, aproximadamente 28% a aproximadamente 42%, aproximadamente 30% a aproximadamente 50%, aproximadamente 30% a aproximadamente 48%, aproximadamente 30% a aproximadamente 46%, aproximadamente 30% a aproximadamente 44%, aproximadamente 30% a aproximadamente 42%, aproximadamente 32% a aproximadamente 50%, aproximadamente 32% a aproximadamente 48%, aproximadamente 32% a aproximadamente 46%, aproximadamente 32% a aproximadamente 44%, aproximadamente 32% a aproximadamente 42%, aproximadamente 34% a aproximadamente 50%, aproximadamente 34% a aproximadamente 48%, aproximadamente 34% a aproximadamente

46%, aproximadamente 34% a aproximadamente 44%, aproximadamente 34% a aproximadamente 42%, aproximadamente 36% a aproximadamente 50%, aproximadamente 36% a aproximadamente 48%, aproximadamente 36% a aproximadamente 46%, aproximadamente 36% a aproximadamente 44%, aproximadamente 36% a aproximadamente 42%, aproximadamente 38% a aproximadamente 50%, aproximadamente 38% a aproximadamente 48%, aproximadamente 38% a aproximadamente 46%, aproximadamente 38% a aproximadamente 44%, aproximadamente 38% a aproximadamente 42%, aproximadamente 40% a aproximadamente 50%, aproximadamente 40% a aproximadamente 48%, aproximadamente 40% a aproximadamente 46%, aproximadamente 40% a aproximadamente 44%, aproximadamente 40% a aproximadamente 42%, aproximadamente 42% a aproximadamente 50%, aproximadamente 42% a aproximadamente 48%, aproximadamente 42% a aproximadamente 46%, aproximadamente 42% a aproximadamente 44%, aproximadamente 44% a aproximadamente 50%, aproximadamente 44% a aproximadamente 48%, aproximadamente 44% a aproximadamente 46%, aproximadamente 46% a aproximadamente 50%, aproximadamente 46% a aproximadamente 48%, ou aproximadamente 48% a aproximadamente 50%).

[0223] Em algumas modalidades destes métodos, o sensibilizador é um agente antiespumante (por exemplo, um antiespumante baseado em polidimetilsiloxano, simeticona, ou qualquer um dos outros antiespumantes no presente documento descritos ou conhecidos na técnica). Em algumas modalidades, o protetor é um poloxamer (por exemplo, poloxamer-188, poloxamer-401, poloxamer-402, ou poloxamer-407), uma poloxamina (por exemplo, poloxamina-904 ou poloxamina-908), ou um poliol plurônico.

[0224] Em algumas modalidades destes métodos, o biorreator de produção (por exemplo, qualquer um dos biorreatores de produção exemplares no presente documento descritos ou conhecidos na técnica) tem um volume de aproximadamente 5 L a aproximadamente 20.000 L (ou qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas). Em algumas modalidades destes métodos, o biorreator de produção é um biorreator de perfusão. Em algumas modalidades destes métodos, o biorreator de produção é um biorreator de lote alimentado.

[0225] Em algumas modalidades, o método resulta em uma taxa de morte de células específica menor do que 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, ou 40% por dia, durante a cultivação da célula no biorreator de produção. Em algumas modalidades, o método resulta em uma taxa de morte de células específica de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 40% por dia (ou qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas) durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

[0226] Em algumas modalidades, o método resulta em uma produção de LDH específica de célula menor do que 150 nU/célula/dia, menor do que 145 nU/célula/dia, menor do que 140 nU/célula/dia, menor do que 135 nU/célula/dia, menor do que 130 nU/célula/dia, menor do que 125 nU/célula/dia, menor do que 120 nU/célula/dia, menor do que 115 nU/célula/dia, menor do que 150 nU/célula/dia, menor do que 110 nU/célula/dia, menor do que 105 nU/célula/dia, menor do que 100 nU/célula/dia, menor do que 95 nU/célula/dia, menor do que 90 nU/célula/dia, menor do que 85 nU/célula/dia, menor do que 80 nU/célula/dia, menor do que 75 nU/célula/dia, menor do que 70 nU/célula/dia, menor do que 65 nU/célula/dia, menor do que 60 nU/célula/dia, menor do que 55 nU/célula/dia, menor do que 50

nU/célula/dia, menor do que 45 nU/célula/dia, menor do que 45 nU/célula/dia, menor do que 40 nU/célula/dia, menor do que 35 nU/célula/dia, menor do que 30 nU/célula/dia, menor do que 25 nU/célula/dia, menor do que 20 nU/célula/dia, menor do que 15 nU/célula/dia, menor do que 10 nU/célula/dia, menor do que 5 nU/célula/dia, ou menor do que menor do que 1 nU/célula/dia, durante a cultivação da célula no biorreator de produção. Em algumas modalidades destes métodos, o método resulta em uma produção de LDH específica de célula de aproximadamente 0,1 nU/célula/dia a aproximadamente 150 nU/célula/dia (ou qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas) durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

[0227] Em algumas modalidades, o método resulta em uma taxa de crescimento aparente maior do que 1% por dia, maior do que 1,5% por dia, maior do que 2% por dia, maior do que 2,5% por dia, maior do que 3% por dia, maior do que 3,5% por dia, maior do que 4,0% por dia, maior do que 4,5% por dia, maior do que 5,0% por dia, maior do que 5,5% por dia, maior do que 6,0% por dia, maior do que 6,5% por dia, maior do que 7,0% por dia, maior do que 7,5% por dia, maior do que 8,0% por dia, maior do que 8,5% por dia, maior do que 9,0% por dia, maior do que 9,5% por dia, maior do que 10,0% por dia, maior do que 10,5% por dia, maior do que 11,0% por dia, maior do que 11,5% por dia, maior do que 12,0% por dia, maior do que 12,5% por dia, maior do que 13,0% por dia, maior do que 13,5% por dia, maior do que 14,0% por dia, maior do que 14,5% por dia, maior do que 15,0% por dia, maior do que 16% por dia, maior do que 17% por dia, maior do que 18% por dia, maior do que 19% por dia, maior do que 20% por dia, maior do que 21% por dia, maior do que 22% por dia, maior do que 23% por dia, maior do que 24% por dia, maior do que 25% por dia, maior do que 30% por dia, maior do que 35% por dia, maior do que 40% por dia, maior do que 45% por dia, maior do

que 50% por dia, maior do que 55% por dia, maior do que 60% por dia, maior do que 65% por dia, maior do que 70% por dia, maior do que 75% por dia, maior do que 80% por dia, maior do que 85% por dia, maior do que 90% por dia, maior do que 95% por dia, maior do que 100% por dia, maior do que 105% por dia, maior do que 110% por dia, maior do que 115% por dia, maior do que 120% por dia, maior do que 125% por dia, maior do que 130% por dia, maior do que 135% por dia, maior do que 140% por dia, maior do que 145% por dia, ou maior do que 150% por dia, durante a cultivação da célula no biorreator de produção. Em algumas modalidades destes métodos, o método resulta em uma taxa de crescimento aparente de aproximadamente 0,1% por dia a aproximadamente 150% por dia (ou qualquer uma das subfaixas desta faixa no presente documento descritas) durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

[0228] Em algumas modalidades destes métodos, a célula (por exemplo, qualquer uma das células no presente documento descritas) contém um ácido nucleico que codifica uma proteína terapêutica recombinante (por exemplo, qualquer uma das proteínas terapêuticas recombinantes no presente documento descritas). Algumas modalidades destes métodos ainda incluem coletar ou recuperar a proteína terapêutica recombinante. Algumas modalidades destes métodos ainda incluem purificar a proteína terapêutica recombinante. Algumas modalidades destes métodos ainda incluem formular a proteína terapêutica recombinante purificada.

[0229] Em algumas modalidades destes métodos, a célula é uma bactéria (por exemplo, qualquer uma das bactérias exemplares no presente documento descritas ou conhecidas na técnica), uma célula de fermento (por exemplo, qualquer uma das células de fermento no presente documento descritas ou conhecidas na técnica), ou uma célula de mamífero (por exemplo, qualquer uma das células de mamífero no presente documento descritas ou conhecidas na técnica).

[0230] Em algumas modalidades destes métodos, a viabilidade de célula é determinada medindo uma concentração de desidrogenase de ácido láctico (LDH) no recipiente de cultura de teste.

EXEMPLOS

[0231] A invenção está adicionalmente descrita nos exemplos seguintes, os quais não limitam o escopo da invenção descrito nas reivindicações.

EXEMPLO 1: **Rastreio Fatorial Total Combinado com Projeto de Composto de Centro Inscrito para Recipientes de Cultura de Teste**

[0232] A agitação rotativa (RPM^3), a concentração do sensibilizador, e a concentração de um protetor foram selecionadas como parâmetros. Um projeto fatorial total combinado com projeto de composto de centro inscrito foram utilizados para determinar um conjunto de condições de teste (Figura 7). Os valores de produção de LDH específica foram medidos em cada condição de teste. Os resultados foram utilizados para prover um contorno estimado dos parâmetros selecionados. Regiões de fraco desempenho e regiões de falha de operação foram identificadas (Figura 9).

EXEMPLO 2: Predizer Valores de Produção de LDH Específica em Escala de Bancada

[0233] Experimentos de prova de conceito foram executados na escala de bancada para determinar a precisão dos métodos de predição como no presente documento descritos.

