(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월19일
(11) 등록번호 10-2769649
(24) 등록일자 2025년02월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) *C12N 9/40* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0682 (2013.01)
C12N 9/2465 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7027804(분할)
(22) 출원일자(국제) 2015년12월21일
심사청구일자 2023년08월16일
(85) 번역문제출일자 2023년08월16일
(65) 공개번호 10-2023-0125102
(43) 공개일자 2023년08월28일
(62) 원출원 특허 10-2017-7020466
원출원일자(국제) 2015년12월21일
심사청구일자 2020년12월18일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/067040
(87) 국제공개번호 WO 2016/106192
국제공개일자 2016년06월30일
(30) 우선권주장
62/095,734 2014년12월22일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Peng, H. et al., Biotechnol. Prog. (2014) 30(6):1411-1418
Tordahl, K. et al, Study of a perfusion process of Chinese Hamster Ovary cells by ATF filtration in bioreactor, KTH VETENSKAP OCH KONST, (2009.09.11.)

(73) 특허권자
젠자임 코포레이션
미국 메사추세츠주 02141 캠브리지 워터 스트리트 450
(72) 발명자
황, 크리스토퍼
미국 02142 매사추세츠주 케임브리지 켄달 스트리트 500
존슨, 티모시
미국 02142 매사추세츠주 케임브리지 켄달 스트리트 500
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

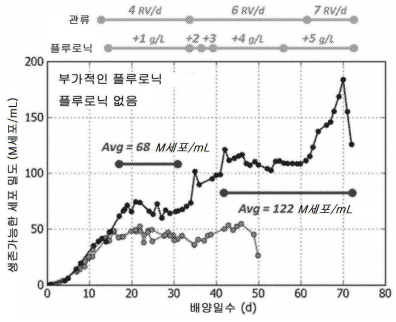
전체 청구항 수 : 총 22 항 심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 **포유류 세포의 배양 방법**

(57) 요 약

본 발명은 1.8 g/L의 농도 또는 1.8 g/L 초과의 농도에서 폴록사머-188을 포함하는 액체 배지, 또는 기공 크기, 기공 유형, 기체 유속, 배지 내 생존가능한 세포 밀도, 및 세포 스트레스와 관련된 마커의 군으로부터 선택되는 하나 이상의 인자를 기반으로 선택된 폴록사머-188 농도를 포함하는 액체 배지에서 포유류 세포를 배양하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Y 302/01022 (2013.01)
C12N 2500/50 (2013.01)
C12N 2510/02 (2013.01)
(72) 발명자
왈터, 제이슨
미국 02142 매사추세츠주 케임브리지 켄달 스트리트 500
쳉, 쳉
미국 02142 매사추세츠주 케임브리지 켄달 스트리트 500
왕, 조나단
미국 02142 매사추세츠주 케임브리지 켄달 스트리트 500
샤, 네하
미국 02142 매사추세츠주 케임브리지 켄달 스트리트 500
배, 슬-아
미국 02142 매사추세츠주 케임브리지 켄달 스트리트 500

명 세 서

청구범위

청구항 1

액체 배지 중 폴록사머-188 농도를 생존가능한 세포 밀도의 함수로서 증가시킴으로써 90 x 10^6개 세포/mL 초과의 생존가능한 세포 밀도를 달성하도록 액체 배지에서 포유류 세포를 배양하는 방법으로서, 상기 방법은

재조합 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 포유류 세포를 재조합 단백질을 생성하기에 충분한 조건 하에 관류 배양하는 단계를 포함하고,

여기서 상기 관류 배양은 폴록사머-188을 1.8 g/L의 농도 또는 1.8 g/L 초과의 농도로 포함하는 액체 배지 내에서 배양하는 단계를 포함하고;

상기 관류 배양은

(a) 액체 배지 내 생존가능한 세포 밀도가 35 x 10^6개 세포/mL 내지 60 x 10^6개 세포/mL임을 확인한 다음, 액체 배지 내 폴록사머-188 농도를 1.8 g/L 내지 2.9 g/L까지 증가시키는 단계;

(b) 액체 배지 내 생존가능한 세포 밀도가 60 x 10^6개 세포/mL 내지 90 x 10^6개 세포/mL임을 확인한 다음, 액체 배지 내 폴록사머-188 농도를 3.0 g/L 내지 5.9 g/L까지 증가시키는 단계; 및

(c) 액체 배지 내 생존가능한 세포 밀도가 90 x 10^6개 세포/mL 초과임을 확인한 다음, 액체 배지 내 폴록사머-188 농도를 6.0 g/L 내지 8.0 g/L까지 증가시키는 단계

를 포함하는 것인, 액체 배지에서 포유류 세포를 배양하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 액체 배지가 소포제를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 액체 배지 내 소포제(g/L) 대 폴록사머-188(g/L)의 비율이 0.5% 내지 6.0%인 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 액체 배지 내 소포제(g/L) 대 폴록사머-188(g/L)의 비율이 1.0% 내지 3.0%인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

액체 배지 내에서 폴록사머-188을 1.8 g/L의 농도 또는 1.8 g/L 초과의 농도로 제공하도록,

배양 단계 이전에 폴록사머-188을 액체 배지에 첨가하는 것; 및

배양 단계 동안에 폴록사머-188을 액체 배지에 첨가하는 것

중 하나 또는 둘 다를 포함하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 관류 배양이,

제1 액체 배지 내에 배치된 포유류 세포를 포함하는 용기를 제공하고;

상기 용기를 32℃내지 40℃의 온도에서 적어도 7일의 배양 기간 동안 교반하면서 인큐베이션하고;

배양 기간의 처음 48시간 내지 96시간 후, 연속적으로 또는 주기적으로, 제1 부피의 제1 액체 배지를 제거하고,

상기 제1 액체 배지에 제2 부피의 제2 액체 배지를 첨가하는 것

을 포함하며,

상기 제1 부피 및 상기 제2 부피는 동일한 것인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 제2 액체 배지가 폴록사머-188을 제1 액체 배지 내의 폴록사머-188의 농도 초과의 농도로 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 제1 액체 배지가 폴록사머-188을 1.8 g/L의 농도 또는 1.8 g/L 미만의 농도로 포함하고, 제2 액체 배지가 폴록사머-188을 1.8 g/L 초과의 농도로 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

포유류 세포로부터의 재조합 단백질을 제1 액체 배지 또는 제2 액체 배지 또는 이들의 임의의 조합으로부터 수집하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 수집된 재조합 단백질을 약제학적 조성물로 제형화하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 11

제6항에 있어서, 제1 액체 배지 및 제2 액체 배지 중 하나 또는 둘 다가 화학적으로-정의된 액체 배양 배지, 혈청-무함유 액체 배양 배지, 혈청-함유 액체 배양 배지, 동물-유래 구성성분-무함유 액체 배양 배지 및 단백질-무함유 배지로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 재조합 단백질이 면역글로불린, 효소, 성장 인자, 단백질 단편 또는 조작된 단백질인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 효소가 갈락토시다제인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 갈락토시다제가 α-갈락토시다제인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, α-갈락토시다제가 α-갈락토시다제-A인 방법.

청구항 16

제1항에 있어서,

단계 (a)에서의 관류 배양이 1일 당 4 반응기 부피의 속도로 수행되는 것인 방법.

청구항 17

제1항에 있어서,

단계 (b)에서의 관류 배양이 1일 당 6 반응기 부피의 속도로 수행되는 것인 방법.

청구항 18

제1항에 있어서,

단계 (c)에서의 관류 배양이 1일 당 7 반응기 부피의 속도로 수행되는 것인 방법.

청구항 19

제1항에 있어서, 포유류 세포가 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포, 인간 배아 신장(HEK) 세포, NSO 세포, 베이비 햄스터 신장(BHK) 세포, PerC6 세포, Vero 세포 또는 HT-1080 세포주인 방법.

청구항 20

제1항에 있어서, 포유류 세포가 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포인 방법.

청구항 21

제6항에 있어서, 상기 용기가 관류 생물반응기인 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 관류 생물반응기가 1.5 L 내지 25,000 L의 부피를 갖는 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 2014년 12월 22일에 출원된 미국 가특허 출원 62/095,734에 대해 우선권을 주장하며, 이의 전체 내용은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은 생명공학 방법 및 재조합 단백질의 제조 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산을 함유하는 포유류 세포는 치료적으로 중요한 단백질 또는 상업적으로 중요한 단백질의 제조에 종종 사용된다. 다양한 제품 파이프라인의 현재 환경에서, 생명공학 회사는 치료용 단백질 약물 성분을 고도로 유연하고 비용-효과적으로 제조하기 위한 혁신적인 해결방안을 개발하기 위해 점점 노력하고 있다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 적어도 부분적으로, 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 포유류 세포가 1.8 g/L의 농도 또는 1.8 g/L 초과의 농도의 폴록사머(poloxamer)-188(예, 2.0 g/L 초과, 2.5 g/L 초과, 3.0 g/L 초과, 3.5 g/L 초과, 4.0 g/L 초과, 4.5 g/L 초과, 5.0 g/L 초과, 5.5 g/L 초과, 6.0 g/L 초과, 6.5 g/L 초과 또는 7.0 g/L 초과의 폴록사머-188)을 포함하는 배양 배지에서 생존가능하고 증식하며, 최적의 세포 성장이 특정 비율의 폴록사머-188 및 소포제에서 달성되며, 세포 배양물 내 폴록사머-188 농도를 생존가능한 세포 밀도의 함수로서 증가시킴으로써 높은 세포 밀도가 달성될 수 있고, 세포 증식을 촉진하기 위해 세포 배양물에 첨가되는 최적의 폴록사머-188 농도가 기공(pore) 크기, 기공 유형, 기체 유속, 배지 내 생존가능한 세포 밀도, 및 세포 스트레스와 관련된 마커의 군으로부터 선택되는 하나 이상의 인자에 따라 다르다는 발견을 기반으로 한다.

[0007] 본 발명은 포유류 세포의 배양 방법을 제공하며, 본 방법은, 재조합 단백질-인코딩 핵산을 포함하는 포유류 세포를, 재조합 단백질을 생성하기에 충분한 조건 하에 관류 배양하는 단계를 포함하며, 관류 배양은 폴록사머-188을 1.8 g/L의 농도 또는 1.8 g/L 초과의 농도로 포함하는 액체 배지 내에서 배양하는 단계를 포함하고, 폴록사머-188은 배지 내에 존재하고/거나 배양 단계 이전에 배지에 첨가되고/거나 배양 단계 동안에 배지에 첨가된다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 배지는 폴록사머-188을 1.8 g/L의 농도 또는 1.8 g/L 초과의 농도(예, 2.8 g/L의 농도 또는 2.8 g/L 초과의 농도, 4.0 g/L의 농도 또는 4.0 g/L 초과의 농

도, 6.0 g/L의 농도 또는 6.0 g/L 초과의 농도, 8.0 g/L의 농도 또는 8.0 g/L 초과의 농도, 또는 10.0 g/L의 농도 또는 10.0 g/L 초과의 농도)로 포함한다.

[0008] 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 배지는 소포제를 추가로 포함하고, 배지 내 소포제(g/L) : 액체 배지 내 폴록사머-188(g/L)의 비율은 약 0.5% 내지 약 6.0%(예, 약 1.0% 내지 약 5.5%, 또는 약 1.5% 내지 약 5.0%)이다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 본 방법은 배양 단계 이전에 폴록사머-188을 배지에 첨가하고/거나 배양 단계 동안에 폴록사머-188을 배지에 첨가하여, 배지에서 폴록사머-188을 1.8 g/L의 농도 또는 1.8 g/L 초과의 농도로 제공하는 단계를 포함한다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 폴록사머-188은 배지에 존재한다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 본 방법은 배양 단계 이전에 폴록사머-188을 배지에 첨가하고/거나 배양 단계 동안에 폴록사머-188을 배지에 첨가하여, 배지에서 폴록사머-188을 2.8 g/L의 농도 또는 2.8 g/L 초과의 농도(예, 4.0 g/L의 농도 또는 4.0 g/L 초과의 농도, 6.0 g/L의 농도 또는 6.0 g/L 초과의 농도, 8.0 g/L의 농도 또는 8.0 g/L 초과의 농도, 또는 10.0 g/L의 농도 또는 10.0 g/L 초과의 농도)로 제공하는 단계를 포함한다.

[0009] 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 본 방법은 배지 내 폴록사머-188 농도를 시간 경과에 따라 증가시키는 단계를 포함한다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 배지 내 폴록사머-188 농도를 시간 경과에 따라 증가시키는 단계는 배지 내 생존가능한 세포 밀도를 기반으로 한다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 본 방법은, 배지 내 생존가능한 세포 밀도가 약 35 x 10^6개 세포/mL 내지 약 60 x 10^6개 세포/mL일 때, 배지 내 폴록사머-188 농도를 1.8 g/L 초과(예, 약 1.8 g/L 내지 약 3.0 g/L, 또는 약 2.3 g/L 내지 약 3.0 g/L)까지 증가시키는 단계를 포함한다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 본 방법은, 배지 내 생존가능한 세포 밀도가 약 60 x 10^6개 세포/mL 내지 약 90 x 10^6개 세포/mL일 때, 배지 내 폴록사머-188 농도를 3.0 g/L 초과(예, 약 3.0 g/L 내지 약 6.0 g/L, 또는 약 3.6 g/L 내지 약 6.0 g/L)까지 증가시키는 단계를 포함한다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 본 방법은, 배지 내 생존가능한 세포 밀도가 90 x 10^6개 세포/mL 초과일 때, 배지 내 폴록사머-188 농도를 6.0 g/L 초과(예, 7.0 g/L 초과, 8.0 g/L 초과, 또는 10.0 g/L 초과)까지 증가시키는 단계를 포함한다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태는, 배지 내 생존가능한 세포 밀도가 약 35 x 10^6개 세포/mL 내지 약 60 x 10^6개 세포/mL일 때, 배지 내 폴록사머-188 농도를 약 1.8 g/L 내지 약 3.0 g/L까지 증가시키는 단계; 배지 내 생존가능한 세포 밀도가 약 60 x 10^6개 세포/mL 내지 약 90 x 10^6개 세포/mL일 때, 배지 내 폴록사머-188 농도를 약 3.0 g/L 내지 약 6.0 g/L까지 증가시키는 단계; 및 배지 내 생존가능한 세포 밀도가 90 x 10^6개 세포/mL 초과일 때, 배지 내 폴록사머-188 농도를 6.0 g/L 초과까지 증가시키는 단계를 포함한다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태는 배양 동안 하나 이상의 시점에서 배지 내 생존가능한 세포 밀도를 확인하는 단계를 추가로 포함한다.

[0010] 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 관류 배양은, 제1 액체 배지 내에 배치된 포유류 세포를 포함하는 용기를 제공하는 단계; 용기를 약 32℃ 내지 약 40℃의 온도에서 적어도 약 7일의 배양 기간 동안 교반하면서 인큐베이션하는 단계; 및 배양 기간의 처음 48시간 내지 96시간 후, 연속적으로 또는 주기적으로, 제1 부피의 제1 액체 배지를 제거하고, 제1 액체 배지에 제2 부피의 제2 액체 배지를 첨가하는 단계를 포함하며, 여기서, 제1 부피 및 제2 부피는 대략 동일하다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 제2 액체 배지는 폴록사머-188을 제1 액체 배지에서보다 더 큰 농도로 포함한다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 제1 액체 배지는 폴록사머-188을 1.8 g/L의 농도 또는 1.8 g/L 미만의 농도로 포함하고, 제2 액체 배지는 폴록사머-188을 1.8 g/L 초과의 농도(예, 2.8 g/L 초과의 농도, 4.0 g/L 초과의 농도, 6.0 g/L 초과의 농도, 8.0 g/L 초과의 농도, 또는 10.0 g/L 초과의 농도)로 포함한다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 본 방법은, 제2 부피의 제2 액체 배지를 제1 액체 배지에 첨가하기 이전 또는 이후에, 폴록사머-188을 제2 액체 배지에 첨가하여, 제2 배지에서 폴록사머-188을 1.8 g/L의 농도 또는 1.8 g/L 초과의 농도(예, 2.8 g/L 초과의 농도, 4.0 g/L 초과의 농도, 6.0 g/L 초과의 농도, 8.0 g/L 초과의 농도, 또는 10.0 g/L 초과의 농도)로 제공하는 단계를 포함한다.

[0011] 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태는 재조합 단백질을 포유류 세포로부터, 제1 액체 배지, 또는 제2 액체 배지 또는 이들의 임의의 조합으로부터 수집하는 단계를 추가로 포함한다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태는 수집된 재조합 단백질을 약제학적 조성물 내로 제형화하는 단계를 추가로 포함한다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 수집은, 배양이 생존가능한 세포 밀도를

30 x 10^6개 세포/mL 초과(예, 50 x 10^6개 세포/mL 초과, 100 x 10^6개 세포/mL 초과, 150 x 10^6개 세포/mL 초과, 또는 200 x 10^6개 세포/mL 초과)로 달성한 후, 수행된다.

[0012] 본 발명은 또한, 포유류 세포의 배양 방법을 제공하며, 본 방법은, 용기, 이 용기 내에 배치된 액체 배지, 및 스파저(sparger)를 통해 액체 배지 내에 기체를 제공하기 위해 배열된 복수의 기공들을 포함하며 이 용기 내에 배치된 스파저를 포함하는 배양 시스템을 제공하는 단계; 및 배양 시스템 내에서 재조합 단백질을 생성하기에 충분한 조건 및 기체 유속 하에, 재조합 단백질-인코딩 핵산을 포함하는 포유류 세포를 배양 시스템 내에서 관류 배양하는 단계를 포함하며, 여기서, 배지는, 기공 크기, 기공 유형, 기체 유속, 배지 내 생존가능한 세포 밀도, 및 세포 스트레스와 관련된 마커의 군으로부터 선택되는 하나 이상의 인자를 기반으로 선택된 폴록사머-188 농도를 포함한다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 선택된 폴록사머-188 농도는, 배양 단계 이전에 폴록사머-188을 배지에 첨가하고/거나 배양 단계 동안에 폴록사머-188을 배지에 첨가함으로써 달성된다.

[0013] 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 인자는 기공 유형이고, 기공 유형은 신터드(sintered) 기공 또는 드릴드(drilled) 기공이다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 본 방법은, 기공 유형 및 기공 크기를 기반으로, 기공 유형이 드릴드 기공이고 기공 크기가 약 750 ㎛ 내지 약 1.5 ㎜일 때, 폴록사머-188을 약 2.3 g/L 내지 약 3.3 g/L의 농도에서 선택하거나, 기공 유형이 드릴드 기공이고 기공 크기가 약 900 ㎛ 내지 약 1.1 ㎜일 때, 폴록사머-188을 약 2.5 g/L 내지 약 3.1 g/L의 농도에서 선택하는 단계를 포함한다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 본 방법은, 기공 유형 및 기공 크기를 기반으로, 기공 유형이 드릴드 기공이고 기공 크기가 약 250 ㎛ 내지 약 750 ㎛일 때, 폴록사머-188을 약 3.3 g/L 내지 약 4.3 g/L의 농도에서 선택하거나, 기공 유형이 드릴드 기공이고 기공 크기가 약 400 ㎛ 내지 약 600 ㎛일 때, 폴록사머-188을 약 3.5 g/L 내지 약 4.1 g/L의 농도에서 선택하는 단계를 포함한다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 본 방법은, 기공 유형 및 기공 크기를 기반으로, 기공 유형이 드릴드 기공이고 기공 크기가 약 1 ㎛ 내지 약 250 ㎛(예, 약 1 ㎛ 내지 약 200 ㎛, 약 160 ㎛ 내지 약 190 ㎛, 또는 약 170 ㎛ 내지 약 180 ㎛)일 때, 폴록사머-188을 4.3 g/L 초과의 농도(예, 5.0 g/L 초과의 농도, 6.0 g/L 초과의 농도, 8.0 g/L 초과의 농도, 또는 10.0 g/L 초과의 농도)에서 선택하는 단계를 포함한다.

[0014] 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 본 방법은, 기공 유형 및 기공 크기를 기반으로, 기공 유형이 신터드 기공이고 기공 크기가 150 ㎛ 초과일 때, 폴록사머-188을 약 1.8 g/L 내지 약 3.3 g/L의 농도에서 선택하는 단계를 포함한다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 본 방법은, 기공 유형 및 기공 크기를 기반으로, 기공 유형이 신터드 기공이고 기공 크기가 약 80 ㎛ 내지 약 150 ㎛일 때, 폴록사머-188을 약 3.3 g/L 내지 약 4.3 g/L의 농도에서 선택하거나, 기공 유형이 신터드 기공이고 기공 크기가 약 90 ㎛ 내지 약 110 ㎛일 때, 폴록사머-188을 약 3.5 g/L 내지 약 4.1 g/L의 농도에서 선택하는 단계를 포함한다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 본 방법은, 기공 유형 및 기공 크기를 기반으로, 기공 유형이 신터드 기공이고 기공 크기가 약 1 ㎛ 내지 약 80 ㎛일 때, 폴록사머-188을 4.5 g/L 초과의 농도(예, 5.0 g/L 초과의 농도, 6.0 g/L 초과의 농도, 8.0 g/L 초과의 농도, 또는 10.0 g/L 초과의 농도)에서 선택하는 단계를 포함한다.

[0015] 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 관류 배양은, 제1 액체 배지를 포함하는 배양 시스템을 약 32℃ 내지 약 40℃의 온도에서 적어도 약 7일의 배양 기간 동안 교반하면서 인큐베이션하는 단계; 및 배양 기간의 처음 48시간 내지 96시간 후, 연속적으로 또는 주기적으로, 제1 부피의 제1 액체 배지를 제거하고, 제1 액체 배지에 제2 부피의 제2 액체 배지를 첨가하는 단계를 포함한다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 제2 액체 배지는 폴록사머-188을 제1 액체 배지 내 폴록사머-188의 농도보다 더 큰 농도로 포함한다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 제2 배지는 선택된 폴록사머-188 농도를 포함한다.

[0016] 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태는 재조합 단백질을 포유류 세포의 내부로부터, 제1 액체 배지, 또는 제2 액체 배지 또는 이들의 임의의 조합으로부터 수집하는 단계를 추가로 포함한다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태는 수집된 재조합 단백질을 약제학적 조성물 내로 제형화하는 단계를 추가로 포함한다.

[0017] 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 용기는 관류 생물반응기이다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 관류 생물반응기의 부피는 약 1.5 L 내지 약 25,000 L이다. 본원에 기

재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 배양 기간은 10일 초과이다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, (c)에서 제1 부피의 제1 액체 배지를 제거하고, 제2 부피의 제2 액체 배지를 첨가하는 단계는 연속적으로 수행된다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, (c)에서 제1 부피의 제1 액체 배지를 제거하고, 제2 부피의 제2 액체 배지를 첨가하는 단계는 주기적으로 수행된다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, (c)에서 제거되는 제1 액체 배지의 제1 부피 및 첨가되는 제2 액체 배지의 제2 부피는 시간 경과에 따라 증가한다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 제1 액체 배지 및/또는 제2 액체 배지는 화학적으로-정의된 액체 배양 배지, 혈청-무함유 액체 배양 배지, 혈청-함유 액체 배양 배지, 동물-유래 구성성분-무함유 액체 배양 배지 및 단백질-무함유 배지의 군으로부터 선택된다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 기간의 처음 약 48시간 내지 96시간 후, 각각의 24시간의 기간에서, (c)에서 제거된 제1 액체 배지의 제1 부피 및 첨가된 제2 액체 배지의 제2 부피는 제1 액체 배지의 부피 또는 용기의 부피의 약 0.3배 내지 약 10배이다.

[0018] 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 포유류 세포는 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포, 인간 배아 신장(HEK) 세포, NSO 세포, 베이비 햄스터 신장(BHK) 세포, PerC6 세포, Vero 세포 또는 HT-1080 세포주이다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 재조합 단백질은 면역글로불린, 효소, 성장 인자, 단백질 단편 또는 조작된 단백질이다.

[0019] 본원에 사용된 바와 같이, 명사 앞의 단어 "a"는 특정 명사의 하나 이상을 나타낸다. 예를 들어, 구 "포유류 세포"는 "하나 이상의 포유류 세포"를 나타낸다.

[0020] 용어 "포유류 세포"는 임의의 포유류(예, 인간, 햄스터, 마우스, 그린 원숭이, 래트, 돼지, 소 또는 토끼)로부터의 임의의 세포 또는 이로부터 유래되는 임의의 세포를 의미한다. 예를 들어, 포유류 세포는 불멸화된 세포일 수 있다. 일부 실시형태에서, 포유류 세포는 분화된 또는 미분화된 세포이다. 포유류 세포의 비제한적인 예들은 본원에 기재되어 있다. 포유류 세포의 부가적인 예는 당업계에 알려져 있다.

[0021] 용어 "배양" 또는 "세포 배양"은, 물리적 조건들의 조절된 세트 하에서의 포유류 세포의 유지 또는 증식을 의미한다.

[0022] 용어 "포유류 세포의 배양물," "배양물" 또는 "세포 배양물"은, 물리적 조건들의 조절된 세트 하에서 유지 또는 증식된 복수의 포유류 세포들을 함유하는 액체 배지를 의미한다.

[0023] 용어 "액체 배양 배지" 또는 "액체 배지"는, 세포(예, 포유류 세포)가 *시험관내에서* 성장 또는 증식하도록 하는 충분한 영양분을 함유한 유체를 의미한다. 예를 들어, 액체 배지는 아미노산(예, 20개 아미노산), 퓨린(예, 하이포크산틴), 피리미딘(예, 티미딘), 콜린, 이노시톨, 티아민, 엽산, 비오틴, 칼슘, 니아신아미드, 피리독신, 리보플라빈, 티미딘, 시아노코발라민, 피루베이트, 리포산, 마그네슘, 글루코스, 나트륨, 칼륨, 철, 구리, 아연 및 중탄산나트륨 중 하나 이상을 함유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 액체 배지는 포유류 유래의 혈청을 함유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 액체 배지는 포유류 유래의 혈청 또는 또 다른 추출물(정의된(defined) 액체 배지)을 함유하지 않는다. 일부 실시형태에서, 액체 배지는 미량 금속, 포유류 성장 호르몬 및/또는 포유류 성장 인자를 함유할 수 있다. 액체 배지의 또 다른 예는 최소 배지(예, 무기 염, 탄소 소스 및 물만 함유하는 배지)이다. 액체 배지의 비제한적인 예는 본원에 기재되어 있다. 액체 배지의 부가적인 예는 당업계에 알려져 있고, 상업적으로 입수가능하다. 액체 배지는 임의의 밀도의 포유류 세포를 함유할 수 있다. 예를 들어, 본원에 사용된 바와 같이, 생물반응기로부터 제거된 액체 배지의 부피에는 포유류 세포가 실질적으로 없을 수 있다.

[0024] 용어 "동물-유래 구성성분-무함유 액체 배양 배지"는 포유류로부터 유래된 임의의 구성성분(예, 단백질 또는 혈청)을 함유하지 않는 액체 배지를 의미한다.

[0025] 용어 "혈청-무함유 액체 배양 배지"는 포유류 혈청을 함유하지 않는 액체 배지를 의미한다.

[0026] 용어 "혈청-함유 액체 배양 배지"는 포유류 혈청을 함유하는 액체 배지를 의미한다.

[0027] 용어 "화학적으로-정의된 액체 배양 배지"는 당업계의 용어이고, 모든 화학적 구성성분들이 알려져 있는 액체 배지를 의미한다. 예를 들어, 화학적으로-정의된 액체 배지는 태아 소 혈청, 소 혈청 알부민 또는 인간 혈청 알부민을 함유하지 않는데, 왜냐하면 이들 조제물이 전형적으로 알부민과 지질의 복잡한 혼합물을 함유하기 때문이다.

[0028] 용어 "단백질-무함유 액체 배양 배지"는 임의의 단백질(예, 임의의 검출가능한 단백질)을 함유하지 않는 액체 배지를 의미한다.

[0029] 용어 "교반"은 용기 내에서 액체 배지의 일부를 스터어링(stirring)하거나 그렇지 않다면 움직이게 하는 것을 의미한다. 이는 예를 들어, 생물 반응기에서 액체 배지 중 용존 O_2 농도를 증가시키기 위해 수행된다. 교반은 임의의 당업계에 알려진 방법, 예를 들어 장비 또는 프로펠러를 사용하여 수행될 수 있다. 생물반응기에서 액체 배지의 일부를 교반하는 데 사용될 수 있는 예시적인 장치 및 방법은 당업계에 알려져 있다.

[0030] 용어 "면역글로불린"은 면역글로불린 단백질(예, 가변 도메인 서열, 골격 서열 또는 불변 도메인 서열)의 적어도 15개 아미노산(예, 적어도 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개 또는 100개 아미노산)으로 된 아미노산 서열을 함유하는 폴리펩타이드를 의미한다. 면역글로불린은 예를 들어 경쇄 면역글로불린의 적어도 15개의 아미노산, 예를 들어 중쇄 면역글로불린의 적어도 15개의 아미노산을 포함할 수 있다. 면역글로불린은 단리된 항체(예, IgG, IgE, IgD, IgA 또는 IgM)일 수 있다. 면역글로불린은 IgG의 하위부류(예, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4)일 수 있다. 면역글로불린은 항체 단편, 예를 들어 Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편 또는 scFv 단편일 수 있다. 면역글로불린은 또한, 이중-특이적 항체 또는 삼중-특이적 항체, 또는 이량체, 삼량체 또는 다량체 항체, 또는 다이아바디(diabody), Affibody® 또는 Nanobody®일 수 있다. 면역글로불린은 또한, 적어도 하나의 면역글로불린 도메인을 함유하는 조작된 단백질(예, 융합 단백질)일 수 있다. 면역글로불린의 비제한적인 예는 본원에 기재되어 있으며, 면역글로불린의 부가적인 예는 당업계에 알려져 있다. 재조합 면역글로불린은 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법을 사용하여 생성될 수 있다.

[0031] 용어 "단백질 단편" 또는 "폴리펩타이드 단편"은 길이가 적어도 또는 약 4개 아미노산, 적어도 또는 약 5개 아미노산, 적어도 또는 약 6개 아미노산, 적어도 또는 약 7개 아미노산, 적어도 또는 약 8개 아미노산, 적어도 또는 약 9개 아미노산, 적어도 또는 약 10개 아미노산, 적어도 또는 약 11개 아미노산, 적어도 또는 약 12개 아미노산, 적어도 또는 약 13개 아미노산, 적어도 또는 약 14개 아미노산, 적어도 또는 약 15개 아미노산, 적어도 또는 약 16개 아미노산, 적어도 또는 약 17개 아미노산, 적어도 또는 약 18개 아미노산, 적어도 또는 약 19개 아미노산, 또는 적어도 또는 약 20개 아미노산, 또는 길이가 20개 초과의 아미노산인 폴리펩타이드 서열의 일부를 의미한다. 재조합 단백질 단편은 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법을 사용하여 생성될 수 있다.

[0032] 용어 "조작된 단백질"은 유기체(예, 포유류) 내에 존재하는 내인성 핵산에 의해 천연적으로 인코딩되지 않는 폴리펩타이드를 의미한다. 조작된 단백질의 예로는, 효소(예, 조작된 효소의 안정성 및/또는 촉매적 활성의 증가를 초래하는 하나 이상의 아미노산 치환, 결실, 삽입 또는 첨가를 가짐), 융합 단백질, 항체(예, 2가 항체, 3가 항체 또는 다이아바디), 및 적어도 하나의 재조합 스캐폴딩 서열을 함유하는 항원-결합 단백질 등이 있다. 재조합 조작된 단백질은 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법을 사용하여 생성될 수 있다.

[0033] 용어 "분비된 단백질" 또는 "분비된 재조합 단백질"은, 포유류 세포 내에서 번역될 때 적어도 하나의 분비 신호 서열을 본래 함유하였으며 적어도 부분적으로는 포유류 세포 내에서 분비 신호 서열의 효소적 절단을 통해 세포 외 공간(예, 액체 배지) 내로 적어도 부분적으로 분비되는 단백질(예, 재조합 단백질)을 의미한다. 당업자는, "분비된" 단백질이 분비된 단백질인 것으로 여겨지기 위해 세포로부터 완전히 해리될 필요가 없음을 이해할 것이다.

[0034] 용어 "관류 생물반응기"는 제1 액체 배지 내에 복수의 세포들(예, 포유류 세포)을 함유하는 생물반응기를 의미하며, 여기서, 생물반응기에 존재하는 세포의 배양은 제1 액체 배지의 주기적인 또는 연속적인 제거, 및 이와 동시에 또는 그 직후 동일한 부피의 제2 액체 배지를 생물반응기에 실질적으로 첨가하는 것을 포함한다. 일부 예에서, 배양 기간(예, 일일 기준으로 액체 배지 재공급 속도) 동안 증분 기간(예, 약 24시간 기간, 약 1분 내지 약 24시간의 기간, 또는 24시간 초과의 기간)에 걸쳐 제거되고 첨가되는 제1 액체 배지의 부피에 있어서 증분 변화(예, 증가 또는 감소)가 존재한다. 매일 제거되고 대체되는 배지의 분획은 배양되고 있는 특정 세포, 초기 접종 밀도, 및 특정 시간에서의 세포 밀도에 따라 다를 수 있다. "RV" 또는 "반응기 부피"는 배양 공정의 시작 시 존재하는 액체 배지의 부피(예, 접종 후 존재하는 액체 배지의 총 부피)를 의미한다.

[0035] 용어 "유가 생물반응기"는 당업계의 용어이고, 제1 액체 배지 내에 복수의 세포들(예, 포유류 세포)을 함유하는 생물반응기를 의미하며, 여기서, 생물반응기에 존재하는 세포의 배양은 세포 배양물로부터 제1 액체 배지 또는 제2 액체 배지의 실질적인 또는 상당한 제거 없이 제1 액체 배지에의 제2 액체 배지의 주기적인 또는 연속적인 첨가를 포함한다. 제2 액체 배지는 제1 액체 배지와 동일할 수 있다. 유기 배양의 일부 예에서, 제2 액체 배지는 제1 액체 배지의 농축된 형태이다. 유가 배양의 일부 예에서, 제2 액체 배지는 건조 분말로서 첨가된다.

[0036] 용어 "스파저"는 당업계의 용어이고, 유입구, 몸체 및 하나 이상의 기공을 가진 표면을 가진 장치를 의미하며, 여기서, 유입구, 몸체 및 하나 이상의 기공은 이러한 유입구를 통해, 이러한 몸체를 통해, 그리고 하나 이상의

기공 밖으로 기체의 유동이 가능하도록 디자인된다. 스파저가 세포 배양물에 사용되는 경우, 하나 이상의 기공들 중 하나가 세포 배양물과 접촉하여, 기체가 적어도 하나의 기공을 나와 세포 배양물 내로 유동하게 된다. 스파저는 종종 이의 기공 크기 및 기공 유형에 의해 기재된다. 기공 크기와 기공 유형의 상이한 조합을 가진 스파저의 비제한적인 예는 본원에 기재되어 있다.

[0037] 용어 "기공 크기"는 당업계의 용어이고, 단일 기공을 가진 스파저에서 단일 기공의 직경, 또는 2개 이상의 기공들을 가진 스파저에서 2개 이상의 기공들의 평균 직경을 지칭한다.

