



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년01월22일
(11) 등록번호 10-2757905
(24) 등록일자 2025년01월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/34 (2006.01) C12M 1/00 (2006.01)
C12Q 1/32 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
C12M 41/46 (2013.01)
C12M 27/20 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7029405
- (22) 출원일자(국제) 2019년03월15일
심사청구일자 2022년03월15일
- (85) 번역문제출일자 2020년10월14일
- (65) 공개번호 10-2020-0132932
- (43) 공개일자 2020년11월25일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2019/022530
- (87) 국제공개번호 WO 2019/178508
국제공개일자 2019년09월19일
- (30) 우선권주장
62/644,339 2018년03월16일 미국(US)
62/645,755 2018년03월20일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020170090508 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
젠자임 코포레이션
미국 메사추세츠주 02141 캠브리지 워터 스트리트 450
- (72) 발명자
왕, 조나단
미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 메일-코드: 55에이-525 코포레이트 드라이브 55 사노피 유.에스.내
샤, 네하
미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 메일-코드: 55에이-525 코포레이트 드라이브 55 사노피 유.에스.내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 임근실

전체 청구항 수 : 총 20 항

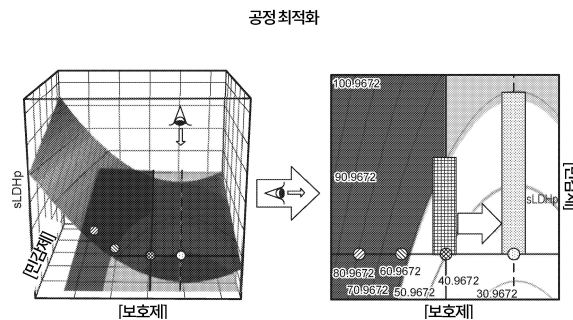
심사관 : 권혁성

(54) 발명의 명칭 **생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력을 개선하는 방법**

(57) 요약

생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력에 대한 민감제 농도의 효과를 예측하는 방법, 생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력을 개선하는 방법, 생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력을 예측하는 방법, 및 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 방법이 본원에 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12M 41/32 (2013.01)

C12M 41/42 (2013.01)

C12M 47/12 (2013.01)

C12Q 1/32 (2013.01)

G01N 33/5014 (2013.01)

(72) 발명자

월더, 제이슨

미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 메일-코드: 55에
이-525 코포레이트 드라이브 55 사노피 유.에스.

내

루, 지유이

미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 메일-코드: 55에
이-525 코포레이트 드라이브 55 사노피 유.에스.

내

존슨, 티모시

미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 메일-코드: 55에
이-525 코포레이트 드라이브 55 사노피 유.에스.

내

렌, 유쿤

미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 메일-코드: 55에
이-525 코포레이트 드라이브 55 사노피 유.에스.

내

맥라티, 진

미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 메일-코드: 55에
이-525 코포레이트 드라이브 55 사노피 유.에스.

내

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 시험 배양 용기에서 복수의 시험 조건 하에서 세포 생존력을 결정하는 단계로서, 상기 복수의 시험 조건은 일련의 매개 변수에 의해 규정되고, 상기 복수의 시험 조건은 완전 요인 스크리닝(full factorial screening) 및/또는 내접 중심 합성 설계(inscribed center composite design)에 기초하여 선택되는 것인, 단계; 및

(b) 상기 복수의 조건 하의 상기 시험 배양 용기에서의 세포 생존력에 기초하여, 생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력에 대한 민감제 농도의 효과를 예측하는 단계;

(c) 상기 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루에 40% 미만의 비세포 사멸률(specific cell death rate);

상기 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 150 nU/세포/일 미만의 세포 비LDH 생산량(specific LDH production); 또는

상기 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루에 1% 초과인 길보기 성장률

을 가져올 것으로 예측되는 민감제 농도를 사용하여 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력에 대한 민감제 농도의 효과를 예측하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 일련의 매개 변수는 진단 능력, 민감제 농도, 및 보호제 농도를 포함하는 것인, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 민감제는 소포제인, 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 시험 배양 용기는 배플형 진탕 플라스크이고, 상기 복수의 시험 조건은 다음 중 하나 이상을 포함하는 것인, 방법:

(a) 125 RPM 내지 400 RPM의 회전 교반;

(b) 0 ppm 내지 120 ppm의 민감제 농도; 및

(c) 1 g/L 내지 10 g/L인 보호제 농도.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 보호제는 폴록사머, 폴록사민, 또는 플루로닉 폴리올인, 방법.

청구항 6

(a) 시험 배양 용기에서 복수의 시험 조건 하에서 세포 생존력을 결정하는 단계로서, 상기 복수의 조건은 일련의 매개 변수에 의해 규정되고, 상기 복수의 시험 조건은 완전 요인 스크리닝 및/또는 내접 중심 합성 설계에 기초하여 선택되는 것인, 단계;

(b) 상기 복수의 조건 하의 상기 시험 배양 용기에서의 세포 생존력에 기초하여, 생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력에 최적인 조건을 선택하는 단계; 및

(c) 상기 선택된 조건 하에서 상기 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 단계로서, 상기 조건은

상기 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루에 40% 미만의 비세포 사멸률;

상기 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 150 nU/세포/일 미만의 세포 비LDH 생산량; 또는

상기 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루에 1% 초과인 길보기 성장률을 가져오는 것인, 단계를 포함하는

생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력을 개선하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 일련의 매개 변수는 전단 응력, 민감제 농도, 및 보호제 농도를 포함하는 것인, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 민감제는 소포제인, 방법.

청구항 9

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 시험 배양 용기는 배플형 진탕 플라스크이고, 상기 복수의 시험 조건은 다음 중 하나 이상을 포함하는 것인, 방법:

- (a) 125 RPM 내지 400 RPM의 회전 교반;
- (b) 0 ppm 내지 120 ppm의 민감제 농도; 및
- (c) 1 g/L 내지 10 g/L인 보호제 농도.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 보호제는 폴록사머, 폴록사민, 또는 플루로닉 폴리올인, 방법.

청구항 11

- (a) 적어도 2개의 매개 변수를 포함하는 일련의 매개 변수를 선택하는 단계;
- (b) 시험 배양 용기에서 상기 일련의 매개 변수에 의해 규정된 바와 같은 복수의 시험 조건 하에서 세포 생존력을 결정하는 단계로서, 상기 복수의 시험 조건은 완전 요인 스크리닝 및/또는 내접 중심 합성 설계에 기초하여 선택되는 것인, 단계; 및
- (c) 상기 복수의 조건 하의 상기 시험 배양 용기에서의 세포 생존력에 기초하여, 생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력을 예측하는 단계를 포함하는, 생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력을 예측하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 일련의 매개 변수는 전단 응력, 민감제 농도, 및 보호제 농도를 포함하는, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 민감제는 소포제인, 방법.

청구항 14

제11항 또는 제12항에 있어서, 상기 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루에 40% 미만의 비세포 사멸률을 가져올 것으로 예측되는 조건을 사용하여 상기 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 15

제11항 또는 제12항에 있어서, 상기 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 150 nU/세포/일 미만의 세포 비 LDH 생산량을 가져올 것으로 예측되는 조건을 사용하여 상기 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 16

제11항 또는 제12항에 있어서, 상기 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루에 1% 초과인 겔보기 성장률을 가져올 것으로 예측되는 조건을 사용하여 상기 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 17

제11항 또는 제12항에 있어서, 상기 시험 배양 용기는 배플형 진탕 플라스크이고, 상기 복수의 시험 조건은 다음 중 하나 이상을 포함하는 것인, 방법:

- (a) 125 RPM 내지 400 RPM의 회전 교반;
- (b) 0 ppm 내지 120 ppm의 민감제 농도; 및
- (c) 1 g/L 내지 10 g/L인 보호제 농도.

청구항 18

제12항에 있어서, 상기 보호제는 폴록사머, 폴록사민, 또는 플루로닉 폴리올인, 방법.

청구항 19

생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 방법으로서, 다음 조건 중 하나 이상 하에서 액체 배양 배지에서 세포를 배양하는 단계를 포함하고,

- a) 상기 생산용 생물 반응기의 $P/V(kW/m^3)$ 가 1.0 내지 110인 조건;
- b) 상기 생산용 생물 반응기의 분당 액체 부피당 공기 부피(VVM)(min^{-1})가 0.01 내지 0.10인 조건;
- c) 상기 배지가 0 ppm 내지 5000 ppm의 농도를 갖는 민감제를 포함하는 조건; 및
- d) 상기 액체 배양 배지가 1 g/L 내지 15 g/L의 농도를 갖는 보호제를 포함하는 조건,

여기서 상기 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 것은

상기 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루에 40% 미만의 비세포 사멸률;

상기 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 150 nU/세포/일 미만의 세포 비LDH 생산량; 또는

상기 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루에 1% 초과인 겔보기 성장률을 가져오는 것인, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 민감제는 소포제이고/이거나;

상기 보호제는 폴록사머, 폴록사민, 또는 플루로닉 폴리올인, 방법.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

- 청구항 25
- 삭제
- 청구항 26
- 삭제
- 청구항 27
- 삭제
- 청구항 28
- 삭제
- 청구항 29
- 삭제
- 청구항 30
- 삭제
- 청구항 31
- 삭제
- 청구항 32
- 삭제
- 청구항 33
- 삭제
- 청구항 34
- 삭제
- 청구항 35
- 삭제
- 청구항 36
- 삭제
- 청구항 37
- 삭제
- 청구항 38
- 삭제
- 청구항 39
- 삭제
- 청구항 40
- 삭제

- 청구항 41
- 삭제
- 청구항 42
- 삭제
- 청구항 43
- 삭제
- 청구항 44
- 삭제
- 청구항 45
- 삭제
- 청구항 46
- 삭제
- 청구항 47
- 삭제
- 청구항 48
- 삭제
- 청구항 49
- 삭제
- 청구항 50
- 삭제
- 청구항 51
- 삭제
- 청구항 52
- 삭제
- 청구항 53
- 삭제
- 청구항 54
- 삭제
- 청구항 55
- 삭제
- 청구항 56
- 삭제

- 청구항 57
- 삭제
- 청구항 58
- 삭제
- 청구항 59
- 삭제
- 청구항 60
- 삭제
- 청구항 61
- 삭제
- 청구항 62
- 삭제
- 청구항 63
- 삭제
- 청구항 64
- 삭제
- 청구항 65
- 삭제
- 청구항 66
- 삭제
- 청구항 67
- 삭제
- 청구항 68
- 삭제
- 청구항 69
- 삭제
- 청구항 70
- 삭제
- 청구항 71
- 삭제
- 청구항 72
- 삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2018년 3월 16일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 62/644,339 및 2018년 3월 20일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 62/645,755에 대해 우선권을 주장하며, 이들 출원 각각의 전체 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0003] 본 개시는 생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력을 개선하는 방법, 및 생물 공학 및 세포 생물학 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0004] 공정 강화는 재조합 치료 단백질의 생산에 많은 장점을 제공한다. 공정 강화를 위한 전략 중 하나는 재조합 단백질 생산을 개선하기 위해 높은 세포 밀도를 유지하는 것으로, 이는 높은 산소 요구량을 추가로 필요로 한다. 생산용 생물 반응기에서의 산소 주입(sparge)은 생산용 생물 반응기에서의 포우밍(foaming)을 가져온다. 포우밍은 종종 강화된 유가식(fed-batch) 및 관류 공정 모두에서 일어난다. 따라서, 소포제가 일반적으로 이들 공정에 첨가된다. 그러나, 소포제의 첨가 및 축적은 세포가 전단(shear)에 민감해지게 하여, 증가된 세포 사멸을 가져올 수 있다.

[0005] 따라서, 다양한 세포 배양 매개 변수, 예를 들어, 전단, 배지 성분 및 첨가제, 및 소포제 농도 간에 생산용 생물 반응기에서 허용 가능한 세포 배양 조건을 특성화하기 위한 모델을 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

[0006] 본 발명은, 예를 들어, 시험 배양 용기(예를 들어, 배플형(baffled) 진탕 플라스크)에서 얻은 데이터를 활용하는 현재 청구된 방법이 생물 반응기에서의 세포 생존력에 대한 민감제 농도의 효과를 정확하게 예측하고, 생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력에 최적의 조건을 정확하게 선택하고, 생물 반응기에서의 세포 생존력을 예측하고, 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 데 사용될 수 있는 일련의 조건을 정확하게 확인하는 데 사용될 수 있다는 발견에 기초한다.

[0007] 일 양태에서, 본 개시는 생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력에 대한 민감제 농도의 효과를 예측하는 방법에 관한 것이다. 방법은 (a) 시험 배양 용기에서 복수의 시험 조건 하에서 세포 생존력을 결정하는 단계로서, 복수의 시험 조건은 일련의 매개 변수에 의해 규정되는, 단계; 및 (b) 복수의 조건 하의 시험 배양 용기에서의 세포 생존력에 기초하여, 생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력에 대한 민감제 농도의 효과를 예측하는 단계를 포함

한다.

- [0008] 일부 구현예에서, 일련의 매개 변수는 진단 능력, 민감제 농도, 및 보호제 농도를 포함한다.
- [0009] 일부 구현예에서, 복수의 시험 조건은 완전 요인 스크리닝(full factorial screening) 및/또는 내접 중심 합성 설계(inscribed center composite design)에 기초하여 선택된다.
- [0010] 일부 구현예에서, 민감제는 소포제이다.
- [0011] 일부 구현예에서, 소포제는 폴리디메틸실록산-기반 소포제 또는 시메티콘(simethicone)이다.
- [0012] 일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 부피가 약 5 mL 내지 약 5 L이거나, 부피가 약 10 mL 내지 약 500 mL이다. 일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 배플형 진탕 플라스크이다.
- [0013] 일부 구현예에서, 생산용 생물 반응기는 부피가 약 5 L 내지 약 20,000 L이거나, 부피가 약 50 L 내지 약 10,000 L이다. 일부 구현예에서, 생산용 생물 반응기는 관류 생물 반응기 또는 유가식 생물 반응기이다.
- [0014] 일부 구현예에서, 방법은 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루에 40% 미만의 비세포 사멸률(specific cell death rate)을 가질 것으로 예측되는 민감제 농도를 사용하여 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0015] 일부 구현예에서, 방법은 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루에 20% 미만의 비세포 사멸률을 갖는 것으로 예측되는 민감제 농도를 사용하여 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0016] 일부 구현예에서, 방법은 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 150 nU 미만/세포/일의 세포 비LDH 생산량(specific LDH production)을 가져올 것으로 예측되는 민감제 농도를 사용하여 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0017] 일부 구현예에서, 방법은 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 100 nU 미만/세포/일의 세포 비LDH 생산량을 가져올 것으로 예측되는 민감제 농도를 사용하여 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0018] 일부 구현예에서, 방법은 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루에 1% 초과와 겔보기 성장률을 가져올 것으로 예측되는 민감제 농도를 사용하여 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0019] 일부 구현예에서, 방법은 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루에 5% 초과와 겔보기 성장률을 가져올 것으로 예측되는 민감제 농도를 사용하여 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0020] 일부 구현예에서, 세포는 재조합 치료 단백질을 인코딩하는 핵산을 함유한다.
- [0021] 일부 구현예에서, 방법은 재조합 치료 단백질을 수집하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 재조합 치료 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 정제된 재조합 치료 단백질을 제형화하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0022] 일부 구현예에서, 세포는 박테리아, 효모, 또는 포유 동물 세포이다.
- [0023] 일부 구현예에서, 세포 생존력은 시험 배양 용기에서 젯산 탈수소효소(LDH)의 농도를 측정함으로써 결정된다.
- [0024] 일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 배플형 진탕 플라스크이고, 복수의 시험 조건은 다음 중 하나 이상을 포함한다:
- [0025] (a) 약 125 RPM 내지 약 400 RPM의 회전 교반;
- [0026] (b) 약 0 ppm 내지 약 5000 ppm의 민감제 농도; 및
- [0027] (c) 약 1 g/L 내지 약 10 g/L인 보호제 농도.
- [0028] 일부 구현예에서, 보호제는 폴록사머, 폴록사민, 또는 플루로닉 폴리올이다.
- [0029] 일부 구현예에서, 폴록사머는 폴록사머-188, 폴록사머-401, 폴록사머-402, 또는 폴록사머-407이다.
- [0030] 일부 구현예에서, 폴록사민은 폴록사민-904 또는 폴록사민-908이다.
- [0031] 또 다른 양태에서, 본 개시는 생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력을 개선하는 방법에 관한 것이다. 방법은,

- [0032] (a) 시험 배양 용기에서 복수의 시험 조건 하에서 세포 생존력을 결정하는 단계로서, 복수의 조건은 일련의 매개 변수에 의해 규정되는, 단계;
- [0033] (b) 복수의 조건 하의 시험 배양 용기에서의 세포 생존력에 기초하여, 생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력에 최적의 조건을 선택하는 단계; 및
- [0034] (c) 선택된 조건 하에서 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 단계를 포함한다.
- [0035] 일부 구현예에서, 일련의 매개 변수는 진단 응력, 민감제 농도, 및 보호제 농도를 포함한다.
- [0036] 일부 구현예에서, 복수의 시험 조건은 완전 요인 스크리닝 및/또는 내접 중심 합성 설계에 기초하여 선택된다.
- [0037] 일부 구현예에서, 민감제는 소포제이다. 일부 구현예에서, 소포제는 폴리디메틸실록산-기반 소포제 또는 시메티콘이다.
- [0038] 일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 부피가 약 5 mL 내지 약 5 L이다.
- [0039] 일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 부피가 약 10 mL 내지 약 500 mL이다. 일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 배플형 진탕 플라스크이다.
- [0040] 일부 구현예에서, 생산용 생물 반응기는 부피가 약 5 L 내지 약 20,000 L이다. 일부 구현예에서, 생산용 생물 반응기는 부피가 약 50 L 내지 약 10,000 L이다. 일부 구현예에서, 생산용 생물 반응기는 관류 생물 반응기 또는 유가식 생물 반응기이다.
- [0041] 일부 구현예에서, 단계 (c)는 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루에 40% 미만의 비세포 사멸물을 가져온다. 일부 구현예에서, 단계 (c)는 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루에 20% 미만의 비세포 사멸물을 가져온다. 일부 구현예에서, 단계 (c)는 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 150 nU 미만/세포/일의 세포 비LDH 생산량을 가져온다. 일부 구현예에서, 단계 (c)는 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 100 nU 미만/세포/일의 세포 비LDH 생산량을 가져온다. 일부 구현예에서, 단계 (c)는 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루에 1% 초과와 걸보기 성장률을 가져온다. 일부 구현예에서, 단계 (c)는 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루에 5% 초과와 걸보기 성장률을 가져온다.
- [0042] 일부 구현예에서, 세포는 재조합 치료 단백질을 인코딩하는 핵산을 함유한다.
- [0043] 일부 구현예에서, 방법은 재조합 치료 단백질을 수집하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 재조합 치료 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 정제된 재조합 치료 단백질을 제형화하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0044] 일부 구현예에서, 세포는 박테리아, 효모, 또는 포유 동물 세포이다. 일부 구현예에서, 세포 생존력은 시험 배양 용기에서 젖산 탈수소효소(LDH)의 농도를 측정함으로써 결정된다.
- [0045] 일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 배플형 진탕 플라스크이고, 복수의 시험 조건은 다음 중 하나 이상을 포함한다:
- [0046] (a) 약 125 RPM 내지 약 400 RPM의 회전 교반;
- [0047] (b) 약 0 ppm 내지 약 5000 ppm의 민감제 농도; 및
- [0048] (c) 약 1 g/L 내지 약 10 g/L인 보호제 농도.
- [0049] 일부 구현예에서, 보호제는 폴록사머, 폴록사민, 또는 플루로닉 폴리올이다. 일부 구현예에서, 폴록사머는 폴록사머-188, 폴록사머-401, 폴록사머-402, 또는 폴록사머-407이다. 일부 구현예에서, 폴록사민은 폴록사민-904 또는 폴록사민-908이다.
- [0050] 또 다른 양태에서, 본 개시는 생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력을 예측하는 방법에 관한 것이다. 방법은,
- [0051] (a) 적어도 2개의 매개 변수를 포함하는 일련의 매개 변수를 선택하는 단계;
- [0052] (b) 시험 배양 용기에서 일련의 매개 변수에 의해 규정된 바와 같은 복수의 시험 조건 하에서 세포 생존력을 결정하는 단계; 및
- [0053] (c) 복수의 조건 하의 시험 배양 용기에서의 세포 생존력에 기초하여, 생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력 예측하는 단계를 포함한다.

- [0054] 일부 구현예에서, 일련의 매개 변수는 진단 능력, 민감제 농도, 및 보호제 농도를 포함한다.
- [0055] 일부 구현예에서, 복수의 시험 조건은 완전 요인 스크리닝 및/또는 내접 중심 합성 설계에 기초하여 선택된다.
- [0056] 일부 구현예에서, 민감제는 소포제이다.
- [0057] 일부 구현예에서, 소포제는 폴리디메틸실록산-기반 소포제이다. 일부 구현예에서, 소포제는 시메티콘이다.
- [0058] 일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 부피가 약 5 mL 내지 약 5 L이다.
- [0059] 일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 부피가 약 10 mL 내지 약 500 mL이다.
- [0060] 일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 배플형 진탕 플라스크이다.
- [0061] 일부 구현예에서, 생산용 생물 반응기는 부피가 약 5 L 내지 약 20,000 L이거나, 부피가 약 50 L 내지 약 10,000 L이다.
- [0062] 일부 구현예에서, 생산용 생물 반응기는 관류 생물 반응기 또는 유가식 생물 반응기이다.
- [0063] 일부 구현예에서, 방법은 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루에 40% 미만의 비세포 사멸물을 가져올 것으로 예측되는 조건을 사용하여 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0064] 일부 구현예에서, 방법은 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루에 20% 미만의 비세포 사멸물을 가져올 것으로 예측되는 조건을 사용하여 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0065] 일부 구현예에서, 방법은 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 150 nU 미만/세포/일의 세포 비LDH 생산량을 가져올 것으로 예측되는 조건을 사용하여 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0066] 일부 구현예에서, 방법은 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 100 nU 미만/세포/일의 세포 비LDH 생산량을 가져올 것으로 예측되는 조건을 사용하여 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0067] 일부 구현예에서, 방법은 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루에 1% 초과와 걸보기 성장물을 가져올 것으로 예측되는 조건을 사용하여 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0068] 일부 구현예에서, 방법은 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루에 5% 초과와 걸보기 성장물을 가져올 것으로 예측되는 조건을 사용하여 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0069] 일부 구현예에서, 세포는 재조합 치료 단백질을 인코딩하는 핵산을 함유한다.
- [0070] 일부 구현예에서, 방법은 재조합 치료 단백질을 수집하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 재조합 치료 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 정제된 재조합 치료 단백질을 제형화하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0071] 일부 구현예에서, 세포는 박테리아, 효모, 또는 포유 동물 세포이다.
- [0072] 일부 구현예에서, 세포 생존력은 시험 배양 용기에서 젖산 탈수소효소(LDH)의 농도를 측정함으로써 결정된다.
- [0073] 일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 배플형 진탕 플라스크이고, 복수의 시험 조건은 다음 중 하나 이상을 포함한다:
- [0074] (a) 약 125 RPM 내지 약 400 RPM의 회전 교반;
- [0075] (b) 약 0 ppm 내지 약 5000 ppm의 민감제 농도; 및
- [0076] (c) 약 1 g/L 내지 약 10 g/L인 보호제 농도.
- [0077] 일부 구현예에서, 보호제는 폴록사머, 폴록사민, 또는 플루로닉 폴리올이다. 일부 구현예에서, 폴록사머는 폴록사머-188, 폴록사머-401, 폴록사머-402, 또는 폴록사머-407이다. 일부 구현예에서, 폴록사민은 폴록사민-904 또는 폴록사민-908이다.
- [0078] 또 다른 양태에서, 본 개시는 또한 다음 조건 중 하나 이상 하에서 액체 배양 배지에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 방법을 제공한다:
- [0079] a) 생산용 생물 반응기의 P/V(W/m³)가 약 1.0 내지 약 110.0(예를 들어, 약 10.0 내지 약 100.0, 약 20.0 내지

약 80.0, 약 40.0 내지 약 60.0, 또는 약 6.0)인 조건;

- [0080] b) 생산용 생물 반응기의 분당 액체 부피당 공기 부피(VVM)(min^{-1})가 약 0.01 내지 약 0.10(예를 들어, 약 0.02 내지 약 0.08, 약 0.04 내지 약 0.06, 또는 약 0.06)인 조건;
- [0081] c) 배지가 약 0 ppm 내지 약 5000 ppm(예를 들어, 약 50 ppm 내지 약 4000 ppm, 약 1000 ppm 내지 약 2000 ppm, 또는 약 100 ppm)의 농도를 갖는 민감제를 포함하는 조건; 및
- [0082] d) 액체 배양 배지가 약 1 g/L 내지 약 15 g/L(예를 들어, 약 2 g/L 내지 약 10 g/L, 약 3 g/L 내지 약 7 g/L, 약 4 g/L 내지 약 6 g/L, 또는 약 5 g/L)의 농도를 갖는 보호제를 포함하는 조건.
- [0083] 일부 구현예에서, 민감제는 소포제이다.
- [0084] 일부 구현예에서, 소포제는 폴리디메틸실록산-기반 소포제이다. 일부 구현예에서, 소포제는 시메티콘이다.
- [0085] 일부 구현예에서, 보호제는 폴록사머, 폴록사민, 또는 플루로닉 폴리올이다.
- [0086] 일부 구현예에서, 폴록사머는 폴록사머-188, 폴록사머-401, 폴록사머-402, 또는 폴록사머-407이다. 일부 구현예에서, 폴록사민은 폴록사민-904 또는 폴록사민-908이다.
- [0087] 일부 구현예에서, 생산용 생물 반응기는 부피가 약 5 L 내지 약 20,000 L이다. 일부 구현예에서, 생산용 생물 반응기는 부피가 약 50 L 내지 약 10,000 L이다. 일부 구현예에서, 생산용 생물 반응기는 관류 생물 반응기 또는 유가식 생물 반응기이다.
- [0088] 일부 구현예에서, 방법은 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루에 40% 미만의 비세포 사멸률을 가져온다. 일부 구현예에서, 방법은 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루에 20% 미만의 비세포 사멸률을 가져온다. 일부 구현예에서, 방법은 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 150 nU 미만/세포/일의 세포 비LDH 생산량을 가져온다. 일부 구현예에서, 방법은 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 100 nU 미만/세포/일의 세포 비LDH 생산량을 가져온다. 일부 구현예에서, 방법은 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루에 1% 초과와 걸보기 성장률을 가져온다. 일부 구현예에서, 방법은 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루에 5% 초과와 걸보기 성장률을 가져온다.
- [0089] 일부 구현예에서, 세포는 재조합 치료 단백질을 인코딩하는 핵산을 함유한다.
- [0090] 일부 구현예에서, 방법은 재조합 치료 단백질을 수집하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 재조합 치료 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 정제된 재조합 치료 단백질을 제형화하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0091] 일부 구현예에서, 세포는 박테리아, 효모, 또는 포유 동물 세포이다. 일부 구현예에서, 세포 생존력은 시험 배양 용기에서 젓산 탈수소효소(LDH)의 농도를 측정함으로써 결정된다.
- [0092] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 단수 형태의 명사는 그 특정 명사가 하나 이상임을 나타낸다. 예를 들어, "세포"라는 어구는 "하나 이상의 세포"를 나타낸다.
- [0093] 용어 "보호제"는 용기(예를 들어, 시험 배양 용기 또는 생산용 생물 반응기)에서의 배양 동안 진단 능력에 대한 세포의 민감도(예를 들어, 포유 동물 세포의 민감도)를 감소시키는 제제를 의미한다. 보호제의 비제한적 예에는, 예를 들어, 폴록사머(예를 들어, 폴록사머-188, 폴록사머-401, 폴록사머-402, 및 폴록사머-407), 폴록사민(예를 들어, 폴록사민-904 또는 폴록사민-908), 및 플루로닉 폴리올이 포함된다. 보호제의 추가의 예가 본 명세서에 기재되어 있으며 당업계에 알려져 있다.
- [0094] 용어 "민감제"는, 용기(예를 들어, 시험 배양 용기 또는 생산용 생물 반응기)에서의 배양 동안 진단 능력에 대한 세포의 민감도를 증가시키는, 세포 배양물(예를 들어, 포유 동물 세포 배양물)의 액체 배양 배지에 첨가되고/첨가되거나 그에 존재하는 제제를 의미한다. 민감제의 비제한적 예에는 소포제(예를 들어, 폴리디메틸실록산-기반 소포제 또는 시메티콘)이 포함된다. 민감제의 추가의 예가 본 명세서에 기재되어 있으며 당업계에 알려져 있다.
- [0095] 용어 "포유 동물 세포"는 임의의 포유 동물(예를 들어, 인간, 햄스터, 마우스, 녹색 원숭이, 래트, 돼지, 소, 또는 토끼)로부터의 또는 그로부터 유래된 임의의 세포를 의미한다. 예를 들어, 포유 동물 세포는 불멸화된 세포일 수 있다. 일부 구현예에서, 포유 동물 세포는 분화된 세포이다. 일부 구현예에서, 포유 동물 세포는 미분화 세포이다. 포유 동물 세포의 비제한적 예가 본 명세서에 기재되어 있다. 포유 동물 세포의 추가의 예가 당업

계에 알려져 있다.

- [0096] 용어 "배양" 또는 "세포 배양"은 제어된 일련의 물리적 조건 하에서의 포유 동물 세포의 유지 또는 증식을 의미한다.
- [0097] 용어 "세포의 배양" 또는 "세포 배양"은 제어된 일련의 물리적 조건 하에서 유지되거나 증식되는 복수의 세포를 함유하는 액체 배양 배지를 의미한다.
- [0098] 용어 "액체 배양 배지"는 세포(예를 들어, 포유 동물 세포)가 시험관 내에서 성장하거나 증식할 수 있도록 충분한 영양분을 함유하는 유체를 의미한다. 예를 들어, 액체 배양 배지는 다음 중 하나 이상을 함유할 수 있다: 아미노산(예를 들어, 20개 아미노산), 퓨린(예를 들어, 하이포크산틴), 피리미딘(예를 들어, 티미딘), 콜린, 이노시톨, 티아민, 엽산, 바이오틴, 칼슘, 나이아신아미드, 피리독신, 리보플라빈, 티미딘, 시아노코발라민, 피루베이트, 리포산, 마그네슘, 포도당, 나트륨, 칼륨, 철, 구리, 아연, 및 중탄산나트륨. 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 포유 동물의 혈청을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 혈청 또는 포유 동물로부터의 다른 추출물을 함유하지 않는다(규정된 액체 배양 배지). 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 미량 금속, 포유 동물 성장 호르몬, 및/또는 포유 동물 성장 인자를 함유할 수 있다. 액체 배양 배지의 또 다른 예는 최소 배지(예를 들어, 무기 염, 탄소원, 및 물만을 함유하는 배지)이다. 액체 배양 배지의 비제한적 예가 본 명세서에 기재되어 있다. 액체 배양 배지의 추가의 예는 당업계에 알려져 있으며 상업적으로 이용 가능하다. 액체 배양 배지는 임의의 밀도의 포유 동물 세포를 함유할 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 생물 반응기로부터 제거된 액체 배양 배지의 부피에는 포유 동물 세포가 실질적으로 없을 수 있다.
- [0099] 용어 "동물 유래 성분이 없는 액체 배양 배지"는 포유 동물로부터 유래된 임의의 성분(예를 들어, 단백질 또는 혈청)을 함유하지 않는 액체 배양 배지를 의미한다.
- [0100] 용어 "무혈청 액체 배양 배지"는 포유 동물 혈청을 함유하지 않는 액체 배양 배지를 의미한다.
- [0101] 용어 "혈청 함유 액체 배양 배지"는 포유 동물 혈청을 함유하는 액체 배양 배지를 의미한다.
- [0102] 용어 "화학적으로 규정된 액체 배양 배지"는 당업계의 용어로서, 모든 화학적 성분이 알려져 있는 액체 배양 배지를 의미한다. 예를 들어, 화학적으로 규정된 액체 배양 배지는 소 태아 혈청, 소 혈청 알부민, 또는 인간 혈청 알부민을 함유하지 않으며, 이는 이러한 제조물이 전형적으로 알부민과 지질의 복합 믹스(complex mix)를 함유하기 때문이다.
- [0103] 용어 "무단백질 액체 배양 배지"는 임의의 단백질(예를 들어, 임의의 검출 가능한 단백질)을 함유하지 않는 액체 배양 배지를 의미한다.
- [0104] 용어 "관류 생물 반응기"는 제1 액체 배양 배지에 복수의 세포(예를 들어, 포유 동물 세포)를 함유하는 생물 반응기를 의미하며, 여기서 생물 반응기에 존재하는 세포의 배양은 제1 액체 배양 배지의 주기적 또는 연속적 제거, 및 그와 동시에 또는 그 직후에 이루어지는 생물 반응기로의 실질적으로 동일한 부피의 제2 액체 배양 배지의 첨가를 포함한다. 일부 예에서, 제2 액체 배양 배지는 제1 액체 배양 배지와 동일할 수 있다. 일부 예에서, 배양 기간(예를 들어, 일일 단위의 배양 배지 제공급 속도) 동안 증분 기간(예를 들어, 약 24시간의 기간, 약 1분 내지 약 24시간의 기간, 또는 24시간 초과와 기간)에 걸쳐 제거되고 첨가되는 제1 액체 배양 배지 부피의 증분 변화(예를 들어, 증가 또는 감소)가 존재한다. 매일 제거되고 교체되는 배지의 분율은 배양되는 특정 세포, 초기 시딩(seeding) 밀도, 및 특정 시간에서의 세포 밀도에 따라 달라질 수 있다. "RV" 또는 "반응기 부피"는 배양 공정의 시작 시 존재하는 배양 배지의 부피(예를 들어, 시딩 후 존재하는 배양 배지의 총 부피)를 의미한다.
- [0105] 용어 "유가식 생물 반응기"는 당업계의 용어로서, 제1 액체 배양 배지에 복수의 세포(예를 들어, 포유 동물 세포)를 함유하는 생물 반응기를 의미하며, 여기서 생물 반응기에 존재하는 세포의 배양은 제1 액체 배양 배지로의 제2 액체 배양 배지의 주기적 또는 연속적 첨가를 포함하고 이는 세포 배양물로부터의 제1 액체 배양 배지 또는 제2 액체 배양 배지의 실질적 또는 상당한 제거없이 이루어진다. 제2 액체 배양 배지는 제1 액체 배양 배지와 동일할 수 있다. 유가식 배양의 일부 예에서, 제2 액체 배양 배지는 농축된 형태의 제1 액체 배양 배지이다. 유가식 배양의 일부 예에서, 제2 액체 배양 배지는 건조 분말로서 첨가된다. 유가식 배양의 일부 예에서, 제2 액체 배양 배지는 제1 액체 배양 배지와 비교하여 완전히 다른 제형이다.
- [0106] 용어 "농축 유가식 생물 반응기"는 당업계의 용어로서, 제1 액체 배양 배지에 복수의 세포(예를 들어, 포유 동물 세포)를 함유하는 생물 반응기를 의미하며, 여기서 생물 반응기에 존재하는 세포의 배양은 제1 액체 배양 배

지로의 제2 액체 배양 배지의 주기적 또는 연속적 첨가를 포함하고 이는 생물 반응기로부터 생성물을 제거하지는 않지만 세포 배양물로부터의 제1 액체 배양 배지 또는 제2 액체 배양 배지의 실질적 또는 상당한 제거와 함께 이루어진다. 제2 액체 배양 배지는 제1 액체 배양 배지와 동일할 수 있다. 농축 유가식 배양의 일부 예에서, 제2 액체 배양 배지는 농축된 형태의 제1 액체 배양 배지이다. 농축 유가식 배양의 일부 예에서, 제2 액체 배양 배지는 건조 분말로서 첨가된다. 농축 유가식 배양의 일부 예에서, 제2 액체 배양 배지는 제1 액체 배양 배지와 완전히 다른 제형이다.