[0234] A concentração de protetores na escala de bancada foi ajustada para três diferentes níveis. Para cada nível, dois biorreatores de cultivação de bancada foram testados. Os valores de produção de LDH específica de pico foram medidos devido ao processo de perfusão, e foram comparados com os valores preditos.

[0235] Os valores observados reais dos experimentos de escala de bancada coincidiram muito bem com aqueles valores preditos

(P<0,0001, R^2=0,84) (Figura 13A e Figura 13C). Os resultados demonstraram que os métodos como no presente documento descritos podem ser utilizados com sucesso para predizer os efeitos de vários parâmetros em uma escala mais alta.

[0236] Os experimentos foram executados mantendo uma faixa de concentração de antiespumante de 30-40 ppm de adição de antiespumante por dia. As concentrações de plurônico foram ajustadas de 1,8 g/L (linha tracejada), 2,8 g/L (linha cheia, círculos fechados), 3,8 g/L (linha cheia, círculos abertos). O experimento foi executado em replicado. Isto demonstra a capacidade dos modelos de predizer a produção de LDH específica quando mudando as concentrações de plurônico.

[0237] Experimentos foram também executados para aumentar a concentração do agente antiespumante de 30 ppm para 80 ppm por dia. A faixa de LDH predita foi de 90,19 ~ 96,38, a qual coincidiu muito bem com a faixa de LDH observada real de 94,74 ~ 99,36 (Figura 14). Os resultados mostraram que os métodos como no presente documento descrito podem ser utilizados com sucesso para predizer os efeitos de agentes antiespumante.

EXEMPLO 3: Predizer Valores de Produção de LDH Específica em Escala de Produção

[0238] Os experimentos foram executados na escala de produção para determinar a precisão do modelo como no presente documento descrito.

[0239] Três biorreatores de produção de 50 L e dois biorreatores de produção de 100 L foram testados. Os experimentos testaram concentrações de poloxamer-188 (plurônico) que variaram de 1,8 g/L a 5,8 g/L.

[0240] Os valores observados reais para produção de LDH específica coincidiram com estes valores preditos (P < 0,0001, R^2 =

0,84) (Figura 15A e Figura 15B). Os resultados demonstraram que os métodos como no presente documento descritos podem ser utilizados com sucesso para predizer os efeitos de parâmetros selecionados na escala de produção (escala de biorreator de produção).

OUTRAS MODALIDADES

[0241] Deve ser compreendido que apesar da invenção ter sido descrita em conjunto com a sua descrição detalhada, a descrição acima pretende ilustrar e não limitar o escopo da invenção, o qual é definido pelo escopo das reivindicações anexas. Outros aspectos, vantagens, e modificações estão dentro do escopo das reivindicações seguintes.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de predizer o efeito de uma concentração de um sensibilizador sobre viabilidade de célula em um biorreator de produção, o método caracterizado pelo fato de compreender:

(a) determinar a viabilidade de célula sob uma pluralidade de condições de teste em um recipiente de cultura de teste, em que a pluralidade de condições de teste é definida por um conjunto de parâmetros; e

(b) com base na viabilidade de célula no recipiente de cultura de teste sob a pluralidade de condições, predizer o efeito de uma concentração de um sensibilizador sobre viabilidade de célula em um biorreator de produção.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o conjunto de parâmetros compreende tensão de cisalhamento, concentração do sensibilizador, e concentração de um protetor.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de condições de teste é selecionada com base em rastreio fatorial total e/ou projeto de composto de centro inscrito.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, caracterizado pelo fato de que o sensibilizador é um agente antiespumante.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o antiespumante é um antiespumante baseado em polidimetilsiloxano.

6. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o antiespumante é simeticona.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações

1-6, caracterizado pelo fato de que o recipiente de cultura de teste tem um volume de aproximadamente 5 mL a aproximadamente 5 L.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o recipiente de cultura de teste tem um volume de aproximadamente 10 mL a aproximadamente 500 mL.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, caracterizado pelo fato de que o recipiente de cultura de teste é um frasco de agitação com defletor.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-9, caracterizado pelo fato de que o biorreator de produção tem um volume de aproximadamente 5 L a aproximadamente 20.000 L.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o biorreator de produção tem um volume de aproximadamente 50 L a aproximadamente 10.000 L.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-11, caracterizado pelo fato de que o biorreator de produção é um biorreator de perfusão.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-11, caracterizado pelo fato de que o biorreator de produção é um biorreator de lote alimentado.

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-13, caracterizado pelo fato de ainda compreender cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma concentração do sensibilizador predita para ter uma taxa de morte de células específica menor do que 40% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-13, caracterizado pelo fato de ainda compreender cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma concentração do sensibilizador predita para ter uma taxa de morte de células específica

menor do que 20% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-13, caracterizado pelo fato de ainda compreender cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma concentração do sensibilizador predita para resultar em uma produção de LDH específica de célula menor do que 150 nU/célula/dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

17. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-13, caracterizado pelo fato de ainda compreender cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma concentração do sensibilizador predita para resultar em uma produção de LDH específica de célula menor do que 100 nU/célula/dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

18. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-13, caracterizado pelo fato de ainda compreender cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma concentração do sensibilizador predita para resultar em uma taxa de crescimento aparente maior do que 1% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

19. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-13, caracterizado pelo fato de ainda compreender cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma concentração do sensibilizador predita para resultar em uma taxa de crescimento aparente maior do que 5% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

20. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 14-19, caracterizado pelo fato de que a célula contém um ácido nucleico que codifica uma proteína terapêutica recombinante.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de ainda compreender coletar a proteína terapêutica recombinante.

22. Método de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de ainda compreender purificar a proteína terapêutica recombinante.

23. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de ainda compreender formular a proteína terapêutica recombinante purificada.

24. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23, caracterizado pelo fato de que a célula é uma bactéria, um fermento, ou uma célula de mamífero.

25. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-24, caracterizado pelo fato de que a viabilidade de célula é determinada medindo uma concentração de desidrogenase de ácido láctico (LDH) no recipiente de cultura de teste.

26. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8 e 10-25, caracterizado pelo fato de que o recipiente de cultura de teste é um frasco de agitação com defletor e a pluralidade de condições de teste compreende um ou mais de:

(a) uma agitação rotativa de aproximadamente 125 RPM a aproximadamente 400 RPM;

(b) uma concentração do sensibilizador de aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 120 ppm; e

(c) uma concentração de um protetor que é aproximadamente 1 g/L a aproximadamente 10 g/L.

27. Método de acordo com a reivindicação 2 ou 26, caracterizado pelo fato de que o protetor é um poloxâmero, uma poloxamina, ou um poliol plurônico.

28. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o poloxâmero é poloxâmero-188, poloxâmero-401, poloxâmero-402, ou poloxâmero-407.

29. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado

pelo fato de que uma poloxamina é poloxamina-904 ou poloxamina-908.

30. Método de aperfeiçoar a viabilidade de célula em um biorreator de produção, o método caracterizado pelo fato de compreender:

(a) determinar a viabilidade de célula sob uma pluralidade de condições de teste em um recipiente de cultura de teste, em que a pluralidade de condições é definida por um conjunto de parâmetros;

(b) com base na viabilidade de célula no recipiente de cultura de teste sob a pluralidade de condições, selecionar uma condição que é ótima para a viabilidade de célula em um biorreator de produção; e

(c) cultivar uma célula no biorreator de produção sob a condição selecionada.

31. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o conjunto de parâmetros compreende tensão de cisalhamento, concentração de um sensibilizador, e concentração de um protetor.

32. Método de acordo com a reivindicação 30 ou reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de condições de teste é selecionada com base em rastreio fatorial total e/ou projeto de composto de centro inscrito.

33. Método de acordo com a reivindicação 31 ou 32, caracterizado pelo fato de que o sensibilizador é um agente antiespumante.

34. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o antiespumante é um antiespumante baseado em polidimetilsiloxano.

35. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o antiespumante é simeticona.

36. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações

30-35, caracterizado pelo fato de que o recipiente de cultura de teste tem um volume de aproximadamente 5 mL a aproximadamente 5 L.

37. Método de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o recipiente de cultura de teste tem um volume de aproximadamente 10 mL a aproximadamente 500 mL.

38. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30-37, caracterizado pelo fato de que o recipiente de cultura de teste é um frasco de agitação com defletor.

39. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30-38, caracterizado pelo fato de que o biorreator de produção tem um volume de aproximadamente 5 L a aproximadamente 20.000 L.

40. Método de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o biorreator de produção tem um volume de aproximadamente 50 L a aproximadamente 10.000 L.

41. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30-40, caracterizado pelo fato de que o biorreator de produção é um biorreator de perfusão.

42. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30-40, caracterizado pelo fato de que o biorreator de produção é um biorreator de lote alimentado.

43. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30-42, caracterizado pelo fato de que a etapa (c) resulta em uma taxa de morte de células específica menor do que 40% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

44. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30-42, caracterizado pelo fato de que a etapa (c) resulta em uma taxa de morte de células específica menor do que 20% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

45. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30-42, caracterizado pelo fato de que a etapa (c) resulta em uma

produção de LDH específica de célula menor do que 150 nU/célula/dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

46. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30-42, caracterizado pelo fato de que a etapa (c) resulta em uma produção de LDH específica de célula menor do que 100 nU/célula/dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

47. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30-42, caracterizado pelo fato de que a etapa (c) resulta em uma taxa de crescimento aparente maior do que 1% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

48. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30-42, caracterizado pelo fato de que a etapa (c) resulta em uma taxa de crescimento aparente maior do que 5% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

49. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30-48, caracterizado pelo fato de que a célula contém um ácido nucleico que codifica uma proteína terapêutica recombinante.