[0038] 용어 "세포 스트레스와 관련된 마커"는 당업계의 용어이고, 생리학적 스트레스 하의 세포(예, 괴사성 세포 사멸 또는 세포자멸사 세포 사멸을 겪는 세포)에 의해 액체 배지 내로 방출되는 생물학적 분자, 또는 생리학적 스트레스 하의 세포(예, 괴사성 세포 사멸 또는 세포자멸사 세포 사멸을 겪는 세포)에서 생성되거나 상승된 수준을 가진 생물학적 분자를 지칭한다. 생리학적 스트레스 하에 세포에 의해 방출되는 세포 스트레스와 관련된 마커의 비제한적인 예로는, 프로테아제(예, 활성화된 카스파제), 락테이트 데하이드로게나제, 게놈 DNA(예, 뉴클레오좀 DNA), 시토크롬 c 및 활성화된 PARP 등이 있다. 생리학적 스트레스 하에 세포에서 생성되거나 상승된 수준을 가진 세포 스트레스와 관련된 마커의 비제한적인 예로는, 활성화된 카스파제, 시토크롬 c, 활성화된 PARP 및 외면화된(externalized) 포스파티딜세린 등이 있다.

[0039] "비생산속도(specific production rate)" 또는 "SPR"은 당업계의 용어이고, 본원에 사용된 바와 같이 1일 당 1개 포유류 세포 당 생성되는 재조합 단백질의 질량 또는 효소적 활성을 지칭한다. 재조합 치료적 항체에 대한 SPR은 통상 질량/세포/일로서 측정된다. 재조합 치료적 효소에 대한 SPR은 통상 단위/세포/일 또는 (단위/질량)/세포/일로서 측정된다.

[0040] "부피 생산 속도" 또는 "VPR"은 당업계의 용어이고, 본원에 사용된 바와 같이 1일 당 배양물 1 부피 당(예, 생물반응기, 용기 또는 튜브 부피 1 L 당) 생성되는 재조합 단백질의 질량 또는 효소적 활성을 지칭한다. 재조합 치료적 항체에 대한 VPR은 통상 질량/L/일로서 측정된다. 재조합 치료적 효소에 대한 VPR은 통상 단위/L/일 또는 질량/L/일로서 측정된다.

[0041] 구 "농도에서의 폴록사머-188" 및 "폴록사머-188 농도"는 본원에서 상호호환적으로 사용된다. 구 "X g/L 이상의 폴록사머-188" 및 "X g/L의 농도 또는 X g/L 초과의 농도에서의 폴록사머-188"은 본원에서 상호호환적으로 사용된다.

[0042] 다르게 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 당업자에 의해 보편적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 방법 및 물질은 본 발명에서의 용도를 위해 본원에 기재되어 있으며; 당업계에 알려진 다른 적합한 방법 및 물질 또한, 사용될 수 있다. 물질, 방법 및 예는 단지 예시적인 것일 뿐 제한하려는 것이 아니다. 본원에 언급된 모든 공개, 특허 출원, 특허, 서열, 데이터베이스 엔트리 및 다른 참조들은 그 전체가 원용에 의해 포함되어 있다. 상충하는 경우, 정의를 포함한 본 명세서가 좌우할 것이다.

[0043] 본 발명의 다른 특징 및 이점들은 하기 상세한 설명 및 도면, 및 청구항으로부터 명확해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 배양 기간의 길이에 걸쳐 부가적인 폴록사머-188을 함유하지 않는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L 정상(steady) 농도의 폴록사머-188) 액체 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행(회색 데이터), 및 배양 기간의 길이에 걸쳐 증가하는 양의 폴록사머-188을 함유하는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L로부터 6.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188) 액체 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행(검은색 데이터)에서 시간 경과에 따른 생존가능한 세포 밀도의 그래프이다.

도 2는 배양 기간의 길이에 걸쳐 증가하는 양의 폴록사머-188을 함유하는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L로부터 6.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188) 액체 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행에서 시간 경과에 따른 비성장속도의 그래프이다.

도 3은 배양 기간의 길이에 걸쳐 부가적인 폴록사머-188을 함유하지 않는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L 정상 농도의 폴록사머-188) 액체 배지를 사용하여 수행되는 2개의 관류 세포 배양물 진행(회색 데이터), 및 배양 기간의 길이에 걸쳐 증가하는 양의 폴록사머-188을 함유하는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L로부터 6.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188) 액체 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행(검은색 데이터)에서 생존가능한 세포의 백분율의 그래프이다.

도 4는 배양 기간의 길이에 걸쳐 증가하는 양의 폴록사머-188을 함유하는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L로부터 6.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188) 액체 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행에서 시간 경과에 따른 부피 생산성의 그래프이다.

도 5는 배양 기간의 길이에 걸쳐 증가하는 양의 폴록사머-188을 함유하는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L로부터 6.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188) 액체 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행에서 시간 경과에 따른 비생산성의 그래프이다.

도 6은 6.8 g/L 폴록사머-188을 함유하는 관류 세포 배양물로부터 수합된 정화된 액체 배지(레인 1); 실온에서 7일 동안 인큐베이션된 6.8 g/L 폴록사머-188을 함유하는 관류 세포 배양물로부터 수합된 정화된 액체 배지(레인 1a); 3.95 g/L 폴록사머-188을 함유하는 관류 세포 배양물로부터 수합된 정화된 액체 배지(레인 2); 3.95 g/L 폴록사머-188을 함유하고 실온에서 7일 동안 인큐베이션된 관류 세포 배양물로부터 수합된 정화된 액체 배지(레인 2a); 3.95 g/L 폴록사머-188을 함유하고, 6.8 g/L 폴록사머-188의 농도에 도달하기 위해 폴록사머-188이 보충되고 실온에서 9일 동안 인큐베이션된 관류 세포 배양물로부터 수합된 정화된 액체 배지(레인 2b); 3.0 g/L 폴록사머-188을 함유하는 관류 세포 배양물로부터 수합된 정화된 액체 배지(레인 3); 3.0 g/L 폴록사머-188을 함유하고 실온에서 7일 동안 인큐베이션된 관류 세포 배양물로부터 수합된 정화된 액체 배지(레인 3a); 및 3.0 g/L 폴록사머-188을 함유하고, 6.8 g/L 폴록사머-188의 농도에 도달하기 위해 폴록사머-188이 보충되고 실온에서 9일 동안 인큐베이션된 관류 세포 배양물로부터 수합된 정화된 액체 배지(레인 3b)에 존재하는 재조합 항체의 분해 산물을 보여주는 Bis-Tris 겔이다.

도 7은 크기가 20 ㎛인 신터드 기공을 가진 스파저, 및 배양 기간의 길이에 걸쳐 증가하는 양의 폴록사머-188을 함유하는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L로부터 5.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188) 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행(사각형); 크기가 200 ㎛인 드릴드 기공을 가진 스파저, 및 배양 기간의 길이에 걸쳐 증가하는 양의 폴록사머-188을 함유하는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L로부터 4.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188) 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행(삼각형); 및 크기가 500 ㎛인 드릴드 기공을 가진 스파저, 및 배양 기간의 길이에 걸쳐 증가하는 양의 폴록사머-188을 함유하는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L로부터 3.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188) 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행(원형)에 대한 시간 경과에 따른 생존가능한 세포 밀도의 그래프이다.

도 8은 크기가 20 ㎛인 신터드 기공을 가진 스파저, 및 배양 기간의 길이에 걸쳐 증가하는 양의 폴록사머-188을 함유하는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L로부터 5.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188) 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행(사각형); 크기가 200 ㎛인 드릴드 기공을 가진 스파저, 및 배양 기간의 길이에 걸쳐 증가하는 양의 폴록사머-188을 함유하는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L로부터 4.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188) 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행(삼각형); 및 크기가 500 ㎛인 드릴드 기공을 가진 스파저, 및 배양 기간의 길이에 걸쳐 증가하는 양의 폴록사머-188을 함유하는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L로부터 3.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188) 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행(원형)에 대한 시간 경과에 따른 비성장속도의 그래프이다.

도 9는 크기가 20 ㎛인 신터드 기공을 가진 스파저, 및 배양 기간의 길이에 걸쳐 증가하는 양의 폴록사머-188을 함유하는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L로부터 5.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188) 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행(사각형); 크기가 200 ㎛인 드릴드 기공을 가진 스파저, 및 배양 기간의 길이에 걸쳐 증가하는 양의 폴록사머-188을 함유하는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L로부터 4.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188) 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행(삼각형); 및 크기가 500 ㎛인 드릴드 기공을 가진 스파저, 및 배양 기간의 길이에 걸쳐 증가하는 양의 폴록사머-188을 함유하는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L로부터 3.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188) 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행(원형)에 대한 시간 경과에 따른 비(specific) 락토스 데하이드로게나제 생성의 그래프이다.

도 10은 크기가 20 ㎛인 신터드 기공을 가진 스파저, 및 배양 기간의 길이에 걸쳐 증가하는 양의 폴록사머-188을 함유하는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L로부터 5.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188) 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행(사각형); 크기가 200 ㎛인 드릴드 기공을 가진 스파저, 및 배양 기간의 길이에 걸쳐 증가하는 양의 폴록사머-188을 함유하는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L로부터 4.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188) 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행(삼각형); 및 크기가 500 ㎛인 드릴드 기공을 가진 스파저, 및 배양 기간의 길이에 걸쳐 증가하는 양의 폴록사머-188을 함유하는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L로부터 3.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188) 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물

진행(원형)에 대한 시간 경과에 따른 생존가능한 세포의 백분율의 그래프이다.

도 11은 크기가 20 ㎛인 신터드 기공을 가진 스파저, 및 배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L 폴록사머-188을 함유하는 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행(열린 원형); 크기가 20 ㎛인 신터드 기공을 가진 스파저, 및 배양 기간의 길이에 걸쳐 증가하는 양의 폴록사머-188을 함유하는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L로부터 5.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188) 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행(사각형); 크기가 200 ㎛인 드릴드 기공을 가진 스파저, 및 배양 기간의 길이에 걸쳐 증가하는 양의 폴록사머-188을 함유하는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L로부터 4.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188) 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행(삼각형); 및 크기가 500 ㎛인 드릴드 기공을 가진 스파저, 및 배양 기간의 길이에 걸쳐 증가하는 양의 폴록사머-188을 함유하는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L로부터 3.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188) 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행(채워진 원형)에 대한 시간 경과에 따른 비 락토스 데하이드로게나제 생성의 그래프이다.

도 12는 크기가 20 ㎛인 신터드 기공을 가진 스파저, 및 배양 기간의 길이에 걸쳐 증가하는 양의 폴록사머-188을 함유하는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L로부터 5.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188) 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행(사각형); 크기가 200 ㎛인 드릴드 기공을 가진 스파저, 및 배양 기간의 길이에 걸쳐 증가하는 양의 폴록사머-188을 함유하는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L로부터 4.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188) 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행(삼각형); 및 크기가 500 ㎛인 드릴드 기공을 가진 스파저, 및 배양 기간의 길이에 걸쳐 증가하는 양의 폴록사머-188을 함유하는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L로부터 3.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188) 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행(채워진 원형)에 대한 부피 생산성의 그래프이다.

도 13은 크기가 20 ㎛인 신터드 기공을 가진 스파저, 및 배양 기간의 길이에 걸쳐 증가하는 양의 폴록사머-188을 함유하는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L로부터 5.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188) 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행(사각형); 크기가 200 ㎛인 드릴드 기공을 가진 스파저, 및 배양 기간의 길이에 걸쳐 증가하는 양의 폴록사머-188을 함유하는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L로부터 4.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188) 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행(삼각형); 및 크기가 500 ㎛인 드릴드 기공을 가진 스파저, 및 배양 기간의 길이에 걸쳐 증가하는 양의 폴록사머-188을 함유하는(배양 기간의 길이에 걸쳐 1.8 g/L로부터 3.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188) 배양 배지를 사용하여 수행되는 관류 세포 배양물 진행(채워진 원형)에 대한 시간 경과에 따른 호기성 글루코스 소모율의 그래프이다.

도 14는 0%의 소포제-c : 폴록사머-188 비율(채워진 원형), 5.6%의 소포제-c : 폴록사머-188 비율 (열린 원형), 11.1%의 소포제-c : 폴록사머-188 비율(채워진 사각형), 27.8%의 소포제-c : 폴록사머-188 비율(열린 사각형), 또는 55.6%의 소포제-c : 폴록사머-188 비율(채워진 삼각형)을 함유하는 CD-CHO 액체 배지를 사용하여 수행되는 상이한 회분식 진탕 플라스크 세포 배양물 진행들에 대한 시간 경과에 따른 생존가능한 세포 밀도의 그래프이다.

도 15는 0%의 소포제-c : 폴록사머-188 비율(채워진 원형), 5.6%의 소포제-c : 폴록사머-188 비율 (열린 원형), 11.1%의 소포제-c : 폴록사머-188 비율(채워진 사각형), 27.8%의 소포제-c : 폴록사머-188 비율(열린 사각형), 또는 55.6%의 소포제-c : 폴록사머-188 비율(채워진 삼각형)을 함유하는 CD-CHO 액체 배지를 사용하여 수행되는 상이한 회분식 진탕 플라스크 세포 배양물 진행들에 대한 시간 경과에 따른 비 락테이트 데하이드로게나제 생성 속도의 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 본 발명은 포유류 세포의 배양 방법을 제공하며, 본 방법은, 재조합 단백질-인코딩 핵산을 포함하는 포유류 세포를, 재조합 단백질을 생성하기에 충분한 조건 하에 배양하는 단계를 포함하며, 여기서, 배양은 폴록사머-188을 1.8 g/L의 농도 또는 1.8 g/L 초과의 농도로 포함하는 액체 배지 내에서 배양하는 단계를 포함하고, 폴록사머-188은 배지 내에 존재하고/거나 배양 단계 이전에 배지에 첨가되고/거나 배양 단계 동안에 배지에 첨가된다. 본 발명은 또한, 포유류 세포의 배양 방법을 제공하며, 본 방법은, 용기, 이 용기 내에 배치된 액체 배지, 및 스파저(sparger)를 통해 액체 배지 내에 기체를 제공하기 위해 배열된 복수의 기공들을 포함하며 이 용기 내에 배치된 스파저를 포함하는 배양 시스템을 제공하는 단계, 및 배양 시스템 내에서 재조합 단백질을 생성하기에 충분한 조건 및 기체 유속 하에, 재조합 단백질-인코딩 핵산을 포함하는 포유류 세포를 배양 시스템 내에서 배양하는 단계를 포함하며, 여기서, 배지는, 기공 크기, 기공 유형, 기체 유속, 배지 내 생존가능한 세포 밀도, 및 세포 스트레스와 관련된 마커의 군으로부터 선택되는 하나 이상의 인자를 기반으로 선택된 폴록사머-188 농

도를 포함한다. 이들 방법의 예시적인 비제한적인 양태들은 하기에 기재되어 있다.

[0046] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 방법은 생존가능한 세포 밀도가 20 x 10^6개 세포/mL 초과, 25 x 10^6개 세포/mL 초과, 30 x 10^6개 세포/mL 초과, 35 x 10^6개 세포/mL 초과, 40 x 10^6개 세포/mL 초과, 45 x 10^6개 세포/mL 초과, 50 x 10^6개 세포/mL 초과, 55 x 10^6개 세포/mL 초과, 60 x 10^6개 세포/mL 초과, 65 x 10^6개 세포/mL 초과, 70 x 10^6개 세포/mL 초과, 75 x 10^6개 세포/mL 초과, 80 x 10^6개 세포/mL 초과, 85 x 10^6개 세포/mL 초과, 90 x 10^6개 세포/mL 초과, 95 x 10^6개 세포/mL 초과, 100 x 10^6개 세포/mL 초과, 105 x 10^6개 세포/mL 초과, 110 x 10^6개 세포/mL 초과, 115 x 10^6개 세포/mL 초과, 120 x 10^6개 세포/mL 초과, 125 x 10^6개 세포/mL 초과, 130 x 10^6개 세포/mL 초과, 135 x 10^6개 세포/mL 초과, 140 x 10^6개 세포/mL 초과, 145 x 10^6개 세포/mL 초과, 150 x 10^6개 세포/mL 초과, 155 x 10^6개 세포/mL 초과, 160 x 10^6개 세포/mL 초과, 165 x 10^6개 세포/mL 초과, 170 x 10^6개 세포/mL 초과, 175 x 10^6개 세포/mL 초과, 180 x 10^6개 세포/mL 초과, 185 x 10^6개 세포/mL 초과, 190 x 10^6개 세포/mL 초과, 195 x 10^6개 세포/mL 초과, 200 x 10^6개 세포/mL 초과, 205 x 10^6개 세포/mL 초과, 210 x 10^6개 세포/mL 초과, 215 x 10^6개 세포/mL 초과, 220 x 10^6개 세포/mL 초과, 225 x 10^6개 세포/mL 초과, 230 x 10^6개 세포/mL 초과, 235 x 10^6개 세포/mL 초과, 240 x 10^6개 세포/mL 초과, 245 x 10^6개 세포/mL 초과, 또는 250 x 10^6개 세포/mL 초과인 세포 배양물을 달성할 수 있다. 세포 배양물의 생존가능한 세포 밀도의 확인 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0047] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 방법은 적어도 5일(예, 적어도 10일, 적어도 15일, 적어도 20일, 적어도 25일, 적어도 30일, 적어도 35일, 적어도 40일, 적어도 45일, 적어도 50일, 적어도 55일, 적어도 60일, 적어도 65일, 또는 적어도 70일)의 배양 기간에 걸쳐 세포 생존력 백분율이 75% 초과(예, 80% 초과, 85% 초과 또는 90% 초과)인 세포 배양물을 제공한다.

[0048] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 방법은 배양 기간 동안 임의의 시점에서 출발 시 적어도 5일(예, 적어도 10일, 적어도 15일, 적어도 20일, 적어도 25일, 적어도 30일, 적어도 35일, 적어도 40일, 적어도 45일, 적어도 50일, 적어도 55일, 적어도 60일, 적어도 65일 또는 적어도 70일)에 걸쳐 부피 생산 속도(volumetric productivity rate; VPR)가 적어도 1.5 g/L/d(예, 적어도 1.6 g/L/d, 적어도 1.7 g/L/d, 적어도 1.8 g/L/d, 적어도 1.9 g/L/d, 적어도 2.0 g/L/d, 적어도 2.1 g/L/d, 적어도 2.2 g/L/day, 적어도 2.3 g/L/d, 적어도 2.4 g/L/d, 적어도 2.5 g/L/d, 적어도 2.6 g/L/d, 적어도 2.7 g/L/d, 적어도 2.8 g/L/d, 적어도 2.9 g/L/d, 적어도 3.0 g/L/d, 적어도 3.1 g/L/d, 적어도 3.2 g/L/d, 적어도 3.3 g/L/d, 적어도 3.4 g/L/d, 적어도 3.5 g/L/d, 적어도 3.6 g/L/d, 적어도 3.7 g/L/d, 적어도 3.8 g/L/d, 적어도 3.9 g/L/d, 적어도 4.0 g/L/d, 적어도 4.1 g/L/d, 적어도 4.2 g/L/d, 적어도 4.3 g/L/d, 적어도 4.4 g/L/d, 또는 적어도 4.5 g/L/d)인 배양물을 달성할 수 있다.

[0049] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 방법은 수집 시, (1.8 g/L 이상의 폴록사머-188을 포함하는 액체 배지에서의 배양을 포함하지 않는 유사한 방법으로 생성된 재조합 단백질과 비교하여) 감소된 수준(예, 약 5% 이하의 감소, 약 10% 이하의 감소, 약 15% 이하의 감소, 약 20% 이하의 감소, 약 25% 이하의 감소, 약 30% 이하의 감소, 약 35% 이하의 감소, 약 40% 이하의 감소, 약 45% 이하의 감소, 약 50% 이하의 감소, 약 55% 이하의 감소, 약 60% 이하의 감소, 약 65% 이하의 감소, 약 70% 이하의 감소, 약 75% 이하의 감소, 약 80% 이하의 감소, 약 80% 이하의 감소, 약 85%, 또는 약 90% 이하의 감소)의 분해를 가진 재조합 단백질의 생성을 초래한다. 세포 배양물로부터 수집된 재조합 단백질의 분해 수준은 예를 들어, 겔 전기영동 및/또는 면역블로팅을 사용하여 검출될 수 있다.

[0050] 일부 실시형태에서, 본 방법은 배양 기간 내의 임의의 시점에서 출발 시 적어도 약 5(예, 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 적어도 55, 적어도 60, 적어도 65 또는 적어도 70) 연속일에 걸쳐 60 nU/세포/일 미만(예, 55 nU/세포/일 미만, 50 nU/세포/일 미만, 45 nU/세포/일 미만, 40 nU/세포/일 미만, 35 nU/세포/일 미만, 30 nU/세포/일 미만, 25 nU/세포/일 미만, 또는 20 nU/세포/일 미만)의 비 락테이트 데하이드로게나제 생성(specific lactate dehydrogenase production)을 가진 세포 배양물을 초래한다.

[0051] 일부 실시형태에서, 본 방법은 세포를 정상 상태(steady state)(정지상(stationary phase))에서 적어도

5일(예, 적어도 10일, 적어도 15일, 적어도 20일, 적어도 25일, 적어도 30일, 적어도 35일, 적어도 40일, 적어도 45일 또는 적어도 50일) 동안 예를 들어 약 30 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 35 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 40 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 45 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 50 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 55 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 60 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 65 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 70 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 75 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 80 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 85 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 90 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 95 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 100 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 105 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 110 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 115 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 120 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 125 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 130 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 135 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 140 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 145 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 150 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 155 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 160 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 165 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 170 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 175 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 180 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 185 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 190 x 10^6개 세포/mL 이상, 약 195 x 10^6개 세포/mL, 또는 약 200 x 10^6개 세포/mL 이상의 생존가능한 세포 밀도에서 유지시킨다.

[0052] **배양물 부피**

[0053] 기재된 방법들 중 임의의 방법에서 배양 단계(예, 관류 배양 단계)는 배양물 내에서 세포 유지 및 증식을 허용하는 조건 하에, 20 L 내지 약 8,000 L(예, 약 20 L 내지 약 7,000 L, 약 20 L 내지 약 6,000 L, 약 20 L 내지 약 5,000 L, 약 20 L 내지 약 4,000 L, 약 20 L 내지 약 3,000 L, 약 20 L 내지 약 2,500 L, 약 20 L 내지 약 2,000 L, 약 20 L 내지 약 1,500 L, 약 20 L 내지 약 1,000 L, 약 20 L 내지 약 500 L, 약 20 L 내지 약 200 L, 약 20 L 내지 약 100 L, 약 100 L 내지 약 8,000 L, 약 100 L 내지 약 7,000 L, 약 100 L 내지 약 6,000 L, 약 100 L 내지 약 5,000 L, 약 100 L 내지 약 4,000 L, 약 100 L 내지 약 3,000 L, 약 100 L 내지 약 2,000 L, 약 100 L 내지 약 1,500 L, 약 100 L 내지 약 1,000 L, 약 100 L 내지 약 800 L, 약 100 L 내지 약 700 L, 약 100 L 내지 약 600 L, 약 100 L 내지 약 500 L, 약 100 L 내지 약 400 L, 약 100 L 내지 약 300 L, 약 100 L 내지 약 200 L, 약 500 L 내지 약 8,000 L, 약 500 L 내지 약 7,000 L, 약 500 L 내지 약 6,000 L, 약 500 L 내지 약 5,000 L, 약 500 L 내지 약 4,000 L, 약 500 L 내지 약 3,000 L, 약 500 L 내지 약 2,000 L, 약 500 L 내지 약 1,500 L, 약 500 L 내지 약 1,000 L, 약 500 L 내지 약 750 L, 약 1,000 L 내지 약 8,000 L, 약 1,000 L 내지 약 7,000 L, 약 1,000 L 내지 약 6,000 L, 약 1,000 L 내지 약 5,000 L, 약 1,000 L 내지 약 4,000 L, 약 1,000 L 내지 약 3,000 L, 약 1,000 L 내지 약 2,000 L, 약 1,000 L 내지 약 1,500 L, 약 2,000 L 내지 약 8,000 L, 약 2,000 L 내지 약 7,000 L, 약 2,000 L 내지 약 6,000 L, 약 2,000 L 내지 약 5,000 L, 약 2,000 L 내지 약 4,000 L, 약 2,000 L 내지 약 3,000 L, 약 3,000 L 내지 약 8,000 L, 약 3,000 L 내지 약 7,000 L, 약 3,000 L 내지 약 6,000 L, 약 3,000 L 내지 약 5,000 L, 약 3,000 L 내지 약 4,000 L, 약 4,000 L 내지 약 8,000 L, 약 4,000 L 내지 약 7,000 L, 약 4,000 L 내지 약 6,000 L, 약 4,000 L 내지 약 5,000 L, 약 5,000 L 내지 약 8,000 L, 약 5,000 L 내지 약 7,000 L, 약 5,000 L 내지 약 6,000 L, 약 6,000 L 내지 약 8,000 L, 약 6,000 L 내지 약 7,000 L, 또는 약 7,000 L 또는 약 8,000 L)의 부피를 가진 세포 배양물을 인큐베이션하는 단계를 포함할 수 있다.

[0054] 당업계에 알려진 바와 같이, 세포 배양물의 부피는 (예, 하기 기재되는 바와 같이) 배양 기간 동안 시간 경과에 따라 실질적으로 동일하게 유지될 수 있거나 증가할 수 있다.

[0055] **배양 기간**

[0056] 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법에서 배양(예, 관류 배양)은 약 3일 내지 약 100일(예, 약 3일 내지 약 95일, 약 3일 내지 약 90일, 약 3일 내지 약 85일, 약 3일 내지 약 80일, 약 3일 내지 약 75일, 약 3일 내지 약 70일, 약 3일 내지 약 65일, 약 3일 내지 약 60일, 약 3일 내지 약 55일, 약 3일 내지 약 50일, 약 3일 내지 약 45일, 약 3일 내지 약 40일, 약 3일 내지 약 35일, 약 3일 내지 약 30일, 약 3일 내지 약 25일, 약 3일 내지 약 20일, 약 3일 내지 약 15일, 약 3일 내지 약 10일, 약 5일 내지 약 100일, 약 5일 내지 약 95일, 약 5일 내지 약 90일, 약 5일 내지 약 85일, 약 5일 내지 약 80일, 약 5일 내지 약 75일, 약 5일 내지 약 70일, 약 5일 내지 약 65일, 약 5일 내지 약 60일, 약 5일 내지 약 55일, 약 5일 내지 약 50일, 약 5일 내지 약 45일, 약 5일 내지 약 40일, 약 5일 내지 약 35일, 약 5일 내지 약 30일, 약 5일 내지 약 25일, 약 5일 내지 약 20일, 약 5일 내지 약 15일, 약 5일 내지 약 10일, 약 10일 내지 약 100일, 약 10일 내지 약 95일, 약 10일 내지 약 90일, 약 10

일 내지 약 85일, 약 10일 내지 약 80일, 약 10일 내지 약 75일, 약 10일 내지 약 70일, 약 10일 내지 약 65일, 약 10일 내지 약 60일, 약 10일 내지 약 55일, 약 10일 내지 약 50일, 약 10일 내지 약 45일, 약 10일 내지 약 40일, 약 10일 내지 약 35일, 약 10일 내지 약 30일, 약 10일 내지 약 25일, 약 10일 내지 약 20일, 약 10일 내지 약 15일, 약 15일 내지 약 100일, 약 15일 내지 약 95일, 약 15일 내지 약 90일, 약 15일 내지 약 85일, 약 15일 내지 약 80일, 약 15일 내지 약 75일, 약 15일 내지 약 70일, 약 15일 내지 약 65일, 약 15일 내지 약 60일, 약 15일 내지 약 55일, 약 15일 내지 약 50일, 약 15일 내지 약 45일, 약 15일 내지 약 40일, 약 15일 내지 약 35일, 약 15일 내지 약 30일, 약 15일 내지 약 25일, 약 15일 내지 약 20일, 약 20일 내지 약 100일, 약 20일 내지 약 95일, 약 20일 내지 약 90일, 약 20일 내지 약 85일, 약 20일 내지 약 80일, 약 20일 내지 약 75일, 약 20일 내지 약 70일, 약 20일 내지 약 65일, 약 20일 내지 약 60일, 약 20일 내지 약 55일, 약 20일 내지 약 50일, 약 20일 내지 약 45일, 약 20일 내지 약 40일, 약 20일 내지 약 35일, 약 20일 내지 약 30일, 약 20일 내지 약 25일, 약 25일 내지 약 100일, 약 25일 내지 약 95일, 약 25일 내지 약 90일, 약 25일 내지 약 85일, 약 25일 내지 약 80일, 약 25일 내지 약 75일, 약 25일 내지 약 70일, 약 25일 내지 약 65일, 약 25일 내지 약 60일, 약 25일 내지 약 55일, 약 25일 내지 약 50일, 약 25일 내지 약 45일, 약 25일 내지 약 40일, 약 25일 내지 약 35일, 약 25일 내지 약 30일, 약 30일 내지 약 100일, 약 30일 내지 약 90일, 약 30일 내지 약 80일, 약 30일 내지 약 70일, 약 30일 내지 약 60일, 약 30일 내지 약 50일, 약 30일 내지 약 40일, 약 40일 내지 약 100일, 약 40일 내지 약 90일, 약 40일 내지 약 80일, 약 40일 내지 약 70일, 약 40일 내지 약 60일, 약 40일 내지 약 50일, 약 50일 내지 약 100일, 약 50일 내지 약 90일, 약 50일 내지 약 80일, 약 50일 내지 약 70일, 약 50일 내지 약 60일, 약 60일 내지 약 100일, 약 60일 내지 약 90일, 약 60일 내지 약 80일, 약 60일 내지 약 70일, 약 70일 내지 약 100일, 약 70일 내지 약 90일, 약 70일 내지 약 80일, 약 80일 내지 약 100일, 약 80일 내지 약 90일, 또는 약 90일 내지 약 100일)의 기간에 걸쳐 수행될 수 있다.

[0057] **포유류 세포**

[0058] 본원에 제공된 방법에서 배양된(예, 관류 배양된) 포유류 세포는 현탁액 내에서 성장하는 세포 또는 부착 세포일 수 있다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법에서 배양될 수 있는 포유류 세포의 비제한적인 예로는, 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포(예, CHO DG44 세포 또는 CHO-K1s 세포), Sp2.0, 골수종 세포(예, NS/0), B-세포, 하이브리도마 세포, T-세포, 인간 배아 신장(HEK) 세포(예, HEK 293E 및 HEK 293F), 아프리카 그린 원숭이 신장 상피 세포(Vero) 세포, NSO 세포, 베이비 햄스터 신장(BHK) 세포, PerC6 세포, Vero 세포, HT-1080 세포 및 마딘-다바이 개과(Madin-Darby Canine)(코커 스패니얼) 신장 상피 세포(MDCK) 세포 등이 있다. 부착 세포가 배양되는 일부 예에서, 배양물은 또한, 복수의 마이크로캐리어(예, 하나 이상의 기공을 함유하는 마이크로캐리어)를 함유할 수 있다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법에서 배양될 수 있는 부가적인 포유류 세포는 당업계에 알려져 있다.

[0059] 포유류 세포는 재조합 단백질을 인코딩하는 재조합 핵산(예, 포유류 세포의 게놈에 안정하게 통합된 핵산)을 함유할 수 있다. 예시적인 재조합 단백질을 인코딩하는 재조합 핵산의 비제한적인 예들은, 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성될 수 있는 재조합 단백질과 마찬가지로 하기에 기재되어 있다. 일부 경우, 생물반응기(예, 본원에 기재된 생물반응기들 중 임의의 생물반응기)에서 배양되는 포유류 세포는 더 큰 배양물로부터 유래되었다.

[0060] 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산은 분자생물학 및 분자유전학에 알려진 여러 가지 다양한 방법들을 사용하여 포유류 세포 내에 도입될 수 있다. 비제한적인 예로는, 트랜스펙션(예, 리포펙션), 트랜스덕션(예, 렌티바이러스, 아데노바이러스 또는 레트로바이러스 감염) 및 전기천공 등이 있다. 일부 경우, 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산은 포유류 세포의 염색체 내에 안정하게 통합되지 않는 한편(일시적인 트랜스펙션), 다른 경우, 핵산은 통합된다. 대안적으로 또는 부가적으로, 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산은 플라스미드 및/또는 포유류 인공 염색체(예, 인간 인공 염색체)에 존재할 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 핵산은 바이러스 벡터(예, 렌티바이러스, 레트로바이러스 또는 아데노바이러스 벡터)를 사용하여 세포 내에 도입될 수 있다. 핵산은 프로모터 서열(예, 강한 프로모터, 예컨대 β-액틴 프로모터 및 CMV 프로모터, 또는 유도성 프로모터)에 작동적으로 연결될 수 있다. 핵산을 함유하는 벡터는 요망된다면, 선별 마커(예, 포유류 세포에 하이그로마이신, 퓨로마이신 또는 네오마이신 내성을 부여하는 유전자)도 함유할 수 있다.

[0061] 일부 경우, 재조합 단백질은 분비된 단백질이고, 포유류 세포에 의해 세포외 배지(예, 관류 배양 시 제1 및/또는 제2 액체 배지, 또는 유가 배양(feed batch culturing) 시 제1 액체 배지 및/또는 공급 액체 배지) 내로 방출된다. 예를 들어, 가용성 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 분비 신호 펩타이드를 인코딩하는 서열을 재조합 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 함유할 수 있으며, 이러한 분비 신호 펩타이드는 포유류 세포에 존재하

는 효소에 의해 절단되어 후속해서 세포외 배지(예, 제1 및/또는 제2 액체 배지) 내로 방출된다.