[0107] "회전 교반"은 당업계에 잘 알려진 용어로서, 예를 들어, 진탕 플라스크를 일반적으로 원형 방식, 예를 들어, 시계 방향 또는 시계 반대 방향으로 움직여서, 예를 들어, 그 안에 함유된 액체 배양 배지 중의 용존 O₂ 농도를 증가시키는 것을 지칭한다. 교반은 임의의 당업계에 알려진 방법, 예를 들어, 회전 진탕기와 같은 원형 또는 타원형 운동으로 진탕 플라스크를 움직이는 기구를 사용하여 수행될 수 있다. 회전 교반을 수행하기 위해 사용될 수 있는 예시적인 장치가 본 명세서에 기재되어 있다. 그러한 장치의 추가의 예가 또한 당업계에 알려져 있으며 상업적으로 이용 가능하다.

[0108] 용어 "진탕 플라스크"는, 적어도 하나의 기체 투과성 표면(예를 들어, 멸균 장벽으로도 작용할 수 있는 기체 투과성 요소에 있는 단부, 예를 들어, 막) 및/또는 적어도 하나의 통기 캡을 가지며, 그의 형상의 적어도 일부가 대략 절두 원추형인, 일정 부피의 액체 배양 배지를 보유할 수 있는 용기(예를 들어, 멸균 용기)를 의미한다. 예를 들어, 진탕 플라스크는 배플형 진탕 플라스크 또는 삼각 플라스크, 또는 이의 임의의 당업계에서 인정되는 변형된 버전일 수 있다.

[0109] 용어 "생산용 생물 반응기"는 당업계의 용어로서, 대규모(예를 들어, 내부 부피가 5 L, 1,000 L, 5,000 L, 10,000 L, 20,000 L, 50,000 L 또는 100,000 L 이상인) 생물 반응기를 의미한다. 예를 들어, 생산용 생물 반응기는 관류 생물 반응기일 수 있다.

[0110] 용어 "시험 배양 용기"는 당업계의 용어로서, 부피가 약 2 mL 내지 약 500 mL인 (예를 들어, 생산용 생물 반응기에 비해) 소규모 생물 반응기를 의미한다. 일부 예에서, 시험 배양 용기의 높이와 폭 비는 본 명세서에 기술된 방법에서의 생산용 생물 반응기의 높이와 폭 비에 거의 상응한다. 일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 진탕 플라스크(예를 들어, 배플형 진탕 플라스크)이다. 시험 배양 용기의 추가의 예가 본 명세서에 기재되어 있으며 당업계에 알려져 있다.

[0111] 용어 "회분식(batch) 배양"은 당업계의 용어로서, 액체 배양 배지에 복수의 세포(예를 들어, 포유 동물 세포)를 함유하는 용기(예를 들어, 생물 반응기)를 의미하며, 여기서 용기(생물 반응기)에 존재하는 세포의 배양은 세포 배양물로의 실질적 또는 상당한 양의 새로운 액체 배양 배지의 첨가를 포함하지 않고 배양 동안 세포 배양물로부터의 실질적 또는 상당한 양의 액체 배양 배지의 제거를 포함하지 않는다.

[0112] 용어 "유가식 배양"은 당업계의 용어로서, 액체 배양 배지에 복수의 세포(예를 들어, 포유 동물 세포)를 함유하는 용기(예를 들어, 생산용 생물 반응기)를 의미하며, 여기서 용기(예를 들어, 생산용 생물 반응기)에 존재하는 세포의 배양은 배양 동안 용기로부터의 액체 배양 배지의 실질적 또는 상당한 제거없이 용기로의 새로운 액체 배양 배지의 주기적 또는 연속적 첨가를 포함한다. 새로운 액체 배양 배지는 배양 시작 시 용기에 존재하는 액체 배양 배지와 동일할 수 있다. 유가식 배양의 일부 예에서, 새로운 액체 배양 배지는 배양 시작 시 용기에 존재하는 농축된 형태의 액체 배양 배지이다. 유가식 배양의 일부 예에서, 새로운 배양 배지는 건조 분말로서 첨가된다. 유가식 배양의 일부 예에서, 새로운 배양 배지는 배양 시작 시 용기에 존재하는 액체 배양 배지와 비교하여 완전히 다른 제형이다.

[0113] 본 명세서에 설명된 방법은 몇 가지 장점을 제공한다. 예를 들어, 다양한 규모를 정렬하고, Δ매개 변수를 예측하며, 기존 설계 공간을 최적화할 수 있다. 또한, 규모에 걸친 성능의 예측 가능성/정렬을 높이고, 더 대표적인 소규모 모델을 생성하고, 공정 견고성을 높이고, 공정 강화를 위한 진단 저항력을 개선하고, 다양한 진단 프로파일에 걸쳐 민감제 및 보호제 추가에 대한 지침을 제공할 수 있다(도 12).

[0114] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용되는 모든 기술적 및 학술적 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본 발명에서 사용하기 위한 방법 및 재료가 본 명세서에 기재되어 있지만, 당업계에 알려진 다른 적합한 방법 및 재료가 또한 사용될 수 있다. 재료, 방법, 및 예는 예시일 뿐이며 제한하고자 하는 것이 아니다. 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허, 서열, 데이터베이스 항목, 및 기타 참고 문헌은 그 전체가 참고로 포함된다. 상충되는 경우, 정의는 비롯한 본 명세서가 우선한다.

[0115] 본 발명의 다른 특징 및 장점은 하기 상세한 설명 및 도면, 및 청구범위로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0116] 도 1은 세포 배양 배지 중의 기포가 어떻게 세포 사멸을 유발할 수 있는지를 보여주는 다이어그램이다.

도 2는 소포제(예시적인 민감제)의 첨가가 작업 조건을 허용 가능한 작업 공간 밖으로 이동시킬 수 있음을 나타내는 다이어그램이다.

도 3은 특정 젖산 탈수소효소(LDH) 생산과 세포 사멸률 간의 관계를 보여주는 다이어그램이다.

도 4는 보호제, 민감제, 및 회전 교반 사이의 관계, 및 세포 배양물에서 비LDH 생산량에 대한 보호제, 민감제, 및 교반의 영향을 보여주는 다이어그램이다.

도 5는 비LDH 생산량이 민감제 농도, 보호제 농도, 및 회전 교반(전단 응력)의 결과임을 보여주는 다이어그램이다.

도 6은 민감제 농도, 보호제 농도, 및 회전 교반(전단 응력)의 3가지 선택된 매개 변수에 대한 완전 요인 설계를 도시한다. 상단 패널은 완전 요인 설계(2³)를 보여주며, 여기서 반응은 비LDH 생산량(사멸률)이고, 요인은 전단, 보호제 농도, 및 민감제 농도이다. 중간 패널은 실패가 극단적인 값을 가져왔고, 실패 지점 대 나머지 데이터 사이에 큰 범위가 있고, 실패 지점을 모델링하기가 어렵고, 극단적인 값이 제외됨(작업 불가능 영역)을 보여준다. 하단 패널은 중심점이 불량하게 예측됨을 보여준다(곡률의 표시, 반응은 비선형일 가능성이 있고, RPM 증가는 선형적으로 확장되지 않음).

도 7은 민감제 농도, 보호제 농도, 및 회전 교반(전단 응력)의 선택된 매개 변수에 대한 내접 중심 합성 설계와 결합된 완전 요인 설계를 보여주는 다이어그램이다.

도 8은 내접 중심 합성 설계와 결합된 완전 요인 설계의 장점을 보여주는 다이어그램이다.

도 9는 본 명세서에 기술된 방법이 성능 불량 영역(밝은 음영) 및 작업 실패 영역(어두운 음영)을 확인하는 데 사용될 수 있음을 나타내는 다이어그램이다.

도 10은 비LDH 생산량을 통해 규모에 걸쳐 전단 응력을 정규화하는 방법 및 매개 변수 변경(Δ매개 변수)의 효과를 예측하는 방법을 나타내는 다이어그램이다.

도 11은 본 명세서에 기재된 모델이 생산용 생물 반응기의 작업 조건을 최적화하기 위해 어떻게 사용될 수 있는지를 나타내는 다이어그램이다. 데이터는 작업 조건(열린 사각형으로 채워진 직사각형)이 현재 작동하고 있지만, 추가로 최적화될 수 있음을 보여준다(큰 화살표 오른쪽에 있는 밝은 음영의 사각형)(예를 들어, 공정에서 민감제 저항력의 농도 범위를 증가시키고 용기 포움 아웃(foam out)에 대한 탄력성을 개선함).

도 12에는 본 명세서에 기재된 모델의 기능 및 유용성이 나열되어 있다. 모델은 다양한 규모를 정렬하고, 매개 변수의 변경을 예측하고, 기존 설계 공간을 최적화할 수 있다. 모델은 또한 규모에 걸친 성능의 예측 가능성/정렬의 증가를 제공한다(예를 들어, 더 대표적인 소규모 모델을 생성하고 전통적인 방법론을 기반으로 규모에 따른 전단의 이해를 증대시킴). 모델은 또한 증가된 공정 견고성을 제공한다(예를 들어, 공정 강화에 대한 개선된 전단 저항력, 및 다양한 전단 프로파일에 걸친 민감제 농도 및 보호제 첨가 농도에 대한 개선된 지침).

도 13a는 시험된 벤치탑(benchtop) 용기에서 관찰된 비LDH 생산량 값을 예측된 비LDH 생산량 값과 비교하는 그래프이다.

도 13b는 실시예 2에 기재된 실험으로부터의 데이터를 도시한다.

도 13c에는 관찰된 비LDH 생산량 값이 예측된 값과 함께 나열되어 있다.

도 14는 비LDH 생산량에 대한 소포제의 관찰된 효과와 비LDH 생산량에 대한 소포제의 예측된 효과를 비교한다.

도 15a는 시험된 생산용 생물 반응기에서 관찰된 비LDH 생산량 값을 예측된 값과 비교하는 그래프이다.

도 15b에는 시험된 생산용 생물 반응기에서 관찰된 비LDH 생산량 값이 예측된 값과 함께 나열되어 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0117] 본 개시는 단백질 또는 폴리펩티드의 생산을 위한 공정 강화를 최적화하는 방법에 관한 것이다. 일 양태에서,

본 개시는 다양한 작업 매개 변수, 예를 들어, 보호제(예를 들어, 폴록사머-188) 농도, 민감제(예를 들어, 소포제), 전단 응력(예를 들어, 교반 속도 또는 산소 주입 속도), 배지 성분 및 첨가제, pH, 및 시간 등에 의해 규정되는 바와 같은 작업 공간을 특성화할 수 있는 소규모 시험 배양 용기(예를 들어, 배플형 진탕 플라스크) 모델에 관한 것이다. 특히, 본 명세서에 기술된 방법은 생산용 생물 반응기에서 세포 배양 성장 및 생존력에 대한 이러한 작업 매개 변수의 효과를 예측하는 데 사용될 수 있다. 소규모 모델과 더 큰 규모의 모델 간의 전단 응력을 상호 관련시키기 위해 직교 접근 방식이 사용되었으며, 예측된 작업 공간은 벤치탑 규모 및 생산 규모의 데이터에 의해 검증되었다.

[0118] 따라서, 생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력에 대한 민감제 농도의 효과를 예측하는 방법, 생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력을 개선하는 방법, 생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력을 예측하는 방법, 및 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 방법이 본원에 제공된다. 이러한 방법의 비제한적 양태들이 본 명세서에 기재되어 있으며, 이들은 제한없이 조합될 수 있다.

[0119] **공정 강화**

[0120] 공정 강화는 제조 공정이 더 정확하고 더 효율적으로 될 수 있도록 기존 작업 계획을 최적화함에 따른 제조 및 처리의 개선을 지칭한다. 이러한 개선은, 바이오매스 증가, 체적 생산성 개선, 설비 용량 활용 최적화, 상품 비용 절감, 생물물 품질 일관성 유지 또는 개선, 설비 풋프린트(footprint) 감소, 및/또는 단위 작업 감소와 같은 다양한 장점을 가져올 수 있다. 분자 수준에서, 공정 강화는 혼합 향상, 반응 속도론 개선, 및/또는 수율 및 특이성 증가를 또한 수반할 수 있다.

[0121] 본 개시는 단백질 또는 폴리펩티드(예를 들어, 재조합 치료 단백질, 재조합 단백질, 또는 재조합 폴리펩티드)의 생산을 위한 공정 강화에 관한 것이다. 재조합 치료 단백질 또는 폴리펩티드 생산을 증가시키는 한 가지 전략은 세포 밀도를 증가시키는 것이다. 높은 세포 밀도는 일반적으로 높은 산소 소비를 필요로 하고, 필요한 산소 주입은 종종 포우밍 문제(즉, 기포)를 유발한다. 도 1에 도시된 바와 같이, 기포는, 예를 들어 세포-기포 접촉, 세포 기포 부착, 또는 기포 파열에 의한 치명적 힘을 통해, 세포 사멸을 가져올 수 있다. 식 1은 세포 사멸률, 체적 폭기(volumetric aeration), 및 기포 크기 간의 관계를 보여준다.

[0122] [식 1]

$$\text{사멸률} \propto \frac{(\text{체적 폭기})}{(\text{기포 크기})^3}$$

[0123]

[0124] 따라서 소포제는 종종 세포 배양 공정에 첨가된다. 그러나, 소포제의 첨가 및/또는 축적은 세포 배양 성능(예를 들어, 포유 동물 세포 배양 성능)에 부정적인 영향을 초래할 수 있다. 일부 경우에, 소포제의 첨가 및 축적은, 특히 생산 규모(생산용 생물 반응기 규모)에서, 세포 사멸률의 증가를 가져올 수 있다. 따라서 생산 규모(생산용 생물 반응기 규모)에서 작업 매개 변수 또는 이러한 작업 매개 변수(예를 들어, 소포제 또는 일부 다른 매개 변수) 변경의 효과를 평가하는 것이 중요하다.

[0125] **민감제, 교반, 및 보호제**

[0126] 생산 규모(생산용 생물 반응기 규모)에서 다양한 작업 매개 변수의 효과를 시험하는 것은 엄청나게 많은 비용이 들기 때문에, 일반적으로 시험 배양 용기(예를 들어, 진탕 플라스크, 실험실 발효기, 또는 과일릿 발효기)에서 먼저 과일릿 실험이 수행된다. 이러한 시험 배양 용기는 소규모에서 다양한 매개 변수, 예를 들어, 교반, 민감제 농도, 보호제 농도, 온도, pH, 영양분 조성, 바이오매스 로딩 및 공급 전략의 효과를 시험하고, 관찰된 효과를 생산 규모(생산용 생물 반응기 규모)에서의 효과와 상호 관련시키기 위해 작동될 수 있다. 많은 전통적인 방법에서, 파워/부피(P/V), 체적 질량 전달 계수(kLa), 턴 속도, 혼합 시간, 전산 유체 역학(CFD) 모델링이 종종 시험 배양 용기에서의 결과를 생산 규모(생산용 생물 반응기 규모)에서의 효과와 상호 관련시키기 위해 사용된다.

[0127] 이러한 다양한 매개 변수 중에서, 민감제 매개 변수(예를 들어, 민감제 농도)는 특히 스케일-업(scale-up)하기가 어렵다. 본 명세서에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 민감제는 소포제(예를 들어, 시메티콘, 시메티콘 에멀전, 또는 폴리디메틸실록산(PDMS)-기반 오일)일 수 있다. 소포제에 대한 설명은, 예를 들어, 문헌 [Brečević et al. "Mechanism of antifoaming action of simethicone," *J. Appl. Toxicol.* 14(3):207-211,

1994] 및 문헌[Bergeron, et al. "Polydimethylsiloxane (PDMS)-based antifoams," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 122(1-3):103-120, 1997]에서 찾을 수 있으며, 두 문헌은 모두 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

[0128] 민감제의 추가의 예에는, 예를 들어, 유기 오일-기반 민감제, 실리콘 오일-기반 민감제, 및 혼합 액체-고체 혼합물/유화 민감제(예를 들어, 흡드 실리카, 오일 조합 소포제)가 포함된다. 민감제는 실리콘 포움 조절제, 예를 들어, XIAMETER® ACP-0100 소포제 화합물, XIAMETER® ACP-1500 소포제 화합물, XIAMETER® AFE-1510 소포제 에멀전, XIAMETER® AFE-1520 소포제 에멀전, XIAMETER® AFE-1530 소포제 에멀전, XIAMETER® ACP-1400 소포제 화합물, XIAMETER® AFE-0700 소포제 에멀전, XIAMETER® ACP-1920 분말 소포제, 및 XIAMETER® PMX-200 실리콘 유체일 수 있다. 민감제의 추가의 예에는 Dow Corning® 소포제 C 에멀전, Antifoam 204(Sigma Aldrich), Antifoam A(Sigma Aldrich), Antifoam B 에멀전(Sigma Aldrich), Antifoam C 에멀전(Sigma Aldrich), Antifoam Y-30 에멀전(Sigma Aldrich), Antifoam O-30(Sigma Aldrich), 및 Antifoam SE-15(Sigma Aldrich)가 포함된다. 유기 비-실리콘 폴리프로필렌-기반 폴리에테르 민감제의 비제한적 예는 Antifoam 204이다. 시메티콘 에멀전의 비제한적 예는 Antifoam EX-Cell이다. 혼합 고체-액체 소포제의 비제한적 예에는 실리콘 오일(PDMS), 화합물 A, 개질된 CA(MCA), 에멀전 A(EA), 및 문헌[Marinova et al., *Langmuir* 17:2426-2436, 2001]에 기재된 EA의 유사체(AEA)가 포함된다. 폴리디메틸실록산(PMSA)-기반 소포제의 비제한적 예는 문헌[Bergeron et al., *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 122:103-120, 1997]에 기재되어 있다.

[0129] 민감제의 추가의 예는 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Rashmika et al., *Biotechnol. Prog.* 34(1):262-270, 2018]을 참조한다.

[0130] 일부 다른 매개 변수, 예를 들어, 배플링(baffling), 플라스크 크기, 교반이 또한 전단에 대한 세포의 민감도에 영향을 미친다. 다른 매개 변수와의 상호 작용으로 인해, 이러한 민감제 매개 변수(예를 들어, 소포제 농도)는 종종 스케일-업 과정에서 비선형 관계를 가지며, 다양한 규모에 걸쳐 기하학적으로 무관하다. 따라서, 전통적인 모델은 생산 규모에서의 민감제 매개 변수의 효과를 예측하는 측면에서 일반적으로 무력하다.

[0131] 예측을 더욱더 어렵게 만드는 것은 전체 생산 기간 동안 민감제 매개 변수가 변경될 수 있다는 것이다. 예를 들어, 생산 공정(예를 들어, 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양) 동안, 세포 밀도가 증가하고, 더 많은 산소 주입이 필요하다. 따라서, 더 많은 소포제가 필요하며 생산용 생물 반응기에 첨가된다. 소포제 농도의 증가는 세포를 전단 응력에 더욱더 민감하게 하고, 작업 조건을 허용 가능한 작업 공간 밖으로 빠르게 이동시킨다(도 2).

[0132] 또한, 보호제는 증가된 전단 응력으로부터 세포를 보호할 수 있으며 종종 액체 배양 배지에 첨가된다. 민감제의 부정적인 영향을 완화하기 위해 증가된 보호제 농도가 필요할 수 있지만, 보호제와 다른 매개 변수의 상호 작용으로 인해 필요한 보호제의 정확한 양을 결정하기가 어려워진다. 일부 통상적인 보호제에는, 예를 들어, 폴록사머, 폴록사민, 및/또는 플루로닉 폴리올이 포함된다. 일부 구현예에서, 보호제는 폴록사머(예를 들어, 폴록사머-188, 폴록사머-401, 폴록사머-402, 또는 폴록사머-407)이다. 일부 다른 구현예에서, 보호제는 폴록사민(예를 들어, 폴록사민-904 또는 폴록사민-908)이다. 일부 추가의 구현예에서, 보호제는 플루로닉 폴리올(예를 들어, L-61, L-121, P-103, P-123, P-84, P-104, P-65, P-105, L-35, F-127, F-38, F-68, 또는 F-108), 또는 리버스(reverse) 플루로닉 폴리올(예를 들어, 25 R-2, 25 R-4, 25 R-5, 25 R-8, 10 R-5, 또는 10 R-8)이다. 예시적인 보호제의 상세한 설명은, 예를 들어, 문헌[Moghimi et al., "Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine," *Trends in Biotechnology* 18(10):412-420, 2000], 문헌[Murhammer et al., "Structural features of nonionic polyglycol polymer molecules responsible for the protective effect in sparged animal cell bioreactors," *Biotechnology Progress* 6(2):142-148, 1990], 및 문헌[Murhammer, "Pluronic polyols, cell protection," *Encyclopedia of Bioprocess Technology* (1999)]에서 찾을 수 있으며, 이들 문헌 각각은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

[0133] **요인 설계 및 중심 합성 설계에 기초한 모델링**

[0134] 본 개시는 시험 배양 용기 모델의 결과에 기초하여 임의의 규모에서 반응기를 최적화하기 위해 다양한 작업 매개 변수, 예를 들어, 보호제(배지 성분/첨가제, 예를 들어, 플루로닉), 민감제(예를 들어, 소포제), 및 전단 응력(교반)의 효과(예를 들어, 세포 생존력, 세포 사멸률, 재조합 치료 단백질 생산, 또는 수율)를 포착하기 위한 모델링 방법을 제공한다.

[0135] 일 양태에서, 본 명세서에 기술된 방법은 생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력을 예측하는 데 사용될 수 있다. 방법은 적어도 2개(예를 들어, 3개, 4개, 5개, 또는 6개) 매개 변수를 포함하는 일련의 매개 변수를 선택

하는 단계; 시험 배양 용기(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 시험 배양 용기)에서 일련의 매개 변수에 의해 규정된 바와 같은 복수의 시험 조건 하에서 세포 생존력을 결정하는 단계; 및 복수의 조건 하의 시험 배양 용기에서의 세포 생존력에 기초하여, 생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력을 예측하는 단계를 포함한다. 예측에 기초하여, 세포 생존력이 개선된 조건이 확인될 수 있다. 또한, 생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력에 대한 민감제 농도의 효과를 예측하는 방법이 본원에 제공된다. 방법은 시험 배양 용기에서 복수의 시험 조건 하에서 세포 생존력을 결정하는 단계로서, 복수의 시험 조건은 일련의 매개 변수에 의해 규정되는, 단계; 및 복수의 조건 하의 시험 배양 용기에서의 세포 생존력에 기초하여, 생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력에 대한 민감제 농도의 효과를 예측하는 단계를 포함한다.

[0136]

시험 배양 용기는 스피ن 튜브(예를 들어, 배플형 스피ن 튜브), 플라스크(예를 들어, 부피가 약 3 L인 진탕 플라스크)(예를 들어, 배플형 진탕 플라스크), 자동화된 실험실 발효기(Sartorius로부터의 Ambr 15 및 Amber 250), 실험실용 발효기, 또는 파일렛 발효기일 수 있다. 일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 부피가 5 L 미만, 3 L 미만, 1 L 미만, 500 ml 미만, 또는 100 ml 미만(예를 들어, 1 L 미만, 또는 50 ml 내지 500 ml)일 수 있다. 일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 부피(내부 부피)가 약 5 mL 내지 약 5 L(예를 들어, 약 10 mL 내지 약 500 mL, 또는 약 2.5 L 내지 약 3.5 L)이다. 예를 들어, 시험 배양 용기는 부피(내부 부피)가 약 5 mL 내지 약 5 L, 약 5 mL 내지 약 4.5 L, 약 5 mL 내지 약 4.0 L, 약 5 mL 내지 약 3.5 L, 약 5 mL 내지 약 3.0 L, 약 5 mL 내지 약 2.5 L, 약 5 mL 내지 약 2 L, 약 5 mL 내지 약 1.5 L, 약 5 mL 내지 약 1 L, 약 5 mL 내지 약 900 mL, 약 5 mL 내지 약 800 mL, 약 5 mL 내지 약 700 mL, 약 5 mL 내지 약 600 mL, 약 5 mL 내지 약 500 mL, 약 5 mL 내지 약 450 mL, 약 5 mL 내지 약 400 mL, 약 5 mL 내지 약 350 mL, 약 5 mL 내지 약 300 mL, 약 5 mL 내지 약 250 mL, 약 5 mL 내지 약 200 mL, 약 5 mL 내지 약 150 mL, 약 5 mL 내지 약 100 mL, 약 5 mL 내지 약 80 mL, 약 5 mL 내지 약 60 mL, 약 5 mL 내지 약 50 mL, 약 5 mL 내지 약 40 mL, 약 5 mL 내지 약 30 mL, 약 5 mL 내지 약 25 mL, 약 5 mL 내지 약 20 mL, 약 5 mL 내지 약 15 mL, 약 5 mL 내지 약 10 mL, 약 10 mL 내지 약 5 L, 약 10 mL 내지 약 4.5 L, 약 10 mL 내지 약 4.0 L, 약 10 mL 내지 약 3.5 L, 약 10 mL 내지 약 3.0 L, 약 10 mL 내지 약 2.5 L, 약 10 mL 내지 약 2 L, 약 10 mL 내지 약 1.5 L, 약 10 mL 내지 약 1 L, 약 10 mL 내지 약 900 mL, 약 10 mL 내지 약 800 mL, 약 10 mL 내지 약 700 mL, 약 10 mL 내지 약 600 mL, 약 10 mL 내지 약 500 mL, 약 10 mL 내지 약 450 mL, 약 10 mL 내지 약 400 mL, 약 10 mL 내지 약 350 mL, 약 10 mL 내지 약 300 mL, 약 10 mL 내지 약 250 mL, 약 10 mL 내지 약 200 mL, 약 10 mL 내지 약 150 mL, 약 10 mL 내지 약 100 mL, 약 10 mL 내지 약 80 mL, 약 10 mL 내지 약 60 mL, 약 10 mL 내지 약 50 mL, 약 10 mL 내지 약 40 mL, 약 10 mL 내지 약 30 mL, 약 10 mL 내지 약 25 mL, 약 10 mL 내지 약 20 mL, 약 10 mL 내지 약 15 mL, 약 15 mL 내지 약 5 L, 약 15 mL 내지 약 4.5 L, 약 15 mL 내지 약 4.0 L, 약 15 mL 내지 약 3.5 L, 약 15 mL 내지 약 3.0 L, 약 15 mL 내지 약 2.5 L, 약 15 mL 내지 약 2 L, 약 15 mL 내지 약 1.5 L, 약 15 mL 내지 약 1 L, 약 15 mL 내지 약 900 mL, 약 15 mL 내지 약 800 mL, 약 15 mL 내지 약 700 mL, 약 15 mL 내지 약 600 mL, 약 15 mL 내지 약 500 mL, 약 15 mL 내지 약 450 mL, 약 15 mL 내지 약 400 mL, 약 15 mL 내지 약 350 mL, 약 15 mL 내지 약 300 mL, 약 15 mL 내지 약 250 mL, 약 15 mL 내지 약 200 mL, 약 15 mL 내지 약 150 mL, 약 15 mL 내지 약 100 mL, 약 15 mL 내지 약 80 mL, 약 15 mL 내지 약 60 mL, 약 15 mL 내지 약 50 mL, 약 15 mL 내지 약 40 mL, 약 15 mL 내지 약 30 mL, 약 15 mL 내지 약 25 mL, 약 15 mL 내지 약 20 mL, 약 20 mL 내지 약 5 L, 약 20 mL 내지 약 4.5 L, 약 20 mL 내지 약 4.0 L, 약 20 mL 내지 약 3.5 L, 약 20 mL 내지 약 3.0 L, 약 20 mL 내지 약 2.5 L, 약 20 mL 내지 약 2 L, 약 20 mL 내지 약 1.5 L, 약 20 mL 내지 약 1 L, 약 20 mL 내지 약 900 mL, 약 20 mL 내지 약 800 mL, 약 20 mL 내지 약 700 mL, 약 20 mL 내지 약 600 mL, 약 20 mL 내지 약 500 mL, 약 20 mL 내지 약 450 mL, 약 20 mL 내지 약 400 mL, 약 20 mL 내지 약 350 mL, 약 20 mL 내지 약 300 mL, 약 20 mL 내지 약 250 mL, 약 20 mL 내지 약 200 mL, 약 20 mL 내지 약 150 mL, 약 20 mL 내지 약 100 mL, 약 20 mL 내지 약 80 mL, 약 20 mL 내지 약 60 mL, 약 20 mL 내지 약 50 mL, 약 20 mL 내지 약 40 mL, 약 20 mL 내지 약 30 mL, 약 20 mL 내지 약 25 mL, 약 25 mL 내지 약 5 L, 약 25 mL 내지 약 4.5 L, 약 25 mL 내지 약 4.0 L, 약 25 mL 내지 약 3.5 L, 약 25 mL 내지 약 3.0 L, 약 25 mL 내지 약 2.5 L, 약 25 mL 내지 약 2 L, 약 25 mL 내지 약 1.5 L, 약 25 mL 내지 약 1 L, 약 25 mL 내지 약 900 mL, 약 25 mL 내지 약 800 mL, 약 25 mL 내지 약 700 mL, 약 25 mL 내지 약 600 mL, 약 25 mL 내지 약 500 mL, 약 25 mL 내지 약 450 mL, 약 25 mL 내지 약 400 mL, 약 25 mL 내지 약 350 mL, 약 25 mL 내지 약 300 mL, 약 25 mL 내지 약 250 mL, 약 25 mL 내지 약 200 mL, 약 25 mL 내지 약 150 mL, 약 25 mL 내지 약 100 mL, 약 25 mL 내지 약 80 mL, 약 25 mL 내지 약 60 mL, 약 25 mL 내지 약 50 mL, 약 25 mL 내지 약 40 mL, 약 25 mL 내지 약 30 mL, 약 30 mL 내지 약 5 L, 약 30 mL 내지 약 4.5 L, 약 30 mL 내지 약 4.0 L, 약 30 mL 내지 약 3.5 L, 약 30 mL 내지 약 3.0 L, 약 30 mL 내지 약 2.5 L, 약 30 mL 내지 약 2 L, 약 30 mL 내지 약 1.5 L, 약 30 mL 내지 약 1 L, 약 30 mL 내지 약 900 mL, 약 30 mL

L, 약 350 mL 내지 약 1 L, 약 350 mL 내지 약 900 mL, 약 350 mL 내지 약 800 mL, 약 350 mL 내지 약 700 mL, 약 350 mL 내지 약 600 mL, 약 350 mL 내지 약 500 mL, 약 350 mL 내지 약 450 mL, 약 350 mL 내지 약 400 mL, 약 400 mL 내지 약 5 L, 약 400 mL 내지 약 4.5 L, 약 400 mL 내지 약 4.0 L, 약 400 mL 내지 약 3.5 L, 약 400 mL 내지 약 3.0 L, 약 400 mL 내지 약 2.5 L, 약 400 mL 내지 약 2 L, 약 400 mL 내지 약 1.5 L, 약 400 mL 내지 약 1 L, 약 400 mL 내지 약 900 mL, 약 400 mL 내지 약 800 mL, 약 400 mL 내지 약 700 mL, 약 400 mL 내지 약 600 mL, 약 400 mL 내지 약 500 mL, 약 400 mL 내지 약 450 mL, 약 450 mL 내지 약 5 L, 약 450 mL 내지 약 4.5 L, 약 450 mL 내지 약 4.0 L, 약 450 mL 내지 약 3.5 L, 약 450 mL 내지 약 3.0 L, 약 450 mL 내지 약 2.5 L, 약 450 mL 내지 약 2 L, 약 450 mL 내지 약 1.5 L, 약 450 mL 내지 약 1 L, 약 450 mL 내지 약 900 mL, 약 450 mL 내지 약 800 mL, 약 450 mL 내지 약 700 mL, 약 450 mL 내지 약 600 mL, 약 450 mL 내지 약 500 mL, 약 500 mL 내지 약 5 L, 약 500 mL 내지 약 4.5 L, 약 500 mL 내지 약 4.0 L, 약 500 mL 내지 약 3.5 L, 약 500 mL 내지 약 3.0 L, 약 500 mL 내지 약 2.5 L, 약 500 mL 내지 약 2 L, 약 500 mL 내지 약 1.5 L, 약 500 mL 내지 약 1 L, 약 500 mL 내지 약 900 mL, 약 500 mL 내지 약 800 mL, 약 500 mL 내지 약 700 mL, 약 500 mL 내지 약 600 mL, 약 600 mL 내지 약 5 L, 약 600 mL 내지 약 4.5 L, 약 600 mL 내지 약 4.0 L, 약 600 mL 내지 약 3.5 L, 약 600 mL 내지 약 3.0 L, 약 600 mL 내지 약 2.5 L, 약 600 mL 내지 약 2 L, 약 600 mL 내지 약 1.5 L, 약 600 mL 내지 약 1 L, 약 600 mL 내지 약 900 mL, 약 600 mL 내지 약 800 mL, 약 600 mL 내지 약 700 mL, 약 700 mL 내지 약 5 L, 약 700 mL 내지 약 4.5 L, 약 700 mL 내지 약 4.0 L, 약 700 mL 내지 약 3.5 L, 약 700 mL 내지 약 3.0 L, 약 700 mL 내지 약 2.5 L, 약 700 mL 내지 약 2 L, 약 700 mL 내지 약 1.5 L, 약 700 mL 내지 약 1 L, 약 700 mL 내지 약 900 mL, 약 700 mL 내지 약 800 mL, 약 800 mL 내지 약 5 L, 약 800 mL 내지 약 4.5 L, 약 800 mL 내지 약 4.0 L, 약 800 mL 내지 약 3.5 L, 약 800 mL 내지 약 3.0 L, 약 800 mL 내지 약 2.5 L, 약 800 mL 내지 약 2 L, 약 800 mL 내지 약 1.5 L, 약 800 mL 내지 약 1 L, 약 800 mL 내지 약 900 mL, 약 900 mL 내지 약 5 L, 약 900 mL 내지 약 4.5 L, 약 900 mL 내지 약 4.0 L, 약 900 mL 내지 약 3.5 L, 약 900 mL 내지 약 3.0 L, 약 900 mL 내지 약 2.5 L, 약 900 mL 내지 약 2 L, 약 900 mL 내지 약 1.5 L, 약 900 mL 내지 약 1 L, 약 1 L 내지 약 5 L, 약 1 L 내지 약 4.5 L, 약 1 L 내지 약 4.0 L, 약 1 L 내지 약 3.5 L, 약 1 L 내지 약 3.0 L, 약 1 L 내지 약 2.5 L, 약 1 L 내지 약 2 L, 약 1 L 내지 약 1.5 L, 약 1.5 L 내지 약 5 L, 약 1.5 L 내지 약 4.5 L, 약 1.5 L 내지 약 4.0 L, 약 1.5 L 내지 약 3.5 L, 약 1.5 L 내지 약 3.0 L, 약 1.5 L 내지 약 2.5 L, 약 1.5 L 내지 약 2 L, 약 2 L 내지 약 5 L, 약 2 L 내지 약 4.5 L, 약 2 L 내지 약 4.0 L, 약 2 L 내지 약 3.5 L, 약 2 L 내지 약 3.0 L, 약 2 L 내지 약 2.5 L, 약 2.5 L 내지 약 5 L, 약 2.5 L 내지 약 4.5 L, 약 2.5 L 내지 약 4.0 L, 약 2.5 L 내지 약 3.5 L, 약 2.5 L 내지 약 3.0 L, 약 3.0 L 내지 약 5 L, 약 3.0 L 내지 약 4.5 L, 약 3.0 L 내지 약 4.0 L, 약 3.0 L 내지 약 3.5 L, 약 3.5 L 내지 약 5 L, 약 3.5 L 내지 약 4.5 L, 약 3.5 L 내지 약 4.0 L, 약 4.0 L 내지 약 5 L, 약 4.0 L 내지 약 4.5 L, 또는 약 4.5 L 내지 약 5.0 L 일 수 있다. 일부 구현예에서, 시험 배양 용기의 높이 대 폭의 비는 생산용 생물 반응기의 높이 대 폭의 비와 거의 동일하다.