50. Método de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de ainda compreender coletar a proteína terapêutica recombinante.

51. Método de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de ainda compreender purificar a proteína terapêutica recombinante.

52. Método de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de ainda compreender formular a proteína terapêutica recombinante purificada.

53. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30-52, caracterizado pelo fato de que a célula é uma bactéria, um fermento, ou uma célula de mamífero.

54. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações

30-53, caracterizado pelo fato de que a viabilidade de célula é determinada medindo uma concentração de desidrogenase de ácido láctico (LDH) no recipiente de cultura de teste.

55. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30-37 e 39-54, caracterizado pelo fato de que o recipiente de cultura de teste é um frasco de agitação com defletor e a pluralidade de condições de teste compreende um ou mais de:

(a) uma agitação rotativa de aproximadamente 125 RPM a aproximadamente 400 RPM;

(b) uma concentração de um sensibilizador de aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 120 ppm; e

(c) uma concentração de um protetor que é aproximadamente 1 g/L a aproximadamente 10 g/L.

56. Método de acordo com a reivindicação 31 ou 55, caracterizado pelo fato de que o protetor é um poloxâmero, uma poloxamina, ou um poliol plurônico.

57. Método de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que o poloxâmero é poloxâmero-188, poloxâmero-401, poloxâmero-402, ou poloxâmero-407.

58. Método de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que uma poloxamina é poloxamina-904 ou poloxamina-908.

59. Método para predizer a viabilidade de célula em um biorreator de produção, o método caracterizado pelo fato de compreender:

(a) selecionar um conjunto de parâmetros que compreende pelo menos dois parâmetros;

(b) determinar a viabilidade de célula sob uma pluralidade de condições de teste como definida pelo conjunto de parâmetros em um recipiente de cultura de teste; e

(c) com base na viabilidade de célula no recipiente de

cultura de teste sob a pluralidade de condições, predizer a viabilidade de célula no biorreator de produção.

60. Método de acordo com a reivindicação 59, caracterizado pelo fato de que o conjunto de parâmetros compreende tensão de cisalhamento, concentração de um sensibilizador, e concentração de um protetor.

61. Método de acordo com a reivindicação 59 ou reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que a pluralidade de condições de teste é selecionada com base em rastreio fatorial total e/ou projeto de composto de centro inscrito.

62. Método de acordo com a reivindicação 60 ou 61, caracterizado pelo fato de que o sensibilizador é um agente antiespumante.

63. Método de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que o antiespumante é um antiespumante baseado em polidimetilsiloxano.

64. Método de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que o antiespumante é simeticona.

65. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 59-64, caracterizado pelo fato de que o recipiente de cultura de teste tem um volume de aproximadamente 5 mL a aproximadamente 5 L.

66. Método de acordo com a reivindicação 65, caracterizado pelo fato de que o recipiente de cultura de teste tem um volume de aproximadamente 10 mL a aproximadamente 500 mL.

67. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 59-66, caracterizado pelo fato de que o recipiente de cultura de teste é um frasco de agitação com defletor.

68. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 59-67, caracterizado pelo fato de que o biorreator de produção tem um volume de aproximadamente 5 L a aproximadamente 20.000 L.

69. Método de acordo com a reivindicação 68, caracterizado pelo fato de que o biorreator de produção tem um volume de aproximadamente 50 L a aproximadamente 10.000 L.

70. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 59-69, caracterizado pelo fato de que o biorreator de produção é um biorreator de perfusão.

71. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 59-69, caracterizado pelo fato de que o biorreator de produção é um biorreator de lote alimentado.

72. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 59-71, caracterizado pelo fato de ainda compreender cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma condição predita para resultar em uma taxa de morte de células específica menor do que 40% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

73. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 59-71, caracterizado pelo fato de ainda compreender cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma condição predita para resultar em uma taxa de morte de células específica menor do que 20% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

74. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 59-71, caracterizado pelo fato de ainda compreender cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma condição predita para resultar em uma produção de LDH específica de célula menor do que 150 nU/célula/dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

75. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 59-71, caracterizado pelo fato de ainda compreender cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma condição predita para resultar em uma produção de LDH específica de célula menor do que 100 nU/célula/dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

76. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 59-71, caracterizado pelo fato de ainda compreender cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma condição predita para resultar em uma taxa de crescimento aparente maior do que 1% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

77. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 59-71, caracterizado pelo fato de ainda compreender cultivar uma célula no biorreator de produção utilizando uma condição predita para resultar em uma taxa de crescimento aparente maior do que 5% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

78. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 72-77, caracterizado pelo fato de que a célula contém um ácido nucleico que codifica uma proteína terapêutica recombinante.

79. Método de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo fato de ainda compreender coletar a proteína terapêutica recombinante.

80. Método de acordo com a reivindicação 79, caracterizado pelo fato de ainda compreender purificar a proteína terapêutica recombinante.

81. Método de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de ainda compreender formular a proteína terapêutica recombinante purificada.

82. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 59-81, caracterizado pelo fato de que a célula é uma bactéria, um fermento, ou uma célula de mamífero.

83. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 59-82, caracterizado pelo fato de que a viabilidade de célula é determinada medindo uma concentração de desidrogenase de ácido láctico (LDH) no recipiente de cultura de teste.

84. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações

59-66 e 68-83, caracterizado pelo fato de que o recipiente de cultura de teste é um frasco de agitação com defletor e a pluralidade de condições de teste compreende um ou mais de:

(a) uma agitação rotativa de aproximadamente 125 RPM a aproximadamente 400 RPM;

(b) uma concentração do sensibilizador de aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 120 ppm; e

(c) uma concentração de um protetor que é aproximadamente 1 g/L a aproximadamente 10 g/L.

85. Método de acordo com a reivindicação 60 ou 84, caracterizado pelo fato de que o protetor é um poloxâmero, uma poloxamina, ou um poliol plurônico.

86. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que o poloxâmero é poloxâmero-188, poloxâmero-401, poloxâmero-402, ou poloxâmero-407.

87. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que a poloxamina é poloxamina-904 ou poloxamina-908.

88. Método para cultivar uma célula em um biorreator de produção, caracterizado pelo fato de compreender cultivar uma célula em um meio de cultura líquido sob uma ou mais das seguintes condições:

d) o biorreator de produção tem um P/V (kW/m^3) de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 110 (por exemplo, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 8,0, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 7,0, de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 6,0, de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0, ou aproximadamente 6,0);

e) o biorreator de produção tem um volume de ar por volume de líquido por minuto (VVM) (min^{-1}) de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,10 (por exemplo, de aproximadamente 0,02 a

aproximadamente 0,08, de aproximadamente 0,04 a aproximadamente 0,06, ou aproximadamente 0,06);

f) o meio compreende um sensibilizador que tem uma concentração de aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 5.000 ppm (por exemplo, aproximadamente 0 ppm a aproximadamente 120 ppm, aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 110 ppm, de aproximadamente 80 ppm a aproximadamente 100 ppm, ou aproximadamente 100 ppm); e

g) o meio de cultura líquido compreende um protetor que tem uma concentração que é de aproximadamente 1 g/L a aproximadamente 15 g/L (por exemplo, de aproximadamente 2 g/L a aproximadamente 10 g/L, de aproximadamente 3 g/L a aproximadamente 7 g/L, de aproximadamente 4 g/L a aproximadamente 6 g/L, ou aproximadamente 5 g/L).

89. Método de acordo com a reivindicação 88, caracterizado pelo fato de que o sensibilizador é um agente antiespumante.

90. Método de acordo com a reivindicação 89, caracterizado pelo fato de que o antiespumante é um antiespumante baseado em polidimetilsiloxano.

91. Método de acordo com a reivindicação 89, caracterizado pelo fato de que o antiespumante é simeticona.

92. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 88-91, caracterizado pelo fato de que o protetor é um poloxâmero, uma poloxamina, ou um poliol plurônico.

93. Método de acordo com a reivindicação 92, caracterizado pelo fato de que o poloxâmero é poloxâmero-188, poloxâmero-401, poloxâmero-402, ou poloxâmero-407.

94. Método de acordo com a reivindicação 92, caracterizado pelo fato de que a poloxamina é poloxamina-904 ou poloxamina-908.

95. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações

88-94, caracterizado pelo fato de que o biorreator de produção tem um volume de aproximadamente 5 L a aproximadamente 20.000 L.

96. Método de acordo com a reivindicação 95, caracterizado pelo fato de que o biorreator de produção tem um volume de aproximadamente 50 L a aproximadamente 10.000 L.

97. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 88-96, caracterizado pelo fato de que o biorreator de produção é um biorreator de perfusão.

98. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 88-96, caracterizado pelo fato de que o biorreator de produção é um biorreator de lote alimentado.

99. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 88-98, caracterizado pelo fato de que o método resulta em uma taxa de morte de células específica menor do que 40% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

100. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 88-98, caracterizado pelo fato de que o método resulta em uma taxa de morte de células específica menor do que 20% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

101. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 88-98, caracterizado pelo fato de que o método resulta em uma produção de LDH específica de célula menor do que 150 nU/célula/dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

102. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 88-98, caracterizado pelo fato de que o método resulta em uma produção de LDH específica de célula menor do que 100 nU/célula/dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

103. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 88-98, caracterizado pelo fato de que o método resulta em uma taxa de crescimento aparente maior do que 1% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

104. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 88-98, caracterizado pelo fato de que o método resulta em uma taxa de crescimento aparente maior do que 5% por dia durante a cultivação da célula no biorreator de produção.

105. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 88-98, caracterizado pelo fato de que a célula contém um ácido nucleico que codifica uma proteína terapêutica recombinante.

106. Método de acordo com a reivindicação 105, caracterizado pelo fato de ainda compreender coletar a proteína terapêutica recombinante.

107. Método de acordo com a reivindicação 106, caracterizado pelo fato de ainda compreender purificar a proteína terapêutica recombinante.

108. Método de acordo com a reivindicação 107, caracterizado pelo fato de ainda compreender formular a proteína terapêutica recombinante purificada.

109. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 88-108, caracterizado pelo fato de que a célula é uma bactéria, um fermento, ou uma célula de mamífero.

110. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 88-109, caracterizado pelo fato de que a viabilidade de célula é determinada medindo uma concentração de desidrogenase de ácido láctico (LDH) no recipiente de cultura de teste.

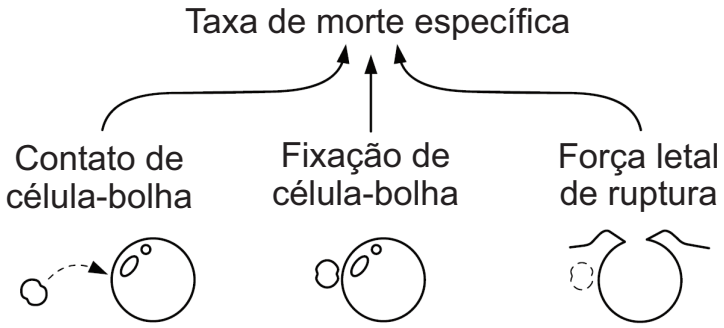
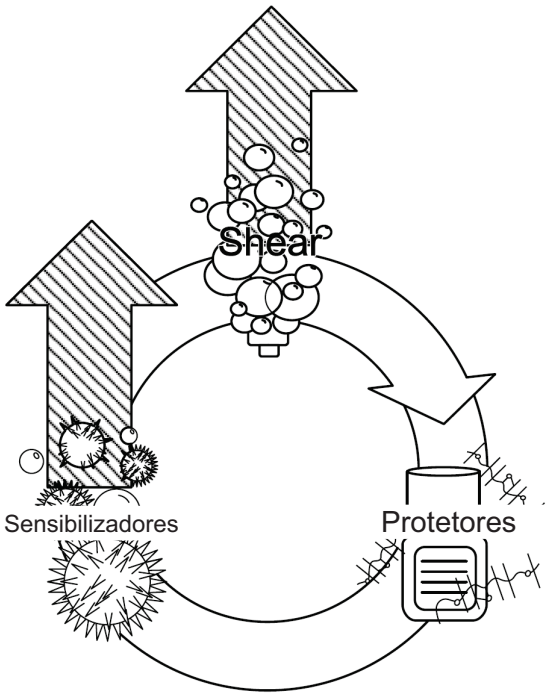


FIG. 1



- Cisalhamento aumentado reduz espaço de operação
- Antiespumante aumentado move para fora do espaço de operação

1. Alta densidade de células
2. Aspersão gera espuma
3. Adição de antiespumante
4. Adição de antiespumante contínua

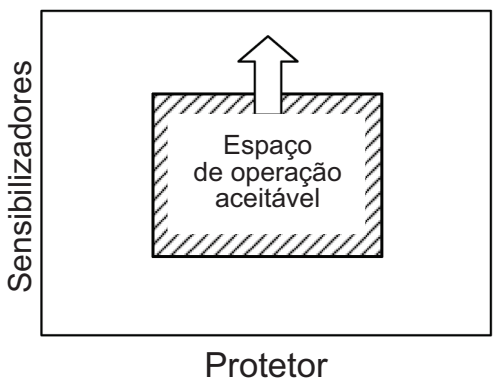


FIG. 2

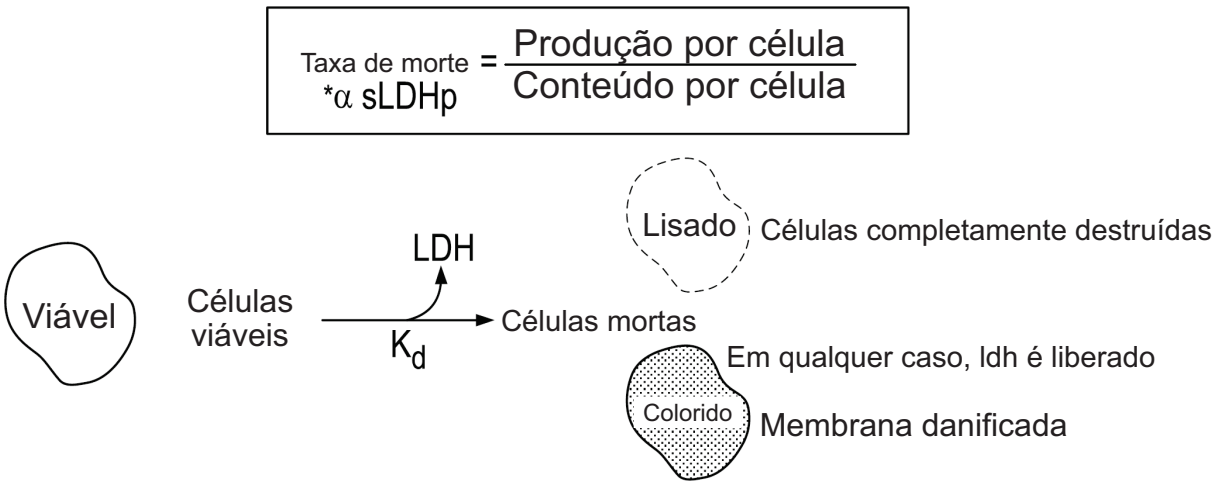

Taxa de morte
*α sLDHp
=
Produção por célula
Conteúdo por célula
Lisado
Células completamente destruídas
LDH
Viável
Células viáveis
Células mortas
K_d
Em qualquer caso, ldh é liberado
Colorido
Membrana danificada

FIG. 3

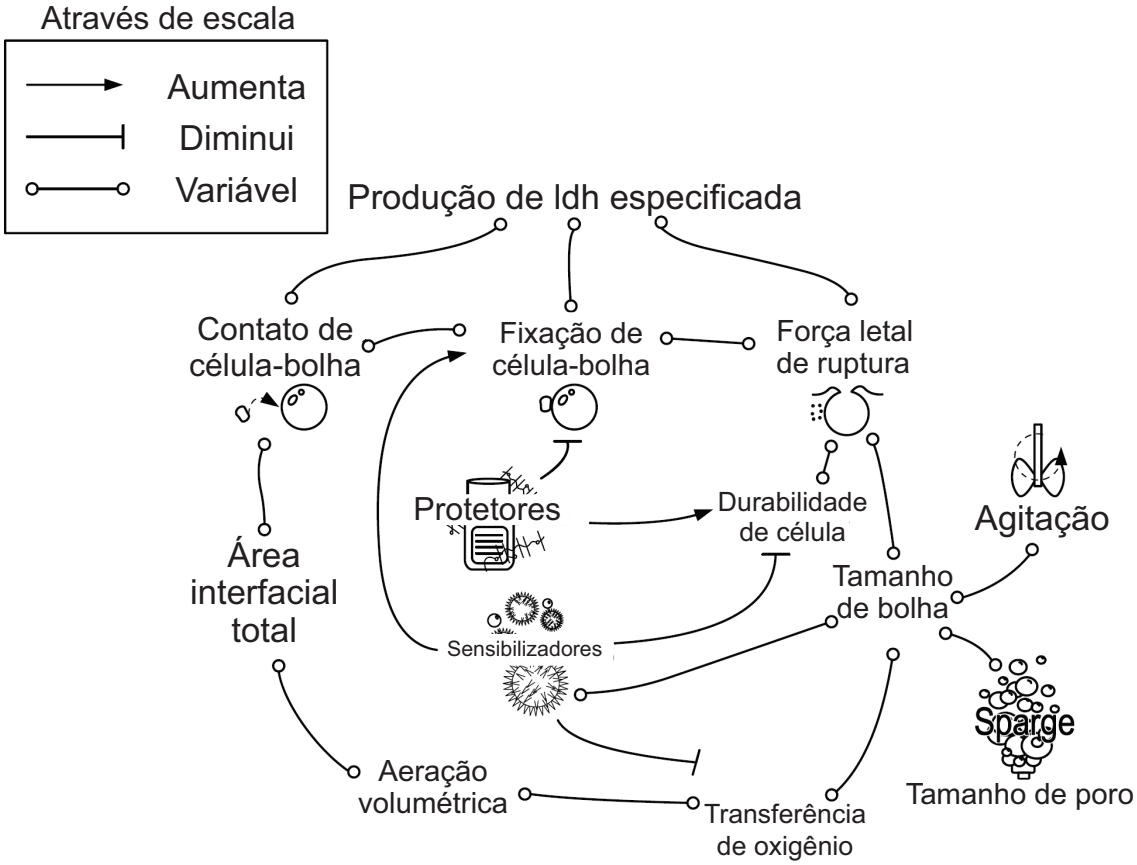

Através de escala
Aumenta
Diminui
Variável
Produção de ldh especificada
Contato de célula-bolha
Fixação de célula-bolha
Força letal de ruptura
Protetores
Durabilidade de célula
Agitação
Área interfacial total
Tamanho de bolha
Sensibilizadores
Sparge
Aeração volumétrica
Transferência de oxigênio
Tamanho de poro