[0062] **생물반응기**

[0063] 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법에서 배양 단계는 생물반응기(예, 관류 생물반응기 또는 유가(fed batch) 생물반응기)를 사용하여 수행될 수 있다. 배양 단계를 수행하는 데 사용되는 생물반응기(예, 관류 생물반응기 또는 유가 생물반응기)는 약 24 L 내지 약 25,000 L(예, 약 24 L 내지 약 20,000 L, 약 24 L 내지 약 15,000 L, 약 24 L 내지 약 10,000 L, 약 24 L 내지 약 9,500 L, 약 24 L 내지 약 9,000 L, 약 24 L 내지 약 8,500 L, 약 24 L 내지 약 8,000 L, 약 24 L 내지 약 7,500 L, 약 24 L 내지 약 7,000 L, 약 24 L 내지 약 6,500 L, 약 24 L 내지 약 6,000 L, 약 24 L 내지 약 5,500 L, 약 24 L 내지 약 5,000 L, 약 24 L 내지 약 4,500 L, 약 24 L 내지 약 4,000 L, 약 24 L 내지 약 3,500 L, 약 24 L 내지 약 3,000 L, 약 24 L 내지 약 2,500 L, 약 24 L 내지 약 2,000 L, 약 24 L 내지 약 1,500 L, 약 24 L 내지 약 1,000 L, 약 24 L 내지 약 900 L, 약 24 L 내지 약 800 L, 약 24 L 내지 약 700 L, 약 24 L 내지 약 600 L, 약 24 L 내지 약 500 L, 약 24 L 내지 약 400 L, 약 24 L 내지 약 300 L, 약 24 L 내지 약 200 L, 약 24 L 내지 약 100 L, 약 100 L 내지 약 25,000 L, 약 100 L 내지 약 20,000 L, 약 100 L 내지 약 15,000, 약 100 L 내지 약 10,000 L, 약 100 L 내지 약 9,500 L, 약 100 L 내지 약 9,000 L, 약 100 L 내지 약 8,500 L, 약 100 L 내지 약 8,000 L, 약 100 L 내지 약 7,500 L, 약 100 L 내지 약 7,000 L, 약 100 L 내지 약 6,500 L, 약 100 L 내지 약 6,000 L, 약 100 L 내지 약 5,500 L, 약 100 L 내지 약 5,000 L, 약 100 L 내지 약 4,500 L, 약 100 L 내지 약 4,000 L, 약 100 L 내지 약 3,500 L, 약 100 L 내지 약 3,000 L, 약 100 L 내지 약 2,500 L, 약 100 L 내지 약 2,000 L, 약 100 L 내지 약 1,500 L, 약 100 L 내지 약 1,000 L, 약 100 L 내지 약 900 L, 약 100 L 내지 약 800 L, 약 100 L 내지 약 700 L, 약 100 L 내지 약 600 L, 약 100 L 내지 약 500 L, 약 100 L 내지 약 400 L, 약 100 L 내지 약 300 L, 약 100 L 내지 약 200 L, 약 200 L 내지 약 25,000 L, 약 200 L 내지 약 20,000 L, 약 200 L 내지 약 15,000 L, 약 200 L 내지 약 10,000 L, 약 200 L 내지 약 9,500 L, 약 200 L 내지 약 9,000 L, 약 200 L 내지 약 8,500 L, 약 200 L 내지 약 8,000 L, 약 200 L 내지 약 7,500 L, 약 200 L 내지 약 7,000 L, 약 200 L 내지 약 6,500 L, 약 200 L 내지 약 6,000 L, 약 200 L 내지 약 5,500 L, 약 200 L 내지 약 5,000 L, 약 200 L 내지 약 4,500 L, 약 200 L 내지 약 4,000 L, 약 200 L 내지 약 3,500 L, 약 200 L 내지 약 3,000 L, 약 200 L 내지 약 2,500 L, 약 200 L 내지 약 2,000 L, 약 200 L 내지 약 1,500 L, 약 200 L 내지 약 1,000 L, 약 200 L 내지 약 900 L, 약 200 L 내지 약 800 L, 약 200 L 내지 약 700 L, 약 200 L 내지 약 600 L, 약 200 L 내지 약 500 L, 약 200 L 내지 약 400 L, 약 200 L 내지 약 300 L, 약 500 L 내지 약 25,000 L, 약 500 L 내지 약 20,000 L, 약 500 L 및 약 15,000 L, 약 500 L 내지 약 10,000 L, 약 500 L 내지 약 9,500 L, 약 500 L 내지 약 9,000 L, 약 500 L 내지 약 8,500 L, 약 500 L 내지 약 8,000 L, 약 500 L 내지 약 7,500 L, 약 500 L 내지 약 7,000 L, 약 500 L 내지 약 6,500 L, 약 500 L 내지 약 6,000 L, 약 500 L 내지 약 5,500 L, 약 500 L 내지 약 5,000 L, 약 500 L 내지 약 4,500 L, 약 500 L 내지 약 4,000 L, 약 500 L 내지 약 3,500 L, 약 500 L 내지 약 3,000 L, 약 500 L 내지 약 2,500 L, 약 500 L 내지 약 2,000 L, 약 500 L 내지 약 1,500 L, 약 500 L 내지 약 1,000 L, 약 500 L 내지 약 900 L, 약 500 L 내지 약 800 L, 약 500 L 내지 약 700 L, 약 500 L 내지 약 600 L, 약 1,000 L 내지 약 25,000 L, 약 1,000 L 내지 약 20,000 L, 약 1,000 L 내지 약 15,000 L, 약 1,000 L 내지 약 10,000 L, 약 1,000 L 내지 약 9,500 L, 약 1,000 L 내지 약 9,000 L, 약 1,000 L 내지 약 8,500 L, 약 1,000 L 내지 약 8,000 L, 약 1,000 L 내지 약 7,500 L, 약 1,000 L 내지 약 7,000 L, 약 1,000 L 내지 약 6,500 L, 약 1,000 L 내지 약 6,000 L, 약 1,000 L 내지 약 5,500 L, 약 1,000 L 내지 약 5,000 L, 약 1,000 L 내지 약 4,500 L, 약 1,000 L 내지 약 4,000 L, 약 1,000 L 내지 약 3,500 L, 약 1,000 L 내지 약 3,000 L, 약 1,000 L 내지 약 2,500 L, 약 1,000 L 내지 약 2,000 L, 약 1,000 L 내지 약 1,500 L, 약 2,000 L 내지 약 25,000 L, 약 2,000 L 내지 약 20,000 L, 약 2,000 L 내지 약 15,000 L, 약 2,000 L 내지 약 10,000 L, 약 2,000 L 내지 약 9,500 L, 약 2,000 L 내지 약 9,000 L, 약 2,000 L 내지 약 8,500 L, 약 2,000 L 내지 약 8,000 L, 약 2,000 L 내지 약 7,500 L, 약 2,000 L 내지 약 7,000 L, 약 2,000 L 내지 약 6,500 L, 약 2,000 L 내지 약 6,000 L, 약 2,000 L 내지 약 5,500 L, 약 2,000 L 내지 약 5,000 L, 약 2,000 L 내지 약 4,500 L, 약 2,000 L 내지 약 4,000 L, 약 2,000 L 내지 약 3,500 L, 약 2,000 L 내지 약 3,000 L, 약 2,000 L 내지 약 2,500 L, 약 3,000 L 내지 약 25,000 L, 약 3,000 L 내지 약 20,000 L, 약 3,000 L 내지 약 15,000 L, 약 3,000 L 내지 약 10,000 L, 약 3,000 L 내지 약 9,500 L, 약 3,000 L 내지 약 9,000 L, 약 3,000 L 내지 약 8,500 L, 약 3,000 L 내지 약 8,000 L, 약 3,000 L 내지 약 7,500 L, 약 3,000 L 내지 약 7,000 L, 약 3,000 L 내지 약 6,500 L, 약 3,000 L 내지 약 6,000 L, 약 3,000 L 내지 약 5,500 L, 약 3,000 L 내지 약 5,000 L, 약 3,000 L 내지 약 4,500 L, 약 3,000 L 내지 약 4,000 L, 약 3,000 L 내지 약 3,500 L, 약 4,000 L 내지 약 9,000 L, 약 4,000 L 내지 약 25,000 L, 약 4,000 L 내지 약 20,000 L, 약 4,000 L 내지 약 15,000 L, 약 4,000 L 내지 약 10,000

L, 약 4,000 L 내지 약 9,500 L, 약 4,000 L 내지 약 9,000 L, 약 4,000 L 내지 약 8,500 L, 약 4,000 L 내지 약 8,000 L, 약 4,000 L 내지 약 7,500 L, 약 4,000 L 내지 약 7,000 L, 약 4,000 L 내지 약 6,500 L, 약 4,000 L 내지 약 6,000 L, 약 4,000 L 내지 약 5,500 L, 약 4,000 L 내지 약 5,000 L, 약 4,000 L 내지 약 4,500 L, 약 5,000 L 내지 약 25,000 L, 약 5,000 L 내지 약 20,000 L, 약 5,000 L 내지 약 15,000 L, 약 5,000 L 내지 약 10,000 L, 약 5,000 L 내지 약 9,500 L, 약 5,000 L 내지 약 9,000 L, 약 5,000 L 내지 약 8,500 L, 약 5,000 L 내지 약 8,000 L, 약 5,000 L 내지 약 7,500 L, 약 5,000 L 내지 약 7,000 L, 약 5,000 L 내지 약 6,500 L, 약 5,000 L 내지 약 6,000 L, 약 5,000 L 내지 약 5,500 L, 약 6,000 L 내지 약 25,000 L, 약 6,000 L 내지 약 20,000 L, 약 6,000 L 내지 약 15,000 L, 약 6.000 L 내지 약 10,000 L, 약 6,000 L 내지 약 9,500 L, 약 6,000 L 내지 약 9,000 L, 약 6,000 L 내지 약 8,500 L, 약 6,000 L 내지 약 8,000 L, 약 6,000 L 내지 약 7,500 L, 약 6,000 L 내지 약 7,000 L, 약 6,000 L 내지 약 6,500 L, 7,000 L 내지 약 25,000 L, 약 7,000 L 내지 약 20,000 L, 약 7,000 L 내지 약 15,000 L, 약 7,000 L 내지 약 10,000 L, 약 7,000 L 내지 약 9,500 L, 약 7,000 L 내지 약 9,000 L, 약 7,000 L 내지 약 8,500 L, 약 7,000 L 내지 약 8,000 L, 약 7,000 L 내지 약 7,500 L, 약 8,000 L 내지 약 25,000 L, 약 8,000 L 내지 약 20,000 L, 약 8,000 L 내지 약 15,000 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 9,000 L 내지 약 25,000 L, 약 9,000 L 내지 약 20,000 L, 약 9,000 L 내지 약 15,000 L, 약 9,000 L 내지 약 10,000 L, 약 9,000 L 내지 약 9,500 L, 약 10,000 L 내지 약 25,000 L, 약 10,000 L 내지 약 20,000 L, 약 10,000 L 내지 약 15,000 L, 약 15,000 L 내지 약 25,000 L, 약 15,000 L 내지 약 20,000 L, 또는 약 20,000 L 내지 약 25,000 L)의 내부 부피(용량)를 가질 수 있다.

[0064] **배양 시스템**

[0065] 본원에 기재된 방법들 중 일부 방법은 용기, 상기 용기 내에 배치된 액체 배지(예, 본원에 기재된 배양 배지들 중 임의의 배양 배지), 및 스파저(sparger)를 통해 액체 배지 내에 기체를 제공하기 위해 배열된 복수의 기공들을 포함하며 상기 용기 내에 배치된 스파저를 포함하는 배양 시스템(예, 관류 배양 시스템)을 사용한다. 용기는 약 24 L 내지 약 20,000 L(예, 약 24 L 내지 약 15,000 L, 약 24 L 내지 약 10,000 L, 약 24 L 내지 약 9,500 L, 약 24 L 내지 약 9,000 L, 약 24 L 내지 약 8,500 L, 약 24 L 내지 약 8,000 L, 약 24 L 내지 약 7,500 L, 약 24 L 내지 약 7,000 L, 약 24 L 내지 약 6,500 L, 약 24 L 내지 약 6,000 L, 약 24 L 내지 약 5,500 L, 약 24 L 내지 약 5,000 L, 약 24 L 내지 약 4,500 L, 약 24 L 내지 약 4,000 L, 약 24 L 내지 약 3,500 L, 약 24 L 내지 약 3,000 L, 약 24 L 내지 약 2,500 L, 약 24 L 내지 약 2,000 L, 약 24 L 내지 약 1,500 L, 약 24 L 내지 약 1,000 L, 약 24 L 내지 약 900 L, 약 24 L 내지 약 800 L, 약 24 L 내지 약 700 L, 약 24 L 내지 약 600 L, 약 24 L 내지 약 500 L, 약 24 L 내지 약 400 L, 약 24 L 내지 약 300 L, 약 24 L 내지 약 200 L, 약 24 L 내지 약 100 L, 약 100 L 내지 약 20,000 L, 약 100 L 내지 약 15,000 L, 약 100 L 내지 약 10,000 L, 약 100 L 내지 약 9,500 L, 약 100 L 내지 약 9,000 L, 약 100 L 내지 약 8,500 L, 약 100 L 내지 약 8,000 L, 약 100 L 내지 약 7,500 L, 약 100 L 내지 약 7,000 L, 약 100 L 내지 약 6,500 L, 약 100 L 내지 약 6,000 L, 약 100 L 내지 약 5,500 L, 약 100 L 내지 약 5,000 L, 약 100 L 내지 약 4,500 L, 약 100 L 내지 약 4,000 L, 약 100 L 내지 약 3,500 L, 약 100 L 내지 약 3,000 L, 약 100 L 내지 약 2,500 L, 약 100 L 내지 약 2,000 L, 약 100 L 내지 약 1,500 L, 약 100 L 내지 약 1,000 L, 약 100 L 내지 약 900 L, 약 100 L 내지 약 800 L, 약 100 L 내지 약 700 L, 약 100 L 내지 약 600 L, 약 100 L 내지 약 500 L, 약 100 L 내지 약 400 L, 약 100 L 내지 약 300 L, 약 100 L 내지 약 200 L, 약 200 L 내지 약 20,000 L, 약 200 L 내지 약 15,000 L, 약 200 L 내지 약 10,000 L, 약 200 L 내지 약 9,500 L, 약 200 L 내지 약 9,000 L, 약 200 L 내지 약 8,500 L, 약 200 L 내지 약 8,000 L, 약 200 L 내지 약 7,500 L, 약 200 L 내지 약 7,000 L, 약 200 L 내지 약 6,500 L, 약 200 L 내지 약 6,000 L, 약 200 L 내지 약 5,500 L, 약 200 L 내지 약 5,000 L, 약 200 L 내지 약 4,500 L, 약 200 L 내지 약 4,000 L, 약 200 L 내지 약 3,500 L, 약 200 L 내지 약 3,000 L, 약 200 L 내지 약 2,500 L, 약 200 L 내지 약 2,000 L, 약 200 L 내지 약 1,500 L, 약 200 L 내지 약 1,000 L, 약 200 L 내지 약 900 L, 약 200 L 내지 약 800 L, 약 200 L 내지 약 700 L, 약 200 L 내지 약 600 L, 약 200 L 내지 약 500 L, 약 200 L 내지 약 400 L, 약 200 L 내지 약 300 L, 약 500 L 내지 약 20,000 L, 약 500 L 내지 약 15,000 L, 약 500 L 내지 약 10,000 L, 약 500 L 내지 약 9,500 L, 약 500 L 내지 약 9,000 L, 약 500 L 내지 약 8,500 L, 약 500 L 내지 약 8,000 L, 약 500 L 내지 약 7,500 L, 약 500 L 내지 약 7,000 L, 약 500 L 내지 약 6,500 L, 약 500 L 내지 약 6,000 L, 약 500 L 내지 약 5,500 L, 약 500 L 내지 약 5,000 L, 약 500 L 내지 약 4,500 L, 약 500 L 내지 약 4,000 L, 약 500 L 내지 약 3,500 L, 약 500 L 내지 약 3,000 L, 약 500 L 내지 약 2,500 L, 약 500 L 내지 약 2,000 L, 약 500 L 내지 약 1,500 L, 약 500 L 내지 약 1,000 L, 약 500 L 내지 약 900 L, 약 500 L 내지 약 800 L, 약 500 L 내지 약 700 L, 약 500 L 내지 약 600 L, 약 1,000 L 내지 약 25,000 L, 약 1,000 L 내지

약 20,000 L, 약 1,000 L 내지 약 15,000 L, 약 1,000 L 내지 약 10,000 L, 약 1,000 L 내지 약 9,500 L, 약 1,000 L 내지 약 9,000 L, 약 1,000 L 내지 약 8,500 L, 약 1,000 L 내지 약 8,000 L, 약 1,000 L 내지 약 7,500 L, 약 1,000 L 내지 약 7,000 L, 약 1,000 L 내지 약 6,500 L, 약 1,000 L 내지 약 6,000 L, 약 1,000 L 내지 약 5,500 L, 약 1,000 L 내지 약 5,000 L, 약 1,000 L 내지 약 4,500 L, 약 1,000 L 내지 약 4,000 L, 약 1,000 L 내지 약 3,500 L, 약 1,000 L 내지 약 3,000 L, 약 1,000 L 내지 약 2,500 L, 약 1,000 L 내지 약 2,000 L, 약 1,000 L 내지 약 1,500 L, 약 2,000 L 내지 약 20,000 L, 약 2,000 L 내지 약 15,000 L, 약 2,000 L 내지 약 10,000 L, 약 2,000 L 내지 약 9,500 L, 약 2,000 L 내지 약 9,000 L, 약 2,000 L 내지 약 8,500 L, 약 2,000 L 내지 약 8,000 L, 약 2,000 L 내지 약 7,500 L, 약 2,000 L 내지 약 7,000 L, 약 2,000 L 내지 약 6,500 L, 약 2,000 L 내지 약 6,000 L, 약 2,000 L 내지 약 5,500 L, 약 2,000 L 내지 약 5,000 L, 약 2,000 L 내지 약 4,500 L, 약 2,000 L 내지 약 4,000 L, 약 2,000 L 내지 약 3,500 L, 약 2,000 L 내지 약 3,000 L, 약 2,000 L 내지 약 2,500 L, 약 3,000 L 내지 약 20,000 L, 약 3,000 L 내지 약 15,000 L, 약 3,000 L 내지 약 10,000 L, 약 3,000 L 내지 약 9,500 L, 약 3,000 L 내지 약 9,000 L, 약 3,000 L 내지 약 8,500 L, 약 3,000 L 내지 약 8,000 L, 약 3,000 L 내지 약 7,500 L, 약 3,000 L 내지 약 7,000 L, 약 3,000 L 내지 약 6,500 L, 약 3,000 L 내지 약 6,000 L, 약 3,000 L 내지 약 5,500 L, 약 3,000 L 내지 약 5,000 L, 약 3,000 L 내지 약 4,500 L, 약 3,000 L 내지 약 4,000 L, 약 3,000 L 내지 약 3,500 L, 약 4,000 L 내지 약 20,000 L, 약 4,000 L 내지 약 15,000 L, 약 4,000 L 내지 약 10,000 L, 약 4,000 L 내지 약 9,500 L, 약 4,000 L 내지 약 9,000 L, 약 4,000 L 내지 약 8,500 L, 약 4,000 L 내지 약 8,000 L, 약 4,000 L 내지 약 7,500 L, 약 4,000 L 내지 약 7,000 L, 약 4,000 L 내지 약 6,500 L, 약 4,000 L 내지 약 6,000 L, 약 4,000 L 내지 약 5,500 L, 약 4,000 L 내지 약 5,000 L, 약 4,000 L 내지 약 4,500 L, 약 5,000 L 내지 약 20,000 L, 약 5,000 L 내지 약 15,000 L, 약 5,000 L 내지 약 10,000 L, 약 5,000 L 내지 약 9,500 L, 약 5,000 L 내지 약 9,000 L, 약 5,000 L 내지 약 8,500 L, 약 5,000 L 내지 약 8,000 L, 약 5,000 L 내지 약 7,500 L, 약 5,000 L 내지 약 7,000 L, 약 5,000 L 내지 약 6,500 L, 약 5,000 L 내지 약 6,000 L, 약 5,000 L 내지 약 5,500 L, 약 6,000 L 내지 약 20,000 L, 약 6,000 L 내지 약 10,000 L, 약 6,000 L 내지 약 9,500 L, 약 6,000 L 내지 약 9,000 L, 약 6,000 L 내지 약 8,500 L, 약 6,000 L 내지 약 8,000 L, 약 6,000 L 내지 약 7,500 L, 약 6,000 L 내지 약 7,000 L, 약 6,000 L 내지 약 6,500 L, 약 7,000 L 내지 약 20,000 L, 약 7,000 L 내지 약 15,000 L, 약 7,000 L 내지 약 10,000 L, 약 7,000 L 내지 약 9,500 L, 약 7,000 L 내지 약 9,000 L, 약 7,000 L 내지 약 8,500 L, 약 7,000 L 내지 약 8,000 L, 약 7,000 L 내지 약 7,500 L, 약 8,000 L 내지 약 20,000 L, 약 8,000 L 내지 약 15,000 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 9,000 L 내지 약 20,000 L, 약 9,000 L 내지 약 15,000 L, 약 9,000 L 내지 약 10,000 L, 약 9,000 L 내지 약 9,500 L, 약 10,000 L 내지 약 20,000 L, 약 10,000 L 내지 약 15,000 L, 또는 약 15,000 L 내지 약 20,000 L)의 의 내부 부피(용량)를 가질 수 있다. 이러한 용기는 금속(예, 스테인리스강), 플라스틱 또는 유리 또는 이들의 임의의 조합으로 제작될 수 있다.

[0066] 일부 실시형태에서, 스파저의 하나 이상의 기공은 약 750 ㎛ 내지 약 1.5 mm(예, 약 750 ㎛ 내지 약 1.45 mm, 약 750 ㎛ 내지 약 1.4 mm, 약 750 ㎛ 내지 약 1.35 mm, 약 750 ㎛ 내지 약 1.3 mm, 약 750 ㎛ 내지 약 1.25 mm, 약 750 ㎛ 내지 약 1.2 mm, 약 750 ㎛ 내지 약 1.15 mm, 약 750 ㎛ 내지 약 1.1 mm, 약 750 ㎛ 내지 약 1.05 mm, 약 750 ㎛ 내지 약 1.0 mm, 약 750 ㎛ 내지 약 950 ㎛, 약 750 ㎛ 내지 약 900 ㎛, 약 750 ㎛ 내지 약 850 ㎛, 약 750 ㎛ 내지 약 800 ㎛, 약 800 ㎛ 내지 약 1.5 mm, 약 800 ㎛ 내지 약 1.45 mm, 약 800 ㎛ 내지 약 1.4 mm, 약 800 ㎛ 내지 약 1.35 mm, 약 800 ㎛ 내지 약 1.3 mm, 약 800 ㎛ 내지 약 1.25 mm, 약 800 ㎛ 내지 약 1.2 mm, 약 800 ㎛ 내지 약 1.15 mm, 약 800 ㎛ 내지 약 1.1 mm, 약 800 ㎛ 내지 약 1.05 mm, 약 800 ㎛ 내지 약 1.0 mm, 약 800 ㎛ 내지 약 950 ㎛, 약 800 ㎛ 내지 약 900 ㎛, 약 800 ㎛ 내지 약 850 ㎛, 약 850 ㎛ 내지 약 1.5 mm, 약 850 ㎛ 내지 약 1.45 mm, 약 850 ㎛ 내지 약 1.4 mm, 약 850 ㎛ 내지 약 1.35 mm, 약 850 ㎛ 내지 약 1.3 mm, 약 850 ㎛ 내지 약 1.25 mm, 약 850 ㎛ 내지 약 1.2 mm, 약 850 ㎛ 내지 약 1.15 mm, 약 850 ㎛ 내지 약 1.1 mm, 약 850 ㎛ 내지 약 1.05 mm, 약 850 ㎛ 내지 약 1.0 mm, 약 850 ㎛ 내지 약 950 ㎛ m, 약 850 ㎛ 내지 약 900 ㎛, 약 900 ㎛ 내지 약 1.5 mm, 약 900 ㎛ 내지 약 1.45 mm, 약 900 ㎛ 내지 약 1.4 mm, 약 900 ㎛ 내지 약 1.35 mm, 약 900 ㎛ 내지 약 1.3 mm, 약 900 ㎛ 내지 약 1.25 mm, 약 900 ㎛ 내지 약 1.2 mm, 약 900 ㎛ 내지 약 1.15 mm, 약 900 ㎛ 내지 약 1.1 mm, 약 900 ㎛ 내지 약 1.05 mm, 약 900 ㎛ 내지 약 1.0 mm, 약 900 ㎛ 내지 약 950 ㎛, 약 950 ㎛ 내지 약 1.5 mm, 약 950 ㎛ 내지 약 1.45 mm, 약 950 ㎛ 내지 약 1.4 mm, 약 950 ㎛ 내지 약 1.35 mm, 약 950 ㎛ 내지 약 1.3 mm, 약 950 ㎛ 내지 약 1.25 mm, 약 950 ㎛ 내지 약 1.2 mm, 약 950 ㎛ 내지 약 1.15 mm, 약 950 ㎛ 내지 약 1.1 mm, 약 950 ㎛ 내지 약 1.05 mm, 약 950 ㎛ 내지 약 1.0 mm, 약 1.0 mm 내지 약 1.5 mm, 약 1.0 mm 내지 약 1.45 mm, 약 1.0 mm 내지 약 1.4 mm, 약

1.0 mm 내지 약 1.35 mm, 약 1.0 mm 내지 약 1.3 mm, 약 1.0 mm 내지 약 1.25 mm, 약 1.0 mm 내지 약 1.2 mm, 약 1.0 mm 내지 약 1.15 mm, 약 1.0 mm 내지 약 1.1 mm, 약 1.0 mm 내지 약 1.05 mm, 약 1.05 mm 내지 약 1.5 mm, 약 1.05 mm 내지 약 1.45 mm, 약 1.05 mm 내지 약 1.4 mm, 약 1.05 mm 내지 약 1.35 mm, 약 1.05 mm 내지 약 1.3 mm, 약 1.05 mm 내지 약 1.25 mm, 약 1.05 mm 내지 약 1.2 mm, 약 1.05 mm 내지 약 1.15 mm, 약 1.05 mm 내지 약 1.1 mm, 약 1.1 mm 내지 약 1.5 mm, 약 1.1 mm 내지 약 1.45 mm, 약 1.1 mm 내지 약 1.4 mm, 약 1.1 mm 내지 약 1.35 mm, 약 1.1 mm 내지 약 1.3 mm, 약 1.1 mm 내지 약 1.25 mm, 약 1.1 mm 내지 약 1.2 mm, 약 1.1 mm 내지 약 1.15 mm, 약 1.15 mm 내지 약 1.5 mm, 약 1.15 mm 내지 약 1.45 mm, 약 1.15 mm 내지 약 1.4 mm, 약 1.15 mm 내지 약 1.35 mm, 약 1.15 mm 내지 약 1.3 mm, 약 1.15 mm 내지 약 1.25 mm, 약 1.15 mm 내지 약 1.2 mm, 약 1.2 mm 내지 약 1.5 mm, 약 1.2 mm 내지 약 1.45 mm, 약 1.2 mm 내지 약 1.4 mm, 약 1.2 mm 내지 약 1.35 mm, 약 1.2 mm 내지 약 1.3 mm, 약 1.2 mm 내지 약 1.25 mm, 약 1.25 mm 내지 약 1.5 mm, 약 1.25 mm 내지 약 1.45 mm, 약 1.25 mm 내지 약 1.4 mm, 약 1.25 mm 내지 약 1.35 mm, 약 1.25 mm 내지 약 1.3 mm, 약 1.3 mm 내지 약 1.5 mm, 약 1.3 mm 내지 약 1.45 mm, 약 1.3 mm 내지 약 1.4 mm, 약 1.3 mm 내지 약 1.35 mm, 약 1.35 mm 내지 약 1.5 mm, 약 1.35 mm 내지 약 1.45 mm, 약 1.35 mm 내지 약 1.4 mm, 약 1.4 mm 내지 약 1.5 mm, 약 1.4 mm 내지 약 1.45 mm, 또는 약 1.45 mm 내지 약 1.5 mm)의 기공 크기를 가질 수 있다.

[0067] 일부 실시형태에서, 스파저의 하나 이상의 기공은 약 250 ㎛ 내지 약 750 ㎛(예, 약 250 ㎛ 내지 약 700 ㎛, 약 250 ㎛ 내지 약 650 ㎛, 약 250 ㎛ 내지 약 600 ㎛, 약 250 ㎛ 내지 약 550 ㎛, 약 250 ㎛ 내지 약 500 ㎛, 약 250 ㎛ 내지 약 450 ㎛, 약 250 ㎛ 내지 약 400 ㎛, 약 250 ㎛ 내지 약 350 ㎛, 약 250 ㎛ 내지 약 300 ㎛, 약 300 ㎛ 내지 약 750 ㎛, 약 300 ㎛ 내지 약 650 ㎛, 약 300 ㎛ 내지 약 600 ㎛, 약 300 ㎛ 내지 약 550 ㎛, 약 300 ㎛ 내지 약 500 ㎛, 약 300 ㎛ 내지 약 450 ㎛, 약 300 ㎛ 내지 약 400 ㎛, 약 300 ㎛ 내지 약 350 ㎛, 약 350 ㎛ 내지 약 750 ㎛, 약 350 ㎛ 내지 약 700 ㎛, 약 350 ㎛ 내지 약 650 ㎛, 약 350 ㎛ 내지 약 600 ㎛, 약 350 ㎛ 내지 약 550 ㎛, 약 350 ㎛ 내지 약 500 ㎛, 약 350 ㎛ 내지 약 450 ㎛, 약 350 ㎛ 내지 약 400 ㎛, 약 400 ㎛ 내지 약 750 ㎛, 약 400 ㎛ 내지 약 700 ㎛, 약 400 ㎛ 내지 약 650 ㎛, 약 400 ㎛ 내지 약 600 ㎛, 약 400 ㎛ 내지 약 550 ㎛, 약 400 ㎛ 내지 약 500 ㎛, 약 400 ㎛ 내지 약 450 ㎛, 약 450 ㎛ 내지 약 750 ㎛, 약 450 ㎛ 내지 약 700 ㎛, 약 450 ㎛ 내지 약 650 ㎛, 약 450 ㎛ 내지 약 600 ㎛, 약 450 ㎛ 내지 약 550 ㎛, 약 450 ㎛ 내지 약 500 ㎛, 약 500 ㎛ 내지 약 750 ㎛, 약 500 ㎛ 내지 약 700 ㎛, 약 500 ㎛ 내지 약 650 ㎛, 약 500 ㎛ 내지 약 600 ㎛, 약 500 ㎛ 내지 약 550 ㎛, 약 550 ㎛ 내지 약 750 ㎛, 약 550 ㎛ 내지 약 700 ㎛, 약 550 ㎛ 내지 약 650 ㎛, 약 550 ㎛ 내지 약 600 ㎛, 약 600 ㎛ 내지 약 750 ㎛, 약 600 ㎛ 내지 약 700 ㎛, 약 600 ㎛ 내지 약 650 ㎛, 약 650 ㎛ 내지 약 750 ㎛, 약 650 ㎛ 내지 약 700 ㎛, 또는 약 700 ㎛ 내지 약 750 ㎛)의 기공 크기를 가질 수 있다.

[0068] 일부 실시형태에서, 스파저의 하나 이상의 기공은 약 1 ㎛ 내지 약 250 ㎛ (예, 약 1 ㎛ 내지 약 240 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 230 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 220 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 210 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 200 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 190 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 180 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 170 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 160 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 130 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 125 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 120 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 115 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 110 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 105 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 100 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 95 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 90 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 85 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 80 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 75 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 70 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 65 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 60 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 55 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 50 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 45 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 40 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 35 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 30 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 25 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 20 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 15 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 10 ㎛, 1 ㎛ 내지 약 5 ㎛, 10 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 240 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 230 ㎛, 10 ㎛ 내지 약 220 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 210 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 200 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 190 ㎛, 10 ㎛ 내지 약 180 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 170 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 160 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 130 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 120 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 110 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 100 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 90 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 80 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 70 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 60 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 50 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 40 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 30 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 20 ㎛, 약 20 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 20 ㎛ 내지 약 240 ㎛, 약 20 ㎛ 내지 약 230 ㎛, 약 20 ㎛ 내지 약 220 ㎛, 약 20 ㎛ 내지 약 210 ㎛, 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 20 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 20 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 20 ㎛ 내지 약 130 ㎛, 약 20 ㎛ 내지 약 120 ㎛, 약 20 ㎛ 내지 약 110 ㎛, 약 20 ㎛ 내지 약 100 ㎛, 약 20 ㎛ 내지 약 90 ㎛, 약 20 ㎛ 내지 약 80 ㎛, 약 20 ㎛ 내지 약 70 ㎛, 약 20 ㎛ 내지 약 60 ㎛, 약 20 ㎛ 내지 약 50 ㎛, 약 20 ㎛ 내지 약 40 ㎛, 약 20 ㎛ 내지 약 30 ㎛, 약 30 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 30 ㎛ 내지 약 240 ㎛, 약 30 ㎛ 내지 약 230 ㎛,

약 30 ㎛ 내지 약 220 ㎛, 약 30 ㎛ 내지 약 210 ㎛, 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 30 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 30 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 30 ㎛ 내지 약 130 ㎛, 약 30 ㎛ 내지 약 120 ㎛, 약 30 ㎛ 내지 약 110 ㎛, 약 30 ㎛ 내지 약 110 ㎛, 약 30 ㎛ 내지 약 100 ㎛, 약 30 ㎛ 내지 약 90 ㎛, 약 30 ㎛ 내지 약 80 ㎛, 약 30 ㎛ 내지 약 70 ㎛, 약 30 ㎛ 내지 약 60 ㎛, 약 30 ㎛ 내지 약 50 ㎛, 약 30 ㎛ 내지 약 40 ㎛, 약 40 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 40 ㎛ 내지 약 240 ㎛, 약 40 ㎛ 내지 약 230 ㎛, 약 40 ㎛ 내지 약 220 ㎛, 약 40 ㎛ 내지 약 210 ㎛, 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 40 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 40 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 40 ㎛ 내지 약 130 ㎛, 약 40 ㎛ 내지 약 120 ㎛, 약 40 ㎛ 내지 약 110 ㎛, 약 40 ㎛ 내지 약 100 ㎛, 약 40 ㎛ 내지 약 90 ㎛, 약 40 ㎛ 내지 약 80 ㎛, 약 40 ㎛ 내지 약 70 ㎛, 약 40 ㎛ 내지 약 60 ㎛, 약 40 ㎛ 내지 약 50 ㎛, 약 50 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 50 ㎛ 내지 약 240 ㎛, 약 50 ㎛ 내지 약 230 ㎛, 약 50 ㎛ 내지 약 220 ㎛, 약 50 ㎛ 내지 약 210 ㎛, 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 50 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 50 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 50 ㎛ 내지 약 130 ㎛, 약 50 ㎛ 내지 약 120 ㎛, 약 50 ㎛ 내지 약 110 ㎛, 약 50 ㎛ 내지 약 100 ㎛, 약 50 ㎛ 내지 약 90 ㎛, 약 50 ㎛ 내지 약 80 ㎛, 약 50 ㎛ 내지 약 70 ㎛, 약 50 ㎛ 내지 약 60 ㎛, 약 60 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 60 ㎛ 내지 약 240 ㎛, 약 60 ㎛ 내지 약 230 ㎛, 약 60 ㎛ 내지 약 220 ㎛, 약 60 ㎛ 내지 약 210 ㎛, 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 60 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 60 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 60 ㎛ 내지 약 130 ㎛, 약 60 ㎛ 내지 약 120 ㎛, 약 60 ㎛ 내지 약 110 ㎛, 약 60 ㎛ 내지 약 100 ㎛, 약 60 ㎛ 내지 약 90 ㎛, 약 60 ㎛ 내지 약 80 ㎛, 약 60 ㎛ 내지 약 70 ㎛, 약 70 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 70 ㎛ 내지 약 240 ㎛, 약 70 ㎛ 내지 약 230 ㎛, 약 70 ㎛ 내지 약 220 ㎛, 약 70 ㎛ 내지 약 210 ㎛, 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 70 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 70 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 70 ㎛ 내지 약 130 ㎛, 약 70 ㎛ 내지 약 120 ㎛, 약 70 ㎛ 내지 약 110 ㎛, 약 70 ㎛ 내지 약 100 ㎛, 약 70 ㎛ 내지 약 90 ㎛, 약 70 ㎛ 내지 약 80 ㎛, 약 80 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 80 ㎛ 내지 약 240 ㎛, 약 80 ㎛ 내지 약 230 ㎛, 약 80 ㎛ 내지 약 220 ㎛, 약 80 ㎛ 내지 약 210 ㎛, 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 80 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 80 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 80 ㎛ 내지 약 130 ㎛, 약 80 ㎛ 내지 약 120 ㎛, 약 80 ㎛ 내지 약 110 ㎛, 약 80 ㎛ 내지 약 100 ㎛, 약 80 ㎛ 내지 약 90 ㎛, 약 90 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 90 ㎛ 내지 약 240 ㎛, 약 90 ㎛ 내지 약 230 ㎛, 약 90 ㎛ 내지 약 220 ㎛, 약 90 ㎛ 내지 약 210 ㎛, 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 90 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 90 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 90 ㎛ 내지 약 130 ㎛, 약 90 ㎛ 내지 약 120 ㎛, 약 90 ㎛ 내지 약 110 ㎛, 약 90 ㎛ 내지 약 100 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 240 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 230 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 220 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 210 ㎛, 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 100 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 130 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 120 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 110 ㎛, 약 110 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 110 ㎛ 내지 약 240 ㎛, 약 110 ㎛ 내지 약 230 ㎛, 약 110 ㎛ 내지 약 220 ㎛, 약 110 ㎛ 내지 약 210 ㎛, 약 110 ㎛ 내지 약 200 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 190 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 180 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 170 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 160 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 130 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 120 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 110 ㎛, 약 110 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 110 ㎛ 내지 약 240 ㎛, 약 110 ㎛ 내지 약 230 ㎛, 약 110 ㎛ 내지 약 220 ㎛, 약 110 ㎛ 내지 약 210 ㎛, 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 110 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 110 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 110 ㎛ 내지 약 130 ㎛, 약 110 ㎛ 내지 약 120 ㎛, 약 120 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 120 ㎛ 내지 약 240 ㎛, 약 120 ㎛ 내지 약 230 ㎛, 약 120 ㎛ 내지 약 220 ㎛, 약 120 ㎛ 내지 약 210 ㎛, 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 120 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 120 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 120 ㎛ 내지 약 130 ㎛, 약 130 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 130 ㎛ 내지 약 240 ㎛, 약 130 ㎛ 내지 약 230 ㎛, 약 130 ㎛ 내지 약 220 ㎛, 약 130 ㎛ 내지 약 210 ㎛, 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 130 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 130 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 140 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 140 ㎛ 내지 약 240 ㎛, 약 140 ㎛ 내지 약 230 ㎛, 약 140 ㎛ 내지 약 220 ㎛, 약 140 ㎛ 내지 약 210 ㎛, 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 140 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 150 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 150 ㎛ 내지 약 240 ㎛, 약 150 ㎛ 내지 약 230 ㎛, 약 150 ㎛ 내지 약 220 ㎛, 약 150 ㎛ 내지 약 210 ㎛, 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 250 ㎛, 약 160 ㎛ 내지 약 240 ㎛, 약 160 ㎛ 내지 약 230 ㎛, 약 160 ㎛ 내지 약 220 ㎛, 약 160 ㎛ 내지 약 210 ㎛, 약 160 ㎛ 내지 약 200 ㎛, 약 160 ㎛ 내지 약 190 ㎛, 약 160 ㎛ 내지 약 180 ㎛, 약 160 ㎛ 내지 약 170 ㎛, 약 170 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 170 ㎛ 내지 약 240 ㎛, 약 170 ㎛ 내지 약 230 ㎛, 약 170 ㎛ 내지 약 220 ㎛, 약 170 ㎛ 내지 약 210 ㎛, 약 170 ㎛ 내지 약 200 ㎛, 약 170 ㎛ 내지 약 190 ㎛, 약 170 ㎛ 내지 약 180 ㎛, 약 180 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 180 ㎛ 내지 약 240 ㎛, 약 180 ㎛ 내지 약 230 ㎛, 약 180 ㎛ 내지 약 220 ㎛, 약 180 ㎛ 내지 약 210 ㎛, 약 180 ㎛ 내지 약 200 ㎛, 약 180 ㎛ 내지 약 190 ㎛, 약 190 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 190 ㎛ 내지 약 240 ㎛, 약 190 ㎛ 내지 약 230 ㎛, 약 190 ㎛ 내지 약 220 ㎛, 약 190 ㎛ 내지 약 210 ㎛, 약 190 ㎛ 내지 약 200 ㎛, 약 200 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 200 ㎛ 내지 약 240 ㎛, 약 200 ㎛ 내지 약 230 ㎛, 약 200 ㎛ 내지 약 220 ㎛, 약 200 ㎛ 내지 약 210 ㎛, 약 210 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 210 ㎛ 내지 약 240 ㎛, 약 210 ㎛ 내지 약 230 ㎛, 약 210 ㎛ 내지 약 220 ㎛, 약 220 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 220 ㎛ 내지 약 240 ㎛, 약 220 ㎛ 내지 약 230 ㎛, 약 230 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 230 ㎛ 내지 약 240 ㎛, 또는 약 240 ㎛ 내지 약 250 ㎛)의 기공 크기를 가질 수 있다.