[0137] 일부 구현예에서, (배양 중에) 시험 배양 용기에 배치된 액체 배양 배지의 부피는 약 0.5 mL 내지 약 1.5 L, 약 0.5 mL 내지 약 1.4 L, 약 0.5 mL 내지 약 1.3 L, 약 0.5 mL 내지 약 1.2 L, 약 0.5 mL 내지 약 1.1 L, 약 0.5 mL 내지 약 1.0 L, 약 0.5 mL 내지 약 900 mL, 약 0.5 mL 내지 약 800 mL, 약 0.5 mL 내지 약 700 mL, 약 0.5 mL 내지 약 600 mL, 약 0.5 mL 내지 약 500 mL, 약 0.5 mL 내지 약 400 mL, 약 0.5 mL 내지 약 300 mL, 약 0.5 mL 내지 약 250 mL, 약 0.5 mL 내지 약 200 mL, 약 0.5 mL 내지 약 150 mL, 약 0.5 mL 내지 약 100 mL, 약 0.5 mL 내지 약 80 mL, 약 0.5 mL 내지 약 60 mL, 약 0.5 mL 내지 약 50 mL, 약 0.5 mL 내지 약 40 mL, 약 0.5 mL 내지 약 30 mL, 약 0.5 mL 내지 약 25 mL, 약 0.5 mL 내지 약 20 mL, 약 0.5 mL 내지 약 10 mL, 약 0.5 mL 내지 약 5 mL, 약 0.5 mL 내지 약 2.5 mL, 약 2.5 mL 내지 약 1.5 L, 약 2.5 mL 내지 약 1.4 L, 약 2.5 mL 내지 약 1.3 L, 약 0.5 mL 내지 약 1.2 L, 약 0.5 mL 내지 약 1.1 L, 약 0.5 mL 내지 약 1.0 L, 약 2.5 mL 내지 약 900 mL, 약 2.5 mL 내지 약 800 mL, 약 2.5 mL 내지 약 700 mL, 약 2.5 mL 내지 약 600 mL, 약 2.5 mL 내지 약 500 mL, 약 2.5 mL 내지 약 400 mL, 약 2.5 mL 내지 약 300 mL, 약 2.5 mL 내지 약 250 mL, 약 2.5 mL 내지 약 200 mL, 약 2.5 mL 내지 약 150 mL, 약 2.5 mL 내지 약 100 mL, 약 2.5 mL 내지 약 80 mL, 약 2.5 mL 내지 약 60 mL, 약 2.5 mL 내지 약 50 mL, 약 2.5 mL 내지 약 40 mL, 약 2.5 mL 내지 약 30 mL, 약 2.5 mL 내지 약 25 mL, 약 2.5 mL 내지 약 20 mL, 약 2.5 mL 내지 약 10 mL, 약 2.5 mL 내지 약 5 mL, 약 5 mL 내지 약 1.5 L, 약 5 mL 내지 약 1.4 L, 약 5 mL 내지 약 1.3 L, 약 5 mL 내지 약 1.2 L, 약 5 mL 내지 약 1.1 L, 약 5 mL 내지 약 1.0 L, 약 5 mL 내지 약 900 mL, 약 5 mL 내지 약 800 mL, 약 5 mL 내지 약 700 mL, 약 5 mL 내지 약 600 mL, 약 5 mL 내지 약 500 mL, 약 5 mL 내지 약 400 mL, 약 5 mL 내지 약 300 mL, 약 5 mL 내지 약 250 mL, 약 5 mL 내지 약 200 mL, 약 5 mL 내지 약 150 mL, 약 5 mL 내지 약 100 mL, 약 5 mL 내지 약 80 mL, 약 5 mL 내

약 400 mL, 약 200 mL 내지 약 300 mL, 약 200 mL 내지 약 250 mL, 약 250 mL 내지 약 1.5 L, 약 250 mL 내지 약 1.4 L, 약 250 mL 내지 약 1.3 L, 약 250 mL 내지 약 1.2 L, 약 250 mL 내지 약 1.1 L, 약 250 mL 내지 약 1.0 L, 약 250 mL 내지 약 900 mL, 약 250 mL 내지 약 800 mL, 약 250 mL 내지 약 700 mL, 약 250 mL 내지 약 600 mL, 약 250 mL 내지 약 500 mL, 약 250 mL 내지 약 400 mL, 약 250 mL 내지 약 300 mL, 약 300 mL 내지 약 1.5 L, 약 300 mL 내지 약 1.4 L, 약 300 mL 내지 약 1.3 L, 약 300 mL 내지 약 1.2 L, 약 300 mL 내지 약 1.1 L, 약 300 mL 내지 약 1.0 L, 약 300 mL 내지 약 900 mL, 약 300 mL 내지 약 800 mL, 약 300 mL 내지 약 700 mL, 약 300 mL 내지 약 600 mL, 약 300 mL 내지 약 500 mL, 약 300 mL 내지 약 400 mL, 약 400 mL 내지 약 1.5 L, 약 400 mL 내지 약 1.4 L, 약 400 mL 내지 약 1.3 L, 약 400 mL 내지 약 1.2 L, 약 400 mL 내지 약 1.1 L, 약 400 mL 내지 약 1.0 L, 약 400 mL 내지 약 900 mL, 약 400 mL 내지 약 800 mL, 약 400 mL 내지 약 700 mL, 약 400 mL 내지 약 600 mL, 약 400 mL 내지 약 500 mL, 약 500 mL 내지 약 1.5 L, 약 500 mL 내지 약 1.4 L, 약 500 mL 내지 약 1.3 L, 약 500 mL 내지 약 1.2 L, 약 500 mL 내지 약 1.1 L, 약 500 mL 내지 약 1.0 L, 약 500 mL 내지 약 900 mL, 약 500 mL 내지 약 800 mL, 약 500 mL 내지 약 700 mL, 약 500 mL 내지 약 600 mL, 약 600 mL 내지 약 1.5 L, 약 600 mL 내지 약 1.4 L, 약 600 mL 내지 약 1.3 L, 약 600 mL 내지 약 1.2 L, 약 600 mL 내지 약 1.1 L, 약 600 mL 내지 약 1.0 L, 약 600 mL 내지 약 900 mL, 약 600 mL 내지 약 800 mL, 약 600 mL 내지 약 700 mL, 약 700 mL 내지 약 1.5 L, 약 700 mL 내지 약 1.4 L, 약 700 mL 내지 약 1.3 L, 약 700 mL 내지 약 1.2 L, 약 700 mL 내지 약 1.1 L, 약 700 mL 내지 약 1.0 L, 약 700 mL 내지 약 900 mL, 약 700 mL 내지 약 800 mL, 약 800 mL 내지 약 1.5 L, 약 800 mL 내지 약 1.4 L, 약 800 mL 내지 약 1.3 L, 약 800 mL 내지 약 1.2 L, 약 800 mL 내지 약 1.1 L, 약 800 mL 내지 약 1.0 L, 약 800 mL 내지 약 900 mL, 약 900 mL 내지 약 1.5 L, 약 900 mL 내지 약 1.4 L, 약 900 mL 내지 약 1.3 L, 약 900 mL 내지 약 1.2 L, 약 900 mL 내지 약 1.1 L, 약 900 mL 내지 약 1.0 L, 약 1.0 L 내지 약 1.5 L, 약 1.0 L 내지 약 1.4 L, 약 1.0 L 내지 약 1.3 L, 약 1.0 L 내지 약 1.2 L, 약 1.0 L 내지 약 1.1 L, 약 1.1 L 내지 약 1.5 L, 약 1.1 L 내지 약 1.4 L, 약 1.1 L 내지 약 1.3 L, 약 1.1 L 내지 약 1.2 L, 약 1.1 L 내지 약 1.2 L, 약 1.2 L 내지 약 1.5 L, 약 1.2 L 내지 약 1.4 L, 약 1.2 L 내지 약 1.3 L, 약 1.3 L 내지 약 1.5 L, 약 1.3 L 내지 약 1.4 L, 또는 약 1.4 L 내지 약 1.5 L의 범위일 수 있다.

[0138] 일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 진탕 플라스크, 예를 들어, 배플형 진탕 플라스크이다. 진탕 플라스크는 부피가, 예를 들어, 약 250 mL 내지 약 300 mL, 약 300 mL 내지 약 400 mL, 또는 약 400 mL 내지 약 500 mL일 수 있다. 진탕 플라스크는 적어도 하나의 기체 투과성 표면(예를 들어, 멸균 장벽으로도 작용할 수 있는 기체 투과성 막을 가진 적어도 하나의 표면) 및/또는 적어도 하나의 통기 캡을 포함할 수 있다. 진탕 플라스크는, 그 외부 표면에, 진탕 플라스크가 조직 배양 인큐베이터(예를 들어, 회전 인큐베이터)에 안정적으로 배치될 수 있게 하는 구조를 가질 수 있다.

[0139] 진탕 플라스크의 내부 표면은 적어도 하나의 코팅(예를 들어, 젤라틴, 콜라겐, 폴리-L-오르니틴, 폴리스티렌, 및 라미닌 코팅 중 적어도 하나)을 가질 수 있다. 본 명세서에 기술된 임의의 방법에 사용될 수 있는 예시적인 진탕 플라스크는 Corning Inc.(미국 매사추세츠주 텍스베리 소재), Presens(덴마크 브룬드비 소재), Nalge-Nunc International(미국 뉴욕주 로체스터 소재)로부터 구입할 수 있다. 예시적인 진탕 플라스크에는 배플형 진탕 플라스크 또는 삼각 플라스크, 또는 이의 임의의 당업계에서 인정되는 변형된 버전이 포함된다. 진탕 플라스크(예를 들어, 다양한 형태 및 치수의 진탕 플라스크) 및 진탕 플라스크의 내부 표면 코팅의 추가의 예는 당업계에 알려져 있으며 본 방법에서 사용될 수 있다.

[0140] 일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 약 125 RPM 내지 약 400 RPM (예를 들어, 약 150 RPM 내지 약 350 RPM, 또는 약 200 RPM 내지 약 300 RPM)의 회전 교반을 가질 수 있다. 예를 들어, 시험 배양 용기는 약 125 RPM 내지 약 400 RPM, 약 125 RPM 내지 약 380 RPM, 약 125 RPM 내지 약 360 RPM, 약 125 RPM 내지 약 340 RPM, 약 125 RPM 내지 약 320 RPM, 약 125 RPM 내지 약 300 RPM, 약 125 RPM 내지 약 280 RPM, 약 125 RPM 내지 약 260 RPM, 약 125 RPM 내지 약 240 RPM, 약 125 RPM 내지 약 220 RPM, 약 125 RPM 내지 약 200 RPM, 약 125 RPM 내지 약 180 RPM, 약 125 RPM 내지 약 160 RPM, 약 125 RPM 내지 약 140 RPM, 약 140 RPM 내지 약 400 RPM, 약 140 RPM 내지 약 380 RPM, 약 140 RPM 내지 약 360 RPM, 약 140 RPM 내지 약 340 RPM, 약 140 RPM 내지 약 320 RPM, 약 140 RPM 내지 약 300 RPM, 약 140 RPM 내지 약 280 RPM, 약 140 RPM 내지 약 260 RPM, 약 140 RPM 내지 약 240 RPM, 약 140 RPM 내지 약 220 RPM, 약 140 RPM 내지 약 200 RPM, 약 140 RPM 내지 약 180 RPM, 약 140 RPM 내지 약 160 RPM, 약 160 RPM 내지 약 400 RPM, 약 160 RPM 내지 약 380 RPM, 약 160 RPM 내지 약 360 RPM, 약 160 RPM 내지 약 340 RPM, 약 160 RPM 내지 약 320 RPM, 약 160 RPM 내지 약 300 RPM, 약 160 RPM 내지 약 280 RPM, 약 160 RPM 내지 약 260 RPM, 약 160 RPM 내지 약 240 RPM, 약 160 RPM 내지 약 220 RPM, 약 160 RPM 내지 약 200 RPM, 약 160 RPM 내지 약 180 RPM, 약 180 RPM 내지 약 400 RPM, 약 180 RPM 내지 약 380 RPM, 약 180 RPM 내지 약 360 RPM, 약 180 RPM 내지 약 340 RPM, 약 180 RPM 내지 약 320 RPM, 약 180 RPM 내

지 약 300 RPM, 약 180 RPM 내지 약 280 RPM, 약 180 RPM 내지 약 260 RPM, 약 180 RPM 내지 약 240 RPM, 약 180 RPM 내지 약 220 RPM, 약 180 RPM 내지 약 200 RPM, 약 200 RPM 내지 약 400 RPM, 약 200 RPM 내지 약 380 RPM, 약 200 RPM 내지 약 360 RPM, 약 200 RPM 내지 약 340 RPM, 약 200 RPM 내지 약 320 RPM, 약 200 RPM 내지 약 300 RPM, 약 200 RPM 내지 약 280 RPM, 약 200 RPM 내지 약 260 RPM, 약 200 RPM 내지 약 240 RPM, 약 200 RPM 내지 약 220 RPM, 약 220 RPM 내지 약 400 RPM, 약 220 RPM 내지 약 380 RPM, 약 220 RPM 내지 약 360 RPM, 약 220 RPM 내지 약 340 RPM, 약 220 RPM 내지 약 320 RPM, 약 220 RPM 내지 약 300 RPM, 약 220 RPM 내지 약 280 RPM, 약 220 RPM 내지 약 260 RPM, 약 220 RPM 내지 약 240 RPM, 약 240 RPM 내지 약 400 RPM, 약 240 RPM 내지 약 380 RPM, 약 240 RPM 내지 약 360 RPM, 약 240 RPM 내지 약 340 RPM, 약 240 RPM 내지 약 320 RPM, 약 240 RPM 내지 약 300 RPM, 약 240 RPM 내지 약 280 RPM, 약 240 RPM 내지 약 260 RPM, 약 260 RPM 내지 약 400 RPM, 약 260 RPM 내지 약 380 RPM, 약 260 RPM 내지 약 360 RPM, 약 260 RPM 내지 약 340 RPM, 약 260 RPM 내지 약 320 RPM, 약 260 RPM 내지 약 300 RPM, 약 260 RPM 내지 약 280 RPM, 약 280 RPM 내지 약 400 RPM, 약 280 RPM 내지 약 380 RPM, 약 280 RPM 내지 약 360 RPM, 약 280 RPM 내지 약 340 RPM, 약 280 RPM 내지 약 320 RPM, 약 280 RPM 내지 약 300 RPM, 약 300 RPM 내지 약 400 RPM, 약 300 RPM 내지 약 380 RPM, 약 300 RPM 내지 약 360 RPM, 약 300 RPM 내지 약 340 RPM, 약 300 RPM 내지 약 320 RPM, 약 320 RPM 내지 약 400 RPM, 약 320 RPM 내지 약 380 RPM, 약 320 RPM 내지 약 360 RPM, 약 320 RPM 내지 약 340 RPM, 약 340 RPM 내지 약 400 RPM, 약 340 RPM 내지 약 380 RPM, 약 340 RPM 내지 약 360 RPM, 약 360 RPM 내지 약 400 RPM, 약 360 RPM 내지 약 380 RPM, 또는 약 380 RPM 내지 약 400 RPM의 회전 교반을 가질 수 있다.

[0141] 일부 구현예에서, 시험 배양 용기의 회전 교반은 약 25 mm 내지 약 50 mm의 스로우(throw)(궤도) 직경을 갖는 회전 인큐베이터를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 약 0 ppm 내지 약 5,000 ppm (예를 들어, 약 0 ppm 내지 약 120 ppm, 약 30 ppm 내지 약 120 ppm, 또는 약 50 ppm 내지 약 100 ppm)의 민감도 농도를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 0 ppm 내지 약 200 ppm, 0 ppm 내지 약 190 ppm, 0 ppm 내지 약 180 ppm, 0 ppm 내지 약 170 ppm, 0 ppm 내지 약 160 ppm, 0 ppm 내지 약 150 ppm, 0 ppm 내지 약 140 ppm, 0 ppm 내지 약 130 ppm, 0 ppm 내지 약 120 ppm, 0 ppm 내지 약 110 ppm, 0 ppm 내지 약 100 ppm, 0 ppm, 내지 약 90 ppm, 0 ppm 내지 약 80 ppm, 0 ppm 내지 약 70 ppm, 0 ppm 내지 약 60 ppm, 0 ppm 내지 약 50 ppm, 0 ppm 내지 약 40 ppm, 0 ppm 내지 약 30 ppm, 0 ppm 내지 약 20 ppm, 0 ppm 내지 약 10 ppm, 약 10 ppm 내지 약 200 ppm, 약 10 ppm 내지 약 190 ppm, 약 10 ppm 내지 약 180 ppm, 약 10 ppm 내지 약 170 ppm, 약 10 ppm 내지 약 160 ppm, 약 10 ppm 내지 약 150 ppm, 약 10 ppm 내지 약 140 ppm, 약 10 ppm 내지 약 130 ppm, 약 10 ppm 내지 약 120 ppm, 약 10 ppm 내지 약 110 ppm, 약 10 ppm 내지 약 100 ppm, 약 10 ppm 내지 약 90 ppm, 약 10 ppm 내지 약 80 ppm, 약 10 ppm 내지 약 70 ppm, 약 10 ppm 내지 약 60 ppm, 약 10 ppm 내지 약 50 ppm, 약 10 ppm 내지 약 40 ppm, 약 10 ppm 내지 약 30 ppm, 약 10 ppm 내지 약 20 ppm, 약 20 ppm 내지 약 200 ppm, 약 20 ppm 내지 약 190 ppm, 약 20 ppm 내지 약 180 ppm, 약 20 ppm 내지 약 170 ppm, 약 20 ppm 내지 약 160 ppm, 약 20 ppm 내지 약 150 ppm, 약 20 ppm 내지 약 140 ppm, 약 20 ppm 내지 약 130 ppm, 약 20 ppm 내지 약 120 ppm, 약 20 ppm 내지 약 110 ppm, 약 20 ppm 내지 약 100 ppm, 약 20 ppm 내지 약 90 ppm, 약 20 ppm 내지 약 80 ppm, 약 20 ppm 내지 약 70 ppm, 약 20 ppm 내지 약 60 ppm, 약 20 ppm 내지 약 50 ppm, 약 20 ppm 내지 약 40 ppm, 약 20 ppm 내지 약 30 ppm, 약 30 ppm 내지 약 200 ppm, 약 30 ppm 내지 약 190 ppm, 약 30 ppm 내지 약 180 ppm, 약 30 ppm 내지 약 170 ppm, 약 30 ppm 내지 약 160 ppm, 약 30 ppm 내지 약 150 ppm, 약 30 ppm 내지 약 140 ppm, 약 30 ppm 내지 약 130 ppm, 약 30 ppm 내지 약 120 ppm, 약 30 ppm 내지 약 110 ppm, 약 30 ppm 내지 약 100 ppm, 약 30 ppm 내지 약 90 ppm, 약 30 ppm 내지 약 80 ppm, 약 30 ppm 내지 약 70 ppm, 약 30 ppm 내지 약 60 ppm, 약 30 ppm 내지 약 50 ppm, 약 30 ppm 내지 약 40 ppm, 약 40 ppm 내지 약 200 ppm, 약 40 ppm 내지 약 190 ppm, 약 40 ppm 내지 약 180 ppm, 약 40 ppm 내지 약 170 ppm, 약 40 ppm 내지 약 160 ppm, 약 40 ppm 내지 약 150 ppm, 약 40 ppm 내지 약 140 ppm, 약 40 ppm 내지 약 130 ppm, 약 40 ppm 내지 약 120 ppm, 약 40 ppm 내지 약 110 ppm, 약 40 ppm 내지 약 100 ppm, 약 40 ppm 내지 약 90 ppm, 약 40 ppm 내지 약 80 ppm, 약 40 ppm 내지 약 70 ppm, 약 40 ppm 내지 약 60 ppm, 약 40 ppm 내지 약 50 ppm, 약 50 ppm 내지 약 200 ppm, 약 50 ppm 내지 약 190 ppm, 약 50 ppm 내지 약 180 ppm, 약 50 ppm 내지 약 170 ppm, 약 50 ppm 내지 약 160 ppm, 약 50 ppm 내지 약 150 ppm, 약 50 ppm 내지 약 140 ppm, 약 50 ppm 내지 약 130 ppm, 약 50 ppm 내지 약 120 ppm, 약 50 ppm 내지 약 110 ppm, 약 50 ppm 내지 약 100 ppm, 약 50 ppm 내지 약 90 ppm, 약 50 ppm 내지 약 80 ppm, 약 50 ppm 내지 약 70 ppm, 약 50 ppm 내지 약 60 ppm, 약 60 ppm 내지 약 200 ppm, 약 60 ppm 내지 약 190 ppm, 약 60 ppm 내지 약 180 ppm, 약 60 ppm 내지 약 170 ppm, 약 60 ppm 내지 약 160 ppm, 약 60 ppm 내지 약 150 ppm, 약 60 ppm 내지 약 140 ppm, 약 60 ppm 내지 약 130 ppm, 약 60 ppm 내지 약 120 ppm, 약 60 ppm 내지 약 110 ppm, 약 60 ppm 내지 약 100 ppm, 약 60 ppm 내지 약 90

ppm, 약 60 ppm 내지 약 80 ppm, 약 60 ppm 내지 약 70 ppm, 약 70 ppm 내지 약 200 ppm, 약 70 ppm 내지 약 190 ppm, 약 70 ppm 내지 약 180 ppm, 약 70 ppm 내지 약 170 ppm, 약 70 ppm 내지 약 160 ppm, 약 70 ppm 내지 약 150 ppm, 약 70 ppm 내지 약 140 ppm, 약 70 ppm 내지 약 130 ppm, 약 70 ppm 내지 약 120 ppm, 약 70 ppm 내지 약 110 ppm, 약 70 ppm 내지 약 100 ppm, 약 70 ppm 내지 약 90 ppm, 약 70 ppm 내지 약 80 ppm, 약 80 ppm 내지 약 200 ppm, 약 80 ppm 내지 약 190 ppm, 약 80 ppm 내지 약 180 ppm, 약 80 ppm 내지 약 170 ppm, 약 80 ppm 내지 약 160 ppm, 약 80 ppm 내지 약 150 ppm, 약 80 ppm 내지 약 140 ppm, 약 80 ppm 내지 약 130 ppm, 약 80 ppm 내지 약 120 ppm, 약 80 ppm 내지 약 110 ppm, 약 80 ppm 내지 약 100 ppm, 약 80 ppm 내지 약 90 ppm, 약 90 ppm 내지 약 200 ppm, 약 90 ppm 내지 약 190 ppm, 약 90 ppm 내지 약 180 ppm, 약 90 ppm 내지 약 170 ppm, 약 90 ppm 내지 약 160 ppm, 약 90 ppm 내지 약 150 ppm, 약 90 ppm 내지 약 140 ppm, 약 90 ppm 내지 약 130 ppm, 약 90 ppm 내지 약 120 ppm, 약 90 ppm 내지 약 110 ppm, 약 90 ppm 내지 약 100 ppm, 약 100 ppm 내지 약 200 ppm, 약 100 ppm 내지 약 190 ppm, 약 100 ppm 내지 약 180 ppm, 약 100 ppm 내지 약 170 ppm, 약 100 ppm 내지 약 160 ppm, 약 100 ppm 내지 약 150 ppm, 약 100 ppm 내지 약 140 ppm, 약 100 ppm 내지 약 130 ppm, 약 100 ppm 내지 약 120 ppm, 약 100 ppm 내지 약 110 ppm, 약 110 ppm 내지 약 200 ppm, 약 110 ppm 내지 약 190 ppm, 약 110 ppm 내지 약 180 ppm, 약 110 ppm 내지 약 170 ppm, 약 110 ppm 내지 약 160 ppm, 약 110 ppm 내지 약 150 ppm, 약 110 ppm 내지 약 140 ppm, 약 110 ppm 내지 약 130 ppm, 약 110 ppm 내지 약 120 ppm, 약 120 ppm 내지 약 200 ppm, 약 120 ppm 내지 약 190 ppm, 약 120 ppm 내지 약 180 ppm, 약 120 ppm 내지 약 170 ppm, 약 120 ppm 내지 약 160 ppm, 약 120 ppm 내지 약 150 ppm, 약 120 ppm 내지 약 140 ppm, 약 120 ppm 내지 약 130 ppm, 약 130 ppm 내지 약 200 ppm, 약 130 ppm 내지 약 190 ppm, 약 130 ppm 내지 약 180 ppm, 약 130 ppm 내지 약 170 ppm, 약 130 ppm 내지 약 160 ppm, 약 130 ppm 내지 약 150 ppm, 약 130 ppm 내지 약 140 ppm, 약 140 ppm 내지 약 200 ppm, 약 140 ppm 내지 약 190 ppm, 약 140 ppm 내지 약 180 ppm, 약 140 ppm 내지 약 170 ppm, 약 140 ppm 내지 약 160 ppm, 약 140 ppm 내지 약 150 ppm, 약 150 ppm 내지 약 200 ppm, 약 150 ppm 내지 약 190 ppm, 약 150 ppm 내지 약 180 ppm, 약 150 ppm 내지 약 170 ppm, 약 150 ppm 내지 약 160 ppm, 약 160 ppm 내지 약 200 ppm, 약 160 ppm 내지 약 190 ppm, 약 160 ppm 내지 약 180 ppm, 약 160 ppm 내지 약 170 ppm, 약 170 ppm 내지 약 200 ppm, 약 170 ppm 내지 약 190 ppm, 약 170 ppm 내지 약 180 ppm, 약 180 ppm 내지 약 200 ppm, 약 180 ppm 내지 약 190 ppm, 또는 약 190 ppm 내지 약 200 ppm의 민감제(예를 들어, 소포제, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 소포제) 농도를 가질 수 있다 (여기서 민감제는 시험 배양 용기에 배치된 액체 배양 배지에, 예를 들어 배양이 진행되는 기간 동안 존재한다).

[0142] 일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 0 ppm 내지 약 5,000 ppm, 0 ppm 내지 약 4,500 ppm, 0 ppm 내지 약 4,000 ppm, 0 ppm 내지 약 3,500 ppm, 0 ppm 내지 약 3,000 ppm, 0 ppm 내지 약 2,500 ppm, 0 ppm 내지 약 2,000 ppm, 0 ppm 내지 약 1,500 ppm, 0 ppm 내지 약 1,000 ppm, 0 ppm 내지 약 800 ppm, 0 ppm 내지 약 600 ppm, 0 ppm 내지 약 500 ppm, 0 ppm 내지 약 450 ppm, 0 ppm 내지 약 400 ppm, 0 ppm 내지 약 350 ppm, 0 ppm 내지 약 300 ppm, 0 ppm 내지 약 250 ppm, 0 ppm 내지 약 200 ppm, 0 ppm 내지 약 150 ppm, 0 ppm 내지 약 140 ppm, 0 ppm 내지 약 120 ppm, 0 ppm 내지 약 100 ppm, 0 ppm 내지 약 80 ppm, 0 ppm 내지 약 60 ppm, 0 ppm 내지 약 50 ppm, 0 ppm 내지 약 40 ppm, 0 ppm 내지 약 30 ppm, 0 ppm 내지 약 20 ppm, 0 ppm 내지 약 10 ppm, 약 10 ppm 내지 약 5,000 ppm, 약 10 ppm 내지 약 4,500 ppm, 약 10 ppm 내지 약 4,000 ppm, 약 10 ppm 내지 약 3,500 ppm, 약 10 ppm 내지 약 3,000 ppm, 약 10 ppm 내지 약 2,500 ppm, 약 10 ppm 내지 약 2,000 ppm, 약 10 ppm 내지 약 1,500 ppm, 약 10 ppm 내지 약 1,000 ppm, 약 10 ppm 내지 약 800 ppm, 약 10 ppm 내지 약 600 ppm, 약 10 ppm 내지 약 500 ppm, 약 10 ppm 내지 약 450 ppm, 약 10 ppm 내지 약 400 ppm, 약 10 ppm 내지 약 350 ppm, 약 10 ppm 내지 약 300 ppm, 약 10 ppm 내지 약 250 ppm, 약 10 ppm 내지 약 200 ppm, 약 10 ppm 내지 약 150 ppm, 약 10 ppm 내지 약 140 ppm, 약 10 ppm 내지 약 120 ppm, 약 10 ppm 내지 약 100 ppm, 약 10 ppm 내지 약 80 ppm, 약 10 ppm 내지 약 60 ppm, 약 10 ppm 내지 약 50 ppm, 약 10 ppm 내지 약 40 ppm, 약 10 ppm 내지 약 30 ppm, 약 10 ppm 내지 약 20 ppm, 약 20 ppm 내지 약 5,000 ppm, 약 20 ppm 내지 약 4,500 ppm, 약 20 ppm 내지 약 4,000 ppm, 약 20 ppm 내지 약 3,500 ppm, 약 20 ppm 내지 약 3,000 ppm, 약 20 ppm 내지 약 2,500 ppm, 약 20 ppm 내지 약 2,000 ppm, 약 20 ppm 내지 약 1,500 ppm, 약 20 ppm 내지 약 1,000 ppm, 약 20 ppm 내지 약 800 ppm, 약 20 ppm 내지 약 600 ppm, 약 20 ppm 내지 약 500 ppm, 약 20 ppm 내지 약 450 ppm, 약 20 ppm 내지 약 400 ppm, 약 20 ppm 내지 약 350 ppm, 약 20 ppm 내지 약 300 ppm, 약 20 ppm 내지 약 250 ppm, 약 20 ppm 내지 약 200 ppm, 약 20 ppm 내지 약 150 ppm, 약 20 ppm 내지 약 140 ppm, 약 20 ppm 내지 약 120 ppm, 약 20 ppm 내지 약 100 ppm, 약 20 ppm 내지 약 80 ppm, 약 20 ppm 내지 약 60 ppm, 약 20 ppm 내지 약 50 ppm, 약 20 ppm 내지 약 40 ppm, 약 20 ppm 내지 약 30 ppm, 약 30 ppm 내지 약 5,000 ppm, 약 30