FIG. 4

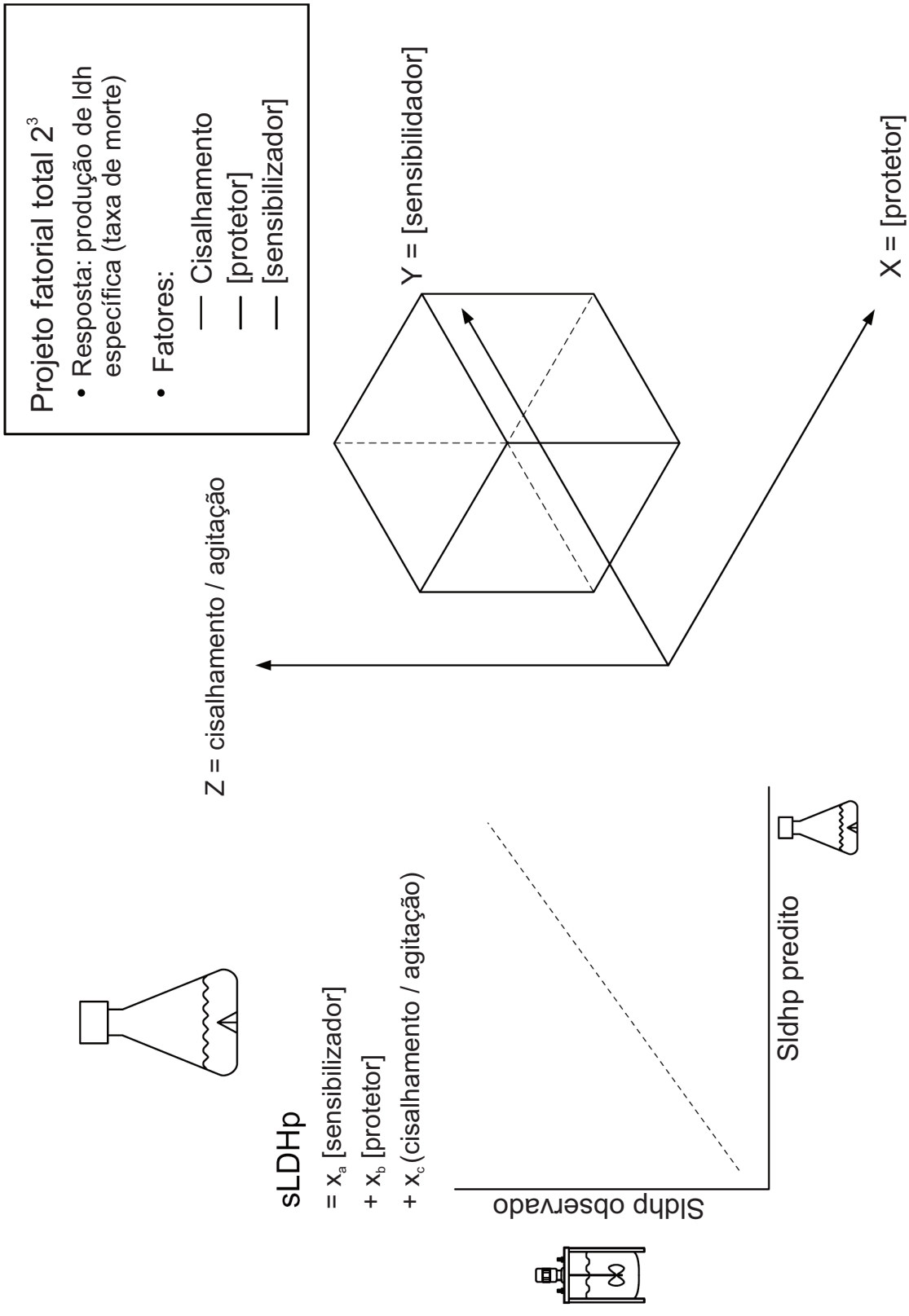

Projeto fatorial total 2^3
• Resposta: produção de ldh específica (taxa de morte)
• Fatores:
— Cisalhamento
— [protetor]
— [sensibilizador]
Y = [sensibilidador]
X = [protetor]
Z = cisalhamento / agitação
sLDHp
= x_a [sensibilizador]
+ x_b [protetor]
+ x_c (cisalhamento / agitação)
Sldhp observado
Sldhp predito

FIG. 5

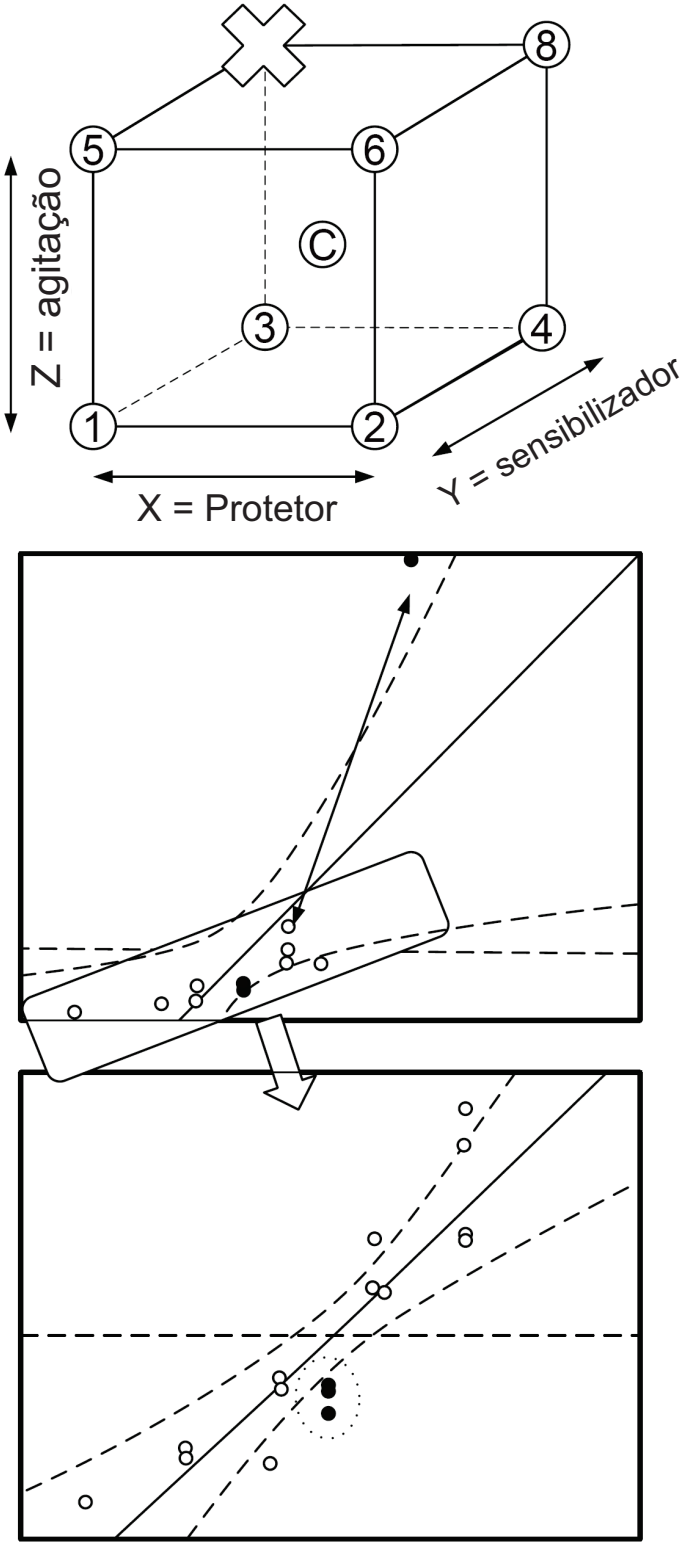
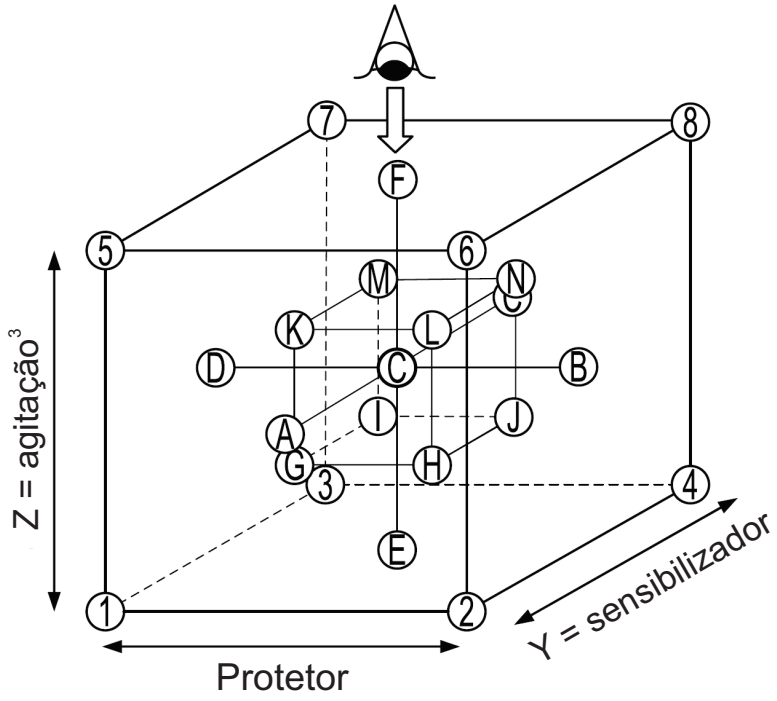