[0069] 스파저의 하나 이상의 기공은 예를 들어, 드릴드(drilled) 기공 또는 신터드(sintered) 기공이라는 기공 유형을 가질 수 있다. 배양 시스템은 용기 내에 배치된 액체 배지를 교반하기 위한 장치(예, 임펠러(impellor) 및 상기 임펠러를 회전시키는 모터)를 포함할 수 있다. 이러한 용기는 물질(예, 액체 배지, 폴록사머-188, 염기 또는 산(pH 조절에 필요한 대로) 및/또는 소포제)을 상기 용기 내에 배치된 액체 배지에 첨가하고/거나 액체 배지(예, 정화된(clarified) 액체 배지, 또는 세포 배양물 시료)를 제거할 수 있게 하는 하나 이상의 포트(및 선택적으로 펌프)를 포함할 수 있다. 배양 시스템은 또한, 배양 기간 동안 액체 배지 내 pH, dO_2, 온도 및 dCO_2를 모니터링하기 위한 하나 이상의 센서를 포함할 수 있다. 배양 시스템은, 실질적으로 세포가 없는 정화된 액체 배지를 제공하기 위해 세포 배양물 부피를 가진 여과 장치(예, 교대 접선(tangential) 여과 또는 접선 유동 여과를 수행하는 장치)를 포함할 수 있다. 배양 시스템은 용기 내에 배치된 액체 배지의 온도를 조절할 수 있게 하는 가열/냉각 장치를 포함할 수 있다. 세포 배양물 시스템의 부가적인 특징은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0070] **관류 배양**

[0071] 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법에서, 배양 단계는 관류 배양일 수 있다. 당업계에 알려진 바와 같이, 관류 배양은 생물반응기로부터 제1 부피의 제1 액체 배지를 제거하는 단계, 및 상기 생물반응기에 제2 부피의 제2 액체 배지를 첨가하는 단계를 포함하며, 여기서, 제1 부피 및 제2 부피는 거의 동일하다. 포유류 세포는 일부 세포 체류 장치에 의해 또는 세포 침강과 같은 기술을 통해 생물반응기 내에 보유된다.

[0072] 당업계에 알려진 바와 같이, 관류 배양은 유기 배양과 상이하고, 관류 배양에 사용되는 배양 배지 및/또는 배양 조건은 유가 배양에서 사용되는 것들과 종종 상이하다.

[0073] 관류 배양에서 배지의 제거 및 첨가는 동시에 또는 순차적으로 수행될 수 있거나, 제거와 첨가의 일부 조합으로 수행될 수 있다. 나아가, 제거 및 첨가는 연속적으로, 예컨대 생물반응기의 부피의 0.1% 내지 800%, 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%, 또는 4% 내지 30%의 부피를 제거하고 대체하는 속도로 수행될 수 있다.

[0074] 제거된 제1 액체 배지의 제1 부피 및 첨가된 제2 액체 배지의 제2 부피는 일부 경우, 각각 24시간의 기간에 걸쳐 대략 동일하게 유지될 수 있다. 당업계에 알려진 바와 같이, 제1 부피의 제1 액체 배지가 제거되는 속도(부피/단위 시간) 및 제2 부피의 제2 액체 배지가 첨가되는 속도(부피/단위 시간)는 변할 수 있고, 특정 세포 배양물 시스템의 조건에 따라 다르다. 제1 부피의 제1 액체 배지가 제거되는 속도(부피/단위 시간) 및 제2 부피의 제2 액체 배지가 첨가되는 속도(부피/단위 시간)는 대략 동일할 수 있거나, 상이할 수 있다.

[0075] 대안적으로, 제거되고 첨가된 부피는 각각 24시간의 기간에 걸쳐 점차 증가함으로써 변할 수 있다. 예를 들어, 각각 24시간 이내에 제거된 제1 액체 배지의 부피 및 첨가된 제2 액체 배지의 부피는 배양 기간에 걸쳐 증가할 수 있다. 부피는 배양 기간에 걸쳐, 생물반응기 부피의 0.5% 내지 약 20%인 부피로부터 증가할 수 있다. 상기 부피는 배양 기간에 걸쳐, 생물반응기 용량 또는 배양 기간의 시작 시 세포 배양물의 부피의 약 25% 내지 약 150%까지 증가할 수 있다.

[0076] 본원에 기재된 방법들의 일부 예에서, 배양 기간의 처음 48시간 내지 96시간 후, (배양 기간 이내에서) 각각의 24시간의 기간에서, 제거된 제1 액체 배지의 제1 부피 및 첨가된 제2 액체 배지의 제2 부피는 배양 기간의 시작 시 세포 배양물의 부피의 약 10% 내지 약 95%, 약 10% 내지 약 20%, 약 20% 내지 약 30%, 약 30% 내지 약 40%, 약 40% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 60%, 약 60% 내지 약 70%, 약 70% 내지 약 80%, 약 80% 내지 약 90%, 약 85% 내지 약 95%, 약 60% 내지 약 80%, 또는 약 70%이다.

[0077] 당업자는, 제1 액체 배지 및 제2 액체 배지가 동일한 유형의 배지일 수 있음을 이해할 것이다. 다른 경우, 제1 액체 배지 및 제2 액체 배지는 상이할 수 있다. 제2 액체 배지는 하나 이상의 배지 구성성분에 관하여 보다 농축될 수 있다.

[0078] 제1 부피의 제1 액체 배지는 임의의 자동화된 시스템을 사용하여 제거될 수 있다. 예를 들어 교대 접선 유동 여과가 사용될 수 있다. 대안적으로, 제1 부피의 제1 액체 배지는, 포유류 세포를 배제한 분자량 컷오프를 가진 멸균 막을 통해 제1 부피의 제1 액체 배지의 삼출(seeping) 또는 중력식 유동(gravity flow)에 의해 제거될 수 있다. 대안적으로, 제1 부피의 제1 액체 배지는 적어도 1분, 적어도 2분, 3분, 4분, 5분, 10분, 15분, 20분, 25분, 30분, 40분, 50분 또는 1시간의 기간 동안 교반 속도를 정지시키거나 상당히 감소시키고, 제1 부피의 제1 액체 배지를 생물반응기의 상부로부터 제거하거나 흡인함으로써 제거될 수 있다.

[0079] 제2 부피의 제2 액체 배지는 펌프에 의해 제1 액체 배지에 첨가될 수 있다. 제2 액체 배지는 제1 액체 배지에 수동으로, 예컨대 제2 부피의 제2 액체 배지를 제1 액체 배지 상에 직접 파이펫팅하거나 주입함으로써 첨가될 수 있거나, 자동화된 방식으로 첨가될 수 있다.

[0080] 본원에 기재된 방법의 일부 실시형태에서, (선택적으로 제1 액체 배지 내에 배치된 포유류 세포를 함유하는 용기를 제공하는 단계, 및) 용기를 약 32℃ 내지 약 40℃의 온도에서 적어도 약 7일의 배양 기간 동안 교반하면서 인큐베이션하는 단계; 및 배양 기간의 처음 48시간 내지 96시간 후, 연속적으로 또는 주기적으로, 제1 부피의 제1 액체 배지를 제거하고 상기 제1 액체 배지에 제2 부피의 제2 액체 배지를 첨가하는 단계를 포함하며, 여기서, 제1 부피 및 제2 부피는 대략 동일하다. 일부 실시형태에서, 배양 기간의 처음 약 48시간 내지 96시간 후, 각각의 24시간 기간 이내에, 제거된 제1 액체 배지의 제1 부피 및 첨가된 제2 액체 배지의 제2 부피는 제1 액체 배지의 부피 또는 용기의 부피의 약 0.3배 내지 약 10배이다.

[0081] 관류 배양의 일부 예는, 제1 액체 배지를 함유하는 배양 시스템을 약 32℃ 내지 약 40℃의 온도에서 적어도 약 7일의 배양 기간 동안 교반하면서 인큐베이션하는 단계; 및 배양 기간의 처음 48시간 내지 96시간 후, 연속적으로 또는 주기적으로, 제1 부피의 제1 액체 배지를 제거하고 상기 제1 액체 배지에 제2 부피의 제2 액체 배지를 첨가하는 단계를 포함한다.

[0082] **유가 배양**

[0083] 본원에 기재된 방법에서 배양 단계는 유가 배양을 포함할 수 있다. 당업계에 알려진 바와 같이, 유가 배양은 세포 배양물로부터 제1 액체 배지의 실질적인 또는 상당한 제거 없이, 초기 세포 배양물에 공급 액체 배지를 증분 또는 연속 첨가하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 공급 액체 배지는 제1 액체 배지와 동일하다. 공급 배지는 액체 형태(공급 액체 배지) 또는 건조 분말일 수 있다. 다른 경우, 공급 액체 배지는 제1 액체 배지의 농축된 형태이고/거나 건조 분말로서 첨가된다.

[0084] 공급 액체 배지는 배양 기간 동안 특정 시점에서 또는 다수의 시점들에서 초기 세포 배양물에 첨가될 수 있다. 예를 들어, 공급 액체 배지는 배양 기간의 시작 후, 6시간 내지 7일, 약 6시간 내지 약 6일, 약 6시간 내지 약 5일, 약 6시간 내지 약 4일, 약 6시간 내지 약 3일, 약 6시간 내지 약 2일, 약 6시간 내지 약 1일, 약 12시간 내지 약 7일, 약 12시간 내지 약 6일, 약 12시간 내지 약 5일, 약 12시간 내지 약 4일, 약 12시간 내지 약 3일, 약 12시간 내지 약 2일, 약 1일 내지 약 7일, 약 1일 내지 약 6일, 약 1일 내지 약 5일, 약 1일 내지 약 4일, 약 1일 내지 약 3일, 약 1일 내지 약 2일, 약 2일 내지 약 7일, 약 2일 내지 약 6일, 약 2일 내지 약 5일, 약 2일 내지 약 4일, 약 2일 내지 약 3일, 약 3일 내지 약 7일, 약 3일 내지 약 6일, 약 3일 내지 약 5일, 약 3일 내지 약 4일, 약 4일 내지 약 7일, 약 4일 내지 약 6일, 약 4일 내지 약 5일, 약 5일 내지 약 7일, 또는 약 5일 내지 약 6일인 시점에서 초기 세포 배양물에 첨가될 수 있다.

[0085] 공급 액체 배지는 배양 기간 동안 초기 세포 배양물에 연속적으로 첨가될 수 있거나, 초기 세포 배양물에 주기적으로(예, 매일) 첨가될 수 있다. 일부 예에서, 공급 액체 배지가 초기 세포 배양물에 주기적으로 첨가되는 경우, 공급 액체 배지는 1회, 2회, 3회, 4회 또는 5회 첨가될 수 있다. 초기 세포 배양물에 첨가되는 공급 액체 배지의 부피 또는 공급 고체 배지의 양은 배양 기간 동안 변할 수 있다(예, 증가할 수 있음). 배양 기간 동안

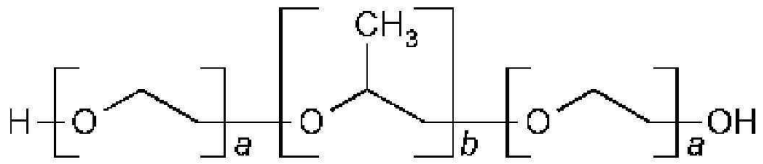
임의의 24시간의 기간에 걸쳐 초기 세포 배양물에 첨가되는 공급 액체 배지의 부피는 생물반응기의 용량의 일부분획일 수 있다. 배양 기간 동안 임의의 24시간의 기간에 걸쳐 초기 세포 배양물에 첨가되는 공급 액체 배지의 부피는 배양물을 함유하는 생물반응기의 용량의 0.01X 내지 약 0.3X(예, 약 0.01X 내지 약 0.28X, 약 0.01X 내지 약 0.26X, 약 0.01X 내지 약 0.24X, 약 0.01X 내지 약 0.22X, 약 0.01X 내지 약 0.20X, 약 0.01X 내지 약 0.18X, 약 0.01X 내지 약 0.16X, 약 0.01X 내지 약 0.14X, 약 0.01X 내지 약 0.12X, 약 0.01X 내지 약 0.10X, 약 0.01X 내지 약 0.08X, 약 0.01X 내지 약 0.06X, 약 0.01X 내지 약 0.04X, 약 0.025X 내지 약 0.3X, 약 0.025X 내지 약 0.28X, 약 0.025X 내지 약 0.26X, 약 0.025X 내지 약 0.24X, 약 0.025X 내지 약 0.22X, 약 0.025X 내지 약 0.20X, 약 0.025X 내지 약 0.18X, 약 0.025X 내지 약 0.16X, 약 0.025X 내지 약 0.14X, 약 0.025X 내지 약 0.12X, 약 0.025X 내지 약 0.10X, 약 0.025X 내지 약 0.08X, 약 0.025X 내지 약 0.06X, 약 0.025X 내지 약 0.04X, 약 0.05X 내지 약 0.3X, 약 0.05X 내지 약 0.28X, 약 0.05X 내지 약 0.26X, 약 0.05X 내지 약 0.24X, 약 0.05X 내지 약 0.22X, 약 0.05X 내지 약 0.20X, 약 0.05X 내지 약 0.18X, 약 0.05X 내지 약 0.16X, 약 0.05X 내지 약 0.14X, 약 0.05X 내지 약 0.12X, 약 0.05X 내지 약 0.10X, 약 0.1X 내지 약 0.3X, 약 0.1X 내지 약 0.28X, 약 0.1X 내지 약 0.26X, 약 0.1X 내지 약 0.24X, 약 0.1X 내지 약 0.22X, 약 0.1X 내지 약 0.20X, 약 0.1X 내지 약 0.18X, 약 0.1X 내지 약 0.16X 약 0.1X 내지 약 0.14X, 약 0.1X, 약 0.15X 내지 약 0.3X, 약 0.15X 내지 약 0.2X, 약 0.2X 내지 약 0.3X, 또는 약 0.25X 내지 약 0.3X)일 수 있다.

[0086] 다른 실시형태에서, 배양 기간에서 임의의 24시간의 기간에 걸쳐 초기 세포 배양물에 첨가되는 공급 액체 배지의 부피는 배양 기간의 시작 시 세포 배양물의 부피의 0.02X 내지 약 1.0X(예, 약 0.02X 내지 약 0.9X, 약 0.02X 내지 약 0.8X, 약 0.02X 내지 약 0.7X, 약 0.02X 내지 약 0.6X, 약 0.02X 내지 약 0.5X, 약 0.02X 내지 약 0.4X, 약 0.02X 내지 약 0.3X, 약 0.02X 내지 약 0.2X, 약 0.02X 내지 약 0.1X, 약 0.05X 내지 약 1.0X, 약 0.05X 내지 약 0.8X, 약 0.05X 내지 약 0.7X, 약 0.05X 내지 약 0.6X, 약 0.05X 내지 약 0.5X, 약 0.05X 내지 약 0.4X, 약 0.05X 내지 약 0.3X, 약 0.05X 내지 약 0.2X, 약 0.05X 내지 약 0.1X, 약 0.1X 내지 약 1.0X, 약 0.1X 내지 약 0.9X, 약 0.1X 내지 약 0.8X, 약 0.1X 내지 약 0.7X, 약 0.1X 내지 약 0.6X, 약 0.1X 내지 약 0.5X, 약 0.1X 내지 약 0.4X, 약 0.1X 내지 약 0.3X, 약 0.1X 내지 약 0.2X, 약 0.2X 내지 약 1.0X, 약 0.2X 내지 약 0.9X, 약 0.2X 내지 약 0.8X, 약 0.2X 내지 약 0.7X, 약 0.2X 내지 약 0.6X, 약 0.2X 내지 약 0.5X, 또는 약 0.2X 내지 약 0.4X)일 수 있다.

[0087] **폴록사머-188**

[0088] 폴록사머-188은 당업계에 알려진 분자이다. 폴록사머-188은 에틸렌 옥사이드와 프로필렌 옥사이드의 비이온성 합성 블록 공중합체이다. 폴록사머-188은 약 7680 내지 약 9510의 평균 분자량을 가지고, 이의 조성물의 약 81.8 중량% ± 1.9 중량%는 옥시에틸렌으로 표시된다. 예를 들어, 폴록사머-188은 하기 식 I로 나타낸 구조를 가지고, 식 I에서, a는 80이고 b는 27이다. 폴록사머-188은 CAS 넘버 9003-11-6를 가진다.

[0089] [식 I]



[0090] 5

[0091] 폴록사머-188은 예를 들어, Sigma-Aldrich(St. Louis, MO), Mediatech, Inc.(Manassas, VA), MAST Therapeutics, Inc.(San Diego, CA), EMD Millipore(Billerica, MA), BASF(Ludwigshafen, Germany), Pluronic ® F-68 Life Technologies(Carlsbad, CA) 및 PhytoTechnology Laboratories, LLC(Shawnee Mission, KS)를 포함한 다수의 상이한 공급업체들로부터 상업적으로 입수가능하다.

[0092] 본원에 제공된 방법은 약 1.8 g/L의 농도 또는 1.8 g/L 초과의 농도(예, 약 1.9 g/L의 농도 또는 1.9 g/L 초과의 농도, 약 2.0 g/L의 농도 또는 2.0 g/L 초과의 농도, 약 2.1 g/L의 농도 또는 2.1 g/L 초과의 농도, 약 2.2 g/L의 농도 또는 2.2 g/L 초과의 농도, 약 2.3 g/L의 농도 또는 2.3 g/L 초과의 농도, 약 2.4 g/L의 농도 또는 2.4 g/L 초과의 농도, 약 2.5 g/L의 농도 또는 2.5 g/L 초과의 농도, 약 2.6 g/L의 농도 또는 2.6 g/L 초과의 농도, 약 2.7 g/L의 농도 또는 2.7 g/L 초과의 농도, 약 2.8 g/L의 농도 또는 2.8 g/L 초과의 농도, 약 2.9 g/L의 농도 또는 2.9 g/L 초과의 농도, 약 3.0 g/L의 농도 또는 3.0 g/L 초과의 농도, 약 3.1 g/L의 농도 또는

3.1 g/L 초과의 농도, 약 3.2 g/L의 농도 또는 3.2 g/L 초과의 농도, 약 3.3 g/L의 농도 또는 3.3 g/L 초과의 농도, 약 3.4 g/L의 농도 또는 3.4 g/L 초과의 농도, 약 3.5 g/L의 농도 또는 3.5 g/L 초과의 농도, 약 3.6 g/L의 농도 또는 3.6 g/L 초과의 농도, 약 3.7 g/L의 농도 또는 3.7 g/L 초과의 농도, 약 3.8 g/L의 농도 또는 3.8 g/L 초과의 농도, 약 3.9 g/L의 농도 또는 3.9 g/L 초과의 농도, 약 4.0 g/L의 농도 또는 4.0 g/L 초과의 농도, 약 4.1 g/L의 농도 또는 4.1 g/L 초과의 농도, 약 4.2 g/L의 농도 또는 4.2 g/L 초과의 농도, 약 4.3 g/L의 농도 또는 4.3 g/L 초과의 농도, 약 4.4 g/L의 농도 또는 4.4 g/L 초과의 농도, 약 4.5 g/L의 농도 또는 4.5 g/L 초과의 농도, 약 4.6 g/L의 농도 또는 4.6 g/L 초과의 농도, 약 4.7 g/L의 농도 또는 4.7 g/L 초과의 농도, 약 4.8 g/L의 농도 또는 4.8 g/L 초과의 농도, 약 4.9 g/L의 농도 또는 4.9 g/L 초과의 농도, 약 5.0 g/L의 농도 또는 5.0 g/L 초과의 농도, 약 5.1 g/L의 농도 또는 5.1 g/L 초과의 농도, 약 5.2 g/L의 농도 또는 5.2 g/L 초과의 농도, 약 5.3 g/L의 농도 또는 5.3 g/L 초과의 농도, 약 5.4 g/L의 농도 또는 5.4 g/L 초과의 농도, 약 5.5 g/L의 농도 또는 5.5 g/L 초과의 농도, 약 5.6 g/L의 농도 또는 5.6 g/L 초과의 농도, 약 5.7 g/L의 농도 또는 5.7 g/L 초과의 농도, 약 5.8 g/L의 농도 또는 5.8 g/L 초과의 농도, 약 5.9 g/L의 농도 또는 5.9 g/L 초과의 농도, 약 6.0 g/L의 농도 또는 6.0 g/L 초과의 농도, 약 6.1 g/L의 농도 또는 6.1 g/L 초과의 농도, 약 6.2 g/L의 농도 또는 6.2 g/L 초과의 농도, 약 6.3 g /L의 농도 또는 6.3 g/L 초과의 농도, 약 6.4 g/L의 농도 또는 6.4 g/L 초과의 농도, 약 6.5 g/L의 농도 또는 6.5 g/L 초과의 농도, 약 6.6 g/L의 농도 또는 6.6 g/L 초과의 농도, 약 6.7 g/L의 농도 또는 6.7 g/L 초과의 농도, 약 6.8 g/L의 농도 또는 6.8 g/L 초과의 농도, 약 6.9 g/L의 농도 또는 6.9 g/L 초과의 농도, 약 7.0 g/L의 농도 또는 7.0 g/L 초과의 농도, 약 7.1 g/L의 농도 또는 7.1 g/L 초과의 농도, 약 7.2 g/L의 농도 또는 7.2 g/L 초과의 농도, 약 7.3 g/L의 농도 또는 7.3 g/L 초과의 농도, 약 7.4 g/L의 농도 또는 7.4 g/L 초과의 농도, 약 7.5 g/L의 농도 또는 7.5 g/L 초과의 농도, 약 7.6 g/L의 농도 또는 7.6 g/L 초과의 농도, 약 7.7 g/L의 농도 또는 7.7 g/L 초과의 농도, 약 7.8 g/L의 농도 또는 7.8 g/L 초과의 농도, 약 7.9 g/L의 농도 또는 7.9 g/L 초과의 농도, 약 8.0 g/L의 농도 또는 8.0 g/L 초과의 농도, 약 8.1 g/L의 농도 또는 8.1 g/L 초과의 농도, 약 8.2 g/L의 농도 또는 8.2 g/L 초과의 농도, 약 8.3 g/L의 농도 또는 8.3 g/L 초과의 농도, 약 8.4 g/L의 농도 또는 8.4 g/L 초과의 농도, 약 8.5 g/L의 농도 또는 8.5 g/L 초과의 농도, 약 8.6 g/L의 농도 또는 8.6 g/L 초과의 농도, 약 8.7 g/L의 농도 또는 8.7 g/L 초과의 농도, 약 8.8 g/L의 농도 또는 8.8 g/L 초과의 농도, 약 8.9 g/L의 농도 또는 8.9 g/L 초과의 농도, 약 9.0 g/L의 농도 또는 9.0 g/L 초과의 농도, 약 9.1 g/L의 농도 또는 9.1 g/L 초과의 농도, 약 9.2 g/L의 농도 또는 9.2 g/L 초과의 농도, 약 9.3 g/L의 농도 또는 9.3 g/L 초과의 농도, 약 9.4 g/L의 농도 또는 9.4 g/L 초과의 농도, 약 9.5 g/L의 농도 또는 9.5 g/L 초과의 농도, 약 9.6 g/L의 농도 또는 9.6 g/L 초과의 농도, 약 9.7 g/L의 농도 또는 9.7 g/L 초과의 농도, 약 9.8 g/L의 농도 또는 9.8 g/L 초과의 농도, 약 9.9 g/L의 농도 또는 9.9 g/L 초과의 농도, 약 10.0 g/L의 농도 또는 10.0 g/L 초과의 농도, 약 10.1 g/L의 농도 또는 10.1 g/L 초과의 농도, 약 10.2 g/L의 농도 또는 10.2 g/L 초과의 농도, 약 10.3 g/L의 농도 또는 10.3 g/L 초과의 농도, 약 10.4 g/L의 농도 또는 10.4 g/L 초과의 농도, 약 10.5 g/L의 농도 또는 10.5 g/L 초과의 농도, 약 10.6 g/L의 농도 또는 10.6 g/L 초과의 농도, 약 10.7 g/L의 농도 또는 10.7 g/L 초과의 농도, 약 10.8 g/L의 농도 또는 10.8 g/L 초과의 농도, 약 10.9 g/L의 농도 또는 10.9 g/L 초과의 농도, 약 11.0 g/L의 농도 또는 11.0 g/L 초과의 농도, 약 11.1 g/L의 농도 또는 11.1 g/L 초과의 농도, 약 11.2 g/L의 농도 또는 11.2 g/L 초과의 농도, 약 11.3 g/L의 농도 또는 11.3 g/L 초과의 농도, 약 11.4 g/L의 농도 또는 11.4 g/L 초과의 농도, 약 11.5 g/L의 농도 또는 11.5 g/L 초과의 농도, 약 11.6 g/L의 농도 또는 11.6 g/L 초과의 농도, 약 11.7 g/L의 농도 또는 11.7 g/L 초과의 농도, 약 11.8 g/L의 농도 또는 11.8 g/L 초과의 농도, 약 11.9 g/L의 농도 또는 11.9 g/L 초과의 농도, 약 12.0 g/L의 농도 또는 12.0 g/L 초과의 농도, 약 12.1 g/L의 농도 또는 12.1 g/L 초과의 농도, 약 12.2 g/L의 농도 또는 12.2 g/L 초과의 농도, 약 12.3 g/L의 농도 또는 12.3 g/L 초과의 농도, 약 12.4 g/L의 농도 또는 12.4 g/L 초과의 농도, 약 12.5 g/L의 농도 또는 12.5 g/L 초과의 농도, 약 12.6 g/L의 농도 또는 12.6 g/L 초과의 농도, 약 12.7 g/L의 농도 또는 12.7 g/L 초과의 농도, 약 12.8 g/L의 농도 또는 12.8 g/L 초과의 농도, 약 12.9 g/L의 농도 또는 12.9 g/L 초과의 농도, 약 13.0 g/L의 농도 또는 13.0 g/L 초과의 농도, 약 13.1 g/L의 농도 또는 13.1 g/L 초과의 농도, 약 13.2 g/L의 농도 또는 13.2 g/L 초과의 농도, 약 13.3 g/L의 농도 또는 13.3 g/L 초과의 농도, 약 13.4 g/L의 농도 또는 13.4 g/L 초과의 농도, 약 13.5 g/L의 농도 또는 13.5 g/L 초과의 농도, 약 13.6 g/L의 농도 또는 13.6 g/L 초과의 농도, 약 13.7 g/L의 농도 또는 13.7 g/L 초과의 농도, 약 13.8 g/L의 농도 또는 13.8 g/L 초과의 농도, 약 13.9 g/L의 농도 또는 13.9 g/L 초과의 농도, 약 14.0 g/L의 농도 또는 14.0 g/L 초과의 농도, 약 14.1 g/L의 농도 또는 14.1 g/L 초과의 농도, 약 14,2 g/L의 농도 또는 14.2 g/L 초과의 농도, 약 14.3 g/L의 농도 또는 14.3 g/L 초과의 농도, 약 14.4 g/L의 농도 또는 14.4 g/L 초과의 농도, 약 14.5 g/L의 농도 또는 14.5 g/L 초과의 농도, 약 14.6 g/L의 농도 또는 14.6 g/L 초과의 농도, 약 14.7 g/L의 농도 또는 14.7 g/L 초과의 농도, 약

14.8 g/L의 농도 또는 14.8 g/L 초과의 농도, 약 14.9 g/L의 농도 또는 14.9 g/L 초과의 농도, 또는 약 15.0 g/L의 농도 또는 15.0 g/L 초과의 농도)에서 폴록사머-188을 포함하는 액체 배지 내에서 포유류 세포(예, 재조합 단백질-인코딩 핵산을 포함하는 포유류 세포)를 배양하는 단계를 포함한다.