약 150 ppm 내지 약 1,500 ppm, 약 150 ppm 내지 약 1,000 ppm, 약 150 ppm 내지 약 800 ppm, 약 150 ppm 내지 약 600 ppm, 약 150 ppm 내지 약 500 ppm, 약 150 ppm 내지 약 450 ppm, 약 150 ppm 내지 약 400 ppm, 약 150 ppm 내지 약 350 ppm, 약 150 ppm 내지 약 300 ppm, 약 150 ppm 내지 약 250 ppm, 약 150 ppm 내지 약 200 ppm, 약 200 ppm 내지 약 5,000 ppm, 약 200 ppm 내지 약 4,500 ppm, 약 200 ppm 내지 약 4,000 ppm, 약 200 ppm 내지 약 3,500 ppm, 약 200 ppm 내지 약 3,000 ppm, 약 200 ppm 내지 약 2,500 ppm, 약 200 ppm 내지 약 2,000 ppm, 약 200 ppm 내지 약 1,500 ppm, 약 200 ppm 내지 약 1,000 ppm, 약 200 ppm 내지 약 800 ppm, 약 200 ppm 내지 약 600 ppm, 약 200 ppm 내지 약 500 ppm, 약 200 ppm 내지 약 450 ppm, 약 200 ppm 내지 약 400 ppm, 약 200 ppm 내지 약 350 ppm, 약 200 ppm 내지 약 300 ppm, 약 200 ppm 내지 약 250 ppm, 약 250 ppm 내지 약 5,000 ppm, 약 250 ppm 내지 약 4,500 ppm, 약 250 ppm 내지 약 4,000 ppm, 약 250 ppm 내지 약 3,500 ppm, 약 250 ppm 내지 약 3,000 ppm, 약 250 ppm 내지 약 2,500 ppm, 약 250 ppm 내지 약 2,000 ppm, 약 250 ppm 내지 약 1,500 ppm, 약 250 ppm 내지 약 1,000 ppm, 약 250 ppm 내지 약 800 ppm, 약 250 ppm 내지 약 600 ppm, 약 250 ppm 내지 약 500 ppm, 약 250 ppm 내지 약 450 ppm, 약 250 ppm 내지 약 400 ppm, 약 250 ppm 내지 약 350 ppm, 약 250 ppm 내지 약 300 ppm, 약 300 ppm 내지 약 5,000 ppm, 약 300 ppm 내지 약 4,500 ppm, 약 300 ppm 내지 약 4,000 ppm, 약 300 ppm 내지 약 3,500 ppm, 약 300 ppm 내지 약 3,000 ppm, 약 300 ppm 내지 약 2,500 ppm, 약 300 ppm 내지 약 2,000 ppm, 약 300 ppm 내지 약 1,500 ppm, 약 300 ppm 내지 약 1,000 ppm, 약 300 ppm 내지 약 800 ppm, 약 300 ppm 내지 약 600 ppm, 약 300 ppm 내지 약 500 ppm, 약 300 ppm 내지 약 450 ppm, 약 300 ppm 내지 약 400 ppm, 약 300 ppm 내지 약 350 ppm, 약 350 ppm 내지 약 5,000 ppm, 약 350 ppm 내지 약 4,500 ppm, 약 350 ppm 내지 약 4,000 ppm, 약 350 ppm 내지 약 3,500 ppm, 약 350 ppm 내지 약 3,000 ppm, 약 350 ppm 내지 약 2,500 ppm, 약 350 ppm 내지 약 2,000 ppm, 약 350 ppm 내지 약 1,500 ppm, 약 350 ppm 내지 약 1,000 ppm, 약 350 ppm 내지 약 800 ppm, 약 350 ppm 내지 약 600 ppm, 약 350 ppm 내지 약 500 ppm, 약 350 ppm 내지 약 450 ppm, 약 350 ppm 내지 약 400 ppm, 약 400 ppm 내지 약 5,000 ppm, 약 400 ppm 내지 약 4,500 ppm, 약 400 ppm 내지 약 4,000 ppm, 약 400 ppm 내지 약 3,500 ppm, 약 400 ppm 내지 약 3,000 ppm, 약 400 ppm 내지 약 2,500 ppm, 약 400 ppm 내지 약 2,000 ppm, 약 400 ppm 내지 약 1,500 ppm, 약 400 ppm 내지 약 1,000 ppm, 약 400 ppm 내지 약 800 ppm, 약 400 ppm 내지 약 600 ppm, 약 400 ppm 내지 약 500 ppm, 약 400 ppm 내지 약 450 ppm, 약 450 ppm 내지 약 5,000 ppm, 약 450 ppm 내지 약 4,500 ppm, 약 450 ppm 내지 약 4,000 ppm, 약 450 ppm 내지 약 3,500 ppm, 약 450 ppm 내지 약 3,000 ppm, 약 450 ppm 내지 약 2,500 ppm, 약 450 ppm 내지 약 2,000 ppm, 약 450 ppm 내지 약 1,500 ppm, 약 450 ppm 내지 약 1,000 ppm, 약 450 ppm 내지 약 800 ppm, 약 450 ppm 내지 약 600 ppm, 약 450 ppm 내지 약 500 ppm, 약 500 ppm 내지 약 5,000 ppm, 약 500 ppm 내지 약 4,500 ppm, 약 500 ppm 내지 약 4,000 ppm, 약 500 ppm 내지 약 3,500 ppm, 약 500 ppm 내지 약 3,000 ppm, 약 500 ppm 내지 약 2,500 ppm, 약 500 ppm 내지 약 2,000 ppm, 약 500 ppm 내지 약 1,500 ppm, 약 500 ppm 내지 약 1,000 ppm, 약 500 ppm 내지 약 800 ppm, 약 500 ppm 내지 약 600 ppm, 약 600 ppm 내지 약 5,000 ppm, 약 600 ppm 내지 약 4,500 ppm, 약 600 ppm 내지 약 4,000 ppm, 약 600 ppm 내지 약 3,500 ppm, 약 600 ppm 내지 약 3,000 ppm, 약 600 ppm 내지 약 2,500 ppm, 약 600 ppm 내지 약 2,000 ppm, 약 600 ppm 내지 약 1,500 ppm, 약 600 ppm 내지 약 1,000 ppm, 약 600 ppm 내지 약 800 ppm, 약 800 ppm 내지 약 5,000 ppm, 약 800 ppm 내지 약 4,500 ppm, 약 800 ppm 내지 약 4,000 ppm, 약 800 ppm 내지 약 3,500 ppm, 약 800 ppm 내지 약 3,000 ppm, 약 800 ppm 내지 약 2,500 ppm, 약 800 ppm 내지 약 2,000 ppm, 약 800 ppm 내지 약 1,500 ppm, 약 800 ppm 내지 약 1,000 ppm, 약 1,000 ppm 내지 약 5,000 ppm, 약 1,000 ppm 내지 약 4,500 ppm, 약 1,000 ppm 내지 약 4,000 ppm, 약 1,000 ppm 내지 약 3,500 ppm, 약 1,000 ppm 내지 약 3,000 ppm, 약 1,000 ppm 내지 약 2,500 ppm, 약 1,000 ppm 내지 약 2,000 ppm, 약 1,000 ppm 내지 약 1,500 ppm, 약 1,500 ppm 내지 약 5,000 ppm, 약 1,500 ppm 내지 약 4,500 ppm, 약 1,500 ppm 내지 약 4,000 ppm, 약 1,500 ppm 내지 약 3,500 ppm, 약 1,500 ppm 내지 약 3,000 ppm, 약 1,500 ppm 내지 약 2,500 ppm, 약 1,500 ppm 내지 약 2,000 ppm, 약 2,000 ppm 내지 약 5,000 ppm, 약 2,000 ppm 내지 약 4,500 ppm, 약 2,000 ppm 내지 약 4,000 ppm, 약 2,000 ppm 내지 약 3,500 ppm, 약 2,000 ppm 내지 약 3,000 ppm, 약 2,000 ppm 내지 약 2,500 ppm, 약 2,500 ppm 내지 약 5,000 ppm, 약 2,500 ppm 내지 약 4,500 ppm, 약 2,500 ppm 내지 약 4,000 ppm, 약 2,500 ppm 내지 약 3,500 ppm, 약 2,500 ppm 내지 약 3,000 ppm, 약 3,000 ppm 내지 약 5,000 ppm, 약 3,000 ppm 내지 약 4,500 ppm, 약 3,000 ppm 내지 약 4,000 ppm, 약 3,000 ppm 내지 약 3,500 ppm, 약 3,500 ppm 내지 약 5,000 ppm, 약 3,500 ppm 내지 약 4,500 ppm, 약 3,500 ppm 내지 약 4,000 ppm, 약 4,000 ppm 내지 약 5,000 ppm, 약 4,000 ppm 내지 약 4,500 ppm, 또는 약 4,500 ppm 내지 약 5,000 ppm의 민감제(예를 들어, 소포제, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 소포제) 농도를 가질 수 있다 (여기서 민감제는 시험 배양 용기에 배치된 액체 배양 배지에, 예를 들어 배양이 진행되는 기간 동안 존재한다).

[0143]

일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 약 1 g/L 내지 약 10 g/L(예를 들어, 약 2 g/L 내지 약 8 g/L, 약 3 g/L 내지 약 7 g/L, 약 4 g/L 내지 약 6 g/L, 또는 약 5 g/L)인 보호제 농도를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 약 1.0 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 1.0 g/L 내지 약 9.5 g/L, 약 1.0 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 1.0 g/L 내지 약 8.5 g/L, 약 1.0 g/L 내지 약 8.0 g/L, 약 1.0 g/L 내지 약 7.5 g/L, 약 1.0 g/L 내지 약 7.0 g/L, 약 1.0 g/L 내지 약 6.5 g/L, 약 1.0 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 1.0 g/L 내지 약 5.5 g/L, 약 1.0 g/L 내지 약 5.0 g/L, 약 1.0 g/L 내지 약 4.5 g/L, 약 1.0 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 1.0 g/L 내지 약 3.5 g/L, 약 1.0 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 1.0 g/L 내지 약 2.5 g/L, 약 1.0 g/L 내지 약 2.0 g/L, 약 1.0 g/L 내지 약 1.5 g/L, 약 1.5 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 1.5 g/L 내지 약 9.5 g/L, 약 1.5 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 1.5 g/L 내지 약 8.5 g/L, 약 1.5 g/L 내지 약 8.0 g/L, 약 1.5 g/L 내지 약 7.5 g/L, 약 1.5 g/L 내지 약 7.0 g/L, 약 1.5 g/L 내지 약 6.5 g/L, 약 1.5 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 1.5 g/L 내지 약 5.5 g/L, 약 1.5 g/L 내지 약 5.0 g/L, 약 1.5 g/L 내지 약 4.5 g/L, 약 1.5 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 1.5 g/L 내지 약 3.5 g/L, 약 1.5 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 1.5 g/L 내지 약 2.5 g/L, 약 1.5 g/L 내지 약 2.0 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 9.5 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 8.5 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 8.0 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 7.5 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 7.0 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 6.5 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 5.5 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 5.0 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 4.5 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 3.5 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 2.5 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 9.5 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 8.5 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 8.0 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 7.5 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 7.0 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 6.5 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 5.5 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 5.0 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 4.5 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 3.5 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 9.5 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 8.5 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 8.0 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 7.5 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 7.0 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 6.5 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 5.5 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 5.0 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 4.5 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 3.5 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 9.5 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 8.5 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 8.0 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 7.5 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 7.0 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 6.5 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 5.5 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 5.0 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 4.5 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 4.0 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 4.0 g/L 내지 약 9.5 g/L, 약 4.0 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 4.0 g/L 내지 약 8.5 g/L, 약 4.0 g/L 내지 약 8.0 g/L, 약 4.0 g/L 내지 약 7.5 g/L, 약 4.0 g/L 내지 약 7.0 g/L, 약 4.0 g/L 내지 약 6.5 g/L, 약 4.0 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 4.0 g/L 내지 약 5.5 g/L, 약 4.0 g/L 내지 약 5.0 g/L, 약 4.0 g/L 내지 약 4.5 g/L, 약 4.5 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 4.5 g/L 내지 약 9.5 g/L, 약 4.5 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 4.5 g/L 내지 약 8.5 g/L, 약 4.5 g/L 내지 약 8.0 g/L, 약 4.5 g/L 내지 약 7.5 g/L, 약 4.5 g/L 내지 약 7.0 g/L, 약 4.5 g/L 내지 약 6.5 g/L, 약 4.5 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 4.5 g/L 내지 약 5.5 g/L, 약 4.5 g/L 내지 약 5.0 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 9.5 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 8.5 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 8.0 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 7.5 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 7.0 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 6.5 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 5.5 g/L, 약 5.5 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 5.5 g/L 내지 약 9.5 g/L, 약 5.5 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 5.5 g/L 내지 약 8.5 g/L, 약 5.5 g/L 내지 약 8.0 g/L, 약 5.5 g/L 내지 약 7.5 g/L, 약 5.5 g/L 내지 약 7.0 g/L, 약 5.5 g/L 내지 약 6.5 g/L, 약 5.5 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 6.0 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 6.0 g/L 내지 약 9.5 g/L, 약 6.0 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 6.0 g/L 내지 약 8.5 g/L, 약 6.0 g/L 내지 약 8.0 g/L, 약 6.0 g/L 내지 약 7.5 g/L, 약 6.0 g/L 내지 약 7.0 g/L, 약 6.0 g/L 내지 약 6.5 g/L, 약 6.5 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 6.5 g/L 내지 약 9.5 g/L, 약 6.5 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 6.5 g/L 내지 약 8.5 g/L, 약 6.5 g/L 내지 약 8.0 g/L, 약 6.5 g/L 내지 약 7.5 g/L, 약 6.5 g/L 내지 약 7.0 g/L, 약 7.0 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 7.0 g/L 내지 약 9.5 g/L, 약 7.0 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 7.0 g/L 내지 약 8.5 g/L, 약 7.0 g/L 내지 약 8.0 g/L, 약 7.0 g/L 내지 약 7.5 g/L, 약 7.5 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 7.5 g/L 내지 약 9.5 g/L, 약 7.5 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 7.5 g/L 내지 약 8.5 g/L, 약 7.5 g/L 내지 약 8.0 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 9.5 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 8.5 g/L, 약 8.5 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 8.5 g/L 내지 약 9.5 g/L, 약 8.5 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 9.0 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 9.0 g/L 내지 약 9.5 g/L, 또는 약 9.5 g/L 내지 약 10.0 g/L의 보호제(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 보호제) 농도를 가질 수 있다(여기서

보호제는 시험 배양 용기에 배치된 액체 배양 배지에, 예를 들어 배양이 진행되는 기간 동안 존재한다).

[0144]

생산용 생물 반응기는 관류 생물 반응기, 유가식 생물 반응기, 또는 농축 유가식 생물 반응기일 수 있다. 일부 구현예에서, 생산용 생물 반응기는 부피가 약 5 L 내지 약 20,000 L (예를 들어, 약 50 L 내지 약 10,000 L)일 수 있다. 일부 구현예에서, 생산용 생물 반응기는 부피가 5 L 초과, 10 L 초과, 50 L 초과, 100 L 초과, 1000 L 초과, 2000 L 초과, 5000 L 초과, 20000 L 초과, 100000 L 초과, 또는 150000 L 초과 (예를 들어, 1000 L 초과)일 수 있다. 일부 구현예에서, 생산용 생물 반응기는 부피가 약 5 L 내지 약 20,000 L, 약 5 L 내지 약 18,000 L, 약 5 L 내지 약 16,000 L, 약 5 L 내지 약 14,000 L, 약 5 L 내지 약 12,000 L, 약 5 L 내지 약 10,000 L, 약 5 L 내지 약 9,500 L, 약 5 L 내지 약 9,000 L, 약 5 L 내지 약 8,500 L, 약 5 L 내지 약 8,000 L, 약 5 L 내지 약 7,500 L, 약 5 L 내지 약 7,000 L, 약 5 L 내지 약 6,500 L, 약 5 L 내지 약 6,000 L, 약 5 L 내지 약 5,500 L, 약 5 L 내지 약 5,000 L, 약 5 L 내지 약 4,500 L, 약 5 L 내지 약 4,000 L, 약 5 L 내지 약 3,500 L, 약 5 L 내지 약 3,000 L, 약 5 L 내지 약 2,500 L, 약 5 L 내지 약 2,000 L, 약 5 L 내지 약 1,500 L, 약 5 L 내지 약 1,000 L, 약 5 L 내지 약 900 L, 약 5 L 내지 약 800 L, 약 5 L 내지 약 700 L, 약 5 L 내지 약 600 L, 약 5 L 내지 약 500 L, 약 5 L 내지 약 400 L, 약 5 L 내지 약 300 L, 약 5 L 내지 약 250 L, 약 5 L 내지 약 200 L, 약 5 L 내지 약 150 L, 약 5 L 내지 약 100 L, 약 5 L 내지 약 80 L, 약 5 L 내지 약 60 L, 약 5 L 내지 약 50 L, 약 5 L 내지 약 25 L, 약 5 L 내지 약 10 L, 약 10 L 내지 약 20,000 L, 약 10 L 내지 약 18,000 L, 약 10 L 내지 약 16,000 L, 약 10 L 내지 약 14,000 L, 약 10 L 내지 약 12,000 L, 약 10 L 내지 약 10,000 L, 약 10 L 내지 약 9,500 L, 약 10 L 내지 약 9,000 L, 약 10 L 내지 약 8,500 L, 약 10 L 내지 약 8,000 L, 약 10 L 내지 약 7,500 L, 약 10 L 내지 약 7,000 L, 약 10 L 내지 약 6,500 L, 약 10 L 내지 약 6,000 L, 약 10 L 내지 약 5,500 L, 약 10 L 내지 약 5,000 L, 약 10 L 내지 약 4,500 L, 약 10 L 내지 약 4,000 L, 약 10 L 내지 약 3,500 L, 약 10 L 내지 약 3,000 L, 약 10 L 내지 약 2,500 L, 약 10 L 내지 약 2,000 L, 약 10 L 내지 약 1,500 L, 약 10 L 내지 약 1,000 L, 약 10 L 내지 약 900 L, 약 10 L 내지 약 800 L, 약 10 L 내지 약 700 L, 약 10 L 내지 약 600 L, 약 10 L 내지 약 500 L, 약 10 L 내지 약 400 L, 약 10 L 내지 약 300 L, 약 10 L 내지 약 250 L, 약 10 L 내지 약 200 L, 약 10 L 내지 약 150 L, 약 10 L 내지 약 100 L, 약 10 L 내지 약 80 L, 약 10 L 내지 약 60 L, 약 10 L 내지 약 50 L, 약 10 L 내지 약 25 L, 약 25 L 내지 약 20,000 L, 약 25 L 내지 약 18,000 L, 약 25 L 내지 약 16,000 L, 약 25 L 내지 약 14,000 L, 약 25 L 내지 약 12,000 L, 약 25 L 내지 약 10,000 L, 약 25 L 내지 약 9,500 L, 약 25 L 내지 약 9,000 L, 약 25 L 내지 약 8,500 L, 약 25 L 내지 약 8,000 L, 약 25 L 내지 약 7,500 L, 약 25 L 내지 약 7,000 L, 약 25 L 내지 약 6,500 L, 약 25 L 내지 약 6,000 L, 약 25 L 내지 약 5,500 L, 약 25 L 내지 약 5,000 L, 약 25 L 내지 약 4,500 L, 약 25 L 내지 약 4,000 L, 약 25 L 내지 약 3,500 L, 약 25 L 내지 약 3,000 L, 약 25 L 내지 약 2,500 L, 약 25 L 내지 약 2,000 L, 약 25 L 내지 약 1,500 L, 약 25 L 내지 약 1,000 L, 약 25 L 내지 약 900 L, 약 25 L 내지 약 800 L, 약 25 L 내지 약 700 L, 약 25 L 내지 약 600 L, 약 25 L 내지 약 500 L, 약 25 L 내지 약 400 L, 약 25 L 내지 약 300 L, 약 25 L 내지 약 250 L, 약 25 L 내지 약 200 L, 약 25 L 내지 약 150 L, 약 25 L 내지 약 100 L, 약 25 L 내지 약 80 L, 약 25 L 내지 약 60 L, 약 25 L 내지 약 50 L, 약 50 L 내지 약 20,000 L, 약 50 L 내지 약 18,000 L, 약 50 L 내지 약 16,000 L, 약 50 L 내지 약 14,000 L, 약 50 L 내지 약 12,000 L, 약 50 L 내지 약 10,000 L, 약 50 L 내지 약 9,500 L, 약 50 L 내지 약 9,000 L, 약 50 L 내지 약 8,500 L, 약 50 L 내지 약 8,000 L, 약 50 L 내지 약 7,500 L, 약 50 L 내지 약 7,000 L, 약 50 L 내지 약 6,500 L, 약 50 L 내지 약 6,000 L, 약 50 L 내지 약 5,500 L, 약 50 L 내지 약 5,000 L, 약 50 L 내지 약 4,500 L, 약 50 L 내지 약 4,000 L, 약 50 L 내지 약 3,500 L, 약 50 L 내지 약 3,000 L, 약 50 L 내지 약 2,500 L, 약 50 L 내지 약 2,000 L, 약 50 L 내지 약 1,500 L, 약 50 L 내지 약 1,000 L, 약 50 L 내지 약 900 L, 약 50 L 내지 약 800 L, 약 50 L 내지 약 700 L, 약 50 L 내지 약 600 L, 약 50 L 내지 약 500 L, 약 50 L 내지 약 400 L, 약 50 L 내지 약 300 L, 약 50 L 내지 약 250 L, 약 50 L 내지 약 200 L, 약 50 L 내지 약 150 L, 약 50 L 내지 약 100 L, 약 50 L 내지 약 80 L, 약 50 L 내지 약 60 L, 약 60 L 내지 약 20,000 L, 약 60 L 내지 약 18,000 L, 약 60 L 내지 약 16,000 L, 약 60 L 내지 약 14,000 L, 약 60 L 내지 약 12,000 L, 약 60 L 내지 약 10,000 L, 약 60 L 내지 약 9,500 L, 약 60 L 내지 약 9,000 L, 약 60 L 내지 약 8,500 L, 약 60 L 내지 약 8,000 L, 약 60 L 내지 약 7,500 L, 약 60 L 내지 약 7,000 L, 약 60 L 내지 약 6,500 L, 약 60 L 내지 약 6,000 L, 약 60 L 내지 약 5,500 L, 약 60 L 내지 약 5,000 L, 약 60 L 내지 약 4,500 L, 약 60 L 내지 약 4,000 L, 약 60 L 내지 약 3,500 L, 약 60 L 내지 약 3,000 L, 약 60 L 내지 약 2,500 L, 약 60 L 내지 약 2,000 L, 약 60 L 내지 약 1,500 L, 약 60 L 내지 약 1,000 L, 약 60 L 내지 약 900 L, 약 60 L 내지 약 800 L, 약 60 L 내지 약 700 L, 약 60 L 내지 약 600 L, 약 60 L 내지 약 500 L, 약 60 L 내지 약 400 L, 약 60 L 내지 약 300 L, 약 60 L 내지 약 250 L, 약 60 L 내지 약 200 L, 약 60 L 내지 약 150 L, 약 60 L 내지 약 100

8,000 L 내지 약 18,000 L, 약 8,000 L 내지 약 16,000 L, 약 8,000 L 내지 약 14,000 L, 약 8,000 L 내지 약 12,000 L, 약 8,000 L 내지 약 10,000 L, 약 8,000 L 내지 약 9,500 L, 약 8,000 L 내지 약 9,000 L, 약 8,000 L 내지 약 8,500 L, 약 8,500 L 내지 약 20,000 L, 약 8,500 L 내지 약 18,000 L, 약 8,500 L 내지 약 16,000 L, 약 8,500 L 내지 약 14,000 L, 약 8,500 L 내지 약 12,000 L, 약 8,500 L 내지 약 10,000 L, 약 8,500 L 내지 약 9,500 L, 약 8,500 L 내지 약 9,000 L, 약 9,000 L 내지 약 20,000 L, 약 9,000 L 내지 약 18,000 L, 약 9,000 L 내지 약 16,000 L, 약 9,000 L 내지 약 14,000 L, 약 9,000 L 내지 약 12,000 L, 약 9,000 L 내지 약 10,000 L, 약 9,000 L 내지 약 9,500 L, 약 9,500 L 내지 약 20,000 L, 약 9,500 L 내지 약 18,000 L, 약 9,500 L 내지 약 16,000 L, 약 9,500 L 내지 약 14,000 L, 약 9,500 L 내지 약 12,000 L, 약 9,500 L 내지 약 10,000 L, 약 10,000 L 내지 약 20,000 L, 약 10,000 L 내지 약 18,000 L, 약 10,000 L 내지 약 16,000 L, 약 10,000 L 내지 약 14,000 L, 약 10,000 L 내지 약 12,000 L, 약 12,000 L 내지 약 20,000 L, 약 12,000 L 내지 약 18,000 L, 약 12,000 L 내지 약 16,000 L, 약 12,000 L 내지 약 14,000 L, 약 14,000 L 내지 약 20,000 L, 약 14,000 L 내지 약 18,000 L, 약 14,000 L 내지 약 16,000 L, 약 16,000 L 내지 약 20,000 L, 약 16,000 L 내지 약 18,000 L, 또는 약 18,000 L 내지 약 20,000 L 일 수 있다.

[0145] 일부 구현예에서, 작업 매개 변수는 세포 생존력 또는 세포 사멸과 관련된 임의의 매개 변수(예를 들어, 전단 응력, 민감제 농도, 보호제 농도, 온도, pH, 영양분 조성, 바이오매스 로딩 및 공급 전략)일 수 있다. 세포 생존력 또는 세포 사멸물은 젖산 탈수소효소(LDH)를 발현할 수 있는 세포를 사용하여 측정될 수 있다. LDH를 발현할 수 있는 세포가 사멸할 때, 세포 내의 LDH가 액체 배양 배지로 방출된다. 따라서, 세포 생존력 또는 세포 사멸물은 LDH와 직교하여 측정될 수 있으며 비LDH 생산량(sLDH_p)에 비례한다(도 3).

[0146] 도 4는 플루로닉(예를 들어, 보호제), 민감제, 및 전단(예를 들어, 교반)이 비LDH 생산량에 어떻게 영향을 미칠 수 있는지를 보여준다. 도 4에 도시된 바와 같이, 보호제는 세포-기포 부착을 감소시키고 세포 내구성을 증가시킴으로써 높은 세포 생존력을 유지하고 세포를 사멸로부터 보호할 수 있다. 대조적으로, 민감제는 세포-기포 부착을 증가시키고 세포 내구성을 감소시킴으로써 세포 생존력을 감소시킬 수 있다. 이들 매개 변수가 서로 연결되어 있기 때문에, 전통적인 모델에 의해 민감제, 교반, 및/또는 보호제의 정확한 효과를 예측하기가 종종 매우 어렵다.

[0147] 도 5는 소규모 모델에서의 비LDH 생산량이 민감제 농도, 보호제 농도, 및 교반의 함수임을 보여준다. 매개 변수 간의 상호 작용으로 인해, 비LDH 생산량은 일반적으로 이들 매개 변수 중 임의의 것과 선형 관계를 갖지 않는다. 비LDH 생산량에 대한 이러한 매개 변수의 효과는 요인 설계, 예를 들어, 완전 요인 설계, 또는 부분 요인 설계에 의해 결정될 수 있다.

[0148] 요인 설계는 일련의 조건 하에서 실험을 수행하는 것을 포함하고, 조건은 일련의 매개 변수(예를 들어, 작업 매개 변수)에 의해 규정된다. 일련의 조건에서, 각각의 매개 변수는 둘 이상의 레벨을 가질 수 있다. 요인 설계의 목적은 다양한 매개 변수(예를 들어, 민감제 농도, 보호제 농도, 및 교반) 간의 주된 효과 및 상호 작용 효과를 연구하는 것이다. 용어 "완전 요인 설계"는 모든 매개 변수에 걸쳐 서로 다른 레벨의 가능한 모든 조합을 포함하는 실험 설계를 지칭한다. 예를 들어, 각각 2가지 레벨을 취하는 3개의 매개 변수(즉, 요인)의 경우, 완전 요인 설계는 총 8개의 조합을 가질 것이며, 이는 일반적으로 2³ 요인 설계라 일컬어진다(도 6). 대조적으로, 용어 "부분 요인 설계"는 완전 요인 설계의 실험 실행 중 신중하게 선택된 부분 집합(일부)으로 구성된 실험 설계를 지칭한다. 부분 집합은, 실험 실행 및 리소스 측면에서 완전 요인 설계의 노력의 일부를 사용하면서 연구되는 문제의 가장 중요한 특징에 관한 정보를 노출시키기 위해 효과 회소성 원칙을 이용하도록 선택된다. 요인 설계를 수행함으로써, 작업 불가능 영역(예를 들어, 작업을 실패하게 만드는 매개 변수 값의 조합)이 확인될 수 있다. 요인 설계는 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어, 문헌[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], 문헌[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], 및 문헌[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]에 기재되어 있고, 이들 문헌 각각은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

[0149] 전형적인 요인 설계에서, 중심점(예를 들어, 관심 영역)은 종종 불량하게 예측된다. 따라서, 일부 구현예에서, 요인 설계는 중심 합성 설계(예를 들어, 내접 중심 합성 설계, 외접 중심 합성 설계, 또는 면 중심 합성 설계)와 조합하여 사용될 수 있다(도 7). 중심 합성 설계는 곡률의 추정을 가능하게 하는 일단의 축 지점이 보장된

중심점이 있는 내재 요인 또는 부분 요인 설계를 포함하는 실험 설계이다. 합성 설계는 당업계에 알려져 있고, 중심 합성 설계에 관한 상세한 설명은, 예를 들어, 문헌[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] 및 문헌[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]에서 찾을 수 있으며, 이들 문헌 각각은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

- [0150] 일부 구현예에서, 시험 조건은 완전 요인 스크리닝 및 중심 합성 설계(예를 들어, 내접 중심 합성 설계)에 기초하여 선택된다. 완전 요인 스크리닝과 중심 합성 설계를 결합함으로써, 선택된 시험 조건은 관심 영역을 최대화하고 잠재적 실패 영역을 최소화할 수 있다(도 8 및 도 9).
- [0151] 시험 배양 용기에서의 이들 시험 조건의 실험 결과는 선택된 매개 변수들 간의 관계를 나타내는 추정 윤곽(estimated contour)을 제공한다. 일단 소규모 모델의 윤곽이 결정되면, 누락된 값을 예측하기 위해 소규모 모델이 사용될 수 있다. 예를 들어, 소포제 농도 또는 전단 응력을 아는 경우, 작업에 필요한 플루로닉의 양을 예측할 수 있다. 이 관계는 다양한 규모(예를 들어, 소규모, 벤치탑, 생산 등)에 걸쳐 세포 성장률과 사멸률을 상호 관련시킴으로써 결정된다.
- [0152] 일부 구현예에서, 소규모 모델의 추정 윤곽은 상이한 규모(예를 들어, 생산 규모)에서 수집된 데이터 포인트들을 일치시키는 데 사용될 수 있다. 감광제와 보호제 농도가 알려져 있기 때문에, 윤곽으로부터 생산용 생물 반응기에서의 전단 응력에 상응하는 소규모 모델에서의 전단 응력을 결정하는 것이 가능하다(도 10). 생산용 생물 반응기에서의 전단 응력에 상응하는 전단 응력 및 민감제 농도에 기초하여, 보호제 농도 변경(Δ [보호제])의 효과가 추정 윤곽으로부터 결정될 수 있다(도 11). 예를 들어, 도 11에 도시된 바와 같이, 맨 왼쪽 지점(원), 왼쪽 중앙 지점(원), 오른쪽 중앙 지점(원), 및 맨 오른쪽 지점(원)은 모두 동일한 전단 응력 및 민감제 농도를 갖는다. 음영 영역은 작업 불가능 공간이다. 보호제 농도를 (오른쪽 중앙 지점(원))으로부터 맨 오른쪽 지점(원)까지(이 두 지점 사이에 화살표가 표시되어 있음)) 증가시킴으로써, 허용 가능한 민감제 농도 범위가 증가하여 민감제에 대한 탄력성을 더 좋게 한다.
- [0153] 따라서, 일부 구현예에서, 본 명세서에 설명된 바와 같은 모델은 다양한 매개 변수 간의 상호 작용 효과를 결정하는 데 사용될 수 있다. 전통적인 모델은 일반적으로 각각의 매개 변수의 효과를 개별적으로 연구한다. 본 명세서에 설명된 바와 같은 모델은 각각 매개 변수의 효과를 개별적으로 연구하는 것이 아니라 3개의 매개 변수의 효과를 한꺼번에 연구할 수 있다. 따라서, 이러한 본 명세서에 설명된 모델은 임의의 단일 매개 변수가 변경될 경우 예상되는 세포 배양 성능이 어디에 있을지 예측할 수 있다.
- [0154] 더욱이, 그러한 전통적인 스케일-업 매개 변수는 일반적으로 세포 배양 성능 예측을 제공하지 않는다. 본 명세서에 설명된 모델은 더 나은 지침으로 작업 범위를 예측할 수 있어 생산 규모로 옮겨질 때 실패 가능성을 낮추며, 일단 다른 전통적인 매개 변수(P/V, 팁 속도, 혼합 시간, $K_L a$)가 충족되면 스케일 업할 수 있는 기능을 제공한다.
- [0155] 일부 다른 구현예에서, 본 명세서에 설명된 바와 같은 모델은 임의의 개별 매개 변수 또는 매개 변수들의 조합(예를 들어, 플루로닉, 소포제, 및 전단)을 고려하여 임의의 규모에서 반응기에 대한 작업 설계 공간을 확립하는 데 사용될 수 있다. 모델은, 주어진 전단 조건에 대해 실패 전에 세포 배양물이 견딜 수 있는 소포제의 최대량을 결정하는 데 사용될 수 있다.
- [0156] 일부 구현예에서, 모델은, 주어진 전단 조건에 대해 플루로닉 농도가 그의 효능을 상실하기 전에 지속할 수 있는 소포제의 최대량을 결정하는 데 사용될 수 있다.
- [0157] 일부 구현예에서, 모델은 상이한 플루로닉에 대해 다양한 유형의 소포제(소포제 C, 오토클레이빙된 소포제, 조사된(irradiated) 소포제 등)를 시험하는 데 사용될 수 있다.
- [0158] 일부 구현예에서, 모델은 세포-밀도-범위 독립적일 수 있으며, 규모에 걸쳐 정규화하기 위해 LDH를 사용하기 때문에 강화된 관류 배양에만 적용될 필요가 없다.
- [0159] 일부 구현예에서, 모델은 또한 절대 첨가(시작 시 1회 볼루스(bolus)) 또는 매일 첨가로 소포제 농도를 시험할 수 있다.
- [0160] 일부 구현예에서, 모델은 소포제 비활성화 이면의 속도론 및 세포 배양에 미치는 그의 영향을 시험하는 데 사용

될 수 있다.