FIG. 6



Rpm ajustada para a 3ª potência

FIG. 7

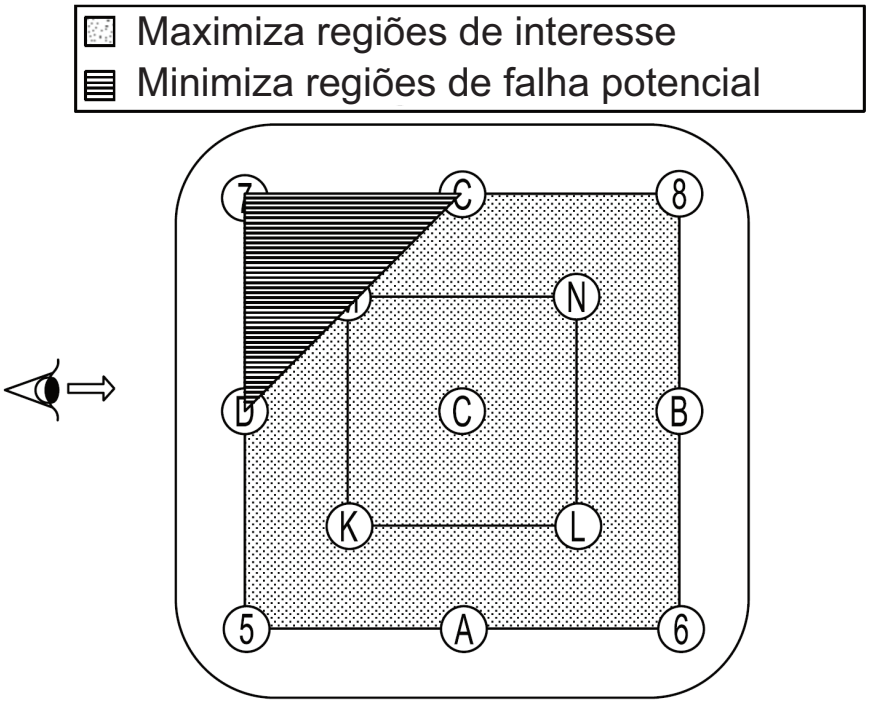
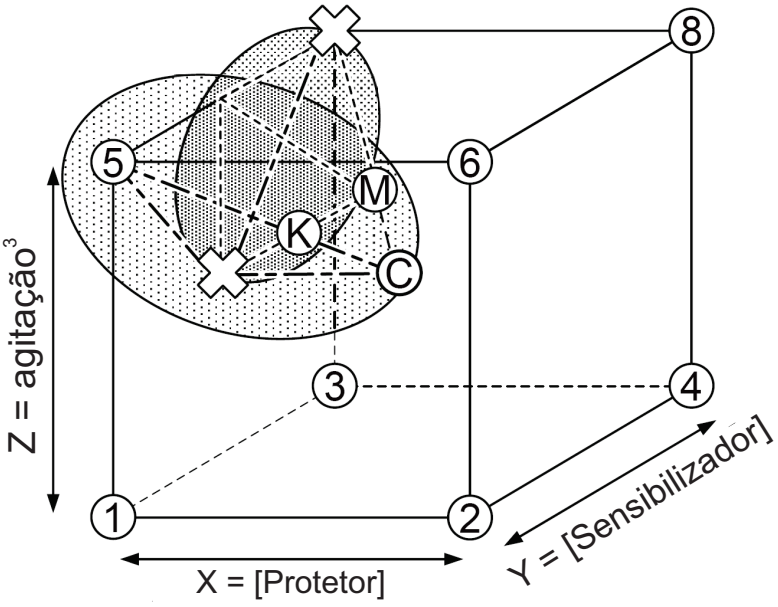


FIG. 8



Região fraca identificada de fraco desempenho / falha

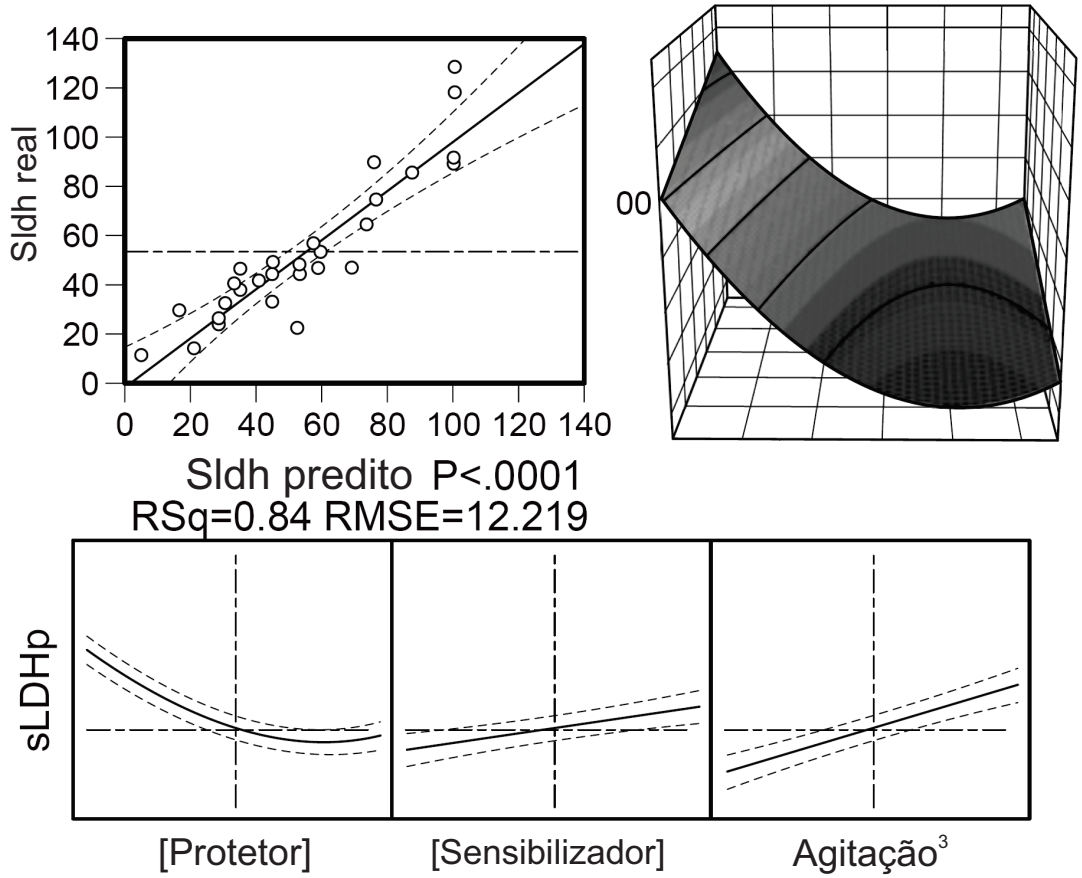
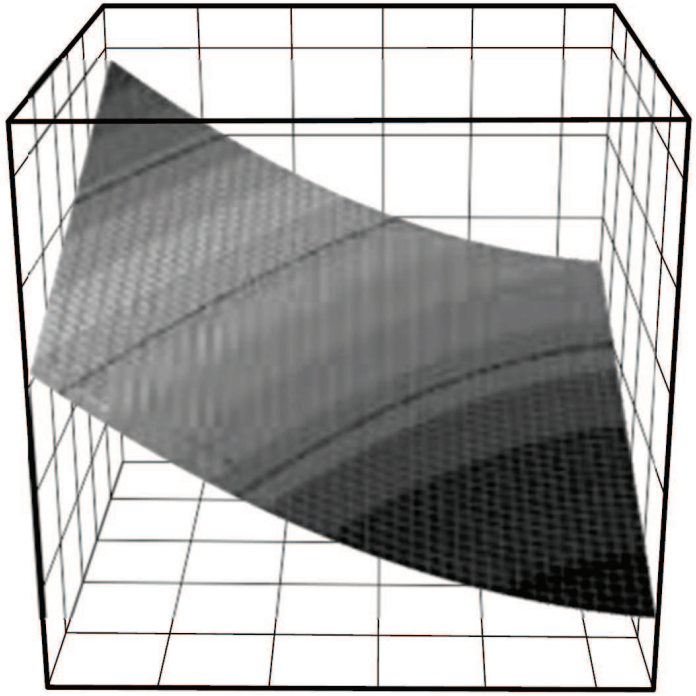
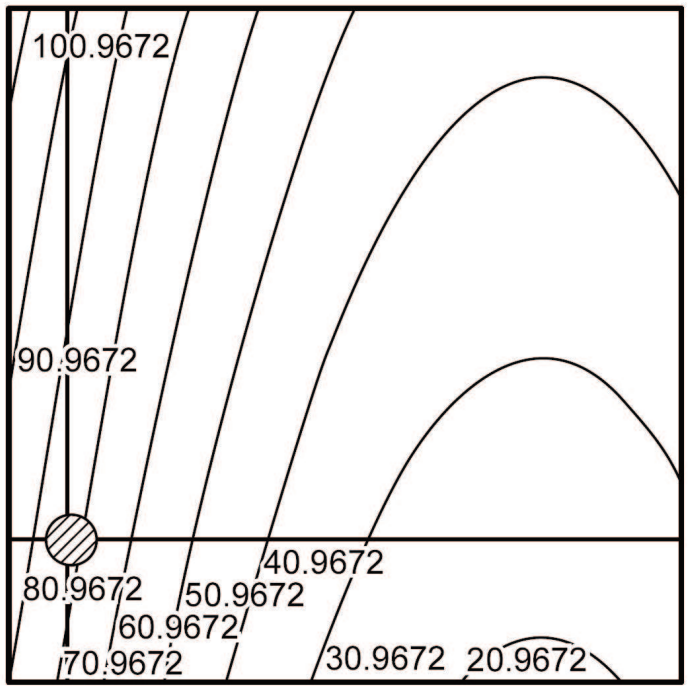