[0093] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 방법은 약 1.8 g/L 내지 약 16.0 g/L(예, 약 1.8 g/L 내지 약 15.8 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 15.6 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 15.4 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 15.2 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 14.8 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 14.6 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 14.4 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 14.2 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 14.0 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 13.8 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 13.6 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 13.4 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 13.2 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 13.0 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 12.8 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 12.6 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 12.4 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 12.2 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 12.0 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 11.8 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 11.6 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 11.4 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 11.2 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 11.0 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 10.8 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 10.6 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 10.4 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 10.2 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 9.8 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 9.6 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 9.4 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 9.2 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 8.8 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 8.6 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 8.4 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 8.2 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 8.0 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 7.8 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 7.6 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 7.4 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 7.2 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 7.0 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 6.8 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 6.6 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 6.4 g/L, 1.8 g/L 내지 약 6.2 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 5.6 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 5.4 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 5.2 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 5.0 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 4.8 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 4.6 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 4.4 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 4.2 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 3.8 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 3.6 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 3.4 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 3.2 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 2.8 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 15.8 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 15.6 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 15.4 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 15.2 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 14.8 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 14.6 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 14.4 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 14.2 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 14.0 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 13.8 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 13.6 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 13.4 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 13.2 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 13.0 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 12.8 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 12.6 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 12.4 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 12.2 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 12.0 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 11.8 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 11.6 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 11.4 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 11.2 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 11.0 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 10.8 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 10.6 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 10.4 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 10.2 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 9.8 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 9.6 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 9.4 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 9.2 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 8.8 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 8.6 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 8.4 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 8.2 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 8.0 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 7.8 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 7.6 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 7.4 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 7.2 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 7.0 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 6.8 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 6.6 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 6.4 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 6.2 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 5.6 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 5.4 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 5.2 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 5.0 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 4.8 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 4.6 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 4.4 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 4.2 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 3.8 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 3.6 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 3.4 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 3.2 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 15.8 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 15.6 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 15.4 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 15.2 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 14.8 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 14.6 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 14.4 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 14.2 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 14.0 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 13.8 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 13.6 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 13.4 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 13.2 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 13.0 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 12.8 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 12.6 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 12.4 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 12.2 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 12.0 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 11.8 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 11.6 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 11.4 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 11.2 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 11.0 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 10.8 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 10.6 g/L. 약 2.2 g/L 내지 약 10.4 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 10.2 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 9.8 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 9.6 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 9.4 g/L, 약 2.2 g/L 내

지 약 9.2 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 8.8 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 8.6 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 8.4 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 8.2 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 8.0 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 7.8 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 7.6 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 7.4 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 7.2 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 7.0 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 6.9 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 6.8 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 6.6 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 6.4 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 6.2 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 5.6 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 5.4 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 5.2 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 5.0 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 4.8 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 4.6 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 4.4 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 4.2 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 3.8 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 3.6 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 3.4 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 3.2 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 15.8 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 15.6 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 15.4 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 15.2 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 14.8 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 14.6 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 14.4 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 14.2 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 14.0 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 13.8 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 13.6 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 13.4 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 13.2 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 13.0 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 12.8 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 12.6 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 12.4 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 12.2 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 12.0 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 11.8 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 11.6 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 11.4 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 11.2 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 11.0 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 10.8 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 10.6 g/L. 약 2.4 g/L 내지 약 10.4 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 10.2 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 9.8 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 9.6 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 9.4 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 9.2 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 8.8 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 8.6 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 8.4 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 8.2 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 8.0 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 7.8 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 7.6 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 7.4 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 7.2 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 7.0 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 6.9 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 6.8 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 6.6 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 6.4 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 6.2 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 5.6 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 5.4 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 5.2 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 5.0 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 4.8 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 4.6 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 4.4 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 4.2 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 3.8 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 3.6 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 3.4 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 15.8 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 15.6 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 15.4 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 15.2 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 14.8 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 14.6 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 14.4 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 14.2 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 14.0 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 13.8 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 13.6 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 13.4 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 13.2 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 13.0 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 12.8 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 12.6 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 12.4 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 12.2 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 12.0 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 11.8 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 11.6 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 11.4 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 11.2 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 11.0 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 10.8 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 10.6 g/L. 약 2.6 g/L 내지 약 10.4 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 10.2 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 9.8 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 9.6 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 9.4 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 9.2 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 8.8 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 8.6 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 8.4 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 8.2 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 8.0 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 7.8 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 7.6 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 7.4 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 7.2 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 7.0 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 6.9 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 6.8 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 6.6 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 6.4 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 6.2 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 5.6 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 5.4 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 5.2 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 5.0 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 4.8 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 4.6 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 4.4 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 4.2 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 3.8 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 3.6 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 15.8 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 15.6 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 15.4 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 15.2 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 14.8 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 14.6 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 14.4 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 14.2 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 14.0 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 13.8 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 13.6 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 13.4 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 13.2 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 13.0 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 12.8 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 12.6 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 12.4 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 12.2 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 12.0 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 11.8 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 11.6 g/L, 약 2.8 g/L

내지 약 11.4 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 11.2 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 11.0 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 10.8 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 10.6 g/L. 약 2.8 g/L 내지 약 10.4 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 10.2 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 9.8 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 9.6 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 9.4 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 9.2 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 8.8 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 8.6 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 8.4 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 8.2 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 8.0 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 7.8 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 7.6 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 7.4 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 7.2 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 7.0 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 6.9 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 6.8 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 6.6 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 6.4 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 6.2 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 5.6 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 5.4 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 5.2 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 5.0 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 4.8 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 4.6 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 4.4 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 4.2 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 3.8 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 15.8 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 15.6 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 15.4 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 15.2 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 14.8 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 14.6 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 14.4 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 14.2 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 14.0 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 13.8 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 13.6 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 13.4 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 13.2 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 13.0 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 12.8 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 12.6 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 12.4 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 12.2 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 12.0 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 11.8 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 11.6 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 11.4 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 11.2 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 11.0 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 10.8 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 10.6 g/L. 약 3.0 g/L 내지 약 10.4 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 10.2 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 9.8 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 9.6 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 9.4 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 9.2 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 8.8 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 8.6 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 8.4 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 8.2 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 8.0 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 7.8 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 7.6 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 7.4 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 7.2 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 7.0 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 6.9 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 6.8 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 6.6 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 6.4 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 6.2 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 5.6 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 5.4 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 5.2 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 5.0 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 4.8 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 4.6 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 4.4 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 4.2 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 15.8 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 15.6 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 15.4 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 15.2 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 14.8 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 14.6 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 14.4 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 14.2 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 14.0 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 13.8 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 13.6 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 13.4 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 13.2 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 13.0 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 12.8 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 12.6 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 12.4 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 12.2 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 12.0 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 11.8 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 11.6 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 11.4 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 11.2 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 11.0 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 10.8 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 10.6 g/L. 약 3.2 g/L 내지 약 10.4 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 10.2 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 9.8 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 9.6 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 9.4 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 9.2 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 8.8 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 8.6 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 8.4 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 8.2 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 8.0 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 7.8 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 7.6 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 7.4 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 7.2 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 7.0 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 6.9 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 6.8 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 6.6 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 6.4 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 6.2 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 5.6 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 5.4 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 5.2 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 5.0 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 4.8 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 4.6 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 4.4 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 4.2 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 15.8 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 15.6 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 15.4 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 15.2 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 14.8 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 14.6 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 14.4 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 14.2 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 14.0 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 13.8 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 13.6 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 13.4 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 13.2 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 13.0 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 12.8 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 12.6 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 12.4 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 12.2 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 12.0

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

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

지 약 7.6 g/L, 약 4.6 g/L 내지 약 7.4 g/L, 약 4.6 g/L 내지 약 7.2 g/L, 약 4.6 g/L 내지 약 7.0 g/L, 약 4.6 g/L 내지 약 6.9 g/L, 약 4.6 g/L 내지 약 6.8 g/L, 약 4.6 g/L 내지 약 6.6 g/L, 약 4.6 g/L 내지 약 6.4 g/L, 약 4.6 g/L 내지 약 6.2 g/L, 약 4.6 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 4.6 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 4.6 g/L 내지 약 5.6 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 15.8 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 15.6 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 15.4 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 15.2 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 14.8 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 14.6 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 14.4 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 14.2 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 14.0 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 13.8 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 13.6 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 13.4 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 13.2 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 13.0 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 12.8 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 12.6 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 12.4 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 12.2 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 12.0 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 11.8 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 11.6 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 11.4 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 11.2 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 11.0 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 10.8 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 10.6 g/L. 약 4.8 g/L 내지 약 10.4 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 10.2 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 9.8 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 9.6 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 9.4 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 9.2 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 8.8 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 8.6 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 8.4 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 8.2 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 8.0 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 7.8 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 7.6 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 7.4 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 7.2 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 7.0 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 6.9 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 6.8 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 6.6 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 6.4 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 6.2 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 15.8 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 15.6 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 15.4 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 15.2 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 14.8 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 14.6 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 14.4 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 14.2 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 14.0 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 13.8 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 13.6 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 13.4 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 13.2 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 13.0 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 12.8 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 12.6 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 12.4 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 12.2 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 12.0 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 11.8 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 11.6 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 11.4 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 11.2 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 11.0 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 10.8 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 10.6 g/L. 약 5.0 g/L 내지 약 10.4 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 10.2 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 9.8 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 9.6 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 9.4 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 9.2 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 8.8 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 8.6 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 8.4 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 8.2 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 8.0 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 7.8 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 7.6 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 7.4 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 7.2 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 7.0 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 6.9 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 6.8 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 6.6 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 6.4 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 6.2 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 15.8 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 15.6 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 15.4 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 15.2 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 14.8 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 14.6 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 14.4 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 14.2 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 14.0 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 13.8 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 13.6 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 13.4 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 13.2 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 13.0 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 12.8 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 12.6 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 12.4 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 12.2 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 12.0 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 11.8 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 11.6 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 11.4 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 11.2 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 11.0 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 10.8 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 10.6 g/L. 약 5.1 g/L 내지 약 10.4 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 10.2 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 9.8 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 9.6 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 9.4 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 9.2 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 8.8 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 8.6 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 8.4 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 8.2 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 8.0 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 7.8 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 7.6 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 7.4 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 7.2 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 7.0 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 6.9 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 6.8 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 6.6 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 6.4 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 6.2 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 6.1 g/L, 약 5.2 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 5.2 g/L 내지 약 15.8 g/L, 약 5.2 g/L 내지 약 15.6 g/L, 약 5.2 g/L 내지 약 15.4 g/L, 약 5.2 g/L 내지 약 15.2 g/L, 약 5.2 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 5.2 g/L 내지 약 14.8 g/L, 약 5.2 g/L 내지 약 14.6 g/L, 약 5.2 g/L 내지 약 14.4 g/L, 약 5.2 g/L 내지 약 14.2 g/L, 약 5.2 g/L 내지 약 14.0 g/L, 약 5.2 g/L 내지 약 13.8 g/L, 약 5.2 g/L 내지 약 13.6 g/L, 약 5.2 g/L 내지 약 13.4 g/L, 약 5.2 g/L 내지 약

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

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

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

내지 약 11.4 g/L, 약 7.6 g/L 내지 약 11.2 g/L, 약 7.6 g/L 내지 약 11.0 g/L, 약 7.6 g/L 내지 약 10.8 g/L, 약 7.6 g/L 내지 약 10.6 g/L. 약 7.6 g/L 내지 약 10.4 g/L, 약 7.6 g/L 내지 약 10.2 g/L, 약 7.6 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 7.6 g/L 내지 약 9.8 g/L, 약 7.6 g/L 내지 약 9.6 g/L, 약 7.6 g/L 내지 약 9.4 g/L, 약 7.6 g/L 내지 약 9.2 g/L, 약 7.6 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 7.6 g/L 내지 약 8.8 g/L, 약 7.6 g/L 내지 약 8.6 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 15.8 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 15.6 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 15.4 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 15.2 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 14.8 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 14.6 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 14.4 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 14.2 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 14.0 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 13.8 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 13.6 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 13.4 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 13.2 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 13.0 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 12.8 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 12.6 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 12.4 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 12.2 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 12.0 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 11.8 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 11.6 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 11.4 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 11.2 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 11.0 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 10.8 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 10.6 g/L. 약 7.8 g/L 내지 약 10.4 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 10.2 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 9.8 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 9.6 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 9.4 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 9.2 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 7.8 g/L 내지 약 8.8 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 15.8 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 15.6 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 15.4 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 15.2 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 14.8 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 14.6 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 14.4 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 14.2 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 14.0 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 13.8 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 13.6 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 13.4 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 13.2 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 13.0 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 12.8 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 12.6 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 12.4 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 12.2 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 12.0 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 11.8 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 11.6 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 11.4 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 11.2 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 11.0 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 10.8 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 10.6 g/L. 약 8.0 g/L 내지 약 10.4 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 10.2 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 9.8 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 9.6 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 9.4 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 9.2 g/L, 약 8.0 g/L 내지 약 9.0 g/L, 약 8.5 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 8.5 g/L 내지 약 15.5 g/L, 약 8.5 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 8.5 g/L 내지 약 14.5 g/L, 약 8.5 g/L 내지 약 14.0 g/L, 약 8.5 g/L 내지 약 13.5 g/L, 약 8.5 g/L 내지 약 13.0 g/L, 약 8.5 g/L 내지 약 12.5 g/L, 약 8.5 g/L 내지 약 12.0 g/L, 약 8.5 g/L 내지 약 11.5 g/L, 약 8.5 g/L 내지 약 11.0 g/L, 약 8.5 g/L 내지 약 10.5 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 9.0 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 9.0 g/L 내지 약 15.5 g/L, 약 9.0 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 9.0 g/L 내지 약 14.5 g/L, 약 9.0 g/L 내지 약 14.0 g/L, 약 9.0 g/L 내지 약 13.5 g/L, 약 9.0 g/L 내지 약 13.0 g/L, 약 9.0 g/L 내지 약 12.5 g/L, 약 9.0 g/L 내지 약 12.0 g/L, 약 9.0 g/L 내지 약 11.5 g/L, 약 9.0 g/L 내지 약 11.0 g/L, 약 9.0 g/L 내지 약 10.5 g/L, 약 9.0 g/L 내지 약 10.0 g/L, 약 9.5 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 9.5 g/L 내지 약 15.5 g/L, 약 9.5 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 9.5 g/L 내지 약 14.5 g/L, 약 9.5 g/L 내지 약 14.0 g/L, 약 9.5 g/L 내지 약 13.5 g/L, 약 9.5 g/L 내지 약 13.0 g/L, 약 9.5 g/L 내지 약 12.5 g/L, 약 9.5 g/L 내지 약 12.0 g/L, 약 9.5 g/L 내지 약 11.5 g/L, 약 9.5 g/L 내지 약 11.0 g/L, 약 9.5 g/L 내지 약 10.5 g/L, 약 10.0 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 10.0 g/L 내지 약 15.5 g/L, 약 10.0 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 10.0 g/L 내지 약 14.5 g/L, 약 10.0 g/L 내지 약 14.0 g/L, 약 10.0 g/L 내지 약 13.5 g/L, 약 10.0 g/L 내지 약 13.0 g/L, 약 10.0 g/L 내지 약 12.5 g/L, 약 10.0 g/L 내지 약 12.0 g/L, 약 10.0 g/L 내지 약 11.5 g/L, 약 10.0 g/L 내지 약 11.0 g/L, 약 10.5 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 10.5 g/L 내지 약 15.5 g/L, 약 10.5 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 10.5 g/L 내지 약 14.5 g/L, 약 10.5 g/L 내지 약 14.0 g/L, 약 10.5 g/L 내지 약 13.5 g/L, 약 10.5 g/L 내지 약 13.0 g/L, 약 10.5 g/L 내지 약 12.5 g/L, 약 10.5 g/L 내지 약 12.0 g/L, 약 10.5 g/L 내지 약 11.5 g/L, 약 11.0 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 11.0 g/L 내지 약 15.5 g/L, 약 11.0 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 11.0 g/L 내지 약 14.5 g/L, 약 11.0 g/L 내지 약 14.0 g/L, 약 11.0 g/L 내지 약 13.5 g/L, 약 11.0 g/L 내지 약 13.0 g/L, 약 11.0 g/L 내지 약 12.5 g/L, 약 11.0 g/L 내지 약 12.0 g/L, 약 11.5 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 11.5 g/L 내지 약 15.5 g/L, 약 11.5 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 11.5 g/L 내지 약 14.5 g/L, 약 11.5 g/L 내지 약 14.0 g/L, 약 11.5 g/L 내지 약 13.5 g/L, 약 11.5 g/L 내지 약 13.0 g/L, 약 11.5 g/L 내지 약 12.5 g/L, 약 12.0 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 12.0 g/L 내지 약 15.5 g/L, 약 12.0 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 12.0 g/L 내지 약 14.5 g/L, 약 12.0 g/L 내지 약 14.0 g/L, 약 12.0 g/L 내지 약 13.5 g/L, 약 12.0 g/L 내지 약 13.0 g/L, 약 12.5 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 12.5 g/L 내지 약 15.5 g/L, 약 12.5 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 12.5 g/L 내지 약 14.5 g/L, 약 12.5 g/L 내지 약 14.0 g/L, 약 12.5 g/L 내지 약 13.5 g/L, 약 13.0 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 13.0

g/L 내지 약 15.5 g/L, 약 13.0 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 13.0 g/L 내지 약 14.5 g/L, 약 13.0 g/L 내지 약 14.0 g/L, 약 13.5 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 13.5 g/L 내지 약 15.5 g/L, 약 13.5 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 13.5 g/L 내지 약 14.5 g/L, 약 14.0 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 14.0 g/L 내지 약 15.5 g/L, 약 14.0 g/L 내지 약 15.0 g/L, 약 14.5 g/L 내지 약 16.0 g/L, 약 14.5 g/L 내지 약 15.5 g/L, 또는 약 15.0 g/L 내지 약 16.0 g/L)의 농도에서 폴록사머-188을 포함하는 액체 배지 내에서 포유류 세포(예, 재조합 단백질-인코딩 핵산을 포함하는 포유류 세포)를 배양하는 단계를 포함한다.

[0094] 일부 실시형태에서, 폴록사머-188은 배지 내에 존재하고/거나 배양 단계 이전에 배지에 첨가되고/거나 배양 단계 동안에 배지에 첨가된다. 예를 들어, 본원에 제공된 방법은 배지 내 1.8 g/L 이상의 농도(예, 본원에 기재된 폴록사머-188의 예시적인 농도 또는 폴록사머-188의 범위 중 임의의 농도 또는 범위)를 제공하기 위해 배양 단계 이전에 및/또는 동안에 폴록사머-188을 첨가하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 예에서, 부가적인 폴록사머-188은 1.8 g/L 이상의 농도의 폴록사머-188(예, 본원에 기재된 폴록사머-188의 예시적인 농도들 중 임의의 농도 또는 폴록사머-188의 범위)을 제공하기 위해, 일부 폴록사머-188을 포함하는 액체 배지에 첨가된다. 예를 들어, 폴록사머-188은 배양 단계 이전 및/또는 동안에 제1 액체 배지, 제2 액체 배지 및/또는 공급 액체 배지에 첨가될 수 있다.

[0095] 일부 예에서, 폴록사머-188은 배양 단계 동안에 하나 이상(예, 2개, 3개, 4개 또는 5개)의 분취물 내 배지에 첨가된다. 폴록사머-188은 연속적인 방식으로 배지에 첨가될 수 있다. 일부 예에서, 제1 액체 배지는 폴록사머-188을 함유할 수 있고, 부가적인 폴록사머-188은 배양 기간 동안 배지에 첨가된다. 일부 실시형태에서, 폴록사머-188은 배지에 존재한다.

[0096] 배양 단계가 관류 배양을 포함하는 경우, 제2 액체 배지는 제1 액체 배지 내 농도보다 더 큰 농도에서 폴록사머-188을 포함할 수 있다. 예를 들어, 제1 액체 배지는 폴록사머-188을 1.8 g/L의 농도 또는 1.8 g/L 이하의 농도에서 포함할 수 있고, 제2 액체 배지는 폴록사머-188을 1.8 g/L 초과의 농도(예, 본원에 기재된 폴록사머-188의 농도 또는 범위들 중 임의의 농도 또는 범위, 예를 들어, 1.9 g/L 초과의 농도, 2.0 g/L 초과의 농도, 2.1 g/L 초과의 농도, 2.2 g/L 초과의 농도, 2.3 g/L 초과의 농도, 2.4 g/L 초과의 농도, 2.5 g/L 초과의 농도, 2.6 g/L 초과의 농도, 2.7 g/L 초과의 농도, 2.8 g/L 초과의 농도, 2.9 g/L 초과의 농도, 3.0 g/L 초과의 농도, 3.1 g/L 초과의 농도, 3.2 g/L 초과의 농도, 3.3 g/L 초과의 농도, 3.4 g/L 초과의 농도, 3.5 g/L 초과의 농도, 3.6 g/L 초과의 농도, 3.7 g/L 초과의 농도, 3.8 g/L 초과의 농도, 3.9 g/L 초과의 농도, 4.0 g/L 초과의 농도, 4.1 g/L 초과의 농도, 4.2 g/L 초과의 농도, 4.3 g/L 초과의 농도, 4.4 g/L 초과의 농도, 4.5 g/L 초과의 농도, 4.6 g/L 초과의 농도, 4.7 g/L 초과의 농도, 4.8 g/L 초과의 농도, 4.9 g/L 초과의 농도, 5.0 g/L 초과의 농도, 5.1 g/L 초과의 농도, 5.2 g/L 초과의 농도, 5.3 g/L 초과의 농도, 5.4 g/L 초과의 농도, 5.5 g/L 초과의 농도, 5.6 g/L 초과의 농도, 5.7 g/L 초과의 농도, 5.8 g/L 초과의 농도, 5.9 g/L 초과의 농도, 6.0 g/L 초과의 농도, 6.1 g/L 초과의 농도, 6.2 g/L 초과의 농도, 6.3 g/L 초과의 농도, 6.4 g/L 초과의 농도, 6.5 g/L 초과의 농도, 6.6 g/L 초과의 농도, 6.7 g/L 초과의 농도, 6.8 g/L 초과의 농도, 6.9 g/L 초과의 농도, 7.0 g/L 초과의 농도, 7.1 g/L 초과의 농도, 7.2 g/L 초과의 농도, 7.3 g/L 초과의 농도, 7.4 g/L 초과의 농도, 7.5 g/L 초과의 농도, 7.6 g/L 초과의 농도, 7.7 g/L 초과의 농도, 7.8 g/L 초과의 농도, 7.9 g/L 초과의 농도, 8.0 g/L 초과의 농도, 8.1 g/L 초과의 농도, 8.2 g/L 초과의 농도, 8.3 g/L 초과의 농도, 8.4 g/L 초과의 농도, 8.5 g/L 초과의 농도, 8.6 g/L 초과의 농도, 8.7 g/L 초과의 농도, 8.8 g/L 초과의 농도, 8.9 g/L 초과의 농도, 9.0 g/L 초과의 농도, 9.1 g/L 초과의 농도, 9.2 g/L 초과의 농도, 9.3 g/L 초과의 농도, 9.4 g/L 초과의 농도, 9.5 g/L 초과의 농도, 9.6 g/L 초과의 농도, 9.7 g/L 초과의 농도, 9.8 g/L 초과의 농도, 9.9 g/L 초과의 농도, 10.0 g/L 초과의 농도, 10.1 g/L 초과의 농도, 10.2 g/L 초과의 농도, 10.3 g/L 초과의 농도, 10.4 g/L 초과의 농도, 10.5 g/L 초과의 농도, 10.6 g/L 초과의 농도, 10.7 g/L 초과의 농도, 10.8 g/L 초과의 농도, 10.9 g/L 초과의 농도, 11.0 g/L 초과의 농도, 11.1 g/L 초과의 농도, 11.2 g/L 초과의 농도, 11.3 g/L 초과의 농도, 11.4 g/L 초과의 농도, 11.5 g/L 초과의 농도, 11.6 g/L 초과의 농도, 11.7 g/L 초과의 농도, 11.8 g/L 초과의 농도, 11.9 g/L 초과의 농도, 12.0 g/L 초과의 농도, 12.1 g/L 초과의 농도, 12.2 g/L 초과의 농도, 12.3 g/L 초과의 농도, 12.4 g/L 초과의 농도, 12.5 g/L 초과의 농도, 12.6 g/L 초과의 농도, 12.7 g/L 초과의 농도, 12.8 g/L 초과의 농도, 12.9 g/L 초과의 농도, 13.0 g/L 초과의 농도, 13.1 g/L 초과의 농도, 13.2 g/L 초과의 농도, 13.3 g/L 초과의 농도, 13.4 g/L 초과의 농도, 13.5 g/L 초과의 농도, 13.6 g/L 초과의 농도, 13.7 g/L 초과의 농도, 13.8 g/L 초과의 농도, 13.9 g/L 초과의 농도, 14.0 g/L 초과의 농도, 14.1 g/L 초과의 농도, 14.2 g/L 초과의 농도, 14.3 g/L 초과의 농도, 14.4 g/L 초과의 농도, 14.5 g/L 초과의 농도, 14.6 g/L 초과의 농도, 14.7 g/L 초과의 농도, 14.8 g/L 초과의 농도, 14.9 g/L 초과의 농도, 15.0 g/L 초과의 농도, 15.1 g/L 초과의 농도, 15.2 g/L 초과의 농도, 15.3 g/L 초과의 농도, 15.4 g/L

초과의 농도, 15.5 g/L 초과의 농도, 15.6 g/L 초과의 농도, 15.7 g/L 초과의 농도, 15.8 g/L 초과의 농도, 15.9 g/L 초과의 농도 또는 16.0 g/L 초과의 농도의 폴록사머-188)에서 포함한다.

[0097] 배양 단계가 유가 배양을 포함하는 경우, 공급 액체 배지는 제1 액체 배지 내 농도보다 더 큰 농도에서 폴록사머-188을 포함할 수 있다. 예를 들어, 제1 액체 배지는 폴록사머-188을 1.8 g/L의 농도 또는 1.8 g/L 이하의 농도에서 포함할 수 있고, 제2 액체 배지는 폴록사머-188을 1.8 g/L 초과의 농도(예, 2.0 g/L 초과의 농도, 2.5 g/L 초과의 농도, 3.0 g/L 초과의 농도, 3.5 g/L 초과의 농도, 4.0 g/L 초과의 농도, 4.5 g/L 초과의 농도, 5.0 g/L 초과의 농도, 5.5 g/L 초과의 농도, 6.0 g/L 초과의 농도, 6.5 g/L 초과의 농도, 7.0 g/L 초과의 농도, 7.5 g/L 초과의 농도, 8.0 g/L 초과의 농도, 8.5 g/L 초과의 농도, 9.0 g/L 초과의 농도, 9.5 g/L 초과의 농도, 10 g/L 초과의 농도, 10.5 g/L 초과의 농도, 11.0 g/L 초과의 농도, 11.5 g/L 초과의 농도, 12.0 g/L 초과의 농도, 12.5 g/L 초과의 농도, 13.0 g/L 초과의 농도, 13.5 g/L 초과의 농도, 14.0 g/L 초과의 농도, 14.5 g/L 초과의 농도, 15.0 g/L 초과의 농도, 15.5 g/L 초과의 농도, 16.0 g/L 초과의 농도, 16.5 g/L 초과의 농도, 17.0 g/L 초과의 농도, 17.5 g/L 초과의 농도, 18.0 g/L 초과의 농도, 18.5 g/L 초과의 농도, 19.0 g/L 초과의 농도, 19.5 g/L 초과의 농도, 20.0 g/L 초과의 농도, 20.5 g/L 초과의 농도, 21.0 g/L 초과의 농도, 21.5 g/L 초과의 농도, 22.0 g/L 초과의 농도, 22.5 g/L 초과의 농도, 23.0 g/L 초과의 농도, 23.5 g/L 초과의 농도, 24.0 g/L 초과의 농도, 24.5 g/L 초과의 농도, 25.0 g/L 초과의 농도, 25.5 g/L 초과의 농도, 26.0 g/L 초과의 농도, 26.5 g/L 초과의 농도, 27.0 g/L 초과의 농도, 28.0 g/L 초과의 농도, 28.5 g/L 초과의 농도, 29.0 g/L 초과의 농도, 29.5 g/L 초과의 농도, 30.0 g/L 초과의 농도, 30.5 g/L 초과의 농도, 31.0 g/L 초과의 농도, 31.5 g/L 초과의 농도, 32.0 g/L 초과의 농도, 32.5 g/L 초과의 농도, 33.0 g/L 초과의 농도, 33.5 g/L 초과의 농도, 34.0 g/L 초과의 농도, 34.5 g/L 초과의 농도, 35.0 g/L 초과의 농도, 35.5 g/L 초과의 농도, 36.0 g/L 초과의 농도, 36.5 g/L 초과의 농도, 37.0 g/L 초과의 농도, 37.5 g/L 초과의 농도, 38.0 g/L 초과의 농도, 38.5 g/L 초과의 농도, 39.0 g/L 초과의 농도, 39.5 g/L 초과의 농도 또는 40.0 g/L 초과의 농도)에서 포함한다.

[0098] 본원에 제공된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태는 시간 경과에 따라 배양물 내 폴록사머-188 농도를 증가시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 배지는 기공 크기, 기공 유형, 기체 유속, 배지 내 생존가능한 세포 밀도, 및 세포 스트레스와 관련된 마커의 군으로부터 선택되는 하나 이상의 인자를 기반으로 선택되는 폴록사머-188 농도를 포함한다. 이들 방법에서, 배지 내 선택된 폴록사머-188 농도는 배양 단계 이전에 폴록사머-188을 상기 배지에 첨가함으로써 및/또는 배양 단계 동안에 폴록사머-188을 상기 배지에 첨가함으로써 달성될 수 있다. 선택된 폴록사머-188 농도는 본원에 기재된 폴록사머-188의 예시적인 농도 또는 범위들 중 임의의 농도 또는 범위일 수 있다.

[0099] **하나 이상의 인자를 기반으로 한 폴록사머-188의 농도의 선택**

[0100] 본원에 기재된 방법의 일부 실시형태는 기공 크기, 기공 유형, 기체 유속, 배지 내 생존가능한 세포 밀도, 및 세포 스트레스와 관련된 마커의 군으로부터 선택되는 하나 이상의 인자를 기반으로 선택되는 폴록사머-188 농도를 포함하는 액체 배지 내에서 포유류 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

[0101] 기공 유형의 상이한 예들은 당업계에 알려져 있다. 기공 유형의 비제한적인 예는 신터드 기공 및 드릴드 기공이다.

[0102] 세포 배양에 적합한 다양한 기체 유속들이 당업계에 알려져 있다. 일반적으로, 더 높은 기체 유속은 (더 낮은 기체 유속을 사용하는 배양 단계와 비교하여) 더 높은 폴록사머-188 농도가 선택되어야 함을 가리키고, 더 낮은 기체 유속은 (더 높은 기체 유속을 사용하는 배양 단계와 비교하여) 더 낮은 폴록사머-188 농도가 선택되어야 함을 가리킨다.

[0103] 다양한 비제한적인 생존가능한 세포 밀도들이 당업계에 알려져 있다. 일반적으로, 더 높은 생존가능한 세포 밀도는 (더 낮은 생존가능한 세포 밀도를 함유하는 배지와 비교하여) 더 높은 폴록사머-188 농도가 선택되어야 함을 가리키고, 더 낮은 생존가능한 세포 밀도는 (더 높은 생존가능한 세포 밀도를 함유하는 배지와 비교하여) 더 낮은 폴록사머-188 농도가 선택되어야 함을 가리킨다.

[0104] 생리학적 스트레스 하에 세포에 의해 방출되는 세포 스트레스의 예시적인 마커로는, 프로테아제(예, 활성화된 카스파제), 락테이트 데하이드로게나제, 게놈 DNA(예, 뉴클레오좀 DNA), 시토크롬 c 및 활성화된 PARP 등이 있다. 생리학적 스트레스 하에 세포에서 생성되거나 상승된 수준을 갖는 세포 스트레스와 관련된 마커의 비제한적인 예로는, 활성화된 카스파제, 시토크롬 c, 활성화된 PARP 및 외면화된 포스파티딜세린 등이 있다. 대조군 값

(들)과 비교하여 이들 세포 스트레스 마커들 중 임의의 하나 이상(예, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개의)의 상승된 수준은, 더 높은 폴록사머-188 농도가 선택되어야 함을 가리킨다. 대조군 값(들)과 비교하여 대조군 값(들)과 대략 동일하거나 낮은 하나 이상의 세포 스트레스 마커의 수준(들)은, 더 낮은 폴록사머-188 농도가 선택되어야 함을 가리킨다. 본원에 기재된 예들 중 임의의 예에서, 대조군 수준은 세포자멸사를 겪고 있지 않거나 괴사를 유발할 조건 하에 배양되지 않는 대조군 세포 내 수준일 수 있다. 하나 이상의 세포 스트레스 마커의 수준을 검출하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 상업적으로 입수가능한 키트는 하나 이상의 세포 스트레스 마커를 측정하기 위해 입수가능하다.

[0105] 본원에 기재된 실시형태들 중 임의의 실시형태에서, 선택된 폴록사머-188 농도는 배양 단계 이전에 폴록사머-188을 배지에 첨가함으로써 및/또는 배양 단계 동안에 폴록사머-188을 배지에 첨가함으로써 달성된다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 기공 유형 및 기공 크기를 기반으로, 기공 유형이 드릴드 기공이고 기공 크기가 약 750 ㎛ 내지 약 1.5 mm(예, 약 750 ㎛ 내지 약 1.45 mm, 약 750 ㎛ 내지 약 1.40 mm, 약 750 ㎛ 내지 약 1.35 mm, 약 750 ㎛ 내지 약 1.30 mm, 약 750 ㎛ 내지 약 1.25 mm, 약 750 ㎛ 내지 약 1.20 mm, 약 750 ㎛ 내지 약 1.15 mm, 약 750 ㎛ 내지 약 1.10 mm, 약 750 ㎛ 내지 약 1.05 mm, 약 750 ㎛ 내지 약 1.00 mm, 약 750 ㎛ 내지 약 950 ㎛, 약 750 ㎛ 내지 약 900 ㎛, 약 750 ㎛ 내지 약 850 ㎛, 약 750 ㎛ 내지 약 800 ㎛, 약 800 ㎛ 내지 약 1.5 mm, 약 800 ㎛ 내지 약 1.45 mm, 약 800 ㎛ 내지 약 1.40 mm, 약 800 ㎛ 내지 약 1.35 mm, 약 800 ㎛ 내지 약 1.30 mm, 약 800 ㎛ 내지 약 1.25 mm, 약 800 ㎛ 내지 약 1.20 mm, 약 800 ㎛ 내지 약 1.15 mm, 약 800 ㎛ 내지 약 1.10 mm, 약 800 ㎛ 내지 약 1.05 mm, 약 800 ㎛ 내지 약 1.00 mm, 약 800 ㎛ 내지 약 950 ㎛, 약 800 ㎛ 내지 약 900 ㎛, 약 800 ㎛ 내지 약 850 ㎛, 약 850 ㎛ 내지 약 1.5 mm, 약 850 ㎛ 내지 약 1.45 mm, 약 850 ㎛ 내지 약 1.40 mm, 약 850 ㎛ 내지 약 1.35 mm, 약 850 ㎛ 내지 약 1.30 mm, 약 850 ㎛ 내지 약 1.25 mm, 약 850 ㎛ 내지 약 1.20 mm, 약 850 ㎛ 내지 약 1.15 mm, 약 850 ㎛ 내지 약 1.10 mm, 약 850 ㎛ 내지 약 1.05 mm, 약 850 ㎛ 내지 약 1.00 mm, 약 850 ㎛ 내지 약 950 ㎛, 약 850 ㎛ 내지 약 900 ㎛, 약 900 ㎛ 내지 약 1.5 mm, 약 900 ㎛ 내지 약 1.45 mm, 약 900 ㎛ 내지 약 1.40 mm, 약 900 ㎛ 내지 약 1.35 mm, 약 900 ㎛ 내지 약 1.30 mm, 약 900 ㎛ 내지 약 1.25 mm, 약 900 ㎛ 내지 약 1.20 mm, 약 900 ㎛ 내지 약 1.15 mm, 약 900 ㎛ 내지 약 1.10 mm, 약 900 ㎛ 내지 약 1.05 mm, 약 900 ㎛ 내지 약 1.00 mm, 약 900 ㎛ 내지 약 950 ㎛, 약 950 ㎛ 내지 약 1.5 mm, 약 950 ㎛ 내지 약 1.45 mm, 약 950 ㎛ 내지 약 1.40 mm, 약 950 ㎛ 내지 약 1.35 mm, 약 950 ㎛ 내지 약 1.30 mm, 약 950 ㎛ 내지 약 1.25 mm, 약 950 ㎛ 내지 약 1.20 mm, 약 950 ㎛ 내지 약 1.15 mm, 약 950 ㎛ 내지 약 1.10 mm, 약 950 ㎛ 내지 약 1.05 mm, 약 950 ㎛ 내지 약 1.00 mm, 약 1.0 mm 내지 약 1.5 mm, 약 1.0 mm 내지 약 1.45 mm, 약 1.0 mm 내지 약 1.40 mm, 약 1.0 mm 내지 약 1.35 mm, 약 1.0 mm 내지 약 1.30 mm, 약 1.0 mm 내지 약 1.25 mm, 약 1.0 mm 내지 약 1.20 mm, 약 1.0 mm 내지 약 1.15 mm, 약 1.0 mm 내지 약 1.10 mm, 약 1.0 mm 내지 약 1.05 mm, 약 1.05 mm 내지 약 1.5 mm, 약 1.05 mm 내지 약 1.45 mm, 약 1.05 mm 내지 약 1.40 mm, 약 1.05 mm 내지 약 1.35 mm, 약 1.05 mm 내지 약 1.30 mm, 약 1.05 mm 내지 약 1.25 mm, 약 1.05 mm 내지 약 1.20 mm, 약 1.05 mm 내지 약 1.15 mm, 약 1.05 mm 내지 약 1.10 mm, 약 1.10 mm 내지 약 1.5 mm, 약 1.10 mm 내지 약 1.45 mm, 약 1.10 mm 내지 약 1.40 mm, 약 1.10 mm 내지 약 1.35 mm, 약 1.10 mm 내지 약 1.30 mm, 약 1.10 mm 내지 약 1.25 mm, 약 1.10 mm 내지 약 1.20 mm, 약 1.10 mm 내지 약 1.15 mm, 약 1.15 mm 내지 약 1.5 mm, 약 1.15 mm 내지 약 1.45 mm, 약 1.15 mm 내지 약 1.40 mm, 약 1.15 mm 내지 약 1.35 mm, 약 1.15 mm 내지 약 1.30 mm, 약 1.15 mm 내지 약 1.25 mm, 약 1.15 mm 내지 약 1.20 mm, 약 1.20 mm 내지 약 1.5 mm, 약 1.20 mm 내지 약 1.45 mm, 약 1.20 mm 내지 약 1.40 mm, 약 1.20 mm 내지 약 1.35 mm, 약 1.20 mm 내지 약 1.30 mm, 약 1.20 mm 내지 약 1.25 mm, 약 1.25 mm 내지 약 1.5 mm, 약 1.25 mm 내지 약 1.45 mm, 약 1.25 mm 내지 약 1.40 mm, 약 1.25 mm 내지 약 1.35 mm, 약 1.25 mm 내지 약 1.30 mm, 약 1.30 mm 내지 약 1.5 mm, 약 1.30 mm 내지 약 1.45 mm, 약 1.30 mm 내지 약 1.40 mm, 약 1.30 mm 내지 약 1.35 mm, 약 1.35 mm 내지 약 1.5 mm, 약 1.35 mm 내지 약 1.45 mm, 약 1.35 mm 내지 약 1.40 mm, 약 1.40 mm 내지 약 1.5 mm, 약 1.40 mm 내지 약 1.45 mm, 또는 약 1.45 mm 내지 약 1.50 mm)일 때, 약 2.3 g/L 내지 약 3.3 g/L(예, 약 2.3 g/L 내지 약 3.2 g/L, 약 2.3 g/L 내지 약 3.1 g/L, 약 2.3 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 2.3 g/L 내지 약 2.9 g/L, 약 2.3 g/L 내지 약 2.8 g/L, 약 2.3 g/L 내지 약 2.7 g/L, 약 2.3 g/L 내지 약 2.6 g/L, 약 2.3 g/L 내지 약 2.5 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 3.3 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 3.2 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 3.1 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 2.9 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 2.8 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 2.7 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 2.6 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 3.3 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 3.2 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 3.1 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 2.9 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 2.8 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 2.7 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 3.3 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 3.2 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 3.1 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 2.9 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 2.8 g/L, 약

2.7 g/L 내지 약 3.3 g/L, 약 2.7 g/L 내지 약 3.2 g/L, 약 2.7 g/L 내지 약 3.1 g/L, 약 2.7 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 2.7 g/L 내지 약 2.9 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 3.3 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 3.2 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 3.1 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 2.9 g/L 내지 약 3.3 g/L, 약 2.9 g/L 내지 약 3.2 g/L, 약 2.9 g/L 내지 약 3.1 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 3.3 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 3.2 g/L, 또는 약 3.1 g/L 내지 약 3.3 g/L)의 폴록사머-188 농도를 선택하는 단계를 포함한다.