- [0161] **세포**
- [0162] 본원에 제공된 방법은 여러 다양한 세포(예를 들어, 포유 동물 세포, 박테리아 세포, 및 효모 세포)를 배양하는 데 사용될 수 있다.
- [0163] 박테리아 세포의 비제한적 예에는 대장균(*E. coli*), 클로스트리디움 디피실(*Clostridium difficile*), 클로스트리디움 스포로게네스(*Clostridium sporogenes*), 클로스트리디움 베이저링키(*Clostridium beijerinckii*), 및 클로스트리디움 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*)이 포함된다. 본 명세서에 기술된 임의의 방법에 사용될 수 있는 예시적인 상업적으로 이용 가능한 박테리아 세포에는 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), 및 Artic Express(DE3)(Agilent Technologies)가 포함된다.
- [0164] 효모 세포의 비제한적 예에는 에스. 세레비시아에(*S. cerevisiae*), 에스. 엑시구스(*S. exiguus*), 및 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)가 포함된다. 본 명세서에 기술된 임의의 방법에 사용될 수 있는 효모 세포의 추가의 예에는 사카로마이세스(*Saccharomyces*) 속, 피키아(*Pichia*) 속, 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 속, 한센울라(*Hansenula*) 속, 및 야로위아(*Yarrowia*) 속의 것들이 포함된다. 본 명세서에 기술된 임의의 방법에 사용될 수 있는 효모 세포의 추가의 예는 문헌[Nielsen, *Methods in Enzymology* 536:133-147, 2014]에 기재되어 있다.
- [0165] 본 명세서에 기술된 임의의 방법을 사용하여 배양될 수 있는 포유 동물 세포의 비제한적 예에는 다음이 포함된다: 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포(예를 들어, CHO DG44 세포, CHO-K1s 세포, 및 CHO-DXB11 세포), Sp2.0, 골수종 세포(예를 들어, NS/0), B-세포, 하이브리도마 세포, T-세포, 인간 배아 신장(HEK) 세포(예를 들어, HEK 293E 및 HEK 293F), 아프리카 녹색 원숭이 신장 상피 세포(Vero) 세포, 및 Madin-Darby Canine(Cocker Spaniel) 신장 상피 세포(MDCK) 세포. 본 명세서에 기술된 방법을 사용하여 배양될 수 있는 추가의 포유 동물 세포는 당업계에 알려져 있다. 본 명세서에 기재된 임의의 방법의 비제한적인 예에서, 배양 시작 시점에 시험 배양 용기 및/또는 생산용 생물 반응기에 존재하는 포유 동물 세포의 농도는 약 0.1×10^6 개 세포/mL 내지 약 10×10^6 개 세포/mL이다 (예를 들어, 약 0.1×10^6 개 세포/mL 내지 약 9×10^6 개 세포/mL, 약 0.1×10^6 개 세포/mL 내지 약 8×10^6 개 세포/mL, 약 0.1×10^6 개 세포/mL 내지 약 7×10^6 개 세포/mL, 약 0.1×10^6 개 세포/mL 내지 약 6×10^6 개 세포/mL, 약 0.1×10^6 개 세포/mL 내지 약 5×10^6 개 세포/mL, 약 0.1×10^6 개 세포/mL 내지 약 4×10^6 개 세포/mL, 약 0.1×10^6 개 세포/mL 내지 약 3×10^6 개 세포/mL, 약 0.1×10^6 개 세포/mL 내지 약 2×10^6 개 세포/mL, 약 0.1×10^6 개 세포/mL 내지 약 1.5×10^6 개 세포/mL, 약 0.1×10^6 개 세포/mL 내지 약 1.0×10^6 개 세포/mL, 약 0.1×10^6 개 세포/mL 내지 약 0.8×10^6 개 세포/mL, 약 0.1×10^6 개 세포/mL 내지 약 0.5×10^6 개 세포/mL, 약 0.1×10^6 개 세포/mL 내지 약 0.3×10^6 개 세포/mL, 약 0.2×10^6 개 세포/mL 내지 약 10×10^6 개 세포/mL, 약 0.2×10^6 개 세포/mL 내지 약 9×10^6 개 세포/mL, 약 0.2×10^6 개 세포/mL 내지 약 8×10^6 개 세포/mL, 약 0.2×10^6 개 세포/mL 내지 약 7×10^6 개 세포/mL, 약 0.2×10^6 개 세포/mL 내지 약 6×10^6 개 세포/mL, 약 0.2×10^6 개 세포/mL 내지 약 5×10^6 개 세포/mL, 약 0.2×10^6 개 세포/mL 내지 약 4×10^6 개 세포/mL, 약 0.2×10^6 개 세포/mL 내지 약 3×10^6 개 세포/mL, 약 0.2×10^6 개 세포/mL 내지 약 2×10^6 개 세포/mL, 약 0.2×10^6 개 세포/mL 내지 약 1.5×10^6 개 세포/mL, 약 0.2×10^6 개 세포/mL 내지 약 1.0×10^6 개 세포/mL, 약 0.2×10^6 개 세포/mL 내지 약 0.8×10^6 개 세포/mL, 약 0.2×10^6 개 세포/mL 내지 약 0.5×10^6 개 세포/mL, 약 0.3×10^6 개 세포/mL 내지 약 10×10^6 개 세포/mL, 약 0.3×10^6 개 세포/mL 내지 약 9×10^6 개 세포/mL, 약 0.3×10^6 개 세포/mL 내지 약 8×10^6 개 세포/mL, 약 0.3×10^6 개 세포/mL 내지 약 7×10^6 개 세포/mL, 약 0.3×10^6 개 세포/mL 내지 약 6×10^6 개 세포/mL, 약 0.3×10^6 개 세포/mL 내지 약 5×10^6 개 세포/mL, 약 0.3×10^6 개 세

10^6 개 세포/mL 내지 약 7×10^6 개 세포/mL, 약 7×10^6 개 세포/mL 내지 약 10×10^6 개 세포/mL, 약 7×10^6 개 세포/mL 내지 약 9×10^6 개 세포/mL, 약 7×10^6 개 세포/mL 내지 약 8×10^6 개 세포/mL, 약 8×10^6 개 세포/mL 내지 약 10×10^6 개 세포/mL, 약 8×10^6 개 세포/mL 내지 약 9×10^6 개 세포/mL, 또는 약 9×10^6 개 세포/mL 내지 약 10×10^6 개 세포/mL).

[0166] 세포(예를 들어, 포유 동물 세포)는 재조합 치료 단백질(예를 들어, 세포에 의해 분비되는 재조합 치료 단백질)을 인코딩하는 재조합 핵산(예를 들어, 세포의 게놈에 안정적으로 통합된 핵산)을 함유할 수 있다. 재조합 치료 단백질의 비제한적 예는 본 명세서에 기재되어 있으며 당업계에 알려져 있다.

[0167] **재조합 치료 단백질**

[0168] 재조합 치료 단백질은 세포(예를 들어, 포유 동물 세포)에 의해 세포 배양물의 액체 배양 배지로 방출되는 분비된 단백질일 수 있다. 예를 들어, 가용성 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 재조합 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 있는 분비 신호 펩티드를 인코딩하는 서열을 포함할 수 있으며, 이는 세포(예를 들어, 포유 동물 세포)에 존재하는 효소에 의해 절단되고, 이어서 세포 배양물의 액체 배양 배지로 방출된다. 다른 예에서, 재조합 단백질은 분비되지 않는 가용성 단백질이고, 재조합 단백질은 세포(예를 들어, 포유 동물 세포) 내에서 그로부터 회수된다.

[0169] 재조합 단백질의 비제한적 예에는 면역글로불린(경쇄 및 중쇄 면역글로불린을 포함함), 항체, 또는 항체 단편(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 항체 단편), 효소(예를 들어, 갈락토시다제(예를 들어, 알파-갈락토시다제), 미오자임(Myozyme), 또는 세레자임(Cerezyme)), 단백질(예를 들어, 인간 에리트로포이에틴, 종양 괴사 인자(TNF), 또는 인터페론 알파 또는 베타), 또는 면역원성 또는 항원성 단백질 또는 단백질 단편(예를 들어, 백신에 사용하기 위한 단백질)이 포함된다. 일부 구현예에서, 재조합 단백질은 적어도 하나의 다기능성 재조합 단백질 스캐폴드를 함유하는 조작된 항원-결합 폴리펩타이드이다(예를 들어, 문헌[Gebauer et al., *Current Opin. Chem. Biol.* 13:245-255, 2009] 및 미국 특허 출원 공개 번호 2012/0164066(그 전체가 본원에 참고로 포함됨)에 기재된 재조합 항원-결합 단백질을 참조함). 항체인 재조합 단백질의 비제한적 예에는 파니투무맙, 오말리주맙, 아바코보맙, 암식시맙, 악톡수맙, 아달리무맙, 아테카투무맙, 아펠리모맙, 아푸투주맙, 알라시주맙, 알라시주맙, 알렘투주맙, 알리로쿠맙, 알투모맙, 아마톡시맙, 아나투모맙, 아폴리주맙, 아티누맙, 토실리주맙, 바실리지맙, 벡투모맙, 벨리무맙, 베바시주맙, 비시로맙, 카나키누맙, 세톡시맙, 다클리주맙, 덴수맙, 에컬리주맙, 에드레콜로맙, 에팔리주맙, 에편구맙, 에르투막소맙, 에타라시주맙, 골리무맙, 인플릭시맙, 나탈리주맙, 팔리비주맙, 파니투무맙, 퍼투주맙, 라니비주맙, 리톡시맙, 토실리주맙, 및 트라스투주맙이 포함된다. 치료 항체의 추가의 예는 당업계에 알려져 있다. 재조합 단백질의 추가의 비제한적 예에는 알글루코시다아제 알파, 라로니다제, 아바타셉트, 갈실과제, 루트로핀 알파, 항혈우병 인자, 아갈시다제 베타, 인터페론 베타-1a, 다베포에틴 알파, 테베크플라제, 에타너셉트, 응고 인자 IX, 여포 자극 호르몬, 인터페론 베타-1a, 이미글루세라제, 도나아제 알파, 에포에틴 알파, 및 알테플라제가 포함된다.

[0170] 분비된 가용성 재조합 단백질은 액체 배양 배지로부터 회수할 수 있다. 예를 들어, 원심분리, 여과, 피펫팅, 및/또는 흡인을 비롯한 세포(예를 들어, 포유 동물 세포)로부터 액체 배양 배지를 제거하기 위한 여러 다양한 방법이 당업계에 알려져 있다. 이어서 분비된 재조합 단백질은 다양한 유형의 크로마토그래피(예를 들어, 친화도 크로마토그래피, 분자체 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, 또는 음이온 교환 크로마토그래피), 및/또는 여과(예를 들어, 분자량 컷오프 여과)를 비롯한 다양한 생화학적 기법을 이용하여 액체 배양 배지로부터 회수되고 추가로 정제될 수 있다.

[0171] 세포 내 재조합 단백질을 회수하기 위해, 세포(예를 들어, 포유 동물 세포)가 용해될 수 있다. 예를 들어, 초음파처리 및/또는 세제, 효소적, 및/또는 화학적 용해를 비롯한 세포(예를 들어, 포유 동물 세포)를 용해하기 위한 매우 다양한 방법이 당업계에 알려져 있다. 재조합 단백질은, 전형적으로 세포 파편을 제거하기 위한 원심분리 단계로 출발하여 이어서 하나 이상의 추가의 단계(예를 들어, 하나 이상의 유형의 크로마토그래피(예를 들어, 친화도 크로마토그래피, 분자체 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, 또는 음이온 교환 크로마토그래피) 및/또는 여과(예를 들어, 분자량 컷오프 여과))를 수반하는 당업계에 알려진 다양한 생화학적 방법을 이용하여 세포 용해물(예를 들어, 포유 동물 세포 용해물)로부터 정제될 수 있다.

[0172] 일부 구현예에서, 회수된 재조합 단백질은 중량 기준으로 적어도 또는 약 50중량% 순도, 예를 들어, 적어도 또는 약 55 중량% 순도, 적어도 60 중량% 순도, 적어도 65 중량% 순도, 적어도 70 중량% 순도, 적어도 75 중량%

순도, 적어도 80 중량% 순도, 적어도 85 중량% 순도, 적어도 90 중량% 순도, 적어도 95 중량% 순도, 적어도 96 중량% 순도, 적어도 97 중량% 순도, 적어도 98 중량% 순도, 적어도 또는 약 99 중량% 순도, 또는 99 중량% 초과 의 순도이다.

[0173] 일부 구현예에서, 회수된 재조합 단백질은 인간의 동일한 천연 단백질과 비교하여 하나 이상의 상이한 생물물리학적 특성(예를 들어, 글리코실화의 유형 또는 양의 차이, 인산화의 차이, 아실화의 차이, 금속화 또는 금속 화학양론의 차이, 및/또는 보조 인자 결합의 차이)을 갖는 재조합 인간 치료 단백질이다.

[0174] 또한, 본 명세서에 기술된 임의의 방법에 의해 생성된 재조합 치료 단백질이 본원에 제공된다.

[0175] **액체 배양 배지**

[0176] 액체 배양 배지가 당업계에 알려져 있다. 액체 배양 배지는 포유 동물 혈청(예를 들어, 소 태아 혈청 및 소 혈청), 및/또는 성장 호르몬 또는 성장 인자(예를 들어, 인슐린, 트랜스페린, 및 표피 성장 인자)로 보충될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 액체 배양 배지는 화학적으로 규정된 액체 배양 배지, 동물 유래 성분이 없는 액체 배양 배지, 무혈청 액체 배양 배지, 또는 혈청 함유 액체 배양 배지일 수 있다. 화학적으로 규정된 액체 배양 배지, 동물 유래 성분이 없는 액체 배양 배지, 무혈청 액체 배양 배지, 및 혈청 함유 액체 배양 배지의 비제한적 예는 상업적으로 이용 가능하다.

[0177] 액체 배양 배지는 전형적으로 에너지원(예를 들어, 탄수화물, 예컨대 포도당), 필수 아미노산(예를 들어, 20개 아미노산의 기본 세트와 시스테인), 저농도로 요구되는 비타민 및/또는 다른 유기 화합물, 유리 지방산, 및/또는 미량 원소를 함유한다. 액체 배양 배지는, 요망되는 경우, 예를 들어, 포유 동물 호르몬 또는 성장 인자(예를 들어, 인슐린, 트랜스페린, 또는 표피 성장 인자), 염 및 완충제(예를 들어, 칼슘, 마그네슘, 및 포스페이트 염), 뉴클레오사이드 및 염기(예를 들어, 아데노신, 티미딘, 및 하이포크산틴), 단백질 및 조직 가수분해물, 및/또는 이들 또는 그 밖의 첨가제의 임의 조합으로 보충될 수 있다.

[0178] 현재 기술된 방법에서 특히 유용한 액체 배양 배지의 비제한적 예에는, 예를 들어, CD CHO, Opti CHO, 및 Forti CHO(모두 미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재의 Life Technologies로부터 입수 가능함), Hycell CHO 배지(미국 매사추세츠주 월섬 소재의 Thermo Fisher Scientific, Inc.), Ex-cell CD CHO Fusion 배지(미국 미주리주 세인트루이스 소재의 Sigma-Aldrich Co.), 및 PowerCHO 배지(스위스 바젤 소재의 Lonza Group, Ltd.)가 포함된다. 본 방법에서 또한 유용할 수 있는 배지 성분에는 화학적으로 규정된(CD) 가수분해물, 예를 들어, CD 펩톤, CD 폴리펩타이드(2개 이상의 아미노산), 및 CD 성장 인자가 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 액체 조직 배양 배지 및 배지 성분의 추가의 예는 당업계에 알려져 있다.

[0179] **관류 배양**

[0180] 세포의 배양은 관류 배양을 사용하여 수행될 수 있다. 용기에서 세포(예를 들어, 포유 동물 세포)를 관류 배양하는 것은 용기로부터의 제1 액체 배양 배지의 제1 부피(예를 들어, 임의의 농도의 포유 동물 세포를 함유함, 예를 들어, 세포가 실질적으로 없는 제1 액체 배양 배지의 제1 부피)의 제거, 및 제1 액체 배양 배지로의 제2 액체 배양 배지의 제2 부피의 첨가를 포함한다. 제거 및 첨가는 동시에 또는 순차적으로 수행되거나, 둘의 조합으로 수행될 수 있다. 또한, 제거 및 첨가는 연속적으로(예를 들어, 임의의 주어진 기간에 걸쳐(예를 들어, 24 시간의 기간, 약 1시간 내지 약 24시간의 증분 기간에 걸쳐, 또는 24시간 초과 증분 기간에 걸쳐) 용기 부피 또는 제1 액체 배양 배지 부피의 0.1% 내지 800%(예를 들어, 1% 내지 700%, 1% 내지 600%, 1% 내지 500%, 1% 내지 400%, 1% 내지 350%, 1% 내지 300%, 1% 내지 250%, 1% 내지 100%, 100% 내지 200%, 5% 내지 150%, 10% 내지 50%, 15% 내지 40%, 8% 내지 80%, 및 4% 내지 30%)의 부피를 제거하고 대체하는 속도로) 또는 주기적으로(예를 들어, 3일에 1회, 2일에 1회, 하루에 1회, 하루에 2회, 하루에 3회, 하루에 4회, 또는 하루에 5회), 또는 이들의 임의의 조합으로 수행될 수 있다. 주기적으로 수행되는 경우, (예를 들어, 약 24시간의 기간 내에, 약 1시간 내지 약 24시간의 증분 기간 내에, 또는 24시간 초과 증분 기간 내에) 제거되거나 대체되는 부피는, 예를 들어, 용기 부피 또는 제1 액체 배양 배지 부피의 0.1% 내지 800%(예를 들어, 1% 내지 700%, 1% 내지 600%, 1% 내지 500%, 1% 내지 400%, 1% 내지 300%, 1% 내지 200%, 1% 내지 100%, 100% 내지 200%, 5% 내지 150%, 10% 내지 50%, 15% 내지 40%, 8% 내지 80%, 및 4% 내지 30%)일 수 있다. 제거되는 제1 액체 배양 배지의 제1 부피 및 첨가되는 제2 액체 배양 배지의 제2 부피는 일부 경우에 배양 기간의 전체 또는 일부에 걸쳐 각각의 24시간의 기간(또는 대안적으로, 약 1시간 내지 약 24시간의 증분 기간 또는 24시간 초과 증분 기간)에 걸쳐 거의 동일하게 유지될 수 있다. 당업계에 알려진 바와 같이, 제1 액체 배양 배지의 제1 부피가 제거되는 속도(부피/단위 시간) 및 제2 액체 배양 배지의 제2 부피가 첨가되는 속도(부피/단위 시간)는 달라질 수 있다. 제1 액체 배양

배지의 제1 부피가 제거되는 속도(부피/단위 시간)와 제2 액체 배양 배지의 제2 부피가 첨가되는 속도(부피/단위 시간)는 거의 동일할 수 있거나 상이할 수 있다.

[0181] 대안적으로, 제거되고 첨가되는 부피는 배양 기간 동안 각각의 24시간의 기간(또는 대안적으로, 약 1시간 내지 약 24시간의 증분 기간 또는 24시간 초과 증분 기간)에 걸쳐 변경될 수 있다(예를 들어, 점진적으로 증가할 수 있음). 예를 들어, 배양 기간에 걸쳐 각각의 24시간의 기간(또는 대안적으로, 약 1시간 내지 약 24시간의 증분 기간, 또는 24시간 초과 증분 기간) 내에 제거되는 제1 액체 배양 배지의 부피와 첨가되는 제2 액체 배양 배지의 부피는 배양 기간에 걸쳐 용기 부피 또는 제1 액체 배양 배지 부피의 0.5% 내지 약 20%인 부피에서 용기 부피 또는 제1 액체 배양 배지 부피의 약 25% 내지 약 150%까지 (예를 들어, 점진적으로 또는 시차 증분(staggered increment)을 통해) 증가될 수 있다.

[0182] 숙련된 실무자는 제1 액체 배양 배지와 제2 액체 배양 배지가 동일한 유형의 배지일 수 있음을 인식할 것이다. 다른 경우에, 제1 액체 배양 배지와 제2 액체 배양 배지는 상이할 수 있다.

[0183] 제1 액체 배양 배지의 제1 부피는, 예를 들어, 용기로부터 제1 액체 배양 배지의 제1 부피(예를 들어, 생물 반응기로부터의 세포가 실질적으로 없는 제1 액체 배양 배지의 제1 부피)를 제거할 수 있는 기계 시스템에 의해 제거될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 제1 액체 배양 배지의 제1 부피는, 세포(포유 동물 세포)를 제외시키는 분자량 컷오프를 갖는 막을 통한 제1 액체 배양 배지의 제1 부피의 삼출(seeping) 또는 중력 흐름에 의해 제거될 수 있다.

[0184] 제2 액체 배양 배지의 제2 부피는, 예를 들어, 관류 펌프에 의해 자동화된 방식으로 제1 액체 배양 배지에 첨가될 수 있다.

[0185] 일부 경우에, 제1 액체 배양 배지의 제1 부피(예를 들어, 포유 동물 세포가 실질적으로 없는 제1 액체 배양 배지의 제1 부피)의 제거 및 제1 액체 배양 배지로의 제2 액체 배양 배지의 첨가는 용기에 세포(예를 들어, 포유 동물 세포)를 시딩한 지 적어도 1시간 이내(예를 들어, 2 시간 이내, 3 시간 이내, 4 시간 이내, 5 시간 이내, 6 시간 이내, 7 시간 이내, 8 시간 이내, 9 시간 이내, 10 시간 이내, 12 시간 이내, 14 시간 이내, 16 시간 이내, 18 시간 이내, 24 시간 이내, 36 시간 이내, 48 시간 이내, 72 시간 이내, 96 시간 이내, 또는 96 시간 후)에 일어나지 않는다.

[0186] **유가식 배양**

[0187] 세포(예를 들어, 포유 동물 세포)의 배양은 유가식 배양을 사용하여 수행될 수 있다. 세포(예를 들어, 포유 동물 세포)를 유가식 배양하는 것은 대부분의 배양 기간에 걸친 제1 액체 배양 배지로의 제2 액체 배양 배지의 제2 부피의 첨가(예를 들어, 주기적 또는 연속적 첨가)를 포함한다. 제2 액체 배양 배지의 첨가는 연속적으로(예를 들어, 임의의 주어진 기간에 걸쳐(예를 들어, 24시간의 기간, 약 1시간 내지 약 24시간의 증분 기간에 걸쳐, 또는 24시간 초과 증분 기간에 걸쳐) 용기 부피 또는 제1 액체 배양 배지 부피의 0.1% 내지 300%(예를 들어, 1% 내지 250%, 1% 내지 100%, 100% 내지 200%, 5% 내지 150%, 10% 내지 50%, 15% 내지 40%, 8% 내지 80%, 및 4% 내지 30%)의 부피를 첨가하는 속도) 또는 주기적으로(예를 들어, 3일에 1회, 2일에 1회, 하루에 1회, 하루에 2회, 하루에 3회, 하루에 4회, 또는 하루에 5회), 또는 이들의 임의의 조합으로 수행될 수 있다. 주기적으로 수행되는 경우, (예를 들어, 약 24시간의 기간 내에, 약 1시간 내지 약 24시간의 증분 기간 내에, 또는 24시간 초과 증분 기간 내에) 첨가되는 부피는, 예를 들어, 용기 부피 또는 제1 액체 배양 배지 부피의 0.1% 내지 300%(예를 들어, 1% 내지 200%, 1% 내지 100%, 100% 내지 200%, 5% 내지 150%, 10% 내지 50%, 15% 내지 40%, 8% 내지 80%, 및 4% 내지 30%)일 수 있다. 첨가되는 제2 액체 배양 배지의 제2 부피는 일부 경우에 배양 기간의 전체 또는 일부에 걸쳐 각각의 24시간의 기간(또는 대안적으로, 약 1시간 내지 약 24시간의 증분 기간 또는 24시간 초과 증분 기간)에 걸쳐 거의 동일하게 유지될 수 있다. 당업계에 알려진 바와 같이, 제2 액체 배양 배지의 제2 부피가 첨가되는 속도(부피/단위 시간)는 배양 기간의 전체 또는 일부에 걸쳐 달라질 수 있다. 예를 들어, 첨가되는 제2 액체 배양 배지의 부피는 배양 기간 동안 각각의 24시간의 기간(또는 대안적으로, 약 1시간 내지 약 24시간의 증분 기간 또는 24시간 초과 증분 기간)에 걸쳐 변경될 수 있다(예를 들어, 점진적으로 증가할 수 있음). 예를 들어, 배양 기간에 걸쳐 각각의 24시간의 기간(또는 대안적으로, 약 1시간 내지 약 24시간의 증분 기간, 또는 24시간 초과 증분 기간) 내에 첨가되는 제2 액체 배양 배지의 부피는 배양 기간에 걸쳐 용기 부피 또는 제1 액체 배양 배지 부피의 0.5% 내지 약 20%인 부피에서 용기 부피 또는 제1 액체 배양 배지 부피의 약 25% 내지 약 150%까지 (예를 들어, 점진적으로 또는 시차 증분을 통해) 증가될 수 있다. 제2 액체 배양 배지의 제2 부피가 첨가되는 속도(부피/단위 시간)는 배양 기간의 전체 또는 일부에 걸쳐 거의 동일할 수 있다.

- [0188] 숙련된 실무자는 제1 액체 배양 배지와 제2 액체 배양 배지가 동일한 유형의 배지일 수 있음을 인식할 것이다. 다른 경우에, 제1 액체 배양 배지와 제2 액체 배양 배지는 상이할 수 있다. 제2 액체 배양 배지의 부피는, 예를 들어, 관류 펌프에 의해 자동화된 방식으로 제1 액체 배양 배지에 첨가될 수 있다.
- [0189] 일부 경우에, 제1 액체 배양 배지로의 제2 액체 배양 배지의 제2 부피의 첨가는 용기에 세포(예를 들어, 포유 동물 세포)를 시딩한 지 적어도 1시간 이내(예를 들어, 2 시간 이내, 3 시간 이내, 4 시간 이내, 5 시간 이내, 6 시간 이내, 7 시간 이내, 8 시간 이내, 9 시간 이내, 10 시간 이내, 12 시간 이내, 14 시간 이내, 16 시간 이내, 18 시간 이내, 24 시간 이내, 36 시간 이내, 48 시간 이내, 72 시간 이내, 96 시간 이내, 또는 96 시간 후)에 일어나지 않는다. 유가식 배양에서 세포 배양 배지는 전형적으로 배양 기간의 말기에 수거되어 본 명세서에 기재된 임의의 공정에 사용되지만, 유가식 배양에서 세포 배양 배지는 또한 배양 기간 동안 하나 이상의 시점에서 수거되어 본 명세서에 기재된 임의의 공정에 사용될 수 있다.
- [0190] 숙련된 실무자는 다양한 배양 매개 변수(예를 들어, 용기, 부피, 배양 부피 교체 속도 또는 빈도, 교반 빈도, 온도, 배지, 및 CO₂ 농도)가 이러한 방법을 수행하기 위해 임의의 조합으로 사용될 수 있음을 인식할 것이다.
- [0191] **온도**
- [0192] 배양은 32°C 내지 약 39°C, 예를 들어, 약 32°C 내지 약 37°C의 온도에서 수행될 수 있다. 숙련된 실무자들은 배양 방법의 특정 시점(들)에서(예를 들어, 제1 기간, 제2 기간 및 제3 기간 중 하나 이상 동안), 예를 들어, 시간 단위 또는 일일 단위로 온도가 변경될 수 있음을 인식할 것이다. 예를 들어, 온도는 포유 동물 세포를 진탕 플라스크에 최초 시딩한 후 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 또는 약 20일 또는 그 초과 시점 또는 본 명세서에 기재된 제1 기간, 제2 기간, 및/또는 제3 기간 내의 임의의 시점에서 변경되거나 이동될 수 있다(예를 들어, 증가되거나 감소됨). 예를 들어, 온도는 상향 이동될 수 있다(예를 들어, 최대 또는 약 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, 또는 10.0°C의 변화). 예를 들어, 온도는 하향 이동될 수 있다(예를 들어, 최대 또는 약 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, 또는 10°C의 변화).
- [0193] **CO₂**
- [0194] 배양은 최대 또는 약 1% 내지 15% CO₂(예를 들어, 최대 또는 약 14% CO₂, 12% CO₂, 10% CO₂, 8% CO₂, 6% CO₂, 5% CO₂, 4% CO₂, 3% CO₂, 2% CO₂, 또는 최대 또는 약 1% CO₂)를 함유하는 분위기에서 세포 배양물을 인큐베이션하는 것을 포함할 수 있다. 배양은 가습된 분위기(예를 들어, 적어도 또는 약 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 85%, 80%, 85%, 90%, 또는 적어도 또는 약 95% 습도, 또는 약 100% 습도)에서 세포 배양물을 인큐베이션하는 것을 포함할 수 있다.
- [0195] **세포 생존력 측정**
- [0196] 세포 배양물(예를 들어, 포유 동물 세포 배양물)의 세포 생존력을 결정하기 위해 사용될 수 있는 다양한 방법 및 분석이 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 젓산 탈수소효소(LDH)가 세포 배양물의 액체 배양 배지에서 검출될 수 있다. 세포 배양물의 액체 배양 배지에서 LDH를 검출하기 위한 상용 키트가 당업계에 알려져 있다.
- [0197] 생존 가능 세포에 의해서는 거부되지만 생존 불가능 세포에 의해서는 선택적으로 흡수되는 여러 다양한 염료가 세포 생존력을 결정하는 데 사용된다. 이들 염료의 비제한적 예에는 요오드화프로피듐, 트립판 블루, 및 7-아미노악티노마이신 D가 포함된다. 세포의 생존력은 염료와 함께 인큐베이션한 후 세포의 염색을 시각화하거나 달리 검출하여 결정된다.
- [0198] 세포 배양물의 세포 생존력을 결정하기 위한 추가의 검정에는 세포에서의 미토콘드리아 활성 또는 카스파제 활성의 검출(예를 들어, Resazurin 및 Formazan)이 포함된다. 세포 배양물에서 세포 생존력을 결정하기 위한 추가의 방법이 당업계에 알려져 있다.
- [0199] **생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력에 대한 민감제 농도의 효과를 예측하는 방법**
- [0200] 하기 단계를 포함하는 생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력에 대한 민감제(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 민감제) 농도의 효과를 예측하는 방법이 본원에 제공된다: (a) 시험 배양 용기(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 시험 배양 용기)에서 복수의 시험 조건 하에서 세포 생존력을 결정하는 단계

로서, 복수의 시험 조건은 일련의 매개 변수에 의해 규정되는, 단계; 및 (b) 복수의 조건 하의 시험 배양 용기에서의 세포 생존력에 기초하여, 생산용 생물 반응기(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 생산용 생물 반응기)에서의 세포 생존력에 대한 민감제 농도의 효과를 예측하는 단계.

[0201] 일부 구현예에서, 일련의 매개 변수는 진단 능력, 민감제 농도, 및 보호제(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 보호제) 농도를 포함하거나, 이로 구성되거나, 이로 본질적으로 구성된다. 이러한 방법의 일부 구현예에서, 복수의 시험 조건은 완전 요인 스크리닝 및/또는 내접 중심 합성 설계에 기초하여 선택된다. 임의의 이러한 방법의 일부 구현예에서, 민감제는 소포제(예를 들어, 폴리디메틸실록산-기반 소포제, 시메티콘, 또는 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 다른 소포제)이다.

[0202] 일부 구현예에서, 시험 배양 용기(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 시험 배양 용기)는 부피가 약 5 mL 내지 약 5 L(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)이다. 일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 진탕 플라스크, 예를 들어 배플형 진탕 플라스크이다.

[0203] 일부 구현예에서, 생산용 생물 반응기(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 생산용 생물 반응기)는 부피가 약 5 L 내지 약 20,000 L(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)이다. 일부 예에서, 생산용 생물 반응기는 관류 생물 반응기이다. 다른 예에서, 생산용 생물 반응기는 유가식 생물 반응기이다.

[0204] 본 명세서에 기재된 바와 같은 비세포 사멸률은 아래 식에 의해 정의된다:

[0205] 비세포 사멸률 = (비LDH 생산량)/(세포 당 LDH 함량).