FIG. 9

Petição 870200125476, de 05/10/2020, pág. 267/277



1. Coincidir contorno correto
Conhecido:
[sensibilizador]
[protetor]
Resolver:
Cisalhamento



2. Predizer parâmetro
Conhecido:
Cisalhamento
[sensibilizador]
Resolver:
Δ[protetor]

FIG. 10

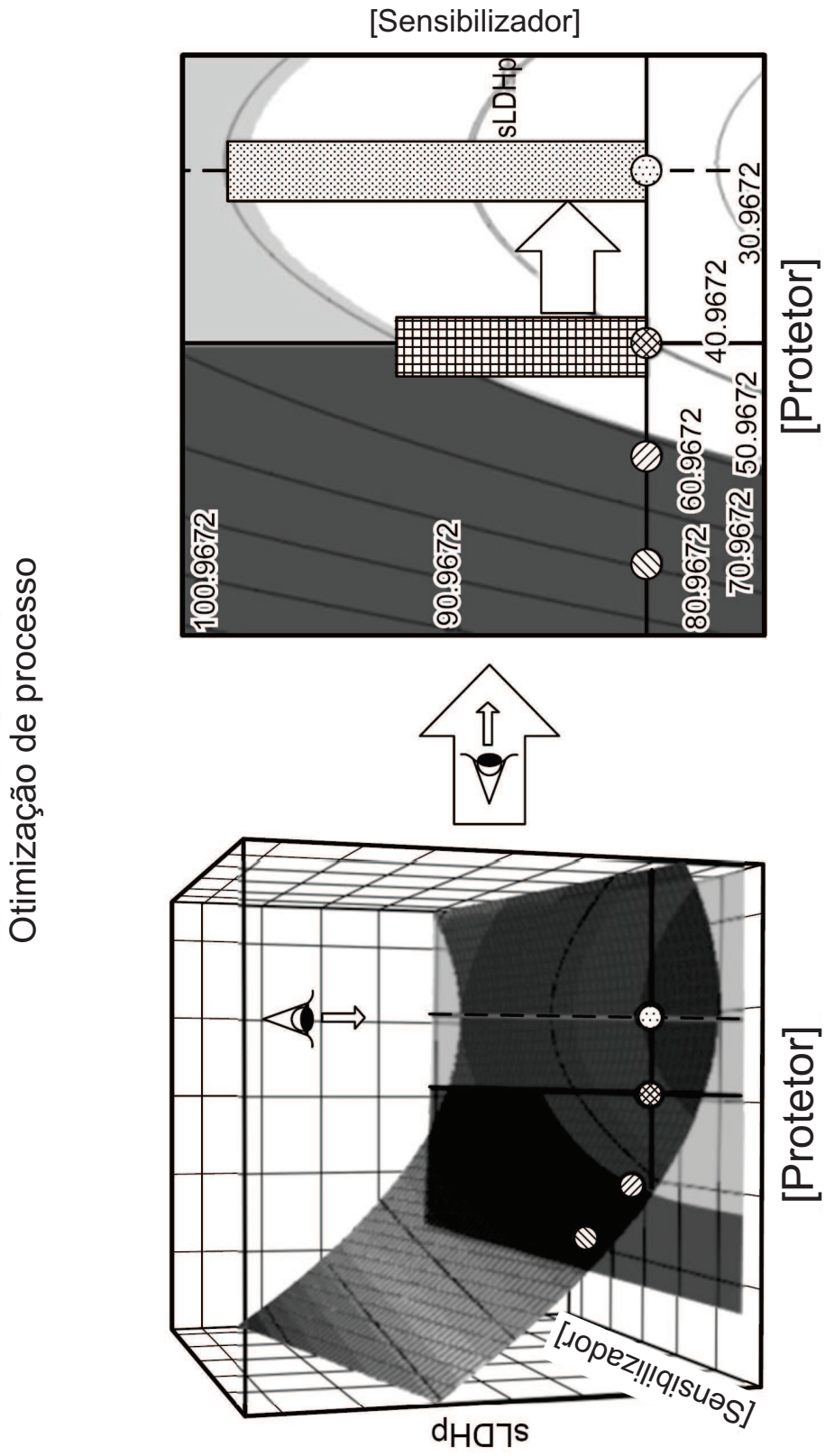

Otimização de processo
[Sensibilizador]
sLDHp
100.9672
90.9672
80.9672
70.9672
60.9672
50.9672
40.9672
30.9672
[Protetor]
sLDHp
[Sensibilizador]
[Protetor]