[0106] 일부 실시형태에서, 본 방법은 기공 유형 및 기공 크기를 기반으로, 기공 유형이 드릴드 기공이고 기공 크기가 약 250 ㎛ 내지 약 750 ㎛(예, 약 250 ㎛ 내지 약 700 ㎛, 약 250 ㎛ 내지 약 650 ㎛, 약 250 ㎛ 내지 약 600 ㎛, 약 250 ㎛ 내지 약 550 ㎛, 약 250 ㎛ 내지 약 500 ㎛, 약 250 ㎛ 내지 약 450 ㎛, 약 250 ㎛ 내지 약 400 ㎛, 약 250 ㎛ 내지 약 350 ㎛, 약 250 ㎛ 내지 약 300 ㎛, 약 300 ㎛ 내지 약 750 ㎛, 약 300 ㎛ 내지 약 700 ㎛, 약 300 ㎛ 내지 약 650 ㎛, 약 300 ㎛ 내지 약 600 ㎛, 약 300 ㎛ 내지 약 550 ㎛, 약 300 ㎛ 내지 약 500 ㎛, 약 300 ㎛ 내지 약 450 ㎛, 약 300 ㎛ 내지 약 400 ㎛, 약 300 ㎛ 내지 약 350 ㎛, 약 350 ㎛ 내지 약 750 ㎛, 약 350 ㎛ 내지 약 700 ㎛, 약 350 ㎛ 내지 약 650 ㎛, 약 350 ㎛ 내지 약 600 ㎛, 약 350 ㎛ 내지 약 550 ㎛, 약 350 ㎛ 내지 약 500 ㎛, 약 350 ㎛ 내지 약 450 ㎛, 약 350 ㎛ 내지 약 400 ㎛, 약 400 ㎛ 내지 약 750 ㎛, 약 400 ㎛ 내지 약 700 ㎛, 약 400 ㎛ 내지 약 650 ㎛, 약 400 ㎛ 내지 약 600 ㎛, 약 400 ㎛ 내지 약 550 ㎛, 약 400 ㎛ 내지 약 500 ㎛, 약 400 ㎛ 내지 약 450 ㎛, 약 450 ㎛ 내지 약 750 ㎛, 약 450 ㎛ 내지 약 700 ㎛, 약 450 ㎛ 내지 약 650 ㎛, 약 450 ㎛ 내지 약 600 ㎛, 약 450 ㎛ 내지 약 550 ㎛, 약 450 ㎛ 내지 약 500 ㎛, 약 500 ㎛ 내지 약 750 ㎛, 약 500 ㎛ 내지 약 700 ㎛, 약 500 ㎛ 내지 약 650 ㎛, 약 500 ㎛ 내지 약 600 ㎛, 약 500 ㎛ 내지 약 550 ㎛, 약 550 ㎛ 내지 약 750 ㎛, 약 550 ㎛ 내지 약 700 ㎛, 약 550 ㎛ 내지 약 650 ㎛, 약 550 ㎛ 내지 약 600 ㎛, 약 600 ㎛ 내지 약 750 ㎛, 약 600 ㎛ 내지 약 700 ㎛, 약 600 ㎛ 내지 약 650 ㎛, 약 650 ㎛ 내지 약 750 ㎛, 약 650 ㎛ 내지 약 700 ㎛, 또는 약 700 ㎛ 내지 750 ㎛)일 때, 약 3.3 g/L 내지 약 4.3 g/L(예, 약 3.3 g/L 내지 약 4.2 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 4.1 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 3.9 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 3.8 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 3.7 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 3.6 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 3.5 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 4.3 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 4.2 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 4.1 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 3.9 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 3.8 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 3.7 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 3.6 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 4.3 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 4.2 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 4.1 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 3.9 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 3.8 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 3.7 g/L, 약 3.6 g/L 내지 약 4.3 g/L, 약 3.6 g/L 내지 약 4.2 g/L, 약 3.6 g/L 내지 약 4.1 g/L, 약 3.6 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 3.6 g/L 내지 약 3.9 g/L, 약 3.6 g/L 내지 약 3.8 g/L, 약 3.7 g/L 내지 약 4.3 g/L, 약 3.7 g/L 내지 약 4.2 g/L, 약 3.7 g/L 내지 약 4.1 g/L, 약 3.7 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 3.7 g/L 내지 약 3.9 g/L, 약 3.8 g/L 내지 약 4.3 g/L, 약 3.8 g/L 내지 약 4.2 g/L, 약 3.8 g/L 내지 약 4.1 g/L, 약 3.8 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 3.9 g/L 내지 약 4.3 g/L, 약 3.9 g/L 내지 약 4.2 g/L, 약 3.9 g/L 내지 약 4.1 g/L, 약 4.0 g/L 내지 약 4.3 g/L, 약 4.0 g/L 내지 약 4.2 g/L, 또는 약 4.1 g/L 내지 약 4.3 g/L)의 폴록사머-188 농도를 선택하는 단계를 포함한다.

[0107] 본 방법은 예를 들어 기공 유형 및 기공 크기를 기반으로, 기공 유형이 드릴드 기공이고 기공 크기가 약 1 ㎛ 내지 약 250 ㎛(예, 약 1 ㎛ 내지 약 200 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 100 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 50 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 25 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 200 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 100 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 50 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 25 ㎛, 약 25 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 25 ㎛ 내지 약 200 ㎛, 약 25 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 25 ㎛ 내지 약 100 ㎛, 약 25 ㎛ 내지 약 50 ㎛, 약 50 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 50 ㎛ 내지 약 200 ㎛, 약 50 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 50 ㎛ 내지 약 100 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 200 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 150 ㎛ 내지 약 250 ㎛, 약 150 ㎛ 내지 약 200 ㎛, 또는 약 200 ㎛ 내지 약 250 ㎛)일 때, 약 4.3 g/L 초과의 농도(예, 약 4.4 g/L 초과의 농도, 약 4.5 g/L 초과의 농도, 약 4.6 g/L 초과의 농도, 약 4.7 g/L 초과의 농도, 약 4.8 g/L 초과의 농도, 약 4.9 g/L 초과의 농도, 약 5.0 g/L 초과의 농도, 약 5.1 g/L 초과의 농도, 약 5.2 g/L 초과의 농도, 약 5.3 g/L 초과의 농도, 약 5.4 g/L 초과의 농도, 약 5.5 g/L 초과의 농도, 약 5.6 g/L 초과의 농도, 약 5.7 g/L 초과의 농도, 약 5.8 g/L 초과의 농도, 약 5.9 g/L 초과의 농도, 약 6.0 g/L 초과의 농도, 약 6.1 g/L 초과의 농도, 약 6.2 g/L 초과의 농도, 약 6.3 g/L 초과의 농도, 약 6.4 g/L 초과의 농도, 약 6.5 g/L 초과의 농도, 약 6.6 g/L 초과의 농도, 약 6.7 g/L 초과의 농도, 약 6.8 g/L 초과의 농도, 약 6.9 g/L 초과의 농도, 약 7.0 g/L 초과의 농도, 약 7.1 g/L 초과의 농도, 약 7.2 g/L 초과의 농도, 약 7.3 g/L 초과의 농도, 약 7.4 g/L 초과의 농도, 약 7.5 g/L 초과의 농도, 약 7.6 g/L 초과의 농도, 약 7.7 g/L 초과의 농도, 약 7.8 g/L 초과의 농도, 약 7.9 g/L 초과의 농도, 약 8.0 g/L 초과의 농도, 약 8.1 g/L 초과의 농도, 약 8.2 g/L 초과의 농도, 약 8.2 g/L

초과의 농도, 약 8.3 g/L 초과의 농도, 약 8.4 g/L 초과의 농도, 약 8.5 g/L 초과의 농도, 약 8.6 g/L 초과의 농도, 약 8.7 g/L 초과의 농도, 약 8.8 g/L 초과의 농도, 약 8.9 g/L 초과의 농도, 약 9.0 g/L 초과의 농도, 약 9.1 g/L 초과의 농도, 약 9.2 g/L 초과의 농도, 약 9.3 g/L 초과의 농도, 약 9.4 g/L 초과의 농도, 약 9.5 g/L 초과의 농도, 약 9.6 g/L 초과의 농도, 약 9.7 g/L 초과의 농도, 약 9.8 g/L 초과의 농도, 약 9.9 g/L 초과의 농도 또는 약 10.0 g/L 초과의 농도)에서 폴록사머-188 농도를 선택하는 단계를 포함할 수 있다.

[0108] 일부 예에서, 본 방법은 예를 들어 기공 유형 및 기공 크기를 기반으로, 기공 유형이 드릴드 기공이고 기공 크기가 약 160 ㎛ 내지 약 190 ㎛(예, 약 160 ㎛ 내지 약 185 ㎛, 약 160 ㎛ 내지 약 180 ㎛, 약 160 ㎛ 내지 약 175 ㎛, 약 160 ㎛ 내지 약 170 ㎛, 약 160 ㎛ 내지 약 165 ㎛, 약 165 ㎛ 내지 약 190 ㎛, 약 165 ㎛ 내지 약 185 ㎛, 약 165 ㎛ 내지 약 180 ㎛, 약 165 ㎛ 내지 약 175 ㎛, 약 165 ㎛ 내지 약 170 ㎛, 약 170 ㎛ 내지 약 190 ㎛, 약 170 ㎛ 내지 약 185 ㎛, 약 170 ㎛ 내지 약 180 ㎛, 약 170 ㎛ 내지 약 175 ㎛, 약 175 ㎛ 내지 약 190 ㎛, 약 175 ㎛ 내지 약 185 ㎛, 약 175 ㎛ 내지 약 180 ㎛, 약 180 ㎛ 내지 약 190 ㎛, 약 180 ㎛ 내지 약 185 ㎛, 또는 약 185 ㎛ 내지 약 190 ㎛)일 때, 4.3 g/L 초과의 농도(예, 약 4.4 g/L 초과의 농도, 약 4.5 g/L 초과의 농도, 약 4.6 g/L 초과의 농도, 약 4.7 g/L 초과의 농도, 약 4.8 g/L 초과의 농도, 약 4.9 g/L 초과의 농도, 약 5.0 g/L 초과의 농도, 약 5.1 g/L 초과의 농도, 약 5.2 g/L 초과의 농도, 약 5.3 g/L 초과의 농도, 약 5.4 g/L 초과의 농도, 약 5.5 g/L 초과의 농도, 약 5.6 g/L 초과의 농도, 약 5.7 g/L 초과의 농도, 약 5.8 g/L 초과의 농도, 약 5.9 g/L 초과의 농도, 약 6.0 g/L 초과의 농도, 약 6.1 g/L 초과의 농도, 약 6.2 g/L 초과의 농도, 약 6.3 g/L 초과의 농도, 약 6.4 g/L 초과의 농도, 약 6.5 g/L 초과의 농도, 약 6.6 g/L 초과의 농도, 약 6.7 g/L 초과의 농도, 약 6.8 g/L 초과의 농도, 약 6.9 g/L 초과의 농도, 약 7.0 g/L 초과의 농도, 약 7.1 g/L 초과의 농도, 약 7.2 g/L 초과의 농도, 약 7.3 g/L 초과의 농도, 약 7.4 g/L 초과의 농도, 약 7.5 g/L 초과의 농도, 약 7.6 g/L 초과의 농도, 약 7.7 g/L 초과의 농도, 약 7.8 g/L 초과의 농도, 약 7.9 g/L 초과의 농도, 약 8.0 g/L 초과의 농도, 약 8.1 g/L 초과의 농도, 약 8.2 g/L 초과의 농도, 약 8.2 g/L 초과의 농도, 약 8.3 g/L 초과의 농도, 약 8.4 g/L 초과의 농도, 약 8.5 g/L 초과의 농도, 약 8.6 g/L 초과의 농도, 약 8.7 g/L 초과의 농도, 약 8.8 g/L 초과의 농도, 약 8.9 g/L 초과의 농도, 약 9.0 g/L 초과의 농도, 약 9.1 g/L 초과의 농도, 약 9.2 g/L 초과의 농도, 약 9.3 g/L 초과의 농도, 약 9.4 g/L 초과의 농도, 약 9.5 g/L 초과의 농도, 약 9.6 g/L 초과의 농도, 약 9.7 g/L 초과의 농도, 약 9.8 g/L 초과의 농도, 약 9.9 g/L 초과의 농도 또는 약 10.0 g/L 초과의 농도)에서 폴록사머-188을 선택하는 단계를 포함한다.

[0109] 일부 실시형태에서, 본 방법은 기공 유형 및 기공 크기를 기반으로, 기공 유형이 신터드 기공이고 기공 크기가 150 ㎛ 초과(예, 155 ㎛ 초과, 160 ㎛ 초과, 165 ㎛ 초과, 170 ㎛ 초과, 175 ㎛ 초과, 약 180 ㎛ 초과, 185 ㎛ 초과, 약 190 ㎛ 초과, 약 195 ㎛ 초과, 약 200 ㎛ 초과, 약 205 ㎛ 초과, 약 210 ㎛ 초과, 약 215 ㎛ 초과, 약 220 ㎛ 초과, 약 225 ㎛ 초과, 약 230 ㎛ 초과, 약 235 ㎛ 초과, 약 240 ㎛ 초과, 약 245 ㎛ 초과, 약 250 ㎛ 초과, 약 255 ㎛ 초과, 약 260 ㎛ 초과, 약 265 ㎛ 초과, 약 270 ㎛ 초과, 약 275 ㎛ 초과, 약 280 ㎛ 초과, 약 290 ㎛ 초과, 약 300 ㎛ 초과, 약 350 ㎛ 초과, 약 400 ㎛ 초과, 약 450 ㎛ 초과 또는 약 500 ㎛ 초과)일 때, 약 1.8 g/L 내지 약 3.3 g/L(예, 약 1.8 g/L 내지 약 3.2 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 3.1 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 2.9 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 2.8 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 2.7 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 2.6 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 2.5 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 2.4 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 2.3 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 2.2 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 2.1 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 2.0 g/L, 약 1.9 g/L 내지 약 3.3 g/L, 약 1.9 g/L 내지 약 3.2 g/L, 약 1.9 g/L 내지 약 3.1 g/L, 약 1.9 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 1.9 g/L 내지 약 2.9 g/L, 약 1.9 g/L 내지 약 2.8 g/L, 약 1.9 g/L 내지 약 2.7 g/L, 약 1.9 g/L 내지 약 2.6 g/L, 약 1.9 g/L 내지 약 2.5 g/L, 약 1.9 g/L 내지 약 2.4 g/L, 약 1.9 g/L 내지 약 2.3 g/L, 약 1.9 g/L 내지 약 2.2 g/L, 약 1.9 g/L 내지 약 2.1 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 3.3 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 3.2 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 3.1 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 2.9 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 2.8 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 2.7 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 2.6 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 2.5 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 2.4 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 2.3 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 2.2 g/L, 약 2.1 g/L 내지 약 3.3 g/L, 약 2.1 g/L 내지 약 3.2 g/L, 약 2.1 g/L 내지 약 3.1 g/L, 약 2.1 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 2.1 g/L 내지 약 2.9 g/L, 약 2.1 g/L 내지 약 2.8 g/L, 약 2.1 g/L 내지 약 2.7 g/L, 약 2.1 g/L 내지 약 2.6 g/L, 약 2.1 g/L 내지 약 2.5 g/L, 약 2.1 g/L 내지 약 2.4 g/L, 약 2.1 g/L 내지 약 2.3 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 3.3 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 3.2 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 3.1 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 2.9 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 2.8 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 2.7 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 2.6 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 2.5 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 2.4 g/L, 약 2.3 g/L 내지 약 3.3 g/L, 약 2.3 g/L 내지 약 3.2 g/L, 약 2.3 g/L 내지 약 3.1 g/L, 약 2.3 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 2.3 g/L 내지 약 2.9 g/L, 약 2.3 g/L 내

지 약 2.8 g/L, 약 2.3 g/L 내지 약 2.7 g/L, 약 2.3 g/L 내지 약 2.6 g/L, 약 2.3 g/L 내지 약 2.5 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 3.3 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 3.2 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 3.1 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 2.9 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 2.8 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 2.7 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 2.6 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 3.3 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 3.2 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 3.1 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 2.9 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 2.8 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 2.7 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 3.3 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 3.2 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 3.1 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 2.9 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 2.8 g/L, 약 2.7 g/L 내지 약 3.3 g/L, 약 2.7 g/L 내지 약 3.2 g/L, 약 2.7 g/L 내지 약 3.1 g/L, 약 2.7 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 2.7 g/L 내지 약 2.9 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 3.3 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 3.2 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 3.1 g/L, 약 2.8 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 2.9 g/L 내지 약 3.3 g/L, 약 2.9 g/L 내지 약 3.2 g/L, 약 2.9 g/L 내지 약 3.1 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 3.3 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 3.2 g/L, 또는 약 3.1 g/L 내지 약 3.3 g/L)의 농도에서 폴록사머-188을 선택하는 단계를 포함한다.

[0110] 본 방법은 예를 들어, 기공 유형 및 기공 크기를 기반으로, 기공 유형이 신터드 기공이고 기공 크기가 약 80 ㎛ 내지 약 150 ㎛(예, 약 80 ㎛ 내지 약 145 ㎛, 약 80 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 80 ㎛ 내지 약 135 ㎛, 약 80 ㎛ 내지 약 130 ㎛, 약 80 ㎛ 내지 약 125 ㎛, 약 80 ㎛ 내지 약 120 ㎛, 약 80 ㎛ 내지 약 115 ㎛, 약 80 ㎛ 내지 약 110 ㎛, 약 80 ㎛ 내지 약 105 ㎛, 약 80 ㎛ 내지 약 100 ㎛, 약 80 ㎛ 내지 약 95 ㎛, 약 80 ㎛ 내지 약 90 ㎛, 약 80 ㎛ 내지 약 85 ㎛, 약 85 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 85 ㎛ 내지 약 145 ㎛, 약 85 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 85 ㎛ 내지 약 135 ㎛, 약 85 ㎛ 내지 약 130 ㎛, 약 85 ㎛ 내지 약 125 ㎛, 약 85 ㎛ 내지 약 120 ㎛, 약 85 ㎛ 내지 약 115 ㎛, 약 85 ㎛ 내지 약 110 ㎛, 약 85 ㎛ 내지 약 105 ㎛, 약 85 ㎛ 내지 약 100 ㎛, 약 85 ㎛ 내지 약 95 ㎛, 약 85 ㎛ 내지 약 90 ㎛, 약 90 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 90 ㎛ 내지 약 145 ㎛, 약 90 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 90 ㎛ 내지 약 135 ㎛, 약 90 ㎛ 내지 약 130 ㎛, 약 90 ㎛ 내지 약 125 ㎛, 약 90 ㎛ 내지 약 120 ㎛, 약 90 ㎛ 내지 약 115 ㎛, 약 90 ㎛ 내지 약 110 ㎛, 약 90 ㎛ 내지 약 105 ㎛, 약 90 ㎛ 내지 약 100 ㎛, 약 90 ㎛ 내지 약 95 ㎛, 약 95 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 95 ㎛ 내지 약 145 ㎛, 약 95 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 95 ㎛ 내지 약 135 ㎛, 약 95 ㎛ 내지 약 130 ㎛, 약 95 ㎛ 내지 약 125 ㎛, 약 95 ㎛ 내지 약 120 ㎛, 약 95 ㎛ 내지 약 115 ㎛, 약 95 ㎛ 내지 약 110 ㎛, 약 95 ㎛ 내지 약 105 ㎛, 약 95 ㎛ 내지 약 100 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 145 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 135 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 130 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 125 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 120 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 115 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 110 ㎛, 약 100 ㎛ 내지 약 105 ㎛, 약 105 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 105 ㎛ 내지 약 145 ㎛, 약 105 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 105 ㎛ 내지 약 135 ㎛, 약 105 ㎛ 내지 약 130 ㎛, 약 105 ㎛ 내지 약 125 ㎛, 약 105 ㎛ 내지 약 120 ㎛, 약 105 ㎛ 내지 약 115 ㎛, 약 105 ㎛ 내지 약 110 ㎛, 약 110 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 110 ㎛ 내지 약 145 ㎛, 약 110 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 110 ㎛ 내지 약 135 ㎛, 약 110 ㎛ 내지 약 130 ㎛, 약 110 ㎛ 내지 약 125 ㎛, 약 110 ㎛ 내지 약 120 ㎛, 약 110 ㎛ 내지 약 115 ㎛, 약 115 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 115 ㎛ 내지 약 145 ㎛, 약 115 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 115 ㎛ 내지 약 135 ㎛, 약 115 ㎛ 내지 약 130 ㎛, 약 115 ㎛ 내지 약 125 ㎛, 약 115 ㎛ 내지 약 120 ㎛, 약 120 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 120 ㎛ 내지 약 145 ㎛, 약 120 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 120 ㎛ 내지 약 135 ㎛, 약 120 ㎛ 내지 약 130 ㎛, 약 120 ㎛ 내지 약 125 ㎛, 약 125 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 125 ㎛ 내지 약 145 ㎛, 약 125 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 125 ㎛ 내지 약 135 ㎛, 약 125 ㎛ 내지 약 130 ㎛, 약 130 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 130 ㎛ 내지 약 145 ㎛, 약 130 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 130 ㎛ 내지 약 135 ㎛, 약 135 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 135 ㎛ 내지 약 145 ㎛, 약 135 ㎛ 내지 약 140 ㎛, 약 140 ㎛ 내지 약 150 ㎛, 약 140 ㎛ 내지 약 145 ㎛, 또는 약 145 ㎛ 내지 약 150 ㎛)일 때, 약 3.3 g/L 내지 약 4.3 g/L(예, 약 3.3 g/L 내지 약 4.2 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 4.1 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 3.9 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 3.8 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 3.7 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 3.6 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 3.5 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 4.3 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 4.2 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 4.1 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 3.9 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 3.8 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 3.7 g/L, 약 3.4 g/L 내지 약 3.6 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 4.3 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 4.2 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 4.1 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 3.9 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 3.8 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 3.7 g/L, 약 3.6 g/L 내지 약 4.3 g/L, 약 3.6 g/L 내지 약 4.2 g/L, 약 3.6 g/L 내지 약 4.1 g/L, 약 3.6 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 3.6 g/L 내지 약 3.9 g/L, 약 3.6 g/L 내지 약 3.8 g/L, 약 3.7 g/L 내지 약 4.3 g/L, 약 3.7 g/L 내지 약 4.2 g/L, 약 3.7 g/L 내지 약 4.1 g/L, 약 3.7 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 3.7 g/L 내지 약 3.9 g/L, 약 3.8 g/L 내지 약 4.3 g/L, 약 3.8 g/L 내지 약 4.2 g/L, 약 3.8 g/L 내지 약 4.1 g/L, 약 3.8 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 3.9 g/L 내지 약 4.3 g/L, 약 3.9 g/L 내지 약 4.2

g/L, 약 3.9 g/L 내지 약 4.1 g/L, 약 4.0 g/L 내지 약 4.3 g/L, 약 4.0 g/L 내지 약 4.2 g/L, 또는 약 4.1 g/L 내지 약 4.3 g/L)의 농도에서 폴록사머-188을 선택하는 단계를 포함할 수 있다.

[0111] 본 방법은 예를 들어, 기공 유형 및 기공 크기를 기반으로, 기공 유형이 신터드 기공이고 기공 크기가 약 1 ㎛ 내지 약 80 ㎛(예, 약 1 ㎛ 내지 약 50 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 25 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 10 ㎛, 약 1 ㎛ 내지 약 5 ㎛, 약 5 ㎛ 내지 약 80 ㎛, 약 5 ㎛ 내지 약 50 ㎛, 약 5 ㎛ 내지 약 25 ㎛, 약 5 ㎛ 내지 약 10 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 80 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 50 ㎛, 약 10 ㎛ 내지 약 25 ㎛, 약 25 ㎛ 내지 약 80 ㎛, 약 25 ㎛ 내지 약 50 ㎛, 또는 약 50 ㎛ 내지 약 80 ㎛)일 때, 약 4.5 g/L의 농도 또는 4.5 g/L 초과의 농도에서(예, 약 4.6 g/L의 농도 또는 4.6 g/L 초과의 농도에서, 약 4.7 g/L의 농도 또는 4.7 g/ 초과의 농도에서, 약 4.8 g/L의 농도 또는 4.8 g/ 초과의 농도에서, 약 4.9 g/L의 농도 또는 4.9 g/ 초과의 농도에서, 약 5.0 g/L의 농도 또는 5.0 g/ 초과의 농도에서, 약 5.1 g/L의 농도 또는 5.1 g/ 초과의 농도에서, 약 5.2 g/L의 농도 또는 5.2 g/ 초과의 농도에서, 약 5.3 g/L의 농도 또는 5.3 g/ 초과의 농도에서, 약 5.4 g/L의 농도 또는 5.4 g/ 초과의 농도에서, 약 5.5 g/L의 농도 또는 5.5 g/ 초과의 농도에서, 약 5.6 g/L의 농도 또는 5.6 g/ 초과의 농도에서, 약 5.7 g/L의 농도 또는 5.7 g/ 초과의 농도에서, 약 5.8 g/L의 농도 또는 5.8 g/ 초과의 농도에서, 약 6.0 g/L의 농도 또는 6.0 g/ 초과의 농도에서, 약 6.1 g/L의 농도 또는 6.1 g/ 초과의 농도에서, 약 6.2 g/L의 농도 또는 6.2 g/ 초과의 농도에서, 약 6.3 g/L의 농도 또는 6.3 g/ 초과의 농도에서, 약 6.4 g/L의 농도 또는 6.4 g/ 초과의 농도에서, 약 6.5 g/L의 농도 또는 6.5 g/ 초과의 농도에서, 약 6.6 g/L의 농도 또는 6.6 g/ 초과의 농도에서, 약 6.7 g/L의 농도 또는 6.7 g/ 초과의 농도에서, 약 6.8 g/L의 농도 또는 6.8 g/ 초과의 농도에서, 약 6.9 g/L의 농도 또는 6.9 g/ 초과의 농도에서, 약 7.0 g/L의 농도 또는 7.0 g/ 초과의 농도에서, 약 7.1 g/L의 농도 또는 7.1 g/ 초과의 농도에서, 약 7.2 g/L의 농도 또는 7.2 g/ 초과의 농도에서, 약 7.3 g/L의 농도 또는 7.3 g/ 초과의 농도에서, 약 7.4 g/L의 농도 또는 7.4 g/ 초과의 농도에서, 약 7.5 g/L의 농도 또는 7.5 g/ 초과의 농도에서, 약 7.6 g/L의 농도 또는 7.6 g/ 초과의 농도에서, 약 7.7 g/L의 농도 또는 7.7 g/ 초과의 농도에서, 약 7.8 g/L의 농도 또는 7.8 g/ 초과의 농도에서, 약 7.9 g/L의 농도 또는 7.9 g/ 초과의 농도에서, 약 8.0 g/L의 농도 또는 8.0 g/ 초과의 농도에서, 약 8.1 g/L의 농도 또는 8.1 g/ 초과의 농도에서, 약 8.2 g/L의 농도 또는 8.2 g/ 초과의 농도에서, 약 8.3 g/L의 농도 또는 8.3 g/ 초과의 농도에서, 약 8.4 g/L의 농도 또는 8.4 g/ 초과의 농도에서, 약 8.5 g/L의 농도 또는 8.5 g/ 초과의 농도에서, 약 8.6 g/L의 농도 또는 8.6 g/ 초과의 농도에서, 약 8.7 g/L의 농도 또는 8.7 g/ 초과의 농도에서, 약 8.8 g/L의 농도 또는 8.8 g/ 초과의 농도에서, 약 8.9 g/L의 농도 또는 8.9 g/ 초과의 농도에서, 약 9.0 g/L의 농도 또는 9.0 g/ 초과의 농도에서, 약 9.1 g/L의 농도 또는 9.1 g/ 초과의 농도에서, 약 9.2 g/L의 농도 또는 9.2 g/ 초과의 농도에서, 약 9.3 g/L의 농도 또는 9.3 g/ 초과의 농도에서, 약 9.4 g/L의 농도 또는 9.4 g/ 초과의 농도에서, 약 9.5 g/L의 농도 또는 9.5 g/ 초과의 농도에서, 약 9.6 g/L의 농도 또는 9.6 g/ 초과의 농도에서, 약 9.7 g/L의 농도 또는 9.7 g/ 초과의 농도에서, 약 9.8 g/L의 농도 또는 9.8 g/ 초과의 농도에서, 약 9.9 g/L의 농도 또는 9.9 g/L 초과의 농도에서, 또는 약 10.0 g/L의 농도 또는 10.0 g/L 초과의 농도에서) 폴록사머-188을 선택하는 단계를 포함할 수 있다.

[0112] 배양이 관류 배양인 경우, 제2 액체 배지는 선택된 폴록사머-188 농도를 포함할 수 있다.