[0206] 이러한 방법의 일부 구현예는 생산용 생물 반응기에서의 세포(본 명세서에 기재된 임의의 세포) 배양 동안 하루 40% 미만, 하루 39% 미만, 하루 38% 미만, 하루 37% 미만, 하루 36% 미만, 하루 35% 미만, 하루 34% 미만, 하루 33% 미만, 하루 32% 미만, 하루 31% 미만, 하루 30% 미만, 하루 29% 미만, 하루 28% 미만, 하루 27% 미만, 하루 26% 미만, 하루 25% 미만, 하루 24% 미만, 하루 23% 미만, 하루 22% 미만, 하루 21% 미만, 하루 20% 미만, 하루 19% 미만, 하루 18% 미만, 하루 17% 미만, 하루 16% 미만, 하루 15% 미만, 하루 14% 미만, 하루 13% 미만, 하루 12% 미만, 하루 11% 미만, 하루 10%, 하루 9% 미만, 하루 8% 미만, 하루 7% 미만, 하루 6% 미만, 하루 5% 미만, 하루 4% 미만, 하루 3% 미만, 하루 2% 미만 또는 하루 1% 미만의 비세포 사멸률을 가질 것으로 예측되는 민감제 농도를 사용하여 생산용 생물 반응기에서 세포(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 세포)를 배양하는 단계를 추가로 포함한다. 본 명세서에 기재된 임의의 방법의 일부 구현예는 생산용 생물 반응기에서의 세포(본 명세서에 기재된 임의의 세포) 배양 동안 하루 약 0.1% 내지 약 40%, 하루 약 0.1% 내지 약 38%, 하루 약 0.1% 내지 약 36%, 하루 약 0.1% 내지 약 34%, 하루 약 0.1% 내지 약 32%, 하루 약 0.1% 내지 약 30%, 하루 약 0.1% 내지 약 28%, 하루 약 0.1% 내지 약 26%, 하루 약 0.1% 내지 약 24%, 하루 약 0.1% 내지 약 22%, 하루 약 0.1% 내지 약 20%, 하루 약 0.1% 내지 약 18%, 하루 약 0.1% 내지 약 16%, 하루 약 0.1% 내지 약 14%, 하루 약 0.1% 내지 약 12%, 하루 약 0.1% 내지 약 10%, 하루 약 0.1% 내지 약 8%, 하루 약 0.1% 내지 약 6%, 하루 약 0.1% 내지 약 5%, 하루 약 0.1% 내지 약 4.5%, 하루 약 0.1% 내지 약 4.0%, 하루 약 0.1% 내지 약 3.5%, 하루 약 0.1% 내지 약 3.0%, 하루 약 0.1% 내지 약 2.5%, 하루 약 0.1% 내지 약 2.0%, 하루 약 0.1% 내지 약 1.5%, 하루 약 0.1% 내지 약 1.0%, 하루 약 0.1% 내지 약 0.5%, 하루 약 0.5% 내지 약 40%, 하루 약 0.5% 내지 약 38%, 하루 약 0.5% 내지 약 36%, 하루 약 0.5% 내지 약 34%, 하루 약 0.5% 내지 약 32%, 하루 약 0.5% 내지 약 30%, 하루 약 0.5% 내지 약 28%, 하루 약 0.5% 내지 약 26%, 하루 약 0.5% 내지 약 24%, 하루 약 0.5% 내지 약 22%, 하루 약 0.5% 내지 약 20%, 하루 약 0.5% 내지 약 18%, 하루 약 0.5% 내지 약 16%, 하루 약 0.5% 내지 약 14%, 하루 약 0.5% 내지 약 12%, 하루 약 0.5% 내지 약 10%, 하루 약 0.5% 내지 약 8%, 하루 약 0.5% 내지 약 6%, 하루 약 0.5% 내지 약 5%, 하루 약 0.5% 내지 약 4.5%, 하루 약 0.5% 내지 약 4.0%, 하루 약 0.5% 내지 약 3.5%, 하루 약 0.5% 내지 약 3.0%, 하루 약 0.5% 내지 약 2.5%, 하루 약 0.5% 내지 약 2.0%, 하루 약 0.5% 내지 약 1.5%, 하루 약 0.5% 내지 약 1.0%, 하루 약 1.0% 내지 약 40%, 하루 약 1.0% 내지 약 38%, 하루 약 1.0% 내지 약 36%, 하루 약 1.0% 내지 약 34%, 하루 약 1.0% 내지 약 32%, 하루 약 1.0% 내지 약 30%, 하루 약 1.0% 내지 약 28%, 하루 약 1.0% 내지 약 26%, 하루 약 1.0% 내지 약 24%, 하루 약 1.0% 내지 약 22%, 하루 약 1.0% 내지 약 20%, 하루 약 1.0% 내지 약 18%, 하루 약 1.0% 내지 약 16%, 하루 약 1.0% 내지 약 14%, 하루 약 1.0% 내지 약 12%, 하루 약 1.0% 내지 약 10%, 하루 약 1.0% 내지 약 8%, 하루 약 1.0% 내지 약 6%, 하루 약 1.0% 내지 약 5%, 하루 약 1.0% 내지 약 4.5%, 하루 약 1.0% 내지 약 4.0%, 하루 약 1.0% 내지 약 3.5%, 하루 약 1.0% 내지 약 3.0%, 하루 약 1.0% 내지 약 2.5%, 하루 약 1.0% 내지 약 2.0%, 하루 약 1.0% 내지 약 1.5%, 하루 약 1.5% 내지 약 40%, 하루 약 1.5% 내지 약 38%, 하루 약 1.5% 내지 약 36%, 하루 약 1.5%

10% 내지 약 30%, 하루 약 10% 내지 약 28%, 하루 약 10% 내지 약 26%, 하루 약 10% 내지 약 24%, 하루 약 10% 내지 약 22%, 하루 약 10% 내지 약 20%, 하루 약 10% 내지 약 18%, 하루 약 10% 내지 약 16%, 하루 약 10% 내지 약 14%, 하루 약 10% 내지 약 12%, 하루 약 12% 내지 약 40%, 하루 약 12% 내지 약 38%, 하루 약 12% 내지 약 36%, 하루 약 12% 내지 약 34%, 하루 약 12% 내지 약 32%, 하루 약 12% 내지 약 30%, 하루 약 12% 내지 약 28%, 하루 약 12% 내지 약 26%, 하루 약 12% 내지 약 24%, 하루 약 12% 내지 약 22%, 하루 약 12% 내지 약 20%, 하루 약 12% 내지 약 18%, 하루 약 12% 내지 약 16%, 하루 약 12% 내지 약 14%, 하루 약 14% 내지 약 40%, 하루 약 14% 내지 약 38%, 하루 약 14% 내지 약 36%, 하루 약 14% 내지 약 34%, 하루 약 14% 내지 약 32%, 하루 약 14% 내지 약 30%, 하루 약 14% 내지 약 28%, 하루 약 14% 내지 약 26%, 하루 약 14% 내지 약 24%, 하루 약 14% 내지 약 22%, 하루 약 14% 내지 약 20%, 하루 약 14% 내지 약 18%, 하루 약 14% 내지 약 16%, 하루 약 16% 내지 약 40%, 하루 약 16% 내지 약 38%, 하루 약 16% 내지 약 36%, 하루 약 16% 내지 약 34%, 하루 약 16% 내지 약 32%, 하루 약 16% 내지 약 30%, 하루 약 16% 내지 약 28%, 하루 약 16% 내지 약 26%, 하루 약 16% 내지 약 24%, 하루 약 16% 내지 약 22%, 하루 약 16% 내지 약 20%, 하루 약 16% 내지 약 18%, 하루 약 18% 내지 약 40%, 하루 약 18% 내지 약 38%, 하루 약 18% 내지 약 36%, 하루 약 18% 내지 약 34%, 하루 약 18% 내지 약 32%, 하루 약 18% 내지 약 30%, 하루 약 18% 내지 약 28%, 하루 약 18% 내지 약 26%, 하루 약 18% 내지 약 24%, 하루 약 18% 내지 약 22%, 하루 약 18% 내지 약 20%, 하루 약 20% 내지 약 40%, 하루 약 20% 내지 약 38%, 하루 약 20% 내지 약 36%, 하루 약 20% 내지 약 34%, 하루 약 20% 내지 약 32%, 하루 약 20% 내지 약 30%, 하루 약 20% 내지 약 28%, 하루 약 20% 내지 약 26%, 하루 약 20% 내지 약 24%, 하루 약 20% 내지 약 22%, 하루 약 22% 내지 약 40%, 하루 약 22% 내지 약 38%, 하루 약 22% 내지 약 36%, 하루 약 22% 내지 약 34%, 하루 약 22% 내지 약 32%, 하루 약 22% 내지 약 30%, 하루 약 22% 내지 약 28%, 하루 약 22% 내지 약 26%, 하루 약 22% 내지 약 24%, 하루 약 24% 내지 약 40%, 하루 약 24% 내지 약 38%, 하루 약 24% 내지 약 36%, 하루 약 24% 내지 약 34%, 하루 약 24% 내지 약 32%, 하루 약 24% 내지 약 30%, 하루 약 24% 내지 약 28%, 하루 약 24% 내지 약 26%, 하루 약 26% 내지 약 40%, 하루 약 26% 내지 약 38%, 하루 약 26% 내지 약 36%, 하루 약 26% 내지 약 34%, 하루 약 26% 내지 약 32%, 하루 약 26% 내지 약 30%, 하루 약 26% 내지 약 28%, 하루 약 28% 내지 약 40%, 하루 약 28% 내지 약 38%, 하루 약 28% 내지 약 36%, 하루 약 28% 내지 약 34%, 하루 약 28% 내지 약 32%, 하루 약 28% 내지 약 30%, 하루 약 30% 내지 약 40%, 하루 약 30% 내지 약 38%, 하루 약 30% 내지 약 36%, 하루 약 30% 내지 약 34%, 하루 약 30% 내지 약 32%, 하루 약 30% 내지 약 30%, 하루 약 32% 내지 약 40%, 하루 약 32% 내지 약 38%, 하루 약 32% 내지 약 36%, 하루 약 32% 내지 약 34%, 하루 약 34% 내지 약 40%, 하루 약 34% 내지 약 38%, 하루 약 34% 내지 약 36%, 하루 약 36% 내지 약 40%, 하루 약 36% 내지 약 38%, 또는 하루 약 38% 내지 약 40%의 비세포 사멸률을 가질 것으로 예측되는 민감제 농도를 사용하여 생산용 생물 반응기에서 세포(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 세포)를 배양하는 단계를 추가로 포함한다.

[0207] 이러한 방법의 일부 구현에는 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 150 nU 미만/세포/일, 145 nU 미만/세포/일, 140 nU 미만/세포/일, 135 nU 미만/세포/일, 130 nU 미만/세포/일, 125 nU 미만/세포/일, 120 nU 미만/세포/일, 115 nU 미만/세포/일, 110 nU 미만/세포/일, 105 nU 미만/세포/일, 100 nU 미만/세포/일, 95 nU 미만/세포/일, 90 nU 미만/세포/일, 85 nU 미만/세포/일, 80 nU 미만/세포/일, 75 nU 미만/세포/일, 70 nU 미만/세포/일, 65 nU 미만/세포/일, 60 nU 미만/세포/일, 55 nU 미만/세포/일, 50 nU 미만/세포/일, 45 nU 미만/세포/일, 40 nU 미만/세포/일, 35 nU 미만/세포/일, 30 nU 미만/세포/일, 25 nU 미만/세포/일, 20 nU 미만/세포/일, 15 nU 미만/세포/일, 10 nU 미만/세포/일, 5 nU 미만/세포/일, 또는 1 nU 미만/세포/일의 세포 비LDH 생산량을 가져올 것으로 예측되는 민감제 농도를 사용하여 생산용 생물 반응기(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 생산용 생물 반응기)에서 세포(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 세포)를 배양하는 단계를 추가로 포함한다. 이러한 방법의 일부 구현에는 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 약 0.1 nU/세포/일 내지 약 150 nU/세포/일, 약 0.1 nU/세포/일 내지 약 140 nU/세포/일, 약 0.1 nU/세포/일 내지 약 130 nU/세포/일, 약 0.1 nU/세포/일 내지 약 120 nU/세포/일, 약 0.1 nU/세포/일 내지 약 110 nU/세포/일, 약 0.1 nU/세포/일 내지 약 100 nU/세포/일, 약 0.1 nU/세포/일 내지 약 95 nU/세포/일, 약 0.1 nU/세포/일 내지 약 90 nU/세포/일, 약 0.1 nU/세포/일 내지 약 85 nU/세포/일, 약 0.1 nU/세포/일 내지 약 80 nU/세포/일, 약 0.1 nU/세포/일 내지 약 75 nU/세포/일, 약 0.1 nU/세포/일 내지 약 70 nU/세포/일, 약 0.1 nU/세포/일 내지 약 65 nU/세포/일, 약 0.1 nU/세포/일 내지 약 60 nU/세포/일, 약 0.1 nU/세포/일 내지 약 55 nU/세포/일, 약 0.1 nU/세포/일 내지 약 50 nU/세포/일, 약 0.1 nU/세포/일 내지 약 45 nU/세포/일, 약 0.1 nU/세포/일 내지 약 40 nU/세포/일, 약 0.1 nU/세포/일 내지 약 35 nU/세포/일, 약 0.1 nU/세포/일 내지 약 30 nU/세포/일, 약 0.1 nU/세포/일 내지 약 25 nU/세포/일, 약 0.1 nU/세포/일 내지 약 20 nU/세포/일, 약 0.1 nU/세포/일 내지

포/일 내지 약 85 nU/세포/일, 약 55 nU/세포/일 내지 약 80 nU/세포/일, 약 55 nU/세포/일 내지 약 75 nU/세포/일, 약 55 nU/세포/일 내지 약 70 nU/세포/일, 약 55 nU/세포/일 내지 약 65 nU/세포/일, 약 55 nU/세포/일 내지 약 60 nU/세포/일, 약 60 nU/세포/일 내지 약 150 nU/세포/일, 약 60 nU/세포/일 내지 약 140 nU/세포/일, 약 60 nU/세포/일 내지 약 130 nU/세포/일, 약 60 nU/세포/일 내지 약 120 nU/세포/일, 약 60 nU/세포/일 내지 약 110 nU/세포/일, 약 60 nU/세포/일 내지 약 100 nU/세포/일, 약 60 nU/세포/일 내지 약 95 nU/세포/일, 약 60 nU/세포/일 내지 약 90 nU/세포/일, 약 60 nU/세포/일 내지 약 85 nU/세포/일, 약 60 nU/세포/일 내지 약 80 nU/세포/일, 약 60 nU/세포/일 내지 약 75 nU/세포/일, 약 60 nU/세포/일 내지 약 70 nU/세포/일, 약 60 nU/세포/일 내지 약 65 nU/세포/일, 약 65 nU/세포/일 내지 약 150 nU/세포/일, 약 65 nU/세포/일 내지 약 140 nU/세포/일, 약 65 nU/세포/일 내지 약 130 nU/세포/일, 약 65 nU/세포/일 내지 약 120 nU/세포/일, 약 65 nU/세포/일 내지 약 110 nU/세포/일, 약 65 nU/세포/일 내지 약 100 nU/세포/일, 약 65 nU/세포/일 내지 약 95 nU/세포/일, 약 65 nU/세포/일 내지 약 90 nU/세포/일, 약 65 nU/세포/일 내지 약 85 nU/세포/일, 약 65 nU/세포/일 내지 약 80 nU/세포/일, 약 65 nU/세포/일 내지 약 75 nU/세포/일, 약 65 nU/세포/일 내지 약 70 nU/세포/일, 약 70 nU/세포/일 내지 약 150 nU/세포/일, 약 70 nU/세포/일 내지 약 140 nU/세포/일, 약 70 nU/세포/일 내지 약 130 nU/세포/일, 약 70 nU/세포/일 내지 약 120 nU/세포/일, 약 70 nU/세포/일 내지 약 110 nU/세포/일, 약 70 nU/세포/일 내지 약 100 nU/세포/일, 약 70 nU/세포/일 내지 약 95 nU/세포/일, 약 70 nU/세포/일 내지 약 90 nU/세포/일, 약 70 nU/세포/일 내지 약 85 nU/세포/일, 약 70 nU/세포/일 내지 약 80 nU/세포/일, 약 70 nU/세포/일 내지 약 75 nU/세포/일, 약 75 nU/세포/일 내지 약 150 nU/세포/일, 약 75 nU/세포/일 내지 약 140 nU/세포/일, 약 75 nU/세포/일 내지 약 130 nU/세포/일, 약 75 nU/세포/일 내지 약 120 nU/세포/일, 약 75 nU/세포/일 내지 약 110 nU/세포/일, 약 75 nU/세포/일 내지 약 100 nU/세포/일, 약 75 nU/세포/일 내지 약 95 nU/세포/일, 약 75 nU/세포/일 내지 약 90 nU/세포/일, 약 75 nU/세포/일 내지 약 85 nU/세포/일, 약 75 nU/세포/일 내지 약 80 nU/세포/일, 약 80 nU/세포/일 내지 약 150 nU/세포/일, 약 80 nU/세포/일 내지 약 140 nU/세포/일, 약 80 nU/세포/일 내지 약 130 nU/세포/일, 약 80 nU/세포/일 내지 약 120 nU/세포/일, 약 80 nU/세포/일 내지 약 110 nU/세포/일, 약 80 nU/세포/일 내지 약 100 nU/세포/일, 약 80 nU/세포/일 내지 약 95 nU/세포/일, 약 80 nU/세포/일 내지 약 90 nU/세포/일, 약 80 nU/세포/일 내지 약 85 nU/세포/일, 약 85 nU/세포/일 내지 약 150 nU/세포/일, 약 85 nU/세포/일 내지 약 140 nU/세포/일, 약 85 nU/세포/일 내지 약 130 nU/세포/일, 약 85 nU/세포/일 내지 약 120 nU/세포/일, 약 85 nU/세포/일 내지 약 110 nU/세포/일, 약 85 nU/세포/일 내지 약 100 nU/세포/일, 약 85 nU/세포/일 내지 약 95 nU/세포/일, 약 85 nU/세포/일 내지 약 90 nU/세포/일, 약 90 nU/세포/일 내지 약 150 nU/세포/일, 약 90 nU/세포/일 내지 약 140 nU/세포/일, 약 90 nU/세포/일 내지 약 130 nU/세포/일, 약 90 nU/세포/일 내지 약 120 nU/세포/일, 약 90 nU/세포/일 내지 약 110 nU/세포/일, 약 90 nU/세포/일 내지 약 100 nU/세포/일, 약 90 nU/세포/일 내지 약 95 nU/세포/일, 약 95 nU/세포/일 내지 약 150 nU/세포/일, 약 95 nU/세포/일 내지 약 140 nU/세포/일, 약 95 nU/세포/일 내지 약 130 nU/세포/일, 약 95 nU/세포/일 내지 약 120 nU/세포/일, 약 95 nU/세포/일 내지 약 110 nU/세포/일, 약 95 nU/세포/일 내지 약 100 nU/세포/일, 약 100 nU/세포/일 내지 약 150 nU/세포/일, 약 100 nU/세포/일 내지 약 140 nU/세포/일, 약 100 nU/세포/일 내지 약 130 nU/세포/일, 약 100 nU/세포/일 내지 약 120 nU/세포/일, 약 100 nU/세포/일 내지 약 110 nU/세포/일, 약 110 nU/세포/일 내지 약 150 nU/세포/일, 약 110 nU/세포/일 내지 약 140 nU/세포/일, 약 110 nU/세포/일 내지 약 130 nU/세포/일, 약 110 nU/세포/일 내지 약 120 nU/세포/일, 약 120 nU/세포/일 내지 약 150 nU/세포/일, 약 120 nU/세포/일 내지 약 140 nU/세포/일, 약 120 nU/세포/일 내지 약 130 nU/세포/일, 약 130 nU/세포/일 내지 약 150 nU/세포/일, 약 130 nU/세포/일 내지 약 140 nU/세포/일, 또는 약 140 nU/세포/일 내지 약 150 nU/세포/일의 세포 비LDH 생산량을 가져올 것으로 예측되는 민감제 농도를 사용하여 생산용 생물 반응기(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 생산용 생물 반응기)에서 세포(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 세포)를 배양하는 단계를 추가로 포함한다.

[0208] 성장률은 복합 성장 계산이며, 하기 방정식을 사용하여 결정될 수 있다.

[0209] 최종 세포 밀도 = 초기 밀도 $\times e^{kt}$,

[0210] 여기서, k는 성장 상수이고, t는 시간(일)이다.

[0211] 길보기 성장률은 성장률에 추가된 계산된 사멸률의 합계이다.

[0212] 본 명세서에 기술된 임의의 방법의 일부 구현에는 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루 1% 초과, 하루 1.5% 초과, 하루 2% 초과, 하루 2.5% 초과, 하루 3% 초과, 하루 3.5% 초과, 하루 4.0% 초과, 하루 4.5% 초과, 하루 5.0% 초과, 하루 5.5% 초과, 하루 6.0% 초과, 하루 6.5% 초과, 하루 7.0% 초과, 하루 7.5% 초과, 하

루 8.0% 초과, 하루 8.5% 초과, 하루 9.0% 초과, 하루 9.5% 초과, 하루 10.0% 초과, 하루 10.5% 초과, 하루 11.0% 초과, 하루 11.5% 초과, 하루 12.0% 초과, 하루 12.5% 초과, 하루 13.0% 초과, 하루 13.5% 초과, 하루 14.0% 초과, 하루 14.5% 초과, 하루 15.0% 초과, 하루 16% 초과, 하루 17% 초과, 하루 18% 초과, 하루 19% 초과, 하루 20% 초과, 하루 21% 초과, 하루 22% 초과, 하루 23% 초과, 하루 24% 초과, 하루 25% 초과, 하루 30% 초과, 하루 35% 초과, 하루 40% 초과, 하루 45% 초과, 하루 50% 초과, 하루 55% 초과, 하루 60% 초과, 하루 65% 초과, 하루 70% 초과, 하루 75% 초과, 하루 80% 초과, 하루 85% 초과, 하루 90% 초과, 하루 95% 초과, 하루 100% 초과, 하루 105% 초과, 하루 110% 초과, 하루 115% 초과, 하루 120% 초과, 하루 125% 초과, 하루 130% 초과, 하루 135% 초과, 하루 140% 초과, 하루 145% 초과, 또는 하루 150% 초과와 같은 겉보기 성장률을 가져올 것으로 예측되는 민감제 농도를 사용하여 생산용 생물 반응기(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 생산용 생물 반응기)에서 세포(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 세포)를 배양하는 단계를 추가로 포함한다. 본 명세서에 기술된 임의의 방법의 일부 구현에는 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루 약 0.1% 내지 하루 약 150%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 140%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 135%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 130%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 125%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 120%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 115%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 110%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 105%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 100%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 95%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 90%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 85%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 80%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 75%, 하루 약 0.1% 내지 약 70%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 65%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 60%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 55%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 50%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 45%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 40%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 35%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 30%, 하루 약 0.1% 내지 약 25%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 20%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 18%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 16%, 하루 약 0.1% 내지 약 14%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 12%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 10%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 9.0%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 8.0%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 7.0%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 6.0%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 5.0%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 4.5%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 4.0%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 3.5%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 3.0%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 2.5%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 2.0%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 1.5%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 1.0%, 하루 약 0.1% 내지 하루 약 0.5%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 140%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 135%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 130%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 125%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 120%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 115%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 110%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 105%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 100%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 95%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 90%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 85%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 80%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 75%, 하루 약 0.5% 내지 약 70%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 65%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 60%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 55%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 50%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 45%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 40%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 35%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 30%, 하루 약 0.5% 내지 약 25%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 20%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 18%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 16%, 하루 약 0.5% 내지 약 14%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 12%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 10%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 9.0%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 8.0%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 7.0%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 6.0%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 5.0%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 4.5%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 4.0%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 3.5%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 3.0%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 2.5%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 2.0%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 1.5%, 하루 약 0.5% 내지 하루 약 1.0%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 140%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 135%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 130%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 125%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 120%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 115%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 110%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 105%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 100%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 95%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 90%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 85%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 80%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 75%, 하루 약 1.0% 내지 약 70%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 65%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 60%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 55%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 50%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 45%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 40%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 35%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 30%, 하루 약 1.0% 내지 약 25%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 20%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 18%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 16%, 하루 약 1.0% 내지 약 14%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 12%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 10%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 9.0%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 8.0%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 7.0%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 6.0%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 5.0%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 4.5%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 4.0%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 3.5%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 3.0%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 2.5%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 2.0%, 하루 약 1.0% 내지 하루 약 1.5%, 하루 약 1.5% 내지 하루 약 140%, 하루 약 1.5% 내지 하루 약 135%, 하루 약 1.5% 내지 하루 약

지 하루 약 130%, 하루 약 130% 내지 하루 약 140%, 하루 약 130% 내지 하루 약 135%, 또는 하루 약 135% 내지 하루 약 140%의 겉보기 성장률을 가져올 것으로 예측되는 민감제 농도를 사용하여 생산용 생물 반응기(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 생산용 생물 반응기)에서 세포(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 세포)를 배양하는 단계를 추가로 포함한다.

[0213] 이러한 방법의 일부 구현예에서, 세포는 재조합 치료 단백질을 인코딩하는 핵산을 함유한다. 이러한 방법의 일부 구현예는 재조합 치료 단백질을 수집하거나 회수하는 단계를 추가로 포함한다. 이러한 방법의 일부 구현예는 재조합 치료 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함한다. 이러한 방법의 일부 구현예는 정제된 재조합 치료 단백질을 제형화하는 단계를 추가로 포함한다.

[0214] 이러한 방법의 일부 구현예에서, 세포는 박테리아(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 박테리아), 효모(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 효모 세포), 또는 포유 동물 세포(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 포유 동물 세포)이다.

[0215] 이러한 방법의 일부 구현예에서, 세포 생존력은 시험 배양 용기에서 젓산 탈수소효소(LDH)의 농도를 측정함으로써 결정된다.

[0216] 일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 배플형 진탕 플라스크(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 배플형 진탕 플라스크)이고, 복수의 시험 조건은 다음 중 하나 이상을 포함한다: (a) 약 125 RPM 내지 약 400 RPM(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)의 회전 교반; (b) 약 0 ppm 내지 약 120 ppm(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)의 민감제(본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 민감제) 농도; 및 (c) 약 1 g/L 내지 약 10 g/L(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)인 보호제(본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 보호제) 농도. 일부 구현예에서, 보호제는 폴록사머(예를 들어, 폴록사머-188, 폴록사머-401, 폴록사머-402, 또는 폴록사머-407), 폴록사민(예를 들어, 폴록사민-904 또는 폴록사민-908), 또는 플루로닉 폴리올이다.

[0217] **생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력을 개선하는 방법**

[0218] 또한, (a) 시험 배양 용기에서 복수의 시험 조건 하에서 세포 생존력을 결정하는 단계로서, 복수의 조건은 일련의 매개 변수에 의해 규정되는, 단계; (b) 복수의 조건 하의 시험 배양 용기에서의 세포 생존력에 기초하여, 생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력에 최적의 조건을 선택하는 단계; 및 (c) 선택된 조건 하에서 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 생산용 생물 반응기(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 생산용 생물 반응기)에서의 세포 생존력을 개선하는 방법이 본원에 제공된다.

[0219] 이러한 방법의 일부 구현예에서, 일련의 매개 변수는 전단 응력, 민감제(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 민감제) 농도, 및 보호제(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 보호제) 농도를 포함하거나, 이로 본질적으로 구성되거나, 이로 구성된다. 이러한 방법의 일부 구현예에서, 복수의 시험 조건은 완전 요인 스크리닝 및/또는 내접 중심 합성 설계에 기초하여 선택된다. 이러한 방법의 일부 구현예에서, 민감제는 소포제(예를 들어, 폴리디메틸실록산-기반 소포제, 시메티콘, 또는 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 다른 소포제)이다.

[0220] 이러한 방법의 일부 구현예에서, 시험 배양 용기(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 시험 배양 용기)는 부피가 약 5 mL 내지 약 5 L(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)이다. 이러한 방법의 일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 진탕 플라스크, 예를 들어 배플형 진탕 플라스크(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 배플형 진탕 플라스크)이다.

[0221] 이러한 방법의 일부 구현예에서, 생산용 생물 반응기(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 생산용 생물 반응기)는 부피가 약 5 L 내지 약 20,000 L(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)이다. 일부 예에서, 생산용 생물 반응기는 관류 생물 반응기이다. 다른 예에서, 생산용 생물 반응기는 유가식 생물 반응기이다.

[0222] 일부 구현예에서, 단계 (c)는 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루 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%, 또는 40% 미만의 비세포 사멸률을 가져온다. 일부 구현예에서, 단계 (c)는 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루 약 0.1% 내지 약 40%(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)의 비세포 사멸률을 가져온다.

[0223] 일부 구현예에서, 단계 (c)는 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 150 nU 미만/세포/일, 145 nU 미만/세포/일, 140 nU 미만/세포/일, 135 nU 미만/세포/일, 130 nU 미만/세포/일, 125 nU 미만/세포/일, 120 nU 미만/세포/일, 115 nU 미만/세포/일, 150 nU 미만/세포/일, 110 nU 미만/세포/일, 105 nU 미만/세포/일, 100 nU 미만/세포/일, 95 nU 미만/세포/일, 90 nU 미만/세포/일, 85 nU 미만/세포/일, 80 nU 미만/세포/일, 75 nU 미만/세포/일, 70 nU 미만/세포/일, 65 nU 미만/세포/일, 60 nU 미만/세포/일, 55 nU 미만/세포/일, 50 nU 미만/세포/일, 45 nU 미만/세포/일, 40 nU 미만/세포/일, 35 nU 미만/세포/일, 30 nU 미만/세포/일, 25 nU 미만/세포/일, 20 nU 미만/세포/일, 15 nU 미만/세포/일, 10 nU 미만/세포/일, 5 nU 미만/세포/일, 또는 1 nU 미만/세포/일의 세포 비LDH 생산량을 가져온다. 이러한 방법의 일부 구현예에서, 단계 (c)는 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 약 0.1 nU/세포/일 내지 약 150 nU/세포/일(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)의 세포 비LDH 생산량을 가져온다.

[0224] 일부 구현예에서, 단계 (c)는 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루 1% 초과, 하루 1.5% 초과, 하루 2% 초과, 하루 2.5% 초과, 하루 3% 초과, 하루 3.5% 초과, 하루 4.0% 초과, 하루 4.5% 초과, 하루 5.0% 초과, 하루 5.5% 초과, 하루 6.0% 초과, 하루 6.5% 초과, 하루 7.0% 초과, 하루 7.5% 초과, 하루 8.0% 초과, 하루 8.5% 초과, 하루 9.0% 초과, 하루 9.5% 초과, 하루 10.0% 초과, 하루 10.5% 초과, 하루 11.0% 초과, 하루 11.5% 초과, 하루 12.0% 초과, 하루 12.5% 초과, 하루 13.0% 초과, 하루 13.5% 초과, 하루 14.0% 초과, 하루 14.5% 초과, 하루 15.0% 초과, 하루 16% 초과, 하루 17% 초과, 하루 18% 초과, 하루 19% 초과, 하루 20% 초과, 하루 21% 초과, 하루 22% 초과, 하루 23% 초과, 하루 24% 초과, 하루 25% 초과, 하루 30% 초과, 하루 35% 초과, 하루 40% 초과, 하루 45% 초과, 하루 50% 초과, 하루 55% 초과, 하루 60% 초과, 하루 65% 초과, 하루 70% 초과, 하루 75% 초과, 하루 80% 초과, 하루 85% 초과, 하루 90% 초과, 하루 95% 초과, 하루 100% 초과, 하루 105% 초과, 하루 110% 초과, 하루 115% 초과, 하루 120% 초과, 하루 125% 초과, 하루 130% 초과, 하루 135% 초과, 하루 140% 초과, 하루 145% 초과, 또는 하루 150% 초과, 또는 하루 약 150%(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)의 겔보기 성장률을 가져온다. 이러한 방법의 일부 구현예에서, 단계 (c)는 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루 약 0.1% 내지 하루 약 150%(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)의 겔보기 성장률을 가져온다.

[0225] 이러한 방법의 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 세포)는 재조합 치료 단백질(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 재조합 치료 단백질을 인코딩하는 핵산을 함유한다. 이러한 방법의 일부 구현예는 재조합 치료 단백질을 수집하거나 회수하는 단계를 추가로 포함한다. 이러한 방법의 일부 구현예는 재조합 치료 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함한다. 이러한 방법의 일부 구현예는 정제된 재조합 치료 단백질을 제형화하는 단계를 추가로 포함한다. 이러한 방법의 일부 구현예에서, 세포는 박테리아(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 박테리아), 효모 세포(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 효모 세포), 또는 포유 동물 세포(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 포유 동물 세포)이다.

[0226] 이러한 방법의 일부 구현예에서, 세포 생존력은 시험 배양 용기에서 젓산 탈수소효소(LDH)의 농도를 측정함으로써 결정된다. 이러한 방법의 일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 배플형 진탕 플라스크이고, 복수의 시험 조건은 다음 중 하나 이상(예를 들어, 2개 또는 3개)을 포함한다(또는 이로 구성됨): (a) 약 125 RPM 내지 약 400 RPM(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)의 회전 교반; (b) 약 0 ppm 내지 약 120 ppm(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)의 민감제(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 민감제) 농도; 및 (c) 약 1 g/L 내지 약 10 g/L(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)인 보호제(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 보호제) 농도. 이러한 방법의 일부 구현예에서, 보호제는 폴록사머(예를 들어, 폴록사머-188, 폴록사머-401, 폴록사머-402, 또는 폴록사머-407), 폴록사민(예를 들어, 폴록사민-904 또는 폴록사민-908), 또는 플루로닉 폴리올이다.

[0227] **생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력을 예측하는 방법**

[0228] 또한, (a) 적어도 2개(예를 들어, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개)의 매개 변수를 포함하는 일련의 매개 변수를 선택하는 단계; (b) 시험 배양 용기(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 시험 배양 용기)에서 일련의 매개 변수에 의해 규정된 바와 같은 복수의 시험 조건 하에서 세포 생존력을 결정하는 단계; 및 (c) 복수의 조건 하의 시험 배양 용기에서의 세포 생존력에 기초하여, 생산용 생물 반응기에서의 세포 생존력 예측하는 단계를 포함하는, 생산용 생물 반응기(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 생산용 생물 반응기)에서의 세포 생존력을 예측하는 방법이 본원에 제공된다.

[0229] 이러한 방법의 일부 구현예에서, 일련의 매개 변수는 전단 응력, 민감제(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당

업계에 알려진 임의의 예시적인 민감제) 농도, 및 보호제(예를 들어, 예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 보호제) 농도를 포함하거나, 이로 본질적으로 구성되거나, 이로 구성된다. 이러한 방법의 일부 구현예에서, 복수의 시험 조건은 완전 요인 스크리닝 및/또는 내접 중심 합성 설계에 기초하여 선택된다.

[0230] 이러한 방법의 일부 구현예에서, 민감제는 소포제(예를 들어, 폴리디메틸실록산-기반 소포제, 시메티콘, 또는 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 다른 소포제)이다.

[0231] 이러한 방법의 일부 구현예에서, 시험 배양 용기(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 시험 배양 용기)는 부피가 약 5 mL 내지 약 5 L(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)이다. 이러한 방법의 일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 진탕 플라스크, 예를 들어 배플형 진탕 플라스크(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 배플형 진탕 플라스크)이다.

[0232] 이러한 방법의 일부 구현예에서, 생산용 생물 반응기(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 생산용 생물 반응기)는 부피가 약 5 L 내지 약 20,000 L(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)이다. 일부 예에서, 생산용 생물 반응기는 관류 생물 반응기이다. 다른 예에서, 생산용 생물 반응기는 유가식 생물 반응기이다.

[0233] 이러한 방법의 일부 구현예는 단계 (c)는 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루 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%, 또는 40% 미만의 비세포 사멸률을 가져올 것으로 예측되는 조건을 사용하여 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함한다. 이러한 방법의 일부 구현예는 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루 약 0.1% 내지 약 40%(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)의 비세포 사멸률을 가져올 것으로 예측되는 조건을 사용하여 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함한다.

[0234] 이러한 방법의 일부 구현예는 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 150 nU 미만/세포/일, 145 nU 미만/세포/일, 140 nU 미만/세포/일, 135 nU 미만/세포/일, 130 nU 미만/세포/일, 125 nU 미만/세포/일, 120 nU 미만/세포/일, 115 nU 미만/세포/일, 110 nU 미만/세포/일, 105 nU 미만/세포/일, 100 nU 미만/세포/일, 95 nU 미만/세포/일, 90 nU 미만/세포/일, 85 nU 미만/세포/일, 80 nU 미만/세포/일, 75 nU 미만/세포/일, 70 nU 미만/세포/일, 65 nU 미만/세포/일, 60 nU 미만/세포/일, 55 nU 미만/세포/일, 50 nU 미만/세포/일, 45 nU 미만/세포/일, 40 nU 미만/세포/일, 35 nU 미만/세포/일, 30 nU 미만/세포/일, 25 nU 미만/세포/일, 20 nU 미만/세포/일, 15 nU 미만/세포/일, 10 nU 미만/세포/일, 5 nU 미만/세포/일, 또는 1 nU 미만/세포/일의 세포 비LDH 생산량을 가져올 것으로 예측되는 조건을 사용하여 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함한다. 이러한 방법의 일부 구현예는 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 약 0.1 nU/세포/일 내지 약 150 nU/세포/일(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)의 세포 비LDH 생산량을 가져올 것으로 예측되는 조건을 사용하여 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함한다.