FIG. 11

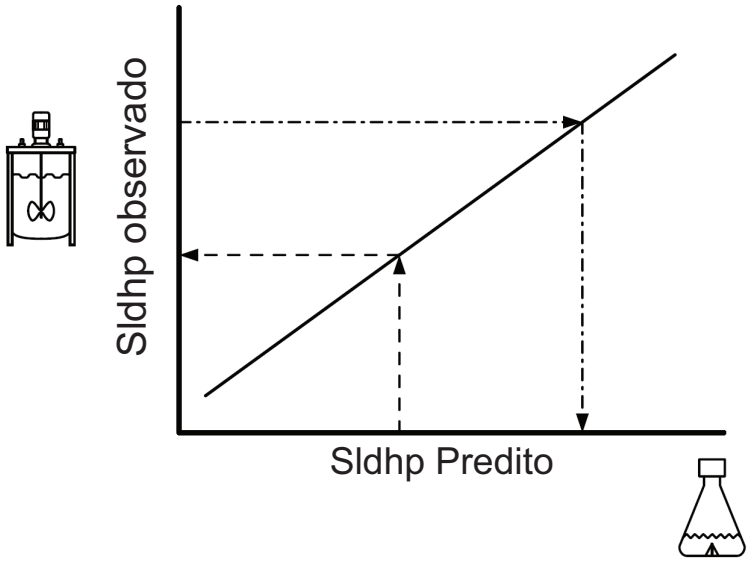


FIG. 12

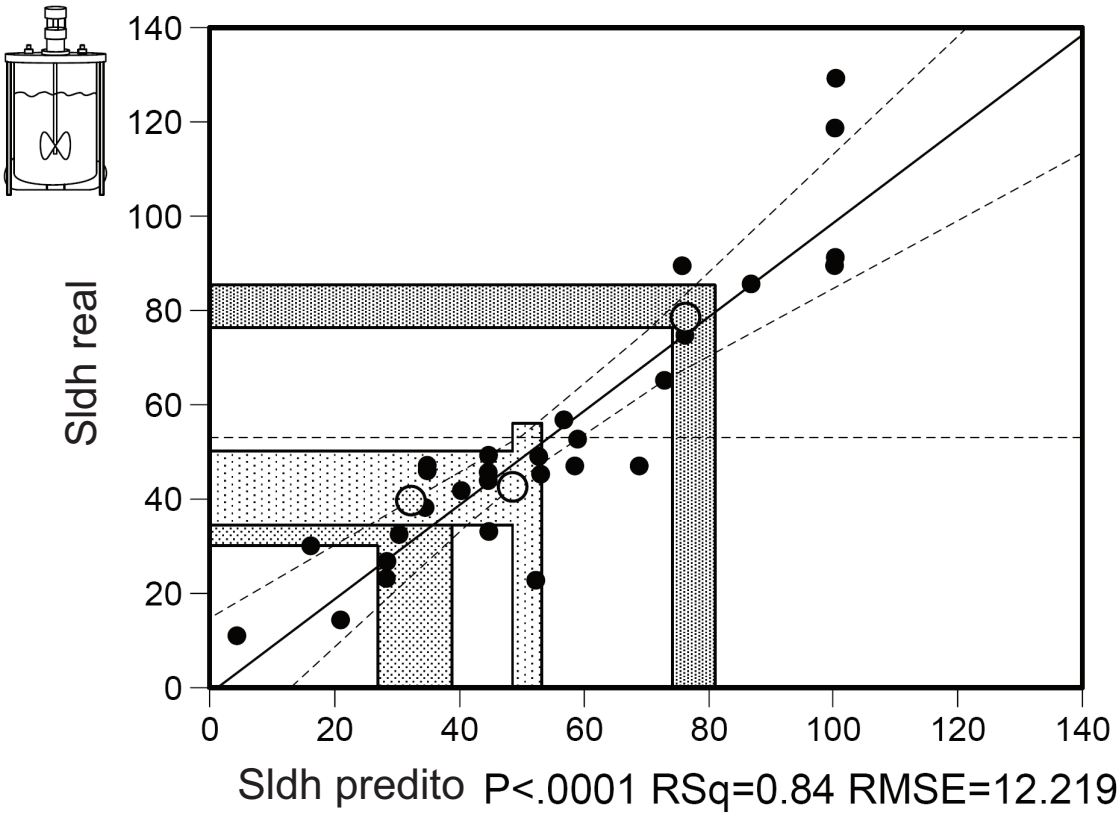


FIG. 13A

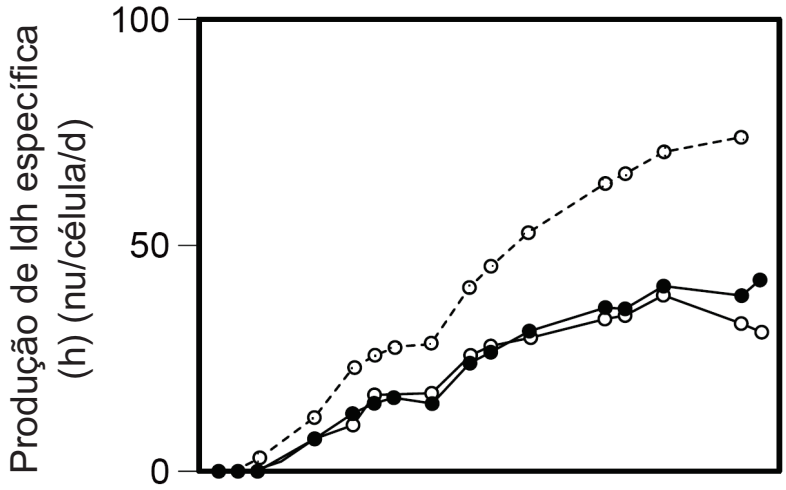
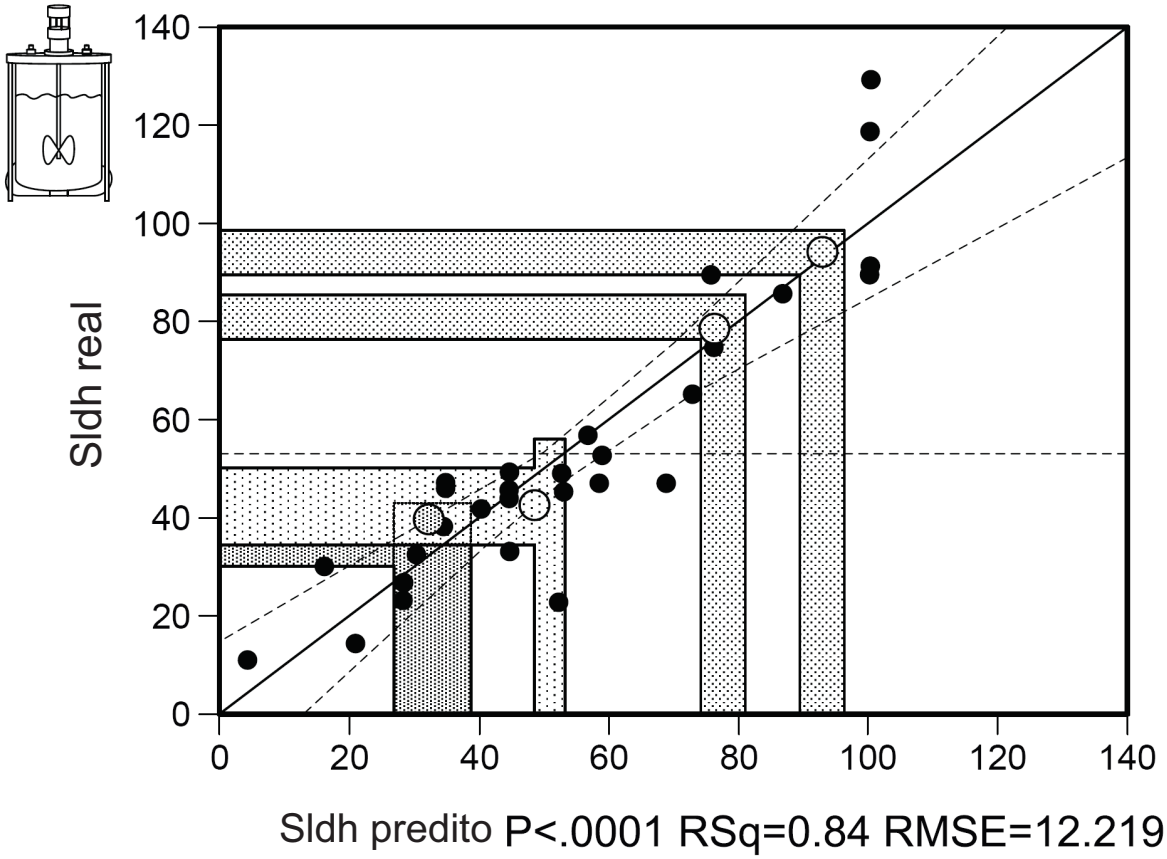


FIG. 13B

Bancada 10 l		Modelo de frasco de agitação	
Ldh observado		Ldh predito	
Avg	Std	Avg	Std
39.00	8.49	37.00	4.24
43.00	7.07	54.00	4.24
80.50	3.54	80.00	4.24
Min	Max	Min	Max
30.51	47.49	32.76	41.24
35.93	50.07	49.76	58.24
76.96	84.04	75.76	84.24

FIG. 13C



N=1 para condição mudada

Antiespumante aumentou de 30 ppm para 80 ppm			
Faixa de ldh observada		Faixa de ldh predita	
94.74	99.36	90.19	96.38

FIG. 14

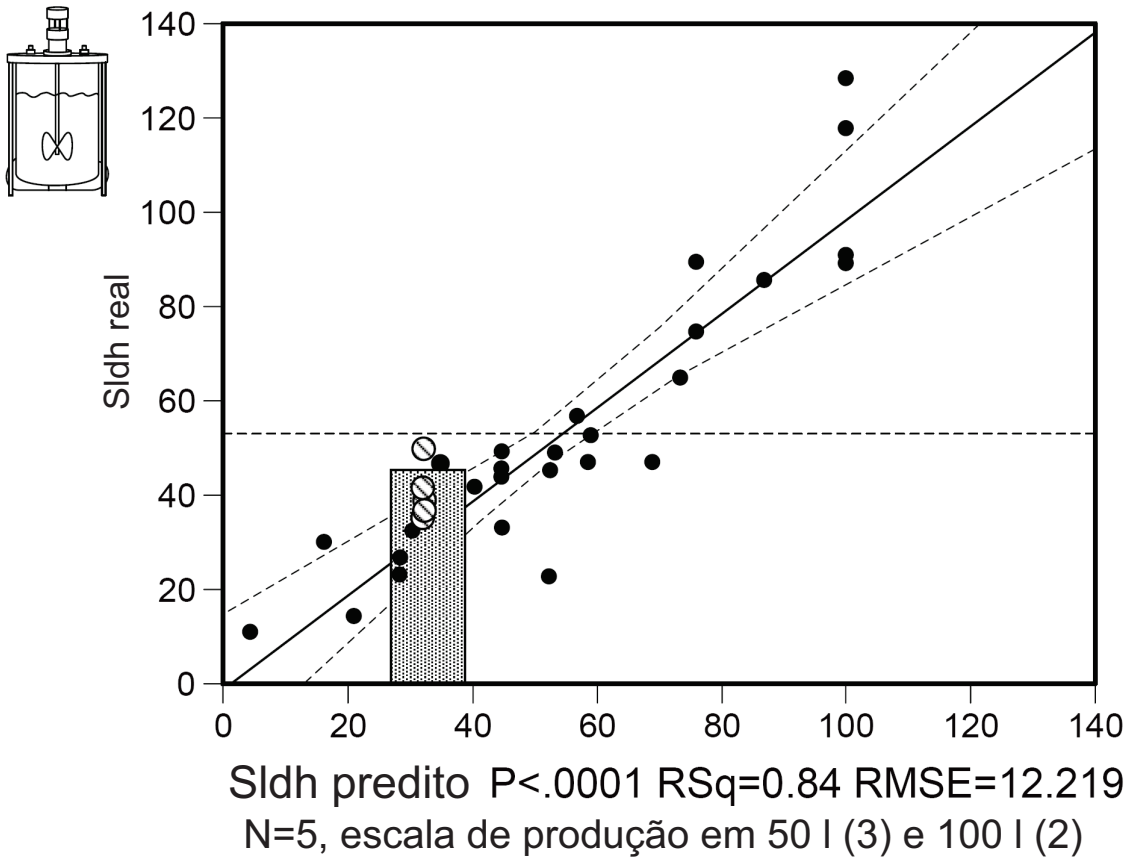


FIG. 15A

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

FIG. 15B

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODOS PARA APERFEIÇOAR VIABILIDADE DE CÉLULA EM UM BIORREATOR DE PRODUÇÃO".**

A presente invenção refere-se a métodos para predizer o efeito de uma concentração de um sensibilizador sobre a viabilidade de célula em um biorreator de produção, métodos de aperfeiçoar a viabilidade de célula em um biorreator de produção, métodos de predizer a viabilidade de célula em um biorreator de produção, e métodos para cultivar uma célula em um biorreator de produção.