[0113] **생존가능한 세포 밀도를 기반으로 한 폴록사머-188 농도의 증가**

[0114] 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태는 배지 내 생존가능한 세포 밀도를 기반으로 시간 경과에 따라 배지 내 폴록사머-188 농도를 증가시키는 단계를 포함한다. 예를 들어, 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법은, 배지 내 생존가능한 세포 밀도가 약 20 x 10^6개 세포/mL 내지 약 60 x 10^6개 세포/mL(예, 약 20 x 10^6개 세포/mL 내지 약 58 x 10^6개 세포/mL, 약 20 x 10^6개 세포/mL 내지 약 56 x 10^6개 세포/mL, 약 20 x 10^6개 세포/mL 내지 약 54 x 10^6개 세포/mL, 약 20 x 10^6개 세포/mL 내지 약 52 x 10^6개 세포/mL, 약 20 x 10^6개 세포/mL 내지 약 50 x 10^6개 세포/mL, 약 20 x 10^6개 세포/mL 내지 약 48 x 10^6개 세포/mL, 약 20 x 10^6개 세포/mL 내지 약 46 x 10^6개 세포/mL, 약 20 x 10^6개 세포/mL 내지 약 44 x 10^6개 세포/mL, 약 20 x 10^6개 세포/mL 내지 약 42 x 10^6개 세포/mL, 약 20 x 10^6개 세포/mL 내지 약 40 x 10^6개 세포/mL, 약 20 x 10^6개 세포/mL 내지 약 38 x 10^6개 세포/mL, 약 20 x 10^6개 세포/mL 내지 약 36 x 10^6개 세포/mL, 약 20 x 10^6개 세포/mL 내지 약 34 x 10^6개 세포/mL, 약 20 x 10^6개 세포/mL 내지 약 32 x 10^6개 세포/mL, 약 20 x 10^6개 세포/mL 내지 약 30 x 10^6개 세포/mL, 약 20 x 10^6개 세포/mL 내지 약 28 x 10^6개 세포/mL, 약 20 x 10^6개 세포/mL 내지 약 26 x 10^6개 세포

/mL, 약 20 x 10^6개 세포/mL 내지 약 24 x 10^6개 세포/mL, 약 20 x 10^6개 세포/mL 내지 약 22 x 10^6개 세포/mL, 약 22 x 10^6개 세포/mL 내지 약 60 x 10^6개 세포/mL, 약 22 x 10^6개 세포/mL 내지 약 58 x 10^6개 세포/mL, 약 22 x 10^6개 세포/mL 내지 약 56 x 10^6개 세포/mL, 약 22 x 10^6개 세포/mL 내지 약 54 x 10^6개 세포/mL, 약 22 x 10^6개 세포/mL 내지 약 52 x 10^6개 세포/mL, 약 22 x 10^6개 세포/mL 내지 약 50 x 10^6개 세포/mL, 약 22 x 10^6개 세포/mL 내지 약 48 x 10^6개 세포/mL, 약 22 x 10^6개 세포/mL 내지 약 46 x 10^6개 세포/mL, 약 22 x 10^6개 세포/mL 내지 약 44 x 10^6개 세포/mL, 약 22 x 10^6개 세포/mL 내지 약 42 x 10^6개 세포/mL, 약 22 x 10^6개 세포/mL 내지 약 40 x 10^6개 세포/mL, 약 22 x 10^6개 세포/mL 내지 약 38 x 10^6개 세포/mL, 약 22 x 10^6개 세포/mL 내지 약 36 x 10^6개 세포/mL, 약 22 x 10^6개 세포/mL 내지 약 34 x 10^6개 세포/mL, 약 22 x 10^6개 세포/mL 내지 약 32 x 10^6개 세포/mL, 약 22 x 10^6개 세포/mL 내지 약 30 x 10^6개 세포/mL, 약 22 x 10^6개 세포/mL 내지 약 28 x 10^6개 세포/mL, 약 22 x 10^6개 세포/mL 내지 약 26 x 10^6개 세포/mL, 약 22 x 10^6개 세포/mL 내지 약 24 x 10^6개 세포/mL, 약 24 x 10^6개 세포/mL 내지 약 60 x 10^6개 세포/mL, 약 24 x 10^6개 세포/mL 내지 약 58 x 10^6개 세포/mL, 약 24 x 10^6개 세포/mL 내지 약 56 x 10^6개 세포/mL, 약 24 x 10^6개 세포/mL 내지 약 54 x 10^6개 세포/mL, 약 24 x 10^6개 세포/mL 내지 약 52 x 10^6개 세포/mL, 약 24 x 10^6개 세포/mL 내지 약 50 x 10^6개 세포/mL, 약 24 x 10^6개 세포/mL 내지 약 48 x 10^6개 세포/mL, 약 24 x 10^6개 세포/mL 내지 약 46 x 10^6개 세포/mL, 약 24 x 10^6개 세포/mL 내지 약 44 x 10^6개 세포/mL, 약 24 x 10^6개 세포/mL 내지 약 42 x 10^6개 세포/mL, 약 24 x 10^6개 세포/mL 내지 약 40 x 10^6개 세포/mL, 약 24 x 10^6개 세포/mL 내지 약 38 x 10^6개 세포/mL, 약 24 x 10^6개 세포/mL 내지 약 36 x 10^6개 세포/mL, 약 24 x 10^6개 세포/mL 내지 약 34 x 10^6개 세포/mL, 약 24 x 10^6개 세포/mL 내지 약 32 x 10^6개 세포/mL, 약 24 x 10^6개 세포/mL 내지 약 30 x 10^6개 세포/mL, 약 24 x 10^6개 세포/mL 내지 약 28 x 10^6개 세포/mL, 약 24 x 10^6개 세포/mL 내지 약 26 x 10^6개 세포/mL, 약 26 x 10^6개 세포/mL 내지 약 60 x 10^6개 세포/mL, 약 26 x 10^6개 세포/mL 내지 약 58 x 10^6개 세포/mL, 약 26 x 10^6개 세포/mL 내지 약 56 x 10^6개 세포/mL, 약 26 x 10^6개 세포/mL 내지 약 54 x 10^6개 세포/mL, 약 26 x 10^6개 세포/mL 내지 약 52 x 10^6개 세포/mL, 약 26 x 10^6개 세포/mL 내지 약 50 x 10^6개 세포/mL, 약 26 x 10^6개 세포/mL 내지 약 48 x 10^6개 세포/mL, 약 26 x 10^6개 세포/mL 내지 약 46 x 10^6개 세포/mL, 약 26 x 10^6개 세포/mL 내지 약 44 x 10^6개 세포/mL, 약 26 x 10^6개 세포/mL 내지 약 42 x 10^6개 세포/mL, 약 26 x 10^6개 세포/mL 내지 약 40 x 10^6개 세포/mL, 약 26 x 10^6개 세포/mL 내지 약 38 x 10^6개 세포/mL, 약 26 x 10^6개 세포/mL 내지 약 36 x 10^6개 세포/mL, 약 26 x 10^6개 세포/mL 내지 약 34 x 10^6개 세포/mL, 약 26 x 10^6개 세포/mL 내지 약 32 x 10^6개 세포/mL, 약 26 x 10^6개 세포/mL 내지 약 30 x 10^6개 세포/mL, 약 26 x 10^6개 세포/mL 내지 약 28 x 10^6개 세포/mL, 약 28 x 10^6개 세포/mL 내지 약 60 x 10^6개 세포/mL, 약 28 x 10^6개 세포/mL 내지 약 58 x 10^6개 세포/mL, 약 28 x 10^6개 세포/mL 내지 약 56 x 10^6개 세포/mL, 약 28 x 10^6개 세포/mL 내지 약 54 x 10^6개 세포/mL, 약 28 x 10^6개 세포/mL 내지 약 52 x 10^6개 세포/mL, 약 28 x 10^6개 세포/mL 내지 약 50 x 10^6개 세포/mL, 약 28 x 10^6개 세포/mL 내지 약 48 x 10^6개 세포/mL, 약 28 x 10^6개 세포/mL 내지 약 46 x 10^6개 세포/mL, 약 28 x 10^6개 세포/mL 내지 약 44 x 10^6개 세포/mL, 약 28 x 10^6개 세포/mL 내지 약 42 x 10^6개 세포/mL, 약 28 x 10^6개 세포/mL 내지 약 40 x 10^6개 세포/mL, 약 28 x 10^6개 세포/mL 내지 약 38 x 10^6개 세포/mL, 약 28 x 10^6개 세포/mL 내지 약 36 x 10^6개 세포/mL, 약 28 x 10^6개 세포/mL 내지 약 34 x 10^6개 세포/mL, 약 28 x 10^6개 세포/mL 내지 약 32 x 10^6개 세포/mL, 약 28 x 10^6개 세포/mL 내지 약 30 x 10^6개 세포/mL, 약 30 x 10^6개 세포/mL 내지 약 60 x 10^6개 세포/mL, 약 30 x 10^6개 세포/mL 내지 약 58 x 10^6개 세포/mL, 약 30 x 10^6개 세포/mL 내지 약 56 x 10^6개 세포/mL, 약 30 x 10^6개 세포/mL 내지 약 54 x 10^6개 세포/mL, 약 30 x 10^6개 세포/mL 내지 약 52 x 10^6개 세포/mL, 약 30 x 10^6개 세포/mL 내지 약 50

x 10^6개 세포/mL, 약 30 x 10^6개 세포/mL 내지 약 48 x 10^6개 세포/mL, 약 30 x 10^6개 세포/mL 내지 약 46 x 10^6개 세포/mL, 약 30 x 10^6개 세포/mL 내지 약 44 x 10^6개 세포/mL, 약 30 x 10^6개 세포/mL 내지 약 42 x 10^6개 세포/mL, 약 30 x 10^6개 세포/mL 내지 약 40 x 10^6개 세포/mL, 약 30 x 10^6개 세포/mL 내지 약 38 x 10^6개 세포/mL, 약 30 x 10^6개 세포/mL 내지 약 36 x 10^6개 세포/mL, 약 30 x 10^6개 세포/mL 내지 약 34 x 10^6개 세포/mL, 약 30 x 10^6개 세포/mL 내지 약 32 x 10^6개 세포/mL, 약 32 x 10^6개 세포/mL 내지 약 60 x 10^6개 세포/mL, 약 32 x 10^6개 세포/mL 내지 약 58 x 10^6개 세포/mL, 약 32 x 10^6개 세포/mL 내지 약 56 x 10^6개 세포/mL, 약 32 x 10^6개 세포/mL 내지 약 54 x 10^6개 세포/mL, 약 32 x 10^6개 세포/mL 내지 약 52 x 10^6개 세포/mL, 약 32 x 10^6개 세포/mL 내지 약 50 x 10^6개 세포/mL, 약 32 x 10^6개 세포/mL 내지 약 48 x 10^6개 세포/mL, 약 32 x 10^6개 세포/mL 내지 약 46 x 10^6개 세포/mL, 약 32 x 10^6개 세포/mL 내지 약 44 x 10^6개 세포/mL, 약 32 x 10^6개 세포/mL 내지 약 42 x 10^6개 세포/mL, 약 32 x 10^6개 세포/mL 내지 약 40 x 10^6개 세포/mL, 약 32 x 10^6개 세포/mL 내지 약 38 x 10^6개 세포/mL, 약 32 x 10^6개 세포/mL 내지 약 36 x 10^6개 세포/mL, 약 32 x 10^6개 세포/mL 내지 약 34 x 10^6개 세포/mL, 약 34 x 10^6개 세포/mL 내지 약 60 x 10^6개 세포/mL, 약 34 x 10^6개 세포/mL 내지 약 58 x 10^6개 세포/mL, 약 34 x 10^6개 세포/mL 내지 약 56 x 10^6개 세포/mL, 약 34 x 10^6개 세포/mL 내지 약 54 x 10^6개 세포/mL, 약 34 x 10^6개 세포/mL 내지 약 52 x 10^6개 세포/mL, 약 34 x 10^6개 세포/mL 내지 약 50 x 10^6개 세포/mL, 약 34 x 10^6개 세포/mL 내지 약 48 x 10^6개 세포/mL, 약 34 x 10^6개 세포/mL 내지 약 46 x 10^6개 세포/mL, 약 34 x 10^6개 세포/mL 내지 약 44 x 10^6개 세포/mL, 약 34 x 10^6개 세포/mL 내지 약 42 x 10^6개 세포/mL, 약 34 x 10^6개 세포/mL 내지 약 40 x 10^6개 세포/mL, 약 34 x 10^6개 세포/mL 내지 약 38 x 10^6개 세포/mL, 약 34 x 10^6개 세포/mL 내지 약 36 x 10^6개 세포/mL, 약 36 x 10^6개 세포/mL 내지 약 60 x 10^6개 세포/mL, 약 36 x 10^6개 세포/mL 내지 약 58 x 10^6개 세포/mL, 약 36 x 10^6개 세포/mL 내지 약 56 x 10^6개 세포/mL, 약 36 x 10^6개 세포/mL 내지 약 54 x 10^6개 세포/mL, 약 36 x 10^6개 세포/mL 내지 약 52 x 10^6개 세포/mL, 약 36 x 10^6개 세포/mL 내지 약 50 x 10^6개 세포/mL, 약 36 x 10^6개 세포/mL 내지 약 48 x 10^6개 세포/mL, 약 36 x 10^6개 세포/mL 내지 약 46 x 10^6개 세포/mL, 약 36 x 10^6개 세포/mL 내지 약 44 x 10^6개 세포/mL, 약 36 x 10^6개 세포/mL 내지 약 42 x 10^6개 세포/mL, 약 36 x 10^6개 세포/mL 내지 약 40 x 10^6개 세포/mL, 약 36 x 10^6개 세포/mL 내지 약 38 x 10^6개 세포/mL, 약 38 x 10^6개 세포/mL 내지 약 60 x 10^6개 세포/mL, 약 38 x 10^6개 세포/mL 내지 약 58 x 10^6개 세포/mL, 약 38 x 10^6개 세포/mL 내지 약 56 x 10^6개 세포/mL, 약 38 x 10^6개 세포/mL 내지 약 54 x 10^6개 세포/mL, 약 38 x 10^6개 세포/mL 내지 약 52 x 10^6개 세포/mL, 약 38 x 10^6개 세포/mL 내지 약 50 x 10^6개 세포/mL, 약 38 x 10^6개 세포/mL 내지 약 48 x 10^6개 세포/mL, 약 38 x 10^6개 세포/mL 내지 약 46 x 10^6개 세포/mL, 약 38 x 10^6개 세포/mL 내지 약 44 x 10^6개 세포/mL, 약 38 x 10^6개 세포/mL 내지 약 42 x 10^6개 세포/mL, 약 38 x 10^6개 세포/mL 내지 약 40 x 10^6개 세포/mL, 약 40 x 10^6개 세포/mL 내지 약 60 x 10^6개 세포/mL, 약 40 x 10^6개 세포/mL 내지 약 58 x 10^6개 세포/mL, 약 40 x 10^6개 세포/mL 내지 약 56 x 10^6개 세포/mL, 약 40 x 10^6개 세포/mL 내지 약 54 x 10^6개 세포/mL, 약 40 x 10^6개 세포/mL 내지 약 52 x 10^6개 세포/mL, 약 40 x 10^6개 세포/mL 내지 약 50 x 10^6개 세포/mL, 약 40 x 10^6개 세포/mL 내지 약 48 x 10^6개 세포/mL, 약 40 x 10^6개 세포/mL 내지 약 46 x 10^6개 세포/mL, 약 40 x 10^6개 세포/mL 내지 약 44 x 10^6개 세포/mL, 약 40 x 10^6개 세포/mL 내지 약 42 x 10^6개 세포/mL, 약 42 x 10^6개 세포/mL 내지 약 60 x 10^6개 세포/mL, 약 42 x 10^6개 세포/mL 내지 약 58 x 10^6개 세포/mL, 약 42 x 10^6개 세포/mL 내지 약 56 x 10^6개 세포/mL, 약 42 x 10^6개 세포/mL 내지 약 54 x 10^6개 세포/mL, 약 42 x 10^6개 세포/mL 내지 약 52 x 10^6개 세포/mL, 약 42 x 10^6개 세포/mL 내지 약 50 x 10^6개 세포/mL, 약 42 x 10^6개 세포/mL 내지 약 48 x 10^6개 세포/mL, 약 42 x 10^6개 세포/mL 내지 약 46 x 10^6개 세포/mL, 약 42 x 10^6개 세

포/mL 내지 약 44 x 10^6개 세포/mL, 약 44 x 10^6개 세포/mL 내지 약 60 x 10^6개 세포/mL, 약 44 x 10^6개 세포/mL 내지 약 58 x 10^6개 세포/mL, 약 44 x 10^6개 세포/mL 내지 약 56 x 10^6개 세포/mL, 약 44 x 10^6개 세포/mL 내지 약 54 x 10^6개 세포/mL, 약 44 x 10^6개 세포/mL 내지 약 52 x 10^6개 세포/mL, 약 44 x 10^6개 세포/mL 내지 약 50 x 10^6개 세포/mL, 약 44 x 10^6개 세포/mL 내지 약 48 x 10^6개 세포/mL, 약 44 x 10^6개 세포/mL 내지 약 46 x 10^6개 세포/mL, 약 46 x 10^6개 세포/mL 내지 약 60 x 10^6개 세포/mL, 약 46 x 10^6개 세포/mL 내지 약 58 x 10^6개 세포/mL, 약 46 x 10^6개 세포/mL 내지 약 56 x 10^6개 세포/mL, 약 46 x 10^6개 세포/mL 내지 약 54 x 10^6개 세포/mL, 약 46 x 10^6개 세포/mL 내지 약 52 x 10^6개 세포/mL, 약 46 x 10^6개 세포/mL 내지 약 50 x 10^6개 세포/mL, 약 46 x 10^6개 세포/mL 내지 약 48 x 10^6개 세포/mL, 약 48 x 10^6개 세포/mL 내지 약 60 x 10^6개 세포/mL, 약 48 x 10^6개 세포/mL 내지 약 58 x 10^6개 세포/mL, 약 48 x 10^6개 세포/mL 내지 약 56 x 10^6개 세포/mL, 약 48 x 10^6개 세포/mL 내지 약 54 x 10^6개 세포/mL, 약 48 x 10^6개 세포/mL 내지 약 52 x 10^6개 세포/mL, 약 48 x 10^6개 세포/mL 내지 약 50 x 10^6개 세포/mL, 약 50 x 10^6개 세포/mL 내지 약 60 x 10^6개 세포/mL, 약 50 x 10^6개 세포/mL 내지 약 58 x 10^6개 세포/mL, 약 50 x 10^6개 세포/mL 내지 약 56 x 10^6개 세포/mL, 약 50 x 10^6개 세포/mL 내지 약 54 x 10^6개 세포/mL, 약 50 x 10^6개 세포/mL 내지 약 52 x 10^6개 세포/mL, 약 52 x 10^6개 세포/mL 내지 약 60 x 10^6개 세포/mL, 약 52 x 10^6개 세포/mL 내지 약 58 x 10^6개 세포/mL, 약 52 x 10^6개 세포/mL 내지 약 56 x 10^6개 세포/mL, 약 52 x 10^6개 세포/mL 내지 약 54 x 10^6개 세포/mL, 약 54 x 10^6개 세포/mL 내지 약 60 x 10^6개 세포/mL, 약 54 x 10^6개 세포/mL 내지 약 58 x 10^6개 세포/mL, 약 54 x 10^6개 세포/mL 내지 약 56 x 10^6개 세포/mL, 약 56 x 10^6개 세포/mL 내지 약 60 x 10^6개 세포/mL, 약 56 x 10^6개 세포/mL 내지 약 58 x 10^6개 세포/mL, 또는 약 58 x 10^6개 세포/mL 내지 약 60 x 10^6개 세포/mL)일 때, 배지 내 폴록사머-188 농도를 1.8 g/L 초과(예, 약 1.8 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 2.9 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 2.8 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 2.7 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 2.5 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 2.4 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 2.3 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 2.2 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 2.1 g/L, 약 1.8 g/L 내지 약 2.0 g/L, 약 1.9 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 1.9 g/L 내지 약 2.9 g/L, 약 1.9 g/L 내지 약 2.8 g/L, 약 1.9 g/L 내지 약 2.7 g/L, 약 1.9 g/L 내지 약 2.6 g/L, 약 1.9 g/L 내지 약 2.5 g/L, 약 1.9 g/L 내지 약 2.4 g/L, 약 1.9 g/L 내지 약 2.3 g/L, 약 1.9 g/L 내지 약 2.2 g/L, 약 1.9 g/L 내지 약 2.1 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 2.9 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 2.8 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 2.7 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 2.6 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 2.5 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 2.4 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 2.3 g/L, 약 2.0 g/L 내지 약 2.2 g/L, 약 2.1 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 2.1 g/L 내지 약 2.9 g/L, 약 2.1 g/L 내지 약 2.8 g/L, 약 2.1 g/L 내지 약 2.7 g/L, 약 2.1 g/L 내지 약 2.6 g/L, 약 2.1 g/L 내지 약 2.5 g/L, 약 2.1 g/L 내지 약 2.4 g/L, 약 2.1 g/L 내지 약 2.3 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 2.9 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 2.8 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 2.7 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 2.6 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 2.5 g/L, 약 2.2 g/L 내지 약 2.4 g/L, 약 2.3 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 2.3 g/L 내지 약 2.9 g/L, 약 2.3 g/L 내지 약 2.8 g/L, 약 2.3 g/L 내지 약 2.7 g/L, 약 2.3 g/L 내지 약 2.6 g/L, 약 2.3 g/L 내지 약 2.5 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 2.9 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 2.8 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 2.7 g/L, 약 2.4 g/L 내지 약 2.6 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 2.9 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 2.8 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 2.7 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 2.9 g/L, 약 2.6 g/L 내지 약 2.8 g/L, 약 2.7 g/L 내지 약 3.0 g/L, 약 2.7 g/L 내지 약 2.9 g/L, 또는 약 2.8 g/L 내지 약 3.0 g/L)까지 증가시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0115] 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법은, 배지 내 생존가능한 세포 밀도가 약 60 x 10^6개 세포/mL 내지 약 90 x 10^6개 세포/mL(예, 약 60 x 10^6개 세포/mL 내지 약 88 x 10^6개 세포/mL, 약 60 x 10^6개 세포/mL 내지 약 86 x 10^6개 세포/mL, 약 60 x 10^6개 세포/mL 내지 약 84 x 10^6개 세포/mL, 약 60 x 10^6개 세포/mL 내지 약 82 x 10^6개 세포/mL, 약 60 x 10^6개 세포/mL 내지 약 80 x 10^6개 세포/mL, 약 60 x 10^6개 세포/mL 내지 약 78 x 10^6개 세포/mL, 약 60 x 10^6개 세포/mL 내지 약 76 x 10^6개 세포/mL, 약 60 x 10^6개 세포/mL 내지 약 74 x 10^6개 세포/mL,

약 60 x 10^6개 세포/mL 내지 약 72 x 10^6개 세포/mL, 약 60 x 10^6개 세포/mL 내지 약 70 x 10^6개 세포/mL, 약 60 x 10^6개 세포/mL 내지 약 68 x 10^6개 세포/mL, 약 60 x 10^6개 세포/mL 내지 약 66 x 10^6개 세포/mL, 약 60 x 10^6개 세포/mL 내지 약 64 x 10^6개 세포/mL, 약 60 x 10^6개 세포/mL 내지 약 62 x 10^6개 세포/mL, 약 62 x 10^6개 세포/mL 내지 약 90 x 10^6개 세포/mL, 약 62 x 10^6개 세포/mL 내지 약 88 x 10^6개 세포/mL, 약 62 x 10^6개 세포/mL 내지 약 86 x 10^6개 세포/mL, 약 62 x 10^6개 세포/mL 내지 약 84 x 10^6개 세포/mL, 약 62 x 10^6개 세포/mL 내지 약 82 x 10^6개 세포/mL, 약 62 x 10^6개 세포/mL 내지 약 80 x 10^6개 세포/mL, 약 62 x 10^6개 세포/mL 내지 약 78 x 10^6개 세포/mL, 약 62 x 10^6개 세포/mL 내지 약 76 x 10^6개 세포/mL, 약 62 x 10^6개 세포/mL 내지 약 74 x 10^6개 세포/mL, 약 62 x 10^6개 세포/mL 내지 약 72 x 10^6개 세포/mL, 약 62 x 10^6개 세포/mL 내지 약 70 x 10^6개 세포/mL, 약 62 x 10^6개 세포/mL 내지 약 68 x 10^6개 세포/mL, 약 62 x 10^6개 세포/mL 내지 약 66 x 10^6개 세포/mL, 약 62 x 10^6개 세포/mL 내지 약 64 x 10^6개 세포/mL, 약 64 x 10^6개 세포/mL 내지 약 90 x 10^6개 세포/mL, 약 64 x 10^6개 세포/mL 내지 약 88 x 10^6개 세포/mL, 약 64 x 10^6개 세포/mL 내지 약 86 x 10^6개 세포/mL, 약 64 x 10^6개 세포/mL 내지 약 84 x 10^6개 세포/mL, 약 64 x 10^6개 세포/mL 내지 약 82 x 10^6개 세포/mL, 약 64 x 10^6개 세포/mL 내지 약 80 x 10^6개 세포/mL, 약 64 x 10^6개 세포/mL 내지 약 78 x 10^6개 세포/mL, 약 64 x 10^6개 세포/mL 내지 약 76 x 10^6개 세포/mL, 약 64 x 10^6개 세포/mL 내지 약 74 x 10^6개 세포/mL, 약 64 x 10^6개 세포/mL 내지 약 72 x 10^6개 세포/mL, 약 64 x 10^6개 세포/mL 내지 약 70 x 10^6개 세포/mL, 약 64 x 10^6개 세포/mL 내지 약 68 x 10^6개 세포/mL, 약 64 x 10^6개 세포/mL 내지 약 66 x 10^6개 세포/mL, 약 66 x 10^6개 세포/mL 내지 약 90 x 10^6개 세포/mL, 약 66 x 10^6개 세포/mL 내지 약 88 x 10^6개 세포/mL, 약 66 x 10^6개 세포/mL 내지 약 86 x 10^6개 세포/mL, 약 66 x 10^6개 세포/mL 내지 약 84 x 10^6개 세포/mL, 약 66 x 10^6개 세포/mL 내지 약 82 x 10^6개 세포/mL, 약 66 x 10^6개 세포/mL 내지 약 80 x 10^6개 세포/mL, 약 66 x 10^6개 세포/mL 내지 약 78 x 10^6개 세포/mL, 약 66 x 10^6개 세포/mL 내지 약 76 x 10^6개 세포/mL, 약 66 x 10^6개 세포/mL 내지 약 74 x 10^6개 세포/mL, 약 66 x 10^6개 세포/mL 내지 약 72 x 10^6개 세포/mL, 약 66 x 10^6개 세포/mL 내지 약 70 x 10^6개 세포/mL, 약 66 x 10^6개 세포/mL 내지 약 68 x 10^6개 세포/mL, 약 68 x 10^6개 세포/mL 내지 약 90 x 10^6개 세포/mL, 약 68 x 10^6개 세포/mL 내지 약 88 x 10^6개 세포/mL, 약 68 x 10^6개 세포/mL 내지 약 86 x 10^6개 세포/mL, 약 68 x 10^6개 세포/mL 내지 약 84 x 10^6개 세포/mL, 약 68 x 10^6개 세포/mL 내지 약 82 x 10^6개 세포/mL, 약 68 x 10^6개 세포/mL 내지 약 80 x 10^6개 세포/mL, 약 68 x 10^6개 세포/mL 내지 약 78 x 10^6개 세포/mL, 약 68 x 10^6개 세포/mL 내지 약 76 x 10^6개 세포/mL, 약 68 x 10^6개 세포/mL 내지 약 74 x 10^6개 세포/mL, 약 68 x 10^6개 세포/mL 내지 약 72 x 10^6개 세포/mL, 약 68 x 10^6개 세포/mL 내지 약 70 x 10^6개 세포/mL, 약 70 x 10^6개 세포/mL 내지 약 90 x 10^6개 세포/mL, 약 70 x 10^6개 세포/mL 내지 약 88 x 10^6개 세포/mL, 약 70 x 10^6개 세포/mL 내지 약 86 x 10^6개 세포/mL, 약 70 x 10^6개 세포/mL 내지 약 84 x 10^6개 세포/mL, 약 70 x 10^6개 세포/mL 내지 약 82 x 10^6개 세포/mL, 약 70 x 10^6개 세포/mL 내지 약 80 x 10^6개 세포/mL, 약 70 x 10^6개 세포/mL 내지 약 78 x 10^6개 세포/mL, 약 70 x 10^6개 세포/mL 내지 약 76 x 10^6개 세포/mL, 약 70 x 10^6개 세포/mL 내지 약 74 x 10^6개 세포/mL, 약 70 x 10^6개 세포/mL 내지 약 72 x 10^6개 세포/mL, 약 72 x 10^6개 세포/mL 내지 약 90 x 10^6개 세포/mL, 약 72 x 10^6개 세포/mL 내지 약 88 x 10^6개 세포/mL, 약 72 x 10^6개 세포/mL 내지 약 86 x 10^6개 세포/mL, 약 72 x 10^6개 세포/mL 내지 약 84 x 10^6개 세포/mL, 약 72 x 10^6개 세포/mL 내지 약 82 x 10^6개 세포/mL, 약 72 x 10^6개 세포/mL 내지 약 80 x 10^6개 세포/mL, 약 72 x 10^6개 세포/mL 내지 약 78 x 10^6개 세포/mL, 약 72 x 10^6개 세포/mL 내지 약 76 x 10^6개 세포/mL, 약 72 x 10^6개 세포/mL 내지 약 74 x 10^6개 세포/mL, 약 74 x 10^6개 세포/mL 내지 약 90 x 10^6개 세포/mL, 약 74 x 10^6개 세포/mL 내지 약 88 x 10^6개 세포/mL, 약 74 x 10^6개 세포/mL 내지 약 86 x 10^6

개 세포/mL, 약 74 x 10^6개 세포/mL 내지 약 84 x 10^6개 세포/mL, 약 74 x 10^6개 세포/mL 내지 약 82 x 10^6개 세포/mL, 약 74 x 10^6개 세포/mL 내지 약 80 x 10^6개 세포/mL, 약 74 x 10^6개 세포/mL 내지 약 78 x 10^6개 세포/mL, 약 74 x 10^6개 세포/mL 내지 약 76 x 10^6개 세포/mL, 약 76 x 10^6개 세포/mL 내지 약 90 x 10^6개 세포/mL, 약 76 x 10^6개 세포/mL 내지 약 88 x 10^6개 세포/mL, 약 76 x 10^6개 세포/mL 내지 약 86 x 10^6개 세포/mL, 약 76 x 10^6개 세포/mL 내지 약 84 x 10^6개 세포/mL, 약 76 x 10^6개 세포/mL 내지 약 82 x 10^6개 세포/mL, 약 76 x 10^6개 세포/mL 내지 약 80 x 10^6개 세포/mL, 약 76 x 10^6개 세포/mL 내지 약 78 x 10^6개 세포/mL, 약 78 x 10^6개 세포/mL 내지 약 90 x 10^6개 세포/mL, 약 78 x 10^6개 세포/mL 내지 약 88 x 10^6개 세포/mL, 약 78 x 10^6개 세포/mL 내지 약 86 x 10^6개 세포/mL, 약 78 x 10^6개 세포/mL 내지 약 84 x 10^6개 세포/mL, 약 78 x 10^6개 세포/mL 내지 약 82 x 10^6개 세포/mL, 약 78 x 10^6개 세포/mL 내지 약 80 x 10^6개 세포/mL, 약 80 x 10^6개 세포/mL 내지 약 90 x 10^6개 세포/mL, 약 80 x 10^6개 세포/mL 내지 약 88 x 10^6개 세포/mL, 약 80 x 10^6개 세포/mL 내지 약 86 x 10^6개 세포/mL, 약 80 x 10^6개 세포/mL 내지 약 84 x 10^6개 세포/mL, 약 80 x 10^6개 세포/mL 내지 약 82 x 10^6개 세포/mL, 약 82 x 10^6개 세포/mL 내지 약 90 x 10^6개 세포/mL, 약 82 x 10^6개 세포/mL 내지 약 88 x 10^6개 세포/mL, 약 82 x 10^6개 세포/mL 내지 약 86 x 10^6개 세포/mL, 약 82 x 10^6개 세포/mL 내지 약 84 x 10^6개 세포/mL, 약 84 x 10^6개 세포/mL 내지 약 90 x 10^6개 세포/mL, 약 84 x 10^6개 세포/mL 내지 약 88 x 10^6개 세포/mL, 약 84 x 10^6개 세포/mL 내지 약 86 x 10^6개 세포/mL, 약 86 x 10^6개 세포/mL 내지 약 90 x 10^6개 세포/mL, 약 86 x 10^6개 세포/mL 내지 약 88 x 10^6개 세포/mL, 또는 약 88 x 10^6개 세포/mL 내지 약 90 x 10^6개 세포/mL)일 때, 배지 내 폴록사머-188 농도를 약 3.0 g/L 내지 약 6.0 g/L(예, 약 3.0 g/L 내지 약 5.9 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 5.7 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 5.6 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 5.5 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 5.4 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 5.3 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 5.2 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 5.1 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 5.0 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 4.9 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 4.8 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 4.7 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 4.6 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 4.5 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 4.4 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 4.3 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 4.2 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 4.1 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 3.9 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 3.8 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 3.7 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 3.6 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 3.5 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 3.4 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 3.3 g/L, 약 3.0 g/L 내지 약 3.2 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 5.9 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 5.7 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 5.6 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 5.5 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 5.4 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 5.3 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 5.2 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 5.1 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 5.0 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 4.9 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 4.8 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 4.7 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 4.6 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 4.5 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 4.4 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 4.3 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 4.2 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 4.1 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 3.9 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 3.8 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 3.7 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 3.6 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 3.5 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 3.4 g/L, 약 3.1 g/L 내지 약 3.3 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 5.9 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 5.7 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 5.6 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 5.5 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 5.4 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 5.3 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 5.2 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 5.1 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 5.0 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 4.9 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 4.8 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 4.7 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 4.6 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 4.5 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 4.4 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 4.3 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 4.2 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 4.1 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 3.9 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 3.8 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 3.7 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 3.6 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 3.5 g/L, 약 3.2 g/L 내지 약 3.4 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 5.9 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 5.7 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 5.6 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 5.5 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 5.4 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 5.3 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 5.2 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 5.1 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 5.0 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 4.9 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 4.8 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 4.7 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 4.6 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 4.5 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 4.4 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 4.3 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 4.2 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 4.1 g/L, 약 3.3 g/L 내지 약 4.0 g/L, 약 3.3 g/L 내

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

지 약 5.0 g/L, 약 4.2 g/L 내지 약 4.9 g/L, 약 4.2 g/L 내지 약 4.8 g/L, 약 4.2 g/L 내지 약 4.7 g/L, 약 4.2 g/L 내지 약 4.6 g/L, 약 4.2 g/L 내지 약 4.5 g/L, 약 4.2 g/L 내지 약 4.4 g/L, 약 4.3 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 4.3 g/L 내지 약 5.9 g/L, 약 4.3 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 4.3 g/L 내지 약 5.7 g/L, 약 4.3 g/L 내지 약 5.6 g/L, 약 4.3 g/L 내지 약 5.5 g/L, 약 4.3 g/L 내지 약 5.4 g/L, 약 4.3 g/L 내지 약 5.3 g/L, 약 4.3 g/L 내지 약 5.2 g/L, 약 4.3 g/L 내지 약 5.1 g/L, 약 4.3 g/L 내지 약 5.0 g/L, 약 4.3 g/L 내지 약 4.9 g/L, 약 4.3 g/L 내지 약 4.8 g/L, 약 4.3 g/L 내지 약 4.7 g/L, 약 4.3 g/L 내지 약 4.6 g/L, 약 4.3 g/L 내지 약 4.5 g/L, 약 4.4 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 4.4 g/L 내지 약 5.9 g/L, 약 4.4 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 4.4 g/L 내지 약 5.7 g/L, 약 4.4 g/L 내지 약 5.6 g/L, 약 4.4 g/L 내지 약 5.5 g/L, 약 4.4 g/L 내지 약 5.4 g/L, 약 4.4 g/L 내지 약 5.3 g/L, 약 4.4 g/L 내지 약 5.2 g/L, 약 4.4 g/L 내지 약 5.1 g/L, 약 4.4 g/L 내지 약 5.0 g/L, 약 4.4 g/L 내지 약 4.9 g/L, 약 4.4 g/L 내지 약 4.8 g/L, 약 4.4 g/L 내지 약 4.7 g/L, 약 4.4 g/L 내지 약 4.6 g/L, 약 4.5 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 4.5 g/L 내지 약 5.9 g/L, 약 4.5 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 4.5 g/L 내지 약 5.7 g/L, 약 4.5 g/L 내지 약 5.6 g/L, 약 4.5 g/L 내지 약 5.5 g/L, 약 4.5 g/L 내지 약 5.4 g/L, 약 4.5 g/L 내지 약 5.3 g/L, 약 4.5 g/L 내지 약 5.2 g/L, 약 4.5 g/L 내지 약 5.1 g/L, 약 4.5 g/L 내지 약 5.0 g/L, 약 4.5 g/L 내지 약 4.9 g/L, 약 4.5 g/L 내지 약 4.8 g/L, 약 4.5 g/L 내지 약 4.7 g/L, 약 4.6 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 4.6 g/L 내지 약 5.9 g/L, 약 4.6 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 4.6 g/L 내지 약 5.7 g/L, 약 4.6 g/L 내지 약 5.6 g/L, 약 4.6 g/L 내지 약 5.5 g/L, 약 4.6 g/L 내지 약 5.4 g/L, 약 4.6 g/L 내지 약 5.3 g/L, 약 4.6 g/L 내지 약 5.2 g/L, 약 4.6 g/L 내지 약 5.1 g/L, 약 4.6 g/L 내지 약 5.0 g/L, 약 4.6 g/L 내지 약 4.9 g/L, 약 4.6 g/L 내지 약 4.8 g/L, 약 4.7 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 4.7 g/L 내지 약 5.9 g/L, 약 4.7 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 4.7 g/L 내지 약 5.7 g/L, 약 4.7 g/L 내지 약 5.6 g/L, 약 4.7 g/L 내지 약 5.5 g/L, 약 4.7 g/L 내지 약 5.4 g/L, 약 4.7 g/L 내지 약 5.3 g/L, 약 4.7 g/L 내지 약 5.2 g/L, 약 4.7 g/L 내지 약 5.1 g/L, 약 4.7 g/L 내지 약 5.0 g/L, 약 4.7 g/L 내지 약 4.9 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 5.9 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 5.7 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 5.6 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 5.5 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 5.4 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 5.3 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 5.2 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 5.1 g/L, 약 4.8 g/L 내지 약 5.0 g/L, 약 4.9 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 4.9 g/L 내지 약 5.9 g/L, 약 4.9 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 4.9 g/L 내지 약 5.7 g/L, 약 4.9 g/L 내지 약 5.6 g/L, 약 4.9 g/L 내지 약 5.5 g/L, 약 4.9 g/L 내지 약 5.4 g/L, 약 4.9 g/L 내지 약 5.3 g/L, 약 4.9 g/L 내지 약 5.2 g/L, 약 4.9 g/L 내지 약 5.1 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 5.9 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 5.7 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 5.6 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 5.5 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 5.4 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 5.3 g/L, 약 5.0 g/L 내지 약 5.2 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 5.9 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 5.7 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 5.6 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 5.5 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 5.4 g/L, 약 5.1 g/L 내지 약 5.3 g/L, 약 5.2 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 5.2 g/L 내지 약 5.9 g/L, 약 5.2 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 5.2 g/L 내지 약 5.7 g/L, 약 5.2 g/L 내지 약 5.6 g/L, 약 5.2 g/L 내지 약 5.5 g/L, 약 5.2 g/L 내지 약 5.4 g/L, 약 5.3 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 5.3 g/L 내지 약 5.9 g/L, 약 5.3 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 5.3 g/L 내지 약 5.7 g/L, 약 5.3 g/L 내지 약 5.6 g/L, 약 5.3 g/L 내지 약 5.5 g/L, 약 5.4 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 5.4 g/L 내지 약 5.9 g/L, 약 5.4 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 5.4 g/L 내지 약 5.7 g/L, 약 5.4 g/L 내지 약 5.6 g/L, 약 5.5 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 5.5 g/L 내지 약 5.9 g/L, 약 5.5 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 5.5 g/L 내지 약 5.7 g/L, 약 5.6 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 5.6 g/L 내지 약 5.9 g/L, 약 5.6 g/L 내지 약 5.8 g/L, 약 5.7 g/L 내지 약 6.0 g/L, 약 5.7 g/L 내지 약 5.9 g/L, 또는 약 5.8 g/L 내지 약 6.0 g/L)까지 증가시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0116] 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법은, 배지 내 생존가능한 세포 밀도가 약 90 x 10^6개 세포/mL 초과(예, 약 91 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 92 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 93 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 94 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 95 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 96 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 97 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 98 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 99 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 100 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 101 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 102 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 103 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 104 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 105 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 106 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 107 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 108 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 109 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 110 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 111 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 112 x 10^6개 세포/mL 초과, 약

113 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 114 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 115 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 116 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 117 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 118 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 119 x 10^6개 세포/mL 초과, 또는 약 120 x 10^6개 세포/mL 초과)일 때, 배지 내 폴록사머-188 농도를 6.0 g/L 초과(예, 6.1 g/L 초과, 6.2 g/L 초과, 6.3 g/L 초과, 6.4 g/L 초과, 6.5 g/L 초과, 6.6 g/L 초과, 6.7 g/L 초과, 6.8 g/L 초과, 6.9 g/L 초과, 7.0 g/L 초과, 7.1 g/L 초과, 7.2 g/L 초과, 7.3 g/L 초과, 7.4 g/L 초과, 7.5 g/L 초과, 7.6 g/L 초과, 7.7 g/L 초과, 7.8 g/L 초과, 7.9 g/L 초과, 8.0 g/L 초과, 8.1 g/L 초과, 8.2 g/L 초과, 8.3 g/L 초과, 8.4 g/L 초과, 8.5 g/L 초과, 8.6 g/L 초과, 8.7 g/L 초과, 8.8 g/L 초과, 8.9 g/L 초과, 9.0 g/L 초과, 9.1 g/L 초과, 9.2 g/L 초과, 9.3 g/L 초과, 9.4 g/L 초과, 9.5 g/L 초과, 9.6 g/L 초과, 9.7 g/L 초과, 9.8 g/L 초과, 9.9 g/L 초과, 10.0 g/L 초과, 약 10.1 g/L 초과, 약 10.2 g/L 초과, 약 10.3 g/L 초과, 약 10.4 g/L 초과, 약 10.5 g/L 초과, 약 10.6 g/L 초과, 약 10.7 g/L 초과, 약 10.8 g/L 초과, 약 10.9 g/L 초과, 또는 약 11.0 g/L 초과)의 폴록사머-188까지 증가시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0117] 일부 실시형태에서, 본 방법은, 배지 내 생존가능한 세포 밀도가 약 35 x 10^6개 세포/mL 내지 약 60 x 10^6개 세포/mL(예, 또는 본원에 기재된 이들 사이의 범위들 중 임의의 범위)일 때, 배지 내 폴록사머-188 농도를 약 1.8 g/L 내지 약 3.0 g/L(예, 본원에 기재된 이들 사이의 범위들 중 임의의 범위)까지 증가시키는 단계; 배지 내 생존가능한 세포 밀도가 약 60 x 10^6개 세포/mL 내지 약 90 x 10^6개 세포/mL(예, 본원에 기재된 이들 사이의 범위들 중 임의의 범위)일 때, 배지 내 폴록사머-188 농도를 약 3.0 g/L 내지 약 6.0 g/L(예, 본원에 기재된 이들 사이의 범위들 중 임의의 범위)까지 증가시키는 단계; 및 배지 내 생존가능한 세포 밀도가 90 x 10^6개 세포/mL 초과(예, 또는 본원에 기재된 90 x 10^6개 세포/mL 초과의 생존가능한 세포 밀도들 중 임의의 밀도)일 때, 배지 내 폴록사머-188 농도를 6.0 g/L 초과(예, 본원에 기재된 6.0 g/L 초과의 농도들 중 임의의 농도)까지 증가시키는 단계를 포함한다. 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태는 배양 동안 하나 이상(예, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개 또는 20개)의 시점들에서 배지 내 생존가능한 세포 밀도를 확인하는 단계를 추가로 포함한다.