[0235] 이러한 방법의 일부 구현예는 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루 1% 초과, 하루 1.5% 초과, 하루 2% 초과, 하루 2.5% 초과, 하루 3% 초과, 하루 3.5% 초과, 하루 4.0% 초과, 하루 4.5% 초과, 하루 5.0% 초과, 하루 5.5% 초과, 하루 6.0% 초과, 하루 6.5% 초과, 하루 7.0% 초과, 하루 7.5% 초과, 하루 8.0% 초과, 하루 8.5% 초과, 하루 9.0% 초과, 하루 9.5% 초과, 하루 10.0% 초과, 하루 10.5% 초과, 하루 11.0% 초과, 하루 11.5% 초과, 하루 12.0% 초과, 하루 12.5% 초과, 하루 13.0% 초과, 하루 13.5% 초과, 하루 14.0% 초과, 하루 14.5% 초과, 하루 15.0% 초과, 하루 16% 초과, 하루 17% 초과, 하루 18% 초과, 하루 19% 초과, 하루 20% 초과, 하루 21% 초과, 하루 22% 초과, 하루 23% 초과, 하루 24% 초과, 하루 25% 초과, 하루 30% 초과, 하루 35% 초과, 하루 40% 초과, 하루 45% 초과, 하루 50% 초과, 하루 55% 초과, 하루 60% 초과, 하루 65% 초과, 하루 70% 초과, 하루 75% 초과, 하루 80% 초과, 하루 85% 초과, 하루 90% 초과, 하루 95% 초과, 하루 100% 초과, 하루 105% 초과, 하루 110% 초과, 하루 115% 초과, 하루 120% 초과, 하루 125% 초과, 하루 130% 초과, 하루 135% 초과, 하루 140% 초과, 하루 145% 초과, 또는 하루 150% 초과와 겔보기 성장률을 가져올 것으로 예측되는 조건을 사용하여 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함한다. 이러한 방법의 일부 구현예는 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루 약 0.1% 내지 하루 약 150%(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)의 겔보기 성장률을 가져올 것으로 예측되는 조건을 사용하여 생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함한다.

[0236] 이러한 방법의 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 세포)는 재조합 치료 단백질(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 재조합 치료 단백질)을 인코딩하는 핵산을 함유한다. 이러한 방법의 일부 구

현에는 재조합 치료 단백질을 수집하거나 회수하는 단계를 추가로 포함한다. 이러한 방법의 일부 구현에는 재조합 치료 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함한다. 이러한 방법의 일부 구현에는 정제된 재조합 치료 단백질을 제형화하는 단계를 추가로 포함한다. 이러한 방법의 일부 구현예에서, 세포는 박테리아(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 박테리아), 효모 세포(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 효모 세포), 또는 포유 동물 세포(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 포유 동물 세포)이다.

[0237] 이러한 방법의 일부 구현예에서, 세포 생존력은 시험 배양 용기에서 젓산 탈수소효소(LDH)의 농도를 측정함으로써 결정된다. 이러한 방법의 일부 구현예에서, 시험 배양 용기는 배플형 진탕 플라스크이고, 복수의 시험 조건은 다음 중 하나 이상(예를 들어, 2개 또는 3개)을 포함한다(또는 이로 구성됨): (a) 약 125 RPM 내지 약 400 RPM(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)의 회전 교반; (b) 약 0 ppm 내지 약 120 ppm(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)의 민감제(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 민감제) 농도; 및 (c) 약 1 g/L 내지 약 10 g/L(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)인 보호제(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 보호제) 농도. 이러한 방법의 일부 구현예에서, 보호제는 폴록사머(예를 들어, 폴록사머-188, 폴록사머-401, 폴록사머-402, 또는 폴록사머-407), 폴록사민(예를 들어, 폴록사민-904 또는 폴록사민-908), 또는 플루로닉 폴리올이다.

[0238] **생산용 생물 반응기에서 세포를 배양하는 방법**

[0239] 또한, 다음 조건 중 하나 이상(예를 들어, 2개, 3개, 또는 4개) 하에서 액체 배양 배지에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 생산용 생물 반응기에서 세포(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 세포)를 배양하는 방법이 본원에 제공된다:

[0240] (a) 생산용 생물 반응기의 P/V (W/m^3)가 약 1.0 내지 약 110(예를 들어, 약 3.0 내지 약 7.0, 약 4.0 내지 약 6.0, 약 5.0 내지 약 6.0, 또는 약 6.0)인 조건(예를 들어, 약 1.0 내지 약 110, 약 1.0 내지 약 95, 약 1.0 내지 약 90, 약 1.0 내지 약 85, 약 1.0 내지 약 80, 약 1.0 내지 약 75, 약 1.0 내지 약 70, 약 1.0 내지 약 65, 약 1.0 내지 약 60, 약 1.0 내지 약 55, 약 1.0 내지 약 50, 약 1.0 내지 약 45, 약 1.0 내지 약 40, 약 1.0 내지 약 35, 약 1.0 내지 약 30, 약 1.0 내지 약 25, 약 1.0 내지 약 20, 약 1.0 내지 약 18, 약 1.0 내지 약 16, 약 1.0 내지 약 14, 약 1.0 내지 약 12, 약 1.0 내지 약 10, 약 1.0 내지 약 9.0, 약 1.0 내지 약 8.0, 약 1.0 내지 약 7.0, 약 1.0 내지 약 6.0, 약 1.0 내지 약 5.0, 약 1.0 내지 약 4.0, 약 1.0 내지 약 3.0, 내지 약 1.0 내지 약 2.0, 약 2.0 내지 약 110, 약 2.0 내지 약 95, 약 2.0 내지 약 90, 약 2.0 내지 약 85, 약 2.0 내지 약 80, 약 2.0 내지 약 75, 약 2.0 내지 약 70, 약 2.0 내지 약 65, 약 2.0 내지 약 60, 약 2.0 내지 약 55, 약 2.0 내지 약 50, 약 2.0 내지 약 45, 약 2.0 내지 약 40, 약 2.0 내지 약 35, 약 2.0 내지 약 30, 약 2.0 내지 약 25, 약 2.0 내지 약 20, 약 2.0 내지 약 18, 약 2.0 내지 약 16, 약 2.0 내지 약 14, 약 2.0 내지 약 12, 약 2.0 내지 약 10, 약 2.0 내지 약 9.0, 약 2.0 내지 약 8.0, 약 2.0 내지 약 7.0, 약 2.0 내지 약 6.0, 약 2.0 내지 약 5.0, 약 2.0 내지 약 4.0, 약 2.0 내지 약 3.0, 약 3.0 내지 약 110, 약 3.0 내지 약 95, 약 3.0 내지 약 90, 약 3.0 내지 약 85, 약 3.0 내지 약 80, 약 3.0 내지 약 75, 약 3.0 내지 약 70, 약 3.0 내지 약 65, 약 3.0 내지 약 60, 약 3.0 내지 약 55, 약 3.0 내지 약 50, 약 3.0 내지 약 45, 약 3.0 내지 약 40, 약 3.0 내지 약 35, 약 3.0 내지 약 30, 약 3.0 내지 약 25, 약 3.0 내지 약 20, 약 3.0 내지 약 18, 약 3.0 내지 약 16, 약 3.0 내지 약 14, 약 3.0 내지 약 12, 약 3.0 내지 약 10, 약 3.0 내지 약 9.0, 약 3.0 내지 약 8.0, 약 3.0 내지 약 7.0, 약 3.0 내지 약 6.0, 약 3.0 내지 약 5.0, 약 3.0 내지 약 4.0, 약 4.0 내지 약 110, 약 4.0 내지 약 95, 약 4.0 내지 약 90, 약 4.0 내지 약 85, 약 4.0 내지 약 80, 약 4.0 내지 약 75, 약 4.0 내지 약 70, 약 4.0 내지 약 65, 약 4.0 내지 약 60, 약 4.0 내지 약 55, 약 4.0 내지 약 50, 약 4.0 내지 약 45, 약 4.0 내지 약 40, 약 4.0 내지 약 35, 약 4.0 내지 약 30, 약 4.0 내지 약 25, 약 4.0 내지 약 20, 약 4.0 내지 약 18, 약 4.0 내지 약 16, 약 4.0 내지 약 14, 약 4.0 내지 약 12, 약 4.0 내지 약 10, 약 4.0 내지 약 9.0, 약 4.0 내지 약 8.0, 약 4.0 내지 약 7.0, 약 4.0 내지 약 6.0, 약 4.0 내지 약 5.0, 약 5.0 내지 약 110, 약 5.0 내지 약 95, 약 5.0 내지 약 90, 약 5.0 내지 약 85, 약 5.0 내지 약 80, 약 5.0 내지 약 75, 약 5.0 내지 약 70, 약 5.0 내지 약 65, 약 5.0 내지 약 60, 약 5.0 내지 약 55, 약 5.0 내지 약 50, 약 5.0 내지 약 45, 약 5.0 내지 약 40, 약 5.0 내지 약 35, 약 5.0 내지 약 30, 약 5.0 내지 약 25, 약 5.0 내지 약 20, 약 5.0 내지 약 18, 약 5.0 내지 약 16, 약 5.0 내지 약 14, 약 5.0 내지 약 12, 약 5.0 내지 약 10, 약 5.0 내지 약 9.0, 약 5.0 내지 약 8.0, 약 5.0 내지 약 7.0, 약 5.0 내지 약 6.0, 약 6.0 내지 약 110, 약 6.0 내지 약 95, 약 6.0 내지 약 90, 약 6.0 내지 약 85, 약 6.0 내지 약 80, 약 6.0 내지 약 75, 약 6.0 내지 약 70, 약 6.0 내지 약 65, 약 6.0 내지 약 60, 약 6.0 내지 약 55, 약 6.0 내지 약 50, 약 6.0 내지

60 내지 약 65, 약 65 내지 약 110, 약 65 내지 약 95, 약 65 내지 약 90, 약 65 내지 약 85, 약 65 내지 약 80, 약 65 내지 약 75, 약 65 내지 약 70, 약 70 내지 약 110, 약 70 내지 약 95, 약 70 내지 약 90, 약 70 내지 약 85, 약 70 내지 약 80, 약 70 내지 약 75, 약 75 내지 약 110, 약 75 내지 약 95, 약 75 내지 약 90, 약 75 내지 약 85, 약 75 내지 약 80, 약 80 내지 약 110, 약 80 내지 약 95, 약 80 내지 약 90, 약 80 내지 약 85, 약 85 내지 약 110, 약 85 내지 약 95, 약 85 내지 약 90, 약 90 내지 약 110, 약 90 내지 약 95, 약 95 내지 약 110, 약 95 내지 약 105, 약 95 내지 약 100, 약 100 내지 약 110, 약 100 내지 약 105, 또는 약 105 내지 약 110);

[0241] (b) 생산용 생물 반응기의 분당 액체 부피당 공기 부피(VVM) (min^{-1})가 약 0.01 내지 약 0.10(예를 들어, 약 0.02 내지 약 0.08, 약 0.04 내지 약 0.06, 또는 약 0.06)인 조건(예를 들어, 약 0.01 내지 약 0.10, 약 0.01 내지 약 0.09, 약 0.01 내지 약 0.08, 약 0.01 내지 약 0.07, 약 0.01 내지 약 0.06, 약 0.01 내지 약 0.05, 약 0.01 내지 약 0.04, 약 0.01 내지 약 0.03, 약 0.01 내지 약 0.02, 약 0.02 내지 약 0.10, 약 0.02 내지 약 0.09, 약 0.02 내지 약 0.08, 약 0.02 내지 약 0.07, 약 0.02 내지 약 0.06, 약 0.02 내지 약 0.05, 약 0.02 내지 약 0.04, 약 0.02 내지 약 0.03, 약 0.03 내지 약 0.10, 약 0.03 내지 약 0.09, 약 0.03 내지 약 0.08, 약 0.03 내지 약 0.07, 약 0.03 내지 약 0.06, 약 0.03 내지 약 0.05, 약 0.03 내지 약 0.04, 약 0.04 내지 약 0.10, 약 0.04 내지 약 0.09, 약 0.04 내지 약 0.08, 약 0.04 내지 약 0.07, 약 0.04 내지 약 0.06, 약 0.04 내지 약 0.05, 약 0.05 내지 약 0.10, 약 0.05 내지 약 0.09, 약 0.05 내지 약 0.08, 약 0.05 내지 약 0.07, 약 0.05 내지 약 0.06, 약 0.06 내지 약 0.10, 약 0.06 내지 약 0.09, 약 0.06 내지 약 0.08, 약 0.06 내지 약 0.07, 약 0.07 내지 약 0.10, 약 0.07 내지 약 0.09, 약 0.07 내지 약 0.08, 약 0.08 내지 약 0.10, 약 0.08 내지 약 0.09, 또는 약 0.09 내지 약 0.10);

[0242] (c) 배지가 약 0 ppm 내지 약 5,000 ppm(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)의 농도를 갖는 민감제(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 민감제)를 포함하는 조건; 및

[0243] (d) 액체 배양 배지가 약 1 g/L 내지 약 15 g/L의 농도를 갖는 보호제(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 민감제)를 포함하는 조건 (예를 들어, 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위, 예를 들어, 약 1 g/L 내지 약 15 g/L, 약 1 g/L 내지 약 14 g/L, 약 1 g/L 내지 약 13 g/L, 약 1 g/L 내지 약 12 g/L, 약 1 g/L 내지 약 11 g/L, 약 2 g/L 내지 약 15 g/L, 약 2 g/L 내지 약 14 g/L, 약 2 g/L 내지 약 13 g/L, 약 2 g/L 내지 약 12 g/L, 약 2 g/L 내지 약 11 g/L, 약 3 g/L 내지 약 15 g/L, 약 3 g/L 내지 약 14 g/L, 약 3 g/L 내지 약 13 g/L, 약 3 g/L 내지 약 12 g/L, 약 3 g/L 내지 약 11 g/L, 약 4 g/L 내지 약 15 g/L, 약 4 g/L 내지 약 14 g/L, 약 4 g/L 내지 약 13 g/L, 약 4 g/L 내지 약 12 g/L, 약 4 g/L 내지 약 11 g/L, 약 5 g/L 내지 약 15 g/L, 약 5 g/L 내지 약 14 g/L, 약 5 g/L 내지 약 13 g/L, 약 5 g/L 내지 약 12 g/L, 약 5 g/L 내지 약 11 g/L, 약 6 g/L 내지 약 15 g/L, 약 6 g/L 내지 약 14 g/L, 약 6 g/L 내지 약 13 g/L, 약 6 g/L 내지 약 12 g/L, 약 6 g/L 내지 약 11 g/L, 약 7 g/L 내지 약 15 g/L, 약 7 g/L 내지 약 14 g/L, 약 7 g/L 내지 약 13 g/L, 약 7 g/L 내지 약 12 g/L, 약 7 g/L 내지 약 11 g/L, 약 8 g/L 내지 약 15 g/L, 약 8 g/L 내지 약 14 g/L, 약 8 g/L 내지 약 13 g/L, 약 8 g/L 내지 약 12 g/L, 약 8 g/L 내지 약 11 g/L, 약 9 g/L 내지 약 15 g/L, 약 9 g/L 내지 약 14 g/L, 약 9 g/L 내지 약 13 g/L, 약 9 g/L 내지 약 12 g/L, 약 9 g/L 내지 약 11 g/L, 약 10 g/L 내지 약 15 g/L, 약 10 g/L 내지 약 14 g/L, 약 10 g/L 내지 약 13 g/L, 약 10 g/L 내지 약 12 g/L, 약 10 g/L 내지 약 11 g/L, 약 11 g/L 내지 약 15 g/L, 약 11 g/L 내지 약 14 g/L, 약 11 g/L 내지 약 13 g/L, 약 11 g/L 내지 약 12 g/L, 약 12 g/L 내지 약 15 g/L, 약 12 g/L 내지 약 14 g/L, 약 12 g/L 내지 약 13 g/L, 약 13 g/L 내지 약 15 g/L, 약 13 g/L 내지 약 14 g/L, 또는 약 14 g/L 내지 약 15 g/L).

[0244] 최적화된 조건 하에서, 비세포 사멸률은 하루 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%, 또는 40% 미만일 수 있거나 그러할 것으로 예측될 수 있다. 최적화된 조건 하에서, 비세포 사멸률은 약 0.1% 내지 약 40%(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)일 수 있다.

[0245] 일부 구현예에서, 세포 생존력은 젖산 탈수소효소(LDH)의 농도를 측정함으로써 결정될 수 있다. 세포 비LDH 생산량(nU/세포/일)은 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 또는 200(예를 들어, 150) 미만일 수 있거나 그러할 것으로 예측될 수 있다. 일부 구현예에서, LDH 생산량(nU/세포/일)은 약 0.1 내지 약 200일 수 있다(예를 들어, 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위, 예를 들어, 약 0.1 내지 약 200, 약 0.1 내지 약 190, 약 0.1 내지 약 180, 약 0.1 내지 약 170, 약 0.1 내지 약 160, 약 0.1 내지 약 150, 약 0.1 내지 약 140, 약 0.1 내지 약 130, 약 0.1 내지 약 120, 약 0.1 내지 약 110, 약 0.1 내지 약 100, 약 0.1 내지 약 90, 약 0.1 내지 약 80, 약 0.1 내지 약 70, 약 0.1 내지 약 60, 약 0.1 내지 약 50, 약 0.1 내지 약 40, 약 0.1 내지 약 30, 약 0.1 내지 약 20, 또는 약 0.1 내지 약 10).

지 약 170, 약 0.1 내지 약 160, 약 0.5 내지 약 200, 약 0.5 내지 약 190, 약 0.5 내지 약 180, 약 0.5 내지 약 170, 약 0.5 내지 약 160, 약 1.0 내지 약 200, 약 1.0 내지 약 190, 약 1.0 내지 약 180, 약 1.0 내지 약 170, 약 1.0 내지 약 160, 약 2.5 내지 약 200, 약 2.5 내지 약 190, 약 2.5 내지 약 180, 약 2.5 내지 약 170, 약 2.5 내지 약 160, 약 5.0 내지 약 200, 약 5.0 내지 약 190, 약 5.0 내지 약 180, 약 5.0 내지 약 170, 약 5.0 내지 약 160, 약 10 내지 약 200, 약 10 내지 약 190, 약 10 내지 약 180, 약 10 내지 약 170, 약 10 내지 약 160, 약 20 내지 약 200, 약 20 내지 약 190, 약 20 내지 약 180, 약 20 내지 약 170, 약 20 내지 약 160, 약 30 내지 약 200, 약 30 내지 약 190, 약 30 내지 약 180, 약 30 내지 약 170, 약 30 내지 약 160, 약 40 내지 약 200, 약 40 내지 약 190, 약 40 내지 약 180, 약 40 내지 약 170, 약 40 내지 약 160, 약 50 내지 약 200, 약 50 내지 약 190, 약 50 내지 약 180, 약 50 내지 약 170, 약 50 내지 약 160, 약 60 내지 약 200, 약 60 내지 약 190, 약 60 내지 약 180, 약 60 내지 약 170, 약 60 내지 약 160, 약 70 내지 약 200, 약 70 내지 약 190, 약 70 내지 약 180, 약 70 내지 약 170, 약 70 내지 약 160, 약 80 내지 약 200, 약 80 내지 약 190, 약 80 내지 약 180, 약 80 내지 약 170, 약 80 내지 약 160, 약 90 내지 약 200, 약 90 내지 약 190, 약 90 내지 약 180, 약 90 내지 약 170, 약 90 내지 약 160, 약 100 내지 약 200, 약 100 내지 약 190, 약 100 내지 약 180, 약 100 내지 약 170, 약 100 내지 약 160, 약 110 내지 약 200, 약 110 내지 약 190, 약 110 내지 약 180, 약 110 내지 약 170, 약 110 내지 약 160, 약 120 내지 약 200, 약 120 내지 약 190, 약 120 내지 약 180, 약 120 내지 약 170, 약 120 내지 약 160, 약 130 내지 약 200, 약 130 내지 약 190, 약 130 내지 약 180, 약 130 내지 약 170, 약 130 내지 약 160, 약 140 내지 약 200, 약 140 내지 약 190, 약 140 내지 약 180, 약 140 내지 약 170, 약 140 내지 약 160, 약 150 내지 약 200, 약 150 내지 약 190, 약 150 내지 약 180, 약 150 내지 약 170, 약 150 내지 약 160, 약 160 내지 약 200, 약 160 내지 약 190, 약 160 내지 약 180, 약 160 내지 약 170, 약 170 내지 약 200, 약 170 내지 약 190, 약 170 내지 약 180, 약 180 내지 약 200, 약 180 내지 약 190, 또는 약 190 내지 약 200).

[0246]

일부 구현예에서, 길보기 성장률은 하루 1% 초과, 하루 1.5% 초과, 하루 2% 초과, 하루 2.5% 초과, 하루 3% 초과, 하루 3.5% 초과, 하루 4.0% 초과, 하루 4.5% 초과, 하루 5.0% 초과, 하루 5.5% 초과, 하루 6.0% 초과, 하루 6.5% 초과, 하루 7.0% 초과, 하루 7.5% 초과, 하루 8.0% 초과, 하루 8.5% 초과, 하루 9.0% 초과, 하루 9.5% 초과, 하루 10.0% 초과, 하루 10.5% 초과, 하루 11.0% 초과, 하루 11.5% 초과, 하루 12.0% 초과, 하루 12.5% 초과, 하루 13.0% 초과, 하루 13.5% 초과, 하루 14.0% 초과, 하루 14.5% 초과, 하루 15.0% 초과, 하루 16% 초과, 하루 17% 초과, 하루 18% 초과, 하루 19% 초과, 하루 20% 초과, 하루 21% 초과, 하루 22% 초과, 하루 23% 초과, 하루 24% 초과, 하루 25% 초과, 하루 30% 초과, 하루 35% 초과, 하루 40% 초과, 하루 45% 초과, 하루 50% 초과, 하루 55% 초과, 하루 60% 초과, 하루 65% 초과, 하루 70% 초과, 하루 75% 초과, 하루 80% 초과, 하루 85% 초과, 하루 90% 초과, 하루 95% 초과, 하루 100% 초과, 하루 105% 초과, 하루 110% 초과, 하루 115% 초과, 하루 120% 초과, 하루 125% 초과, 하루 130% 초과, 하루 135% 초과, 하루 140% 초과, 하루 145% 초과, 또는 하루 150% 초과보다 크거나 클 것으로 예측될 수 있다. 일부 구현예에서, 길보기 성장률은 하루 약 0.1% 내지 하루 약 150%일 수 있다(예를 들어, 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위, 예를 들어, 약 0.1% 내지 약 48%, 약 0.1% 내지 약 46%, 약 0.1% 내지 약 44%, 약 0.1% 내지 약 42%, 약 0.5% 내지 약 50%, 약 0.5% 내지 약 48%, 약 0.5% 내지 약 46%, 약 0.5% 내지 약 44%, 약 0.5% 내지 약 42%, 약 1.0% 내지 약 50%, 약 1.0% 내지 약 48%, 약 1.0% 내지 약 46%, 약 1.0% 내지 약 44%, 약 1.0% 내지 약 42%, 약 2.0% 내지 약 50%, 약 2.0% 내지 약 48%, 약 2.0% 내지 약 46%, 약 2.0% 내지 약 44%, 약 2.0% 내지 약 42%, 약 4.0% 내지 약 50%, 약 4.0% 내지 약 48%, 약 4.0% 내지 약 46%, 약 4.0% 내지 약 44%, 약 4.0% 내지 약 42%, 약 6.0% 내지 약 50%, 약 6.0% 내지 약 48%, 약 6.0% 내지 약 46%, 약 6.0% 내지 약 44%, 약 6.0% 내지 약 42%, 약 8.0% 내지 약 50%, 약 8.0% 내지 약 48%, 약 8.0% 내지 약 46%, 약 8.0% 내지 약 44%, 약 8.0% 내지 약 42%, 약 10% 내지 약 50%, 약 10% 내지 약 48%, 약 10% 내지 약 46%, 약 10% 내지 약 44%, 약 10% 내지 약 42%, 약 12% 내지 약 50%, 약 12% 내지 약 48%, 약 12% 내지 약 46%, 약 12% 내지 약 44%, 약 12% 내지 약 42%, 약 14% 내지 약 50%, 약 14% 내지 약 48%, 약 14% 내지 약 46%, 약 14% 내지 약 44%, 약 14% 내지 약 42%, 약 16% 내지 약 50%, 약 16% 내지 약 48%, 약 16% 내지 약 46%, 약 16% 내지 약 44%, 약 16% 내지 약 42%, 약 18% 내지 약 50%, 약 18% 내지 약 48%, 약 18% 내지 약 46%, 약 18% 내지 약 44%, 약 18% 내지 약 42%, 약 20% 내지 약 50%, 약 20% 내지 약 48%, 약 20% 내지 약 46%, 약 20% 내지 약 44%, 약 20% 내지 약 42%, 약 22% 내지 약 50%, 약 22% 내지 약 48%, 약 22% 내지 약 46%, 약 22% 내지 약 44%, 약 22% 내지 약 42%, 약 24% 내지 약 50%, 약 24% 내지 약 48%, 약 24% 내지 약 46%, 약 24% 내지 약 44%, 약 24% 내지 약 42%, 약 26% 내지 약 50%, 약 26% 내지 약 48%, 약 26% 내지 약 46%, 약 26% 내지 약 44%, 약 26% 내지 약 42%, 약 28% 내지 약 50%, 약 28% 내지 약 48%, 약 28% 내지 약 46%, 약 28% 내지 약 44%, 약 28% 내지 약 42%, 약 30% 내지 약

50%, 약 30% 내지 약 48%, 약 30% 내지 약 46%, 약 30% 내지 약 44%, 약 30% 내지 약 42%, 약 32% 내지 약 50%, 약 32% 내지 약 48%, 약 32% 내지 약 46%, 약 32% 내지 약 44%, 약 32% 내지 약 42%, 약 34% 내지 약 50%, 약 34% 내지 약 48%, 약 34% 내지 약 46%, 약 34% 내지 약 44%, 약 34% 내지 약 42%, 약 36% 내지 약 50%, 약 36% 내지 약 48%, 약 36% 내지 약 46%, 약 36% 내지 약 44%, 약 36% 내지 약 42%, 약 38% 내지 약 50%, 약 38% 내지 약 48%, 약 38% 내지 약 46%, 약 38% 내지 약 44%, 약 38% 내지 약 42%, 약 40% 내지 약 50%, 약 40% 내지 약 48%, 약 40% 내지 약 46%, 약 40% 내지 약 44%, 약 40% 내지 약 42%, 약 42% 내지 약 50%, 약 42% 내지 약 48%, 약 42% 내지 약 46%, 약 42% 내지 약 44%, 약 44% 내지 약 50%, 약 44% 내지 약 48%, 약 44% 내지 약 46%, 약 46% 내지 약 50%, 약 46% 내지 약 48%, 또는 약 48% 내지 약 50%).

[0247] 이러한 방법의 일부 구현예에서, 민감제는 소포제(예를 들어, 폴리디메틸실록산-기반 소포제, 시메티콘, 또는 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 다른 소포제)이다. 일부 구현예에서, 보호제는 폴록사머(예를 들어, 폴록사머-188, 폴록사머-401, 폴록사머-402, 또는 폴록사머-407), 폴록사민(예를 들어, 폴록사민-904 또는 폴록사민-908), 또는 플루로닉 폴리올이다.

[0248] 이러한 방법의 일부 구현예에서, 생산용 생물 반응기(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 생산용 생물 반응기)는 부피가 약 5 L 내지 약 20,000 L(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)이다. 이러한 방법의 일부 구현예에서, 생산용 생물 반응기는 관류 생물 반응기이다. 이러한 방법의 일부 구현예에서, 생산용 생물 반응기는 유가식 생물 반응기이다.

[0249] 일부 구현예에서, 방법은 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루 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%, 또는 40% 미만의 비세포 사멸률을 가져온다. 일부 구현예에서, 방법은 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루 약 0.1% 내지 약 40%(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)의 비세포 사멸률을 가져온다.

[0250] 일부 구현예에서, 상기 방법은 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 150 nU 미만/세포/일, 145 nU 미만/세포/일, 140 nU 미만/세포/일, 135 nU 미만/세포/일, 130 nU 미만/세포/일, 125 nU 미만/세포/일, 120 nU 미만/세포/일, 115 nU 미만/세포/일, 110 nU 미만/세포/일, 105 nU 미만/세포/일, 100 nU 미만/세포/일, 95 nU 미만/세포/일, 90 nU 미만/세포/일, 85 nU 미만/세포/일, 80 nU 미만/세포/일, 75 nU 미만/세포/일, 70 nU 미만/세포/일, 65 nU 미만/세포/일, 60 nU 미만/세포/일, 55 nU 미만/세포/일, 50 nU 미만/세포/일, 45 nU 미만/세포/일, 40 nU 미만/세포/일, 35 nU 미만/세포/일, 30 nU 미만/세포/일, 25 nU 미만/세포/일, 20 nU 미만/세포/일, 15 nU 미만/세포/일, 10 nU 미만/세포/일, 5 nU 미만/세포/일, 또는 1 nU 미만/세포/일의 세포 비LDH 생산량을 가져온다. 이러한 방법의 일부 구현예에서, 방법은 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 약 0.1 nU/세포/일 내지 약 150 nU/세포/일(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)의 세포 비LDH 생산량을 가져온다.

[0251] 일부 구현예에서, 상기 방법은 생산용 생물 반응기에서의 반응 동안 하루 1% 초과, 하루 1.5% 초과, 하루 2% 초과, 하루 2.5% 초과, 하루 3% 초과, 하루 3.5% 초과, 하루 4.0% 초과, 하루 4.5% 초과, 하루 5.0% 초과, 하루 5.5% 초과, 하루 6.0% 초과, 하루 6.5% 초과, 하루 7.0% 초과, 하루 7.5% 초과, 하루 8.0% 초과, 하루 8.5% 초과, 하루 9.0% 초과, 하루 9.5% 초과, 하루 10.0% 초과, 하루 10.5% 초과, 하루 11.0% 초과, 하루 11.5% 초과, 하루 12.0% 초과, 하루 12.5% 초과, 하루 13.0% 초과, 하루 13.5% 초과, 하루 14.0% 초과, 하루 14.5% 초과, 하루 15.0% 초과, 하루 16% 초과, 하루 17% 초과, 하루 18% 초과, 하루 19% 초과, 하루 20% 초과, 하루 21% 초과, 하루 22% 초과, 하루 23% 초과, 하루 24% 초과, 하루 25% 초과, 하루 30% 초과, 하루 35% 초과, 하루 40% 초과, 하루 45% 초과, 하루 50% 초과, 하루 55% 초과, 하루 60% 초과, 하루 65% 초과, 하루 70% 초과, 하루 75% 초과, 하루 80% 초과, 하루 85% 초과, 하루 90% 초과, 하루 95% 초과, 하루 100% 초과, 하루 105% 초과, 하루 110% 초과, 하루 115% 초과, 하루 120% 초과, 하루 125% 초과, 하루 130% 초과, 하루 135% 초과, 하루 140% 초과, 하루 145% 초과, 또는 하루 150% 초과와 겜보기 성장률을 가져온다. 이러한 방법의 일부 구현예에서, 방법은 생산용 생물 반응기에서의 세포 배양 동안 하루 약 0.1% 내지 하루 약 150%(또는 본 명세서에 기재된 이 범위의 임의의 하위 범위)의 겜보기 성장률을 가져온다.

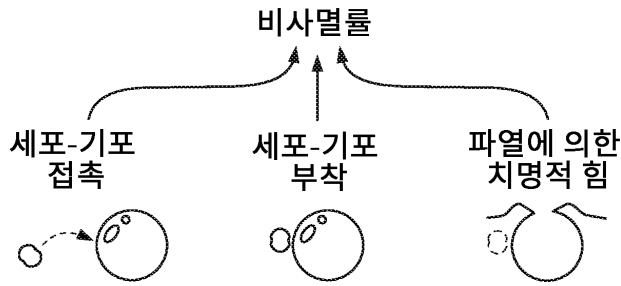
[0252] 이러한 방법의 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 세포)는 재조합 치료 단백질(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 재조합 치료 단백질)을 인코딩하는 핵산을 함유한다. 이러한 방법의 일부 구현예는 재조합 치료 단백질을 수집하거나 회수하는 단계를 추가로 포함한다. 이러한 방법의 일부 구현예는 재조합 치료 단백질을 정제하는 단계를 추가로 포함한다. 이러한 방법의 일부 구현예는 정제된 재조합 치료 단백질

을 제형화하는 단계를 추가로 포함한다.

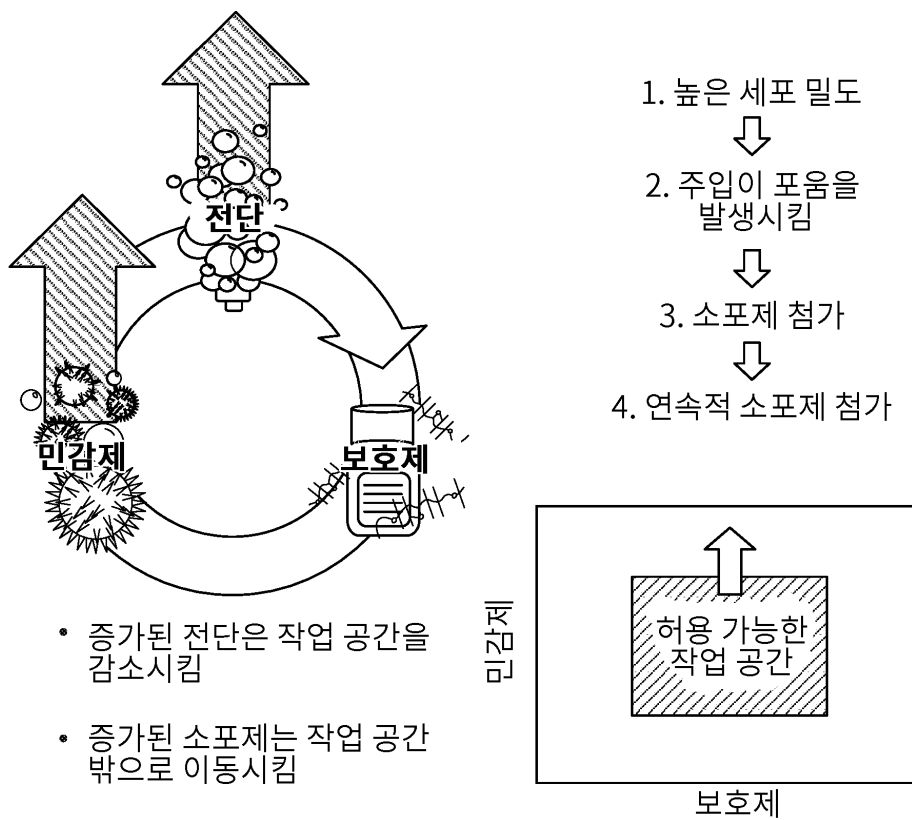
- [0253] 이러한 방법의 일부 구현예에서, 세포는 박테리아(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 예시적인 박테리아), 효모 세포(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 효모 세포), 또는 포유 동물 세포(예를 들어, 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 포유 동물 세포)이다.
- [0254] 이러한 방법의 일부 구현예에서, 세포 생존력은 시험 배양 용기에서 젓산 탈수소효소(LDH)의 농도를 측정함으로써 결정된다.
- [0255] **실시예**
- [0256] 본 발명은 청구범위에 기재된 본 발명의 범주를 제한하지 않는 하기 실시예로 추가로 설명된다.
- [0257] **실시예 1: 시험 배양 용기를 위한 내접 중심 합성 설계와 결합된 완전 요인 스크리닝**
- [0258] 회전 교반(RPM³), 민감제 농도, 및 보호제 농도를 매개 변수로 선택하였다. 내접 중심 합성 설계와 결합된 완전 요인 설계를 사용하여 일련의 시험 조건을 결정하였다(도 7). 비LDH 생산량 값을 각각의 시험 조건에서 측정하였다. 결과는 선택된 매개 변수의 추정 윤곽을 제공하는 데 사용되었다. 성능 불량 영역과 작업 실패 영역이 확인되었다(도 9).
- [0259] **실시예 2: 벤치탑 규모에서의 비LDH 생산량 값 예측**
- [0260] 본 명세서에 기술된 바와 같은 예측 방법의 정확도를 결정하기 위해 개념 증명 실험을 벤치탑 규모로 수행하였다.
- [0261] 벤치탑 규모에서 보호제 농도는 세 가지 레벨로 설정되었다. 각각의 레벨에 대해, 2개의 벤치탑 배양 생물 반응기를 시험하였다. 관류 공정으로 인한 피크 비LDH 생산량 값을 측정하고, 이를 예측된 값과 비교하였다.
- [0262] 벤치탑 규모 실험으로부터 실제 관찰된 값은 예측된 값과 아주 잘 일치했다($P < 0.0001$, $R^2 = 0.84$)(도 13a 및 도 13c). 결과는 본 명세서에 기술된 바와 같은 방법이 더 큰 규모에서 다양한 매개 변수의 효과를 예측하는 데 성공적으로 사용될 수 있음을 나타냈다.
- [0263] 하루 30 ppm 내지 40 ppm의 소포제 첨가의 소포제 농도 범위를 유지하면서 실험을 수행하였다. 플루로닉 농도는 1.8 g/L(점선), 2.8 g/L(실선, 닫힌 원), 3.8 g/L(실선, 열린 원)로부터 조정되었다. 실험을 반복적으로 수행하였다. 이는 플루로닉 농도를 변경할 때 비LDH 생산량을 예측하는 모델의 능력을 나타낸다.
- [0264] 소포제의 농도를 하루 30 ppm에서 80 ppm까지 높이는 실험도 수행하였다. 예측된 LDH 범위는 90.19 내지 96.38로, 실제 관찰된 LDH 범위인 94.74 내지 99.36과 매우 잘 일치했다(도 14). 결과는 본 명세서에 기술된 바와 같은 방법이 소포제의 효과를 예측하는 데 성공적으로 사용될 수 있음을 나타냈다.
- [0265] **실시예 3: 생산 규모에서의 비LDH 생산량 값 예측**
- [0266] 본 명세서에 기재된 바와 같은 모델의 정확도를 결정하기 위해 생산 규모에서 실험을 수행하였다.
- [0267] 3개의 50 L 들이 생산용 생물 반응기와 2 개의 100 L 들이 생산용 생물 반응기를 시험하였다. 실험은 1.8 g/L 내지 5.8 g/L 범위의 폴록사머-188(플루로닉) 농도를 시험하였다.
- [0268] 비LDH 생산량에 대해 실제 관찰된 값은 이러한 예측된 값과 잘 일치했다($P < 0.0001$, $R^2 = 0.84$)(도 15a 및 도 15b). 결과는 본 명세서에 기술된 바와 같은 방법이 생산 규모(생산용 생물 반응기 규모)에서의 선택된 매개 변수의 효과를 예측하는 데 성공적으로 사용될 수 있음을 나타냈다.
- [0269] **다른 구현예**
- [0270] 본 발명이 이의 상세한 설명과 함께 설명되었지만, 전술한 설명은 첨부된 청구범위의 범주에 의해 규정되는 본 발명의 범주를 제한하고자 하는 것이 아니라 예시하고자 하는 것임을 이해해야 한다. 다른 양태, 장점, 및 변형은 하기 청구범위의 범주 내에 속한다.

도면

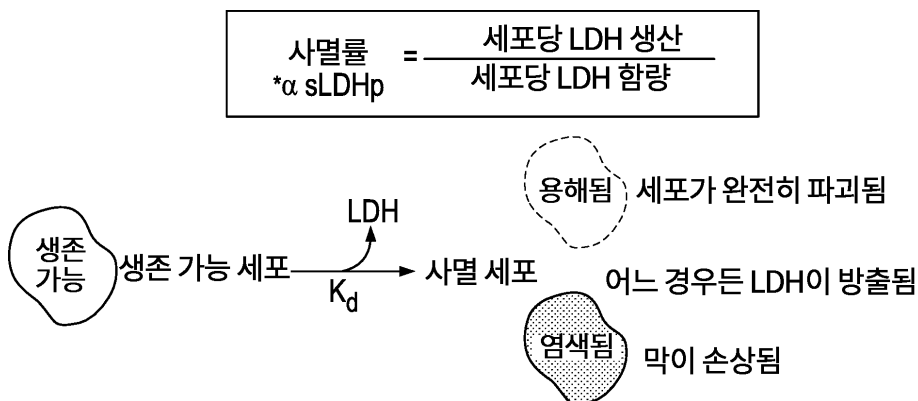
도면1



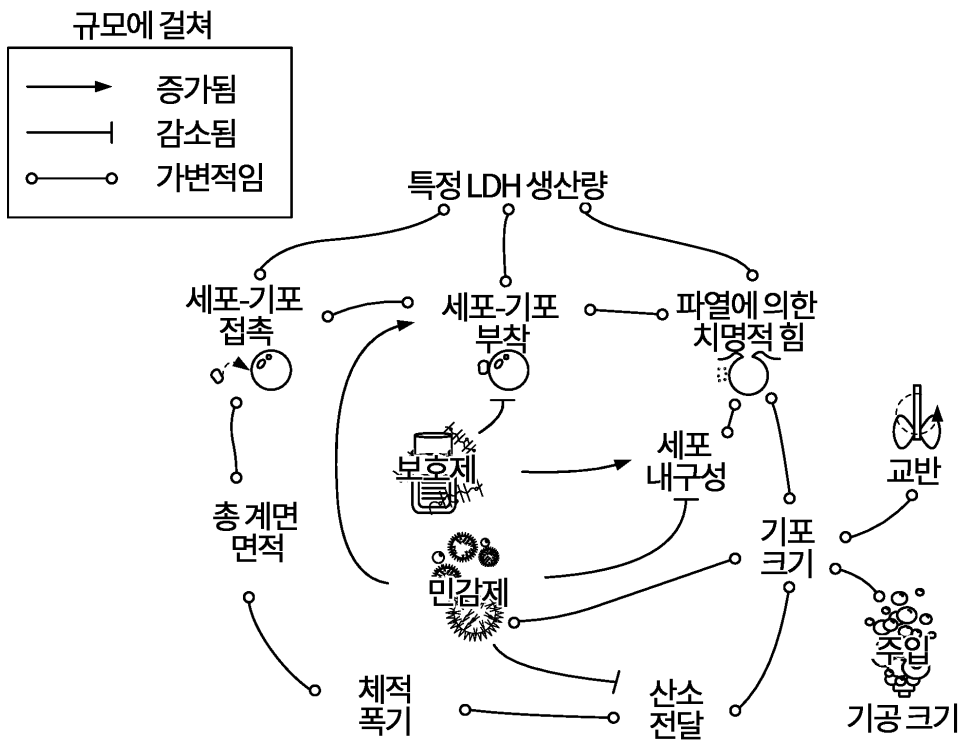
도면2



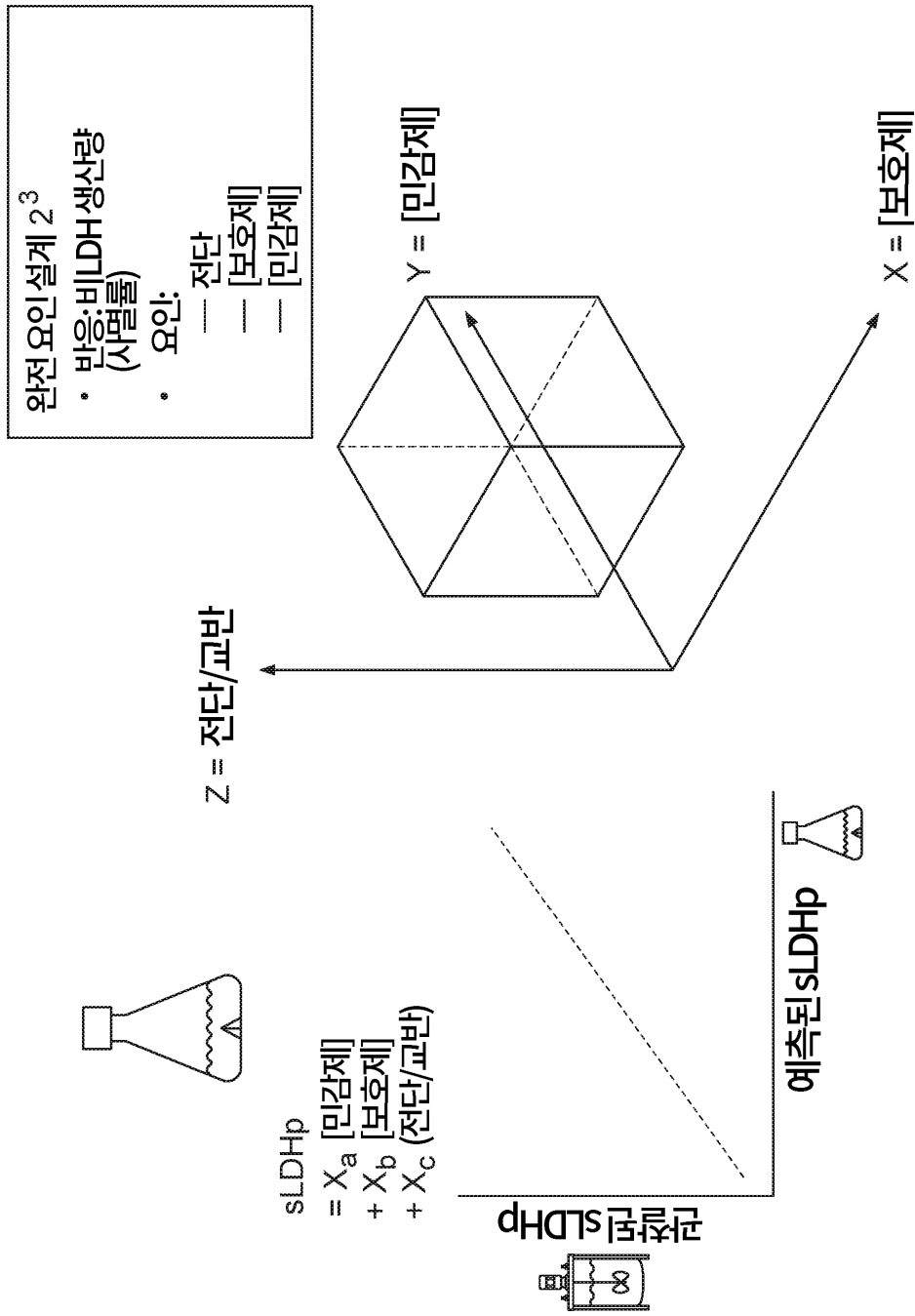
도면3



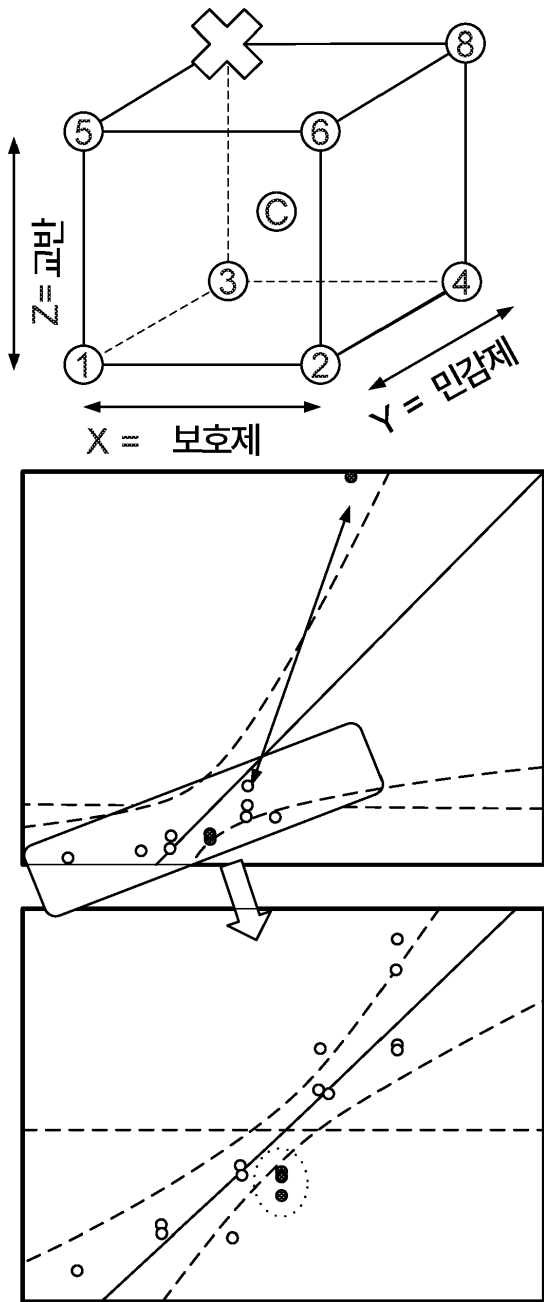
도면4



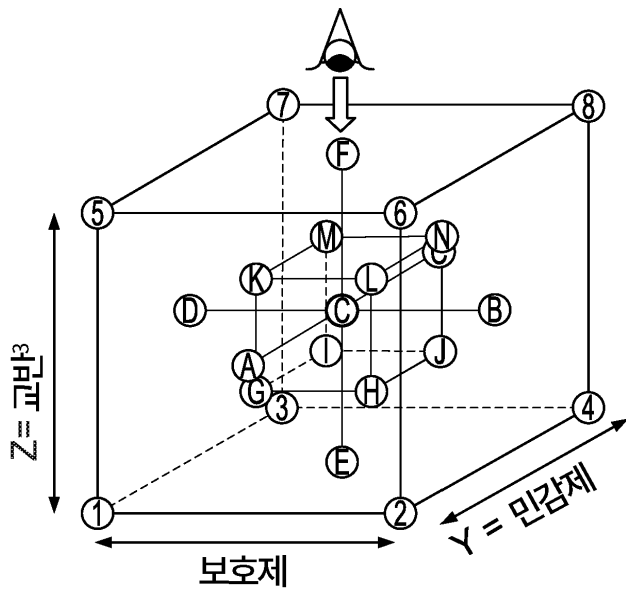
도면5



도면6



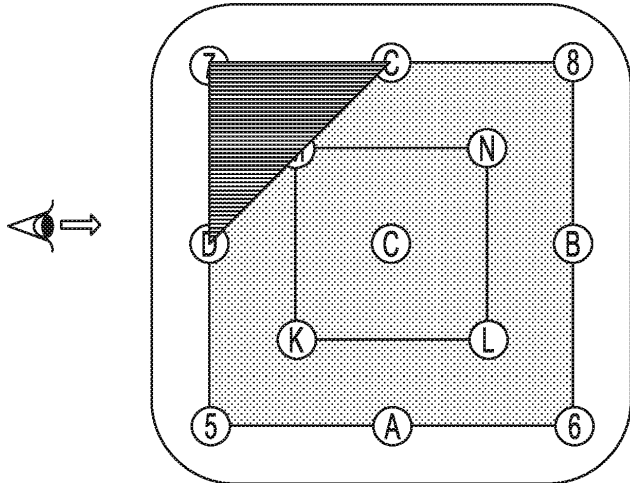
도면7



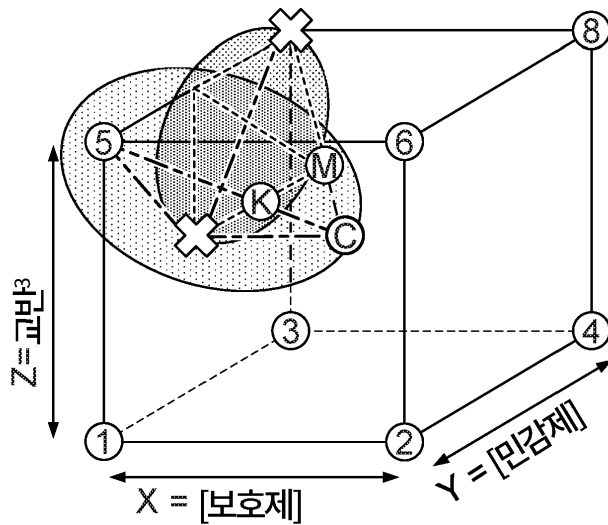
RPM이 세제공으로 설정됨

도면8

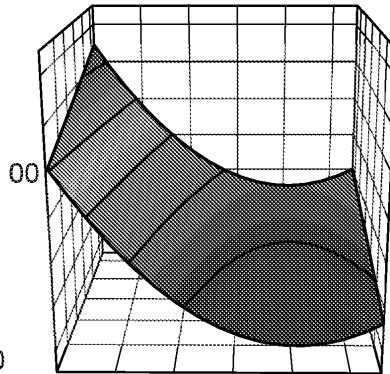
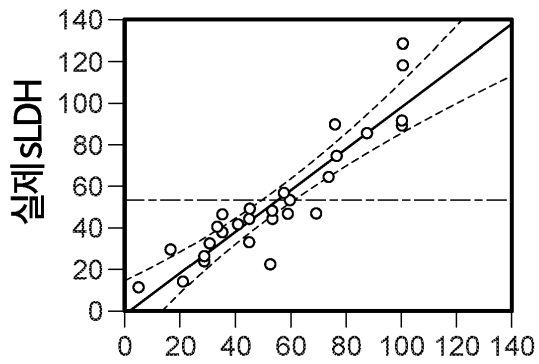
- 관심영역을 최대화함
- 잠재적 실패영역을 최소화함



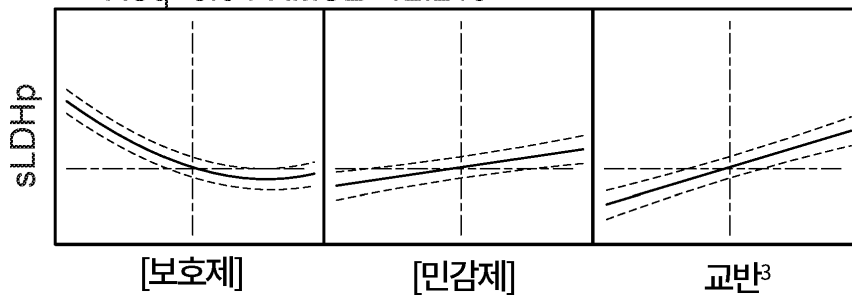
도면9



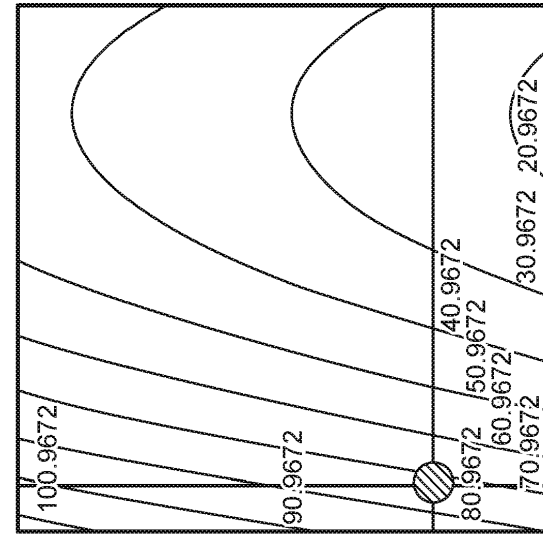
불량한 성능 불량영역/실패 영역을 확인함



예측된 sLDH $P < .0001$
 $RSq = 0.84$ $RMSE = 12.219$

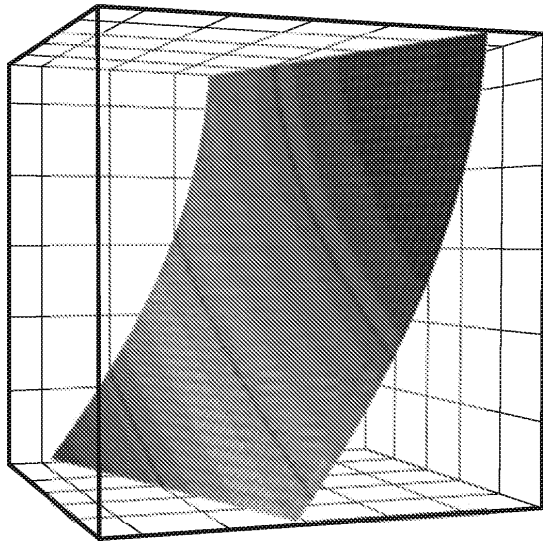


도면10



2. 알려진 Δ 매개 변수를 예측함:

- 전단
- [민감제]
- 구함:
- Δ [보호제]

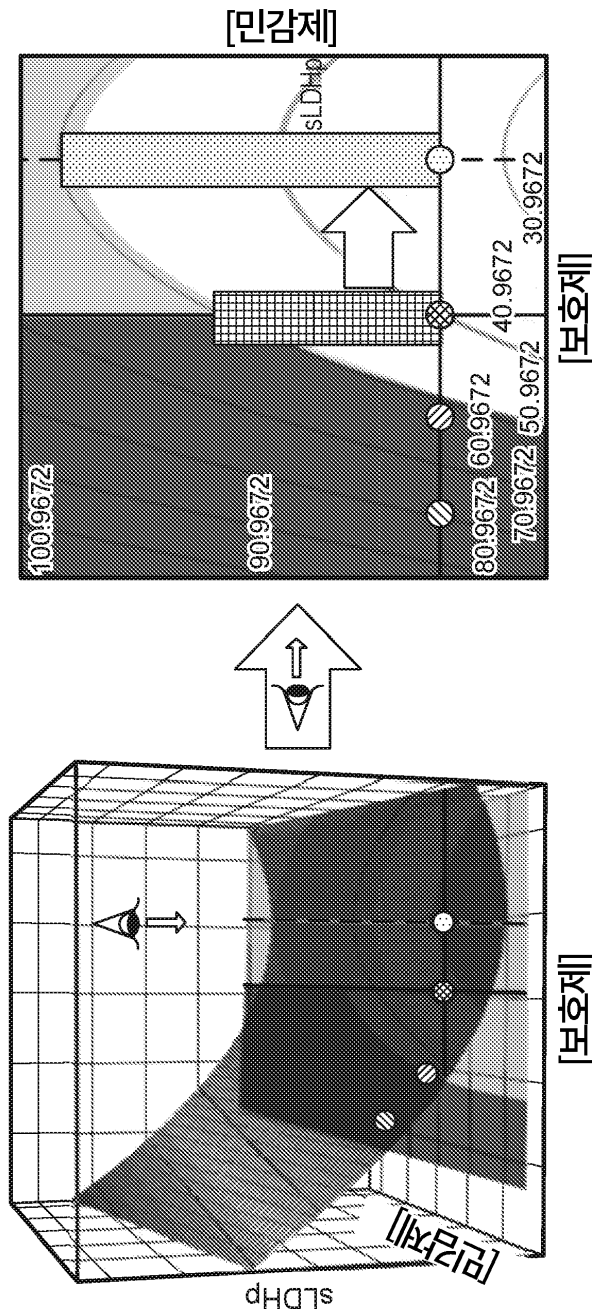


1. 알려진 올바른 윤곽과 일치함:

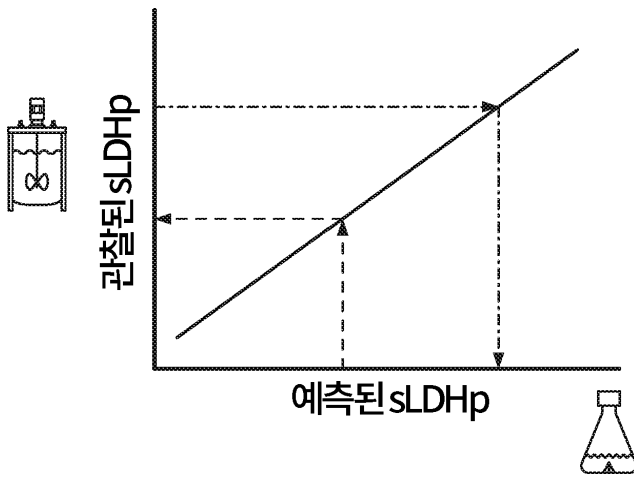
- [민감제]
- [보호제]
- 구함:
- 전단

도면11

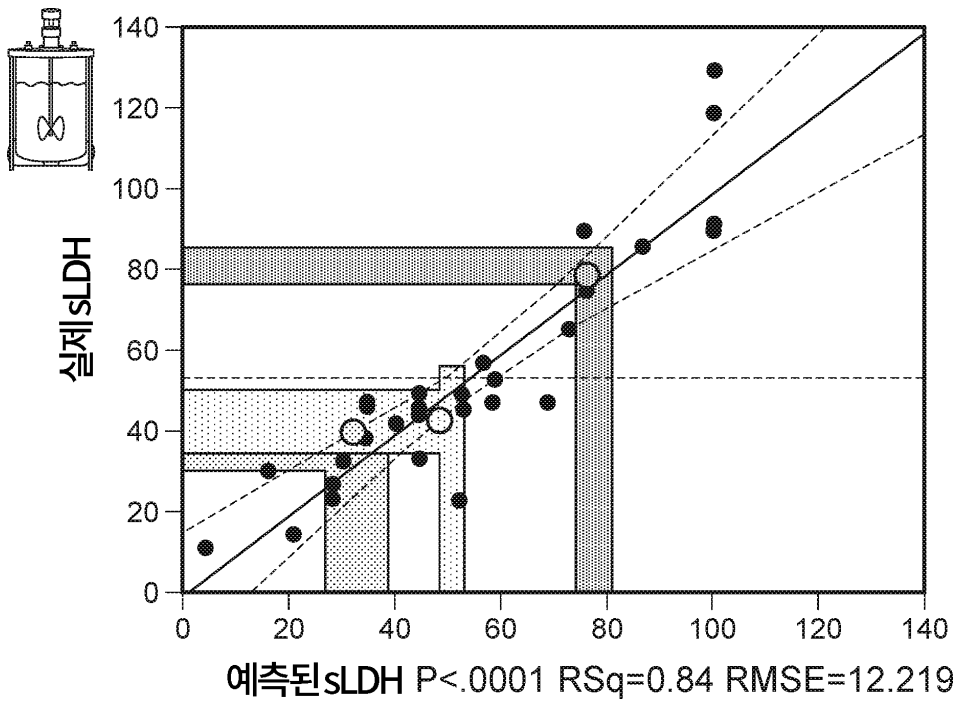
고정 최적화



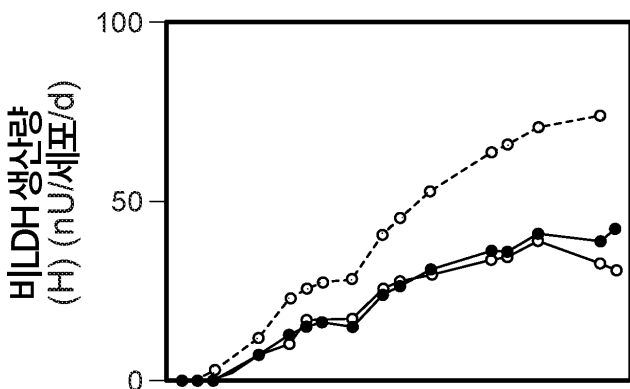
도면12



도면13a



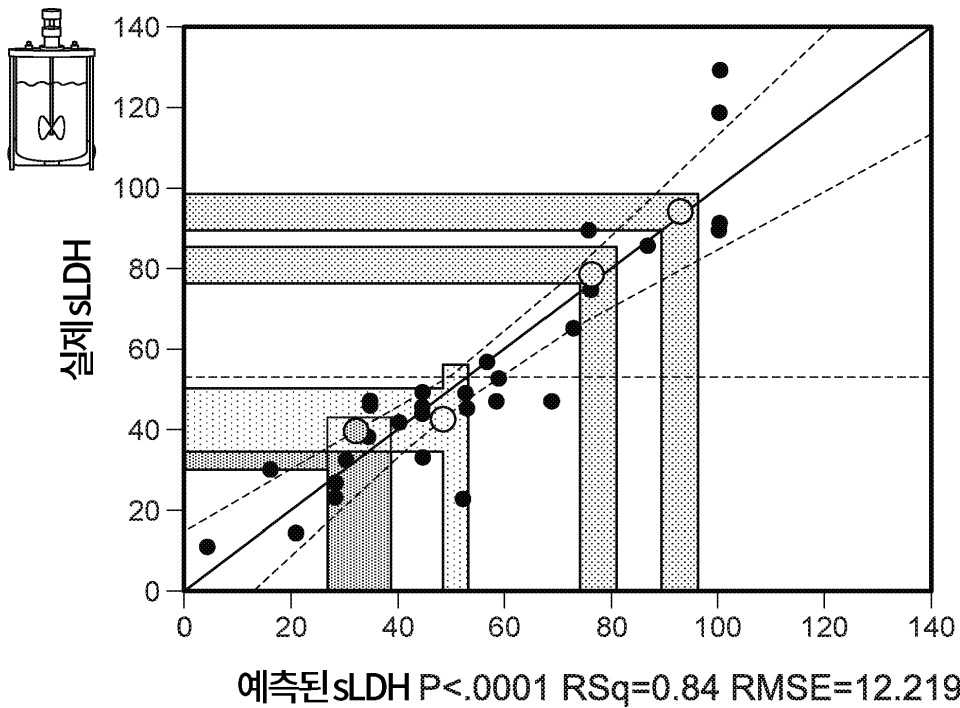
도면13b



도면13c

10L 벤치탑		진탕플라스크 모델	
관찰된 LDH		예측된 LDH	
Avg	Std	Avg	Std
39.00	8.49	37.00	4.24
43.00	7.07	54.00	4.24
80.50	3.54	80.00	4.24
Min	Max	Min	Max
30.51	47.49	32.76	41.24
35.93	50.07	49.76	58.24
76.96	84.04	75.76	84.24

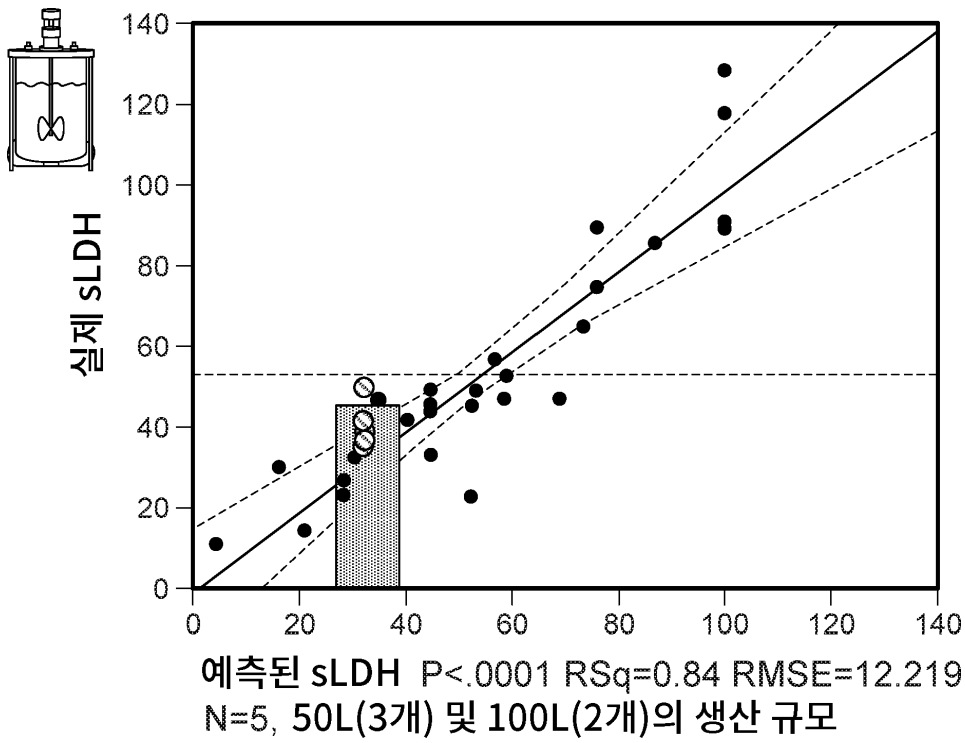
도면14



변경된 조건에 대한 n=1

소포제가 30 ppm에서 80 ppm까지 증가됨			
관찰된 LDH 범위		예측된 LDH 범위	
94.74	99.36	90.19	96.38

도면15a



도면15b

LDH		예측값	
50L		모델	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