[0118] **폴록사머-188 : 소포제 비율**

[0119] 본원에 기재된 실시형태들 중 임의의 실시형태에서, 액체 배지는 소포제(예, 소포제-c)를 포함하고, 배지 내 소포제(g/L) : 폴록사머-188(g/L)의 비율은 약 0.5% 내지 약 6.0%(예, 약 0.5% 내지 약 5.5%, 약 0.5% 내지 약 5.0%, 약 0.5% 내지 약 4.5%, 약 0.5% 내지 약 4.0%, 약 0.5% 내지 약 3.5%, 약 0.5% 내지 약 3.0%, 약 0.5% 내지 약 2.5%, 약 0.5% 내지 약 2.0%, 약 0.5% 내지 약 1.5%, 약 0.5% 내지 약 1.0%, 약 1.0% 내지 약 6.0%, 약 1.0% 내지 약 5.5%, 약 1.0% 내지 약 5.0%, 약 1.0% 내지 약 4.5%, 약 1.0% 내지 약 4.0%, 약 1.0% 내지 약 3.5%, 약 1.0% 내지 약 3.0%, 약 1.0% 내지 약 2.5%, 약 1.0% 내지 약 2.0%, 약 1.0% 내지 약 1.5%, 약 2.0% 내지 약 6.0%, 약 2.0% 내지 약 5.5%, 약 2.0% 내지 약 5.0%, 약 2.0% 내지 약 4.5%, 약 2.0% 내지 약 4.0%, 약 2.0% 내지 약 3.5%, 약 2.0% 내지 약 3.0%, 약 2.0% 내지 약 2.5%, 약 2.5% 내지 약 6.0%, 약 2.5% 내지 약 5.5%, 약 2.5% 내지 약 5.0%, 약 2.5% 내지 약 4.5%, 약 2.5% 내지 약 4.0%, 약 2.5% 내지 약 3.5%, 약 2.5% 내지 약 3.0%, 약 3.0% 내지 약 6.0%, 약 3.0% 내지 약 5.5%, 약 3.0% 내지 약 5.0%, 약 3.0% 내지 약 4.5%, 약 3.0% 내지 약 4.0%, 약 3.0% 내지 약 3.5%, 약 3.5% 내지 약 6.0%, 약 3.5% 내지 약 5.5%, 약 3.5% 내지 약 5.0%, 약 3.5% 내지 약 4.5%, 약 3.5% 내지 약 4.0%, 약 4.0% 내지 약 6.0%, 약 4.0% 내지 약 5.5%, 약 4.0% 내지 약 5.0%, 약 4.0% 내지 약 4.5%, 약 4.5% 내지 약 6.0%, 약 4.5% 내지 약 5.5%, 약 4.5% 내지 약 5.0%, 약 5.0% 내지 약 6.0%, 약 5.0% 내지 약 5.5%, 또는 약 5.5% 내지 약 6.0%)이다.

[0120] **배양 배지**

[0121] 액체 배양 배지는 당업계에 알려져 있다. 액체 배양 배지(예, 제1 및/또는 제2 액체 배지)에는 포유류 혈청(예, 태아 소 혈청, 및 소 혈청), 및/또는 성장 호르몬 또는 성장 인자(예, 인슐린, 트랜스페린 및 상피 성장 인자)가 보충될 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 액체 배양 배지(예, 제1 및/또는 제2 액체 배지)는 화학적으로-정의된 액체 배양 배지, 동물-유래 구성성분-무함유 액체 배양 배지, 혈청-무함유 액체 배양 배지 또는 혈청-함유 액체 배양 배지일 수 있다. 화학적으로-정의된 액체 배양 배지, 동물-유래 구성성분-무함유 액체 배양 배지, 혈청-무함유 액체 배양 배지 및 혈청-함유 액체 배양 배지의 비제한적인 예들은 상업적으로 입수가능하다.

[0122] 액체 배지는 전형적으로 에너지 소스(예, 탄수화물, 예컨대 글루코스), 필수 아미노산(예, 20개의 아미노산으로 된 기본 세트 + 시스테인), 비타민 및/또는 저농도에서 필요한 다른 유기 화합물, 자유 지방산, 및/또는 미량

원소를 함유한다. 액체 배양 배지(예, 제1 및/또는 제2 액체 배지)에는 요망되는 경우, 예를 들어, 포유류 호르몬 또는 성장 인자(예, 인슐린, 트랜스페린 또는 상피 성장 인자), 염 및 완충제(예, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트 염), 뉴클레오사이드 및 염기(예, 아데노신, 티미딘 및 하이포크산틴), 단백질 및 조직 가수분해물, 및/또는 이들 첨가제의 임의의 조합이 보충될 수 있다.

[0123] 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법에서 세포(예, 포유류 세포)를 배양하는 데 사용될 수 있는 여러 가지 광범위하게 상이한 액체 배양 배지들이 당업계에 알려져 있다. 본 공정에 또한 유용할 수 있는 배지 구성성분으로는, 화학적으로-정의된(CD) 가수분해물, 예를 들어, CD 펩톤, CD 폴리펩타이드(2개 이상의 아미노산) 및 CD 성장 인자 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 액체 배지 및 배지 구성성분의 부가적인 예는 당업계에 알려져 있다.

[0124] 당업자는, 본원에 기재된 제1 액체 배지 및 제2 액체 배지 또는 공급 액체 배지가 동일한 유형의 배지 또는 상이한 유형의 배지일 수 있음을 이해할 것이다.

[0125] 세포 배양물로부터 수득된 액체 배지는 여과 또는 정화되어, 실질적으로 세포 및/또는 바이러스가 없는 액체 배지가 수득될 수 있다. 세포를 제거하기 위한 액체 배지의 여과 또는 정화 방법(예, 0.2-㎛ 여과 및 교대 접선 유동(ATFTM) 시스템을 사용한 여과)은 당업계에 알려져 있다. 포유류 세포는 또한, 원심분리를 사용하고 실질적으로 세포가 없는 액체 배지인 상층액을 제거하거나, 또는 세포가 액체 배지를 함유하는 용기 또는 생물반응기의 중력적 하부에 침강할 수 있게 하고 침강된 재조합 세포로부터 떨어져 있는 액체 배지(실질적으로 세포가 없는 액체 배지)를 제거함으로써, 액체 배지로부터 제거될 수 있다.

[0126] **온도**

[0127] 포유류 세포의 배양 단계는 약 31℃ 내지 약 40℃의 온도에서 수행될 수 있다. 당업자는, 온도가 배양 단계 동안 특정한 시점(들)에서 예를 들어 매시간 또는 매일 기준으로 변할 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 온도는 생물반응기에 세포(예, 포유류 세포)를 초기 접종한 후, 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일 또는 약 20일째 또는 그 이상째에 변화하거나 시프트(예, 증가 또는 감소)될 수 있다. 예를 들어, 온도는 상향으로 시프트될 수 있다(예, 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℃, 10℃, 11℃, 12℃, 13℃, 14℃, 15℃, 16℃, 17℃, 18℃, 19℃, 또는 최대 또는 약 20℃의 변화). 예를 들어, 온도는 하향으로 시프트될 수 있다(예, 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℃, 10℃, 11℃, 12℃, 13℃, 14℃, 15℃, 16℃, 17℃, 18℃, 19℃, 또는 최대 또는 약 20℃의 변화).

[0128] CO_2

[0129] 본원에 기재된 배양 단계는 생물반응기 내 액체 배지를 최대 또는 약 15%의 CO_2(예, 최대 또는 약 14% CO_2, 12% CO_2, 10% CO_2, 8% CO_2, 6% CO_2, 5% CO_2, 4% CO_2, 3% CO_2, 2% CO_2, 또는 최대 또는 약 1% CO_2)를 함유하는 분위기에 노출시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0130] **재조합 단백질**

[0131] 본원에 제공된 방법에 의해 생성될 수 있는 재조합 단백질의 비제한적인 예로는, 면역글로불린(경쇄 및 중쇄 면역글로불린), 항체 또는 항체 단편(예, 본원에 기재된 임의의 항체 단편), 효소(예, 갈락토시다제(예, 알파-갈락토시다제), 미오자임(Myozyme) 또는 세레자임(Cerezyme)), 단백질(예, 인간 에리트로포이에틴, 종양 괴사 인자(TNF), 또는 인터페론 알파 또는 베타), 또는 면역원성 또는 항원성 단백질 또는 단백질 단편(예, 백신용 단백질) 등이 있다. 재조합 단백질은 적어도 하나의 다관능성 재조합 단백질 스캐폴드를 함유하는 조작된 항원-결합 폴리펩타이드일 수 있다(예를 들어, 문헌[Gebauer et al., *Current Opin. Chem. Biol.* 13:245-255, 2009]; 및 미국 특허 출원 공개 2012/0164066(그 전체가 원용에 의해 본원에 포함되어 있음)에 기재된 재조합 항원-결합 단백질 참조). 항체인 재조합 단백질의 비제한적인 예로는, 파니투무맙(panitumumab), 오말리주맙(omalizumab), 아바고보맙(abagovomab), 아브식시맙(abciximab), 악톡수맙(actoxumab), 아달리무맙(adalimumab), 아데카투무맙(adecatumumab), 아펠리모맙(afelimomab), 아푸투주맙(afutuzumab), 알라시주맙(alacizumab), 알라시주맙, 알렘투주맙(alemtuzumab), 알리로쿠맙(alirocumab), 알투모맙(altumomab), 아마툭시맙(amatuximab), 아마툭시맙, 아나투모맙(anatumomab), 안루킨주맙(anrukinzumab), 아폴리주맙(apolizumab),

아르시투모맙(arcitumomab), 아티누맙(atinumab), 토실리주맙(tocilizumab), 바실리지맙(basilizimab), 벡투모맙(bectumomab), 벨리무맙(belimumab), 베바시주맙(bevacizumab), 베실레소맙(besilesomab), 베즐로톡수맙(bezlotoxumab), 비시로맙(biciromab), 카나키누맙(canakinumab), 세르톨리주맙(certolizumab), 세툭시맙(cetuximab), 식수투무맙(cixutumumab), 다클리주맙(daclizumab), 데노수맙(denosumab), 덴수맙(densumab), 에쿨리주맙(eculizumab), 에드레콜로맙(edrecolomab), 에팔리주맙(efalizumab), 에푼구맙(efungumab), 에프라투주맙(epratuzumab), 에르투막소맙(ertumaxomab), 에타라시주맙(etaracizumab), 피기투무맙(figitumumab), 골리무맙(golimumab), 이브리투모맙(ibritumomab), 티욱세탄(tiuxetan), 이고보맙(igovomab), 임가투주맙(imgatuzumab), 인플릭시맙(infliximab), 이놀리모맙(inolimomab), 이노투주맙(inotuzumab), 라베투주맙(labetuzumab), 레브리키주맙(lebrikizumab), 목세주모맙(moxetumomab), 나탈리주맙(natalizumab), 오비누투주맙(obinutuzumab), 오레고보맙(oregovomab), 팔리비주맙(palivizumab), 파니투무맙(panitumumab), 페르투주맙(pertuzumab), 라니비주맙(ranibizumab), 리툭시맙(rituximab), 토실리주맙(tocilizumab), 토시투모맙(tositumomab), 트랄로키누맙(tralokinumab), 투코투주맙(tucotuzumab), 트라스투주맙(trastuzumab), 벨투주맙(veltuzumab), 잘루투무맙(zalutumumab) 및 자툭시맙(zatuximab) 등이 있다. 본원에 기재된 방법에 의해 생성될 수 있는 재조합 항체의 부가적인 예는 당업계에 알려져 있다. 본 방법에 의해 생성될 수 있는 재조합 단백질의 부가적인 비제한적인 예로는, 알글루코시다제(alglucosidase) 알파, 라로니다제(laronidase), 아바타셉트(abatacept), 갈설파제(galsulfase), 루트로핀(lutropin) 알파, 항혈우병 인자, 아갈시다제(agalsidase) 베타, 인터페론 베타-1a, 다르베포에틴(darbepoetin) 알파, 테넥테플라제(tenecteplase), 에타네르셉트(etanercept), 응고 인자 IX, 여포 자극 호르몬, 인터페론 베타-1a, 이미글루세라제(imiglucerase), 도르나제(dornase) 알파, 에포에틴 알파, 인슐린 또는 인슐린 유사체, 메카세르민(mecasermin), 인자 VIII, 인자 VIIa, 항-트롬빈 III, 단백질 C, 인간 알부민, 에리트로포이에틴, 과립구 콜로니 자극 인자, 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자, 인터루킨-11, 라로니다제, 이두르수파제(idursuphase), 갈설파제, α-1-프로테이나제 저해제, 락타제, 아데노신 데아미나제, 조직 플라스미노겐 활성제, 티로트로핀 알파(예, Thyrogen®) 및 알테플라제 등이 있다. 본 방법에 의해 생성될 수 있는 재조합 단백질의 부가적인 예로는, 산 α-글루코시다제, 알글루코시다제(alglucosidase) 알파(예, Myozyme® 및 Lumizyme®), α-L-이두로니다제(iduronidase)(예, Aldurazyme®), 이두로네이트 설파타제, 헤파란 N-설파타제, 갈락토스-6-설파타제, 산 β-갈락토시다제, β-글루코로니다제, N-아세틸글루코사민-1-포스포트랜스퍼라제, α-N-아세틸갈락토스아미니다제, 산 리파제, 리소좀 산 세라미다제, 산 스핑고미엘리나제, β-글루코시다제(예, Cerezyme® 및 Ceredase®), 갈락토실세라미다제, α-갈락토시다제-A(예, Fabrazyme®), 산 β-갈락토시다제, β-갈락토시다제, 뉴라미니다제(neuraminidase), 헥소스아미니다제 A 및 헥소스아미니다제 B 등이 있다.

[0132] 분비된 가용성 재조합 단백질은 세포(예, 포유류 세포)로부터 액체 배지를 제거하거나 그렇지 않다면 물리적으로 분리함으로써, 액체 배지(예, 제1 및/또는 제2 액체 배지)로부터 회수될 수 있다. 예를 들어, 원심분리, 여과, 파이펫팅 및/또는 흡인을 포함하여 세포(예, 포유류 세포)로부터 액체 배지를 제거하는 여러 가지 상이한 방법들이 당업계에 알려져 있다. 그런 다음, 분비된 재조합 단백질은 다양한 유형의 크로마토그래피(예, 친화성 크로마토그래피, 분자체 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피 또는 음이온 교환 크로마토그래피) 및/또는 여과(예, 분자량 컷오프 여과)를 포함한 여러 가지 생화학적 기술들을 사용하여 액체 배지로부터 회수되고 추가로 정제될 수 있다.

[0133] **재조합 단백질의 수집**

[0134] 일부 실시형태는 재조합 단백질(예, 본원에 기재된 재조합 단백질들 중 임의의 재조합 단백질)을 수집하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 예에서, 수집은 포유류 세포를 용해하는 단계를 포함한다. 다른 예에서, 수집은 재조합 단백질을 배지(예, 관류 배양이 수행되는 경우 제1 액체 배지 및 제2 액체 배지 중 하나 또는 둘 다, 또는 유가 배양이 수행되는 경우 제1 액체 배지 및 공급 액체 배지 중 하나 또는 둘 다)로부터 수집하는 단계를 포함할 수 있다.

[0135] 수집은, 배양이 예를 들어, 약 30 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 32 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 34 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 36 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 38 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 40 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 42 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 44 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 46 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 48 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 50 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 52 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 54 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 56 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 58 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 60 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 62 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 64 x 10^6개 세포/mL

초과, 약 66 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 68 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 70 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 72 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 74 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 76 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 78 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 80 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 82 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 84 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 86 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 88 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 90 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 92 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 94 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 96 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 98 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 100 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 102 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 104 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 106 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 108 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 110 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 112 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 114 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 116 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 118 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 120 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 122 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 124 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 126 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 128 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 130 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 132 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 134 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 136 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 138 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 140 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 142 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 144 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 146 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 148 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 150 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 152 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 154 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 156 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 158 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 160 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 162 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 164 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 166 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 168 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 170 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 172 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 174 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 176 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 178 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 180 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 182 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 184 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 186 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 188 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 190 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 192 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 194 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 196 x 10^6개 세포/mL 초과, 약 198 x 10^6개 세포/mL 초과, 또는 약 200 x 10^6개 세포/mL 초과)의 생존가능한 세포 밀도를 달성한 후, 수행될 수 있다.

[0136] **재조합 단백질의 제형화**

[0137] 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 일부 실시형태는 재조합 단백질(예, 수집된 재조합 단백질)을 약제학적 조성물 내로 제형화하는 단계를 추가로 포함한다. 예를 들어, 제형화는 약제학적으로 허용가능한 부형제를 재조합 단백질(예, 수집된 재조합 단백질)에 첨가하는 단계를 포함할 수 있다. 제형화는 약제학적으로 허용가능한 부형제를 재조합 단백질(예, 수집된 재조합 단백질)과 혼합하는 단계를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 부형제(예, 비-자연 발생 약제학적으로 허용가능한 부형제)의 예는 당업계에 잘 알려져 있다. 일부 실시형태에서, 재조합 단백질(예, 수집된 재조합 단백질)은 정맥내, 동맥내, 피하, 복강내 또는 근육내 투여를 위해 제형화된다.

[0138] **실시예**

[0139] **실시예 1. 분비되는 재조합 항체를 생성하는 관류 세포 배양물에 미치는 증가된 농도의 폴록사머-188의 효과**

[0140] 본 세트의 실험을 수행하여, 재조합 항체를 인코딩하는 핵산을 함유하는 포유류 세포를 포함하는 관류 세포 배양물에서 세포 성장 및 재조합 항체 생성에 미치는, 증가하는 농도의 폴록사머-188의 효과를 시험하였다. 이들 실험에서, 전체 배양 기간에 걸쳐 1.8 g/L을 함유하는 CD-CHO 배지를 사용하는 제1 관류 세포 배양물 진행을 수행하였으며, 배양 기간에 걸쳐 증가하는 농도의 폴록사머-188(배양 기간에 걸쳐 1.8 g/L로부터 6.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188)을 함유하는 CD-CHO 배지를 사용하는 제2 관류 세포 배양물 진행을 수행하였다. 각각의 세포 배양물 진행에 있어서, 관류를 배양 제12일 내지 제33일에 4 반응기 부피(RV)/일의 속도로 수행하고, 배양 제33일 내지 제63일에 6 RV/일의 속도로 전환하고, 배양 제63일 내지 제72일에 7 RV/일의 속도로 전환하였다. 제2 세포 배양물 진행을 배양 제0일 내지 제14일에 1.8 g/L 폴록사머-188을 함유하는 CD-CHO 배지, 배양 제15일 내지 제34일에 2.8 g/L 폴록사머-188을 함유하는 CD-CHO 배지, 배양 제35일 내지 제39일에 3.8 g/L 폴록사머-188을 함유하는 CD-CHO 배지, 배양 제40일 내지 제56일에 4.8 g/L 폴록사머-188을 함유하는 CD-CHO 배지, 및 배양 제57일 내지 제72일에 5.8 g/L 폴록사머-188을 함유하는 CD-CHO 배지를 사용하여 수행하였다.

[0141] 생존가능한 세포 밀도, 비성장속도, 생존가능한 세포의 백분율, 부피 생산 속도 및 비생산속도를 잘 알려진 방법을 사용하여 제1 관류 배양물 및 제2 관류 배양물 둘 다에 대해 매일 확인하였다.

[0142] 데이터는, 배양물 내에서 1.8 g/L 초과의 폴록사머-188 농도를 구축함으로써 100 x 10^6개 세포/mL를 초과하는 생존가능한 세포 밀도가 달성됨을 보여준다(도 1). 이와는 대조적으로, 배양 배지 내에서 오로지 1.8 g/L 폴록사머-188만 사용한 제1 세포 배양물 진행은 50 x 10^6개 세포/mL의 생존가능한 세포 밀도를 달성하였다(도 1). 제2 세포 배양물 진행에 대한 데이터 또한, 배양물 내에서 1.8 g/L 초과의 폴록사머-188 농도를 구축하면, 세포 배양물이 100 x 10^6개 세포/mL 초과의 생존가능한 세포 밀도를 갖는 경우에라도 강력한 비성장속도를 초래함을 보여준다(도 2). 도 3의 데이터는 또한, 배양물 내에서 1.8 g/L 초과의 폴록사머-188 농도를 구축하면, 배양 기간 전체에 걸쳐 1.8 g/L 폴록사머-188을 함유하는 배양 배지를 사용한 관류 세포 배양물 진행과 비교하여 높고 정상(steady) 백분율(배양 기간 전체에 걸쳐 80% 초과)의 생존가능한 세포를 초래함을 보여준다(도 3).

[0143] 도 4 및 도 5의 데이터 또한, 배양 기간에 걸쳐 증가하는 농도의 폴록사머-188(1.8 g/L로부터 6.8 g/L까지 증가하는 폴록사머-188)을 함유하는 배양 배지를 사용하여 수행된 제2 관류 세포 배양물 진행이 각각 높은 부피 생산 속도(3 g/L/d 초과) 및 높은 비생산속도(15 pg/세포/일 내지 42 pg/세포/일)를 가짐을 보여준다.

[0144] **실시예 2. 액체 배지에서 재조합 항체의 안정성에 미치는 증가된 농도의 폴록사머-188의 효과**

[0145] 본 세트의 실험을 수행하여, 증가된 농도의 폴록사머-188이 세포 배양물의 수합 후 정화된 액체 배지에 존재하는 재조합 단백질의 분해를 저해할 것인지 확인하였다. 이들 실험에서, 배양이 6.8 g/L 농도의 폴록사머-188을 달성하고, 배양물 내 폴록사머-188 농도를 3.95 g/L 폴록사머-188까지 감소시킨 다음, 다시 한번 3.0 g/L 폴록사머-188까지 감소시킨 점을 제외하고는, 실시예 1에 기재된 제2 관류 세포 배양물 진행과 유사한 관류 세포 배양물 진행을 수행하였다. 이들 실험에서, 2개 또는 3개의 액체 배지 시료를 하기 시점에서 배양물로부터 제거하였다: 배양물이 6.8 g/L 폴록사머-188을 함유한 제1 시점, 배양물이 3.95 g/L 폴록사머-188을 함유한 제2 시점, 및 배양물이 3.0 g/L 폴록사머-188을 함유한 제3 시점. 각각의 시점에서 수집된 하나의 시료를 4℃에서 저장하였으며, 각각의 시점에서 수집된 하나의 시료를 4℃에 저장하기 전 실온에서 7일 동안 인큐베이션하였고, 제2 시점 및 제3 시점 각각에 있어서, 각각의 시료에서 6.8 g/L 폴록사머-188 농도를 달성하기 위해 시료에 폴록사머-188을 보충하였고, 그런 다음, 각각의 시료를 4℃에 저장하기 전 실온에서 9일 동안 인큐베이션하였다. 결과적인 비처리된 및 처리된 시료를 4-20% Bis-Tris 겔 상에서 진행시키고, 쿠마시 블루를 사용하여 염색하였다.

[0146] 도 6의 데이터는, 6.8 g/L, 3.95 g/L 또는 3.0 g/L 폴록사머-188을 함유하는 모든 비처리된 시료들이 유사한 생성물 안정성(레인 1, 2 및 3)을 나타내었음을 보여준다. 이 데이터는 또한 놀랍게도, 6.8 g/L 폴록사머-188을 함유하는 시료가 실온에서 7일 동안 인큐베이션된 후에 실질적인 분해를 나타내지 않는 한편, 3.0 g/L 또는 3.95 g/L 폴록사머-188을 함유하는 시료 둘 다 동일한 인큐베이션 후에 검출가능한 분해를 나타내었음을 보여준다(도 6; 레인 1a, 2a 및 3a). 데이터는 또한, 저농도의 폴록사머-188을 함유하는 시료에의 폴록사머-188의 첨가가 생성물 안정성을 개선하지 않음을 나타낸다(도 6; 레인 2b 및 3b). 이들 데이터는, 배양물 내 1.8 g/L 초과인 폴록사머-188 농도의 사용이 이러한 배양물에서 재조합 단백질의 분해를 감소시키거나 저해할 수 있음을 보여주고, 폴록사머-188이 더 건강한 세포 배양물을 제공함으로써 이러한 효과를 달성할 수 있음을 가리킨다.

[0147] **실시예 3. 세포 배양물 성장 및 생산성에 미치는 유익 효과를 달성하는 데 필요한 폴록사머-188의 양에 미치는 스파저 기공 유형 및 크기의 효과**

[0148] 본 세트의 실험을 수행하여, 관류 세포 배양물에서 유익한 성장 및 생산성을 달성하는 데 필요한 폴록사머-188의 양에 미치는 스파저 기공 유형 및 크기의 효과를 시험하였다. 이들 실험에서, 상이한 관류 세포 배양물 진행들을 상이한 스파저들을 사용하여 수행하였다: 크기가 20 ㎛인 신터드 기공을 가진 스파저(1 반응기); 크기가 200 ㎛인 드릴드 기공을 가진 스파저(2 반응기); 또는 크기가 500 ㎛인 드릴드 기공을 가진 스파저(1 반응기). 각각의 관류 배양물은 1.8 g/L 폴록사머-188을 함유하는 CD CHO 배지를 초기에 사용하였으며, 필요한 대로 세포 생존력을 유지시키고 세포 용해를 최소화하기 위해 폴록사머-188을 증가하는 증분으로 상기 배양물에 첨가하였다. 각각의 세포 배양물에 대한 생존가능한 세포 밀도, 비성장속도, 비 락테이트 데하이드로게나제 생성 속도, 생존가능한 세포의 백분율, 부피 생산 속도, 및 호기성 글루코스 소모율을 잘 알려진 방법을 사용하여 배양 기간 동안 상이한 시점들에서 수행하였다.

[0149] 데이터는, 배양물 내 3.8 g/L 농도의 폴록사머-188이, 크기가 500 ㎛인 드릴드 기공을 가진 스파저를 사용하여 수행된 관류 세포 배양물 진행에서 생존가능한 세포 밀도를 유지시킬 수 있었으며, 4.8 g/L 농도의 폴록사머-

188이, 크기가 200 ㎛인 드릴드 기공을 가진 스파저를 사용하여 수행된 관류 세포 배양물 진행에서 생존가능한 세포 밀도를 유지시킬 수 있었고, 5.8 g/L 농도의 폴록사머-188이, 크기가 20 ㎛인 신터드 기공을 가진 스파저를 사용하여 수행된 관류 세포 배양물 진행에서 생존가능한 세포 밀도를 유지시킬 수 있었음을 보여준다(도 7).

[0150] 데이터는 또한, 3.8 g/L 폴록사머-188 및 크기가 500 ㎛인 드릴드 기공을 가진 스파저를 사용하여 수행된 관류 세포 배양물 진행, 4.8 g/L 폴록사머-188 및 크기가 200 ㎛인 드릴드 기공을 가진 스파저를 사용하여 수행된 관류 세포 배양물 진행, 및 5.8 g/L 폴록사머-188 및 크기가 20 ㎛인 신터드 기공을 가진 스파저를 사용하여 수행된 관류 세포 배양물 진행에 대해, 유사한 비성장속도(도 8), 비 락토스 데하이드로게나제 생성 속도(도 9 및 도 11), 생존가능한 세포의 백분율(도 10), 부피 생산 속도(도 12) 및 호기성 글루코스 소모율(도 13)이 달성되었음을 보여준다.

[0151] 데이터는 또한, 폴록사머-188이 배양물에서 1.8 g/L 초과의 농도로 존재할 때, 60 x 10^6개 세포/mL의 생존가능한 세포 밀도를 달성할 수 있음을 보여준다. 예를 들어, 60 x 10^6개 세포/mL 초과의 생존가능한 세포 밀도는: 배양물에서 2.8 g/L 폴록사머-188을 사용함으로써 크기가 1 ㎜인 드릴드 기공을 가진 스파저를 사용하는 관류 세포 배양물 진행, 배양물에서 3.8 g/L 폴록사머-188을 사용함으로써 크기가 500 ㎛인 드릴드 기공을 가진 스파저를 사용하는 관류 세포 배양물 진행, 배양물에서 4.8 g/L 폴록사머-188을 사용함으로써 크기가 200 ㎛인 드릴드 기공을 가진 스파저를 사용하는 관류 세포 배양물 진행, 배양물에서 5.8 g/L 폴록사머-188을 사용함으로써 크기가 20 ㎛인 신터드 기공을 가진 스파저를 사용하는 관류 세포 배양물 진행에서 달성될 수 있다. 데이터는, 기공 크기가 더 작을수록, 건강한 배양물을 유지시키는 데 더 많은 폴록사머-188이 필요함을 가리킨다.

[0152] **실시예 4. 관류 배양물 세포 성장에 미치는 스파저 기공 유형, 기공 크기, 및 소포제 : 폴록사머-188 비율의 효과**

[0153] 부가적인 세트의 실험을 수행하여, 상이한 기공 유형 및 크기들을 가진 스파저, 및 배양물 내 상이한 소포제 : 폴록사머-188 비율들을 사용한 관류 배양물에서 정상-상태 세포 성장을 확인하였다(하기 표 1에 나타나 있음).

[0154] 표 1의 데이터는, 더 작은 기공 크기는, 폼의 발생을 경감시키기 위해 더 많은 소포제-c가 배양물에 첨가되어야 하는 것을 필요로 하며, 스파지 속도가 증가함에 따라 부가적인 소포제-c가 필요하고, 소포제-c : 폴록사머-188의 최적의 비율이 0% 내지 5% 미만(예, 약 1% 내지 약 3%)일 수 있음을 보여준다.

[0155] [표 1]

[0156] **시험된 관류 배양물에 대해 달성된 정상 상태 생존가능한 세포 밀도**

Exp	스파저 유형	정상-상태 생존가능한 세포 밀도 ($10e^6$개 세포/mL)	부가적인 플루로닉 (g/L) (CD-CHO = 1.8 g/L)	소포제 첨가 속도 (ppm/일)	소포제 첨가 : 총 플루로닉 비율 (%/일)	스파지 속도 (기체 부피/분 : 반응기 부피)	소포제 첨가 : 스파지 속도 비율 (ppm)	관류 속도 (RV/일)
2	20 μm 드릴드 정공	60	4	43	0.7	0.03	1	4
1	100 μm 신터드	110	4	160	2.8	0.43	0.26	6
2	200 μm 드릴드 정공	60	3	77-116	1.6 - 2.4	0.16 - 0.19	0.33 - 0.42	4
2	500 μm 드릴드 정공	60	2	69	1.8	0.15	0.32	4
1	1 mm 드릴드 정공	65	1	64	2.3	0.69	0.06	4

[0157]

[0158] **실시예 5. 유가 세포 배양물 진행에서 세포 성장에 미치는 소포제-C : 폴록사머-188 비율의 효과**

[0159] 본 세트의 실험을 수행하여, 0%의 소포제-c : 폴록사머-188 비율, 5.6%의 소포제-c : 폴록사머-188 비율, 11.1%의 소포제-c : 폴록사머-188 비율, 27.8%의 소포제-c : 폴록사머-188 비율, 또는 55.6%의 소포제-c : 폴록사머-188 비율을 함유하는 CD-CHO 액체 배지를 사용하는 유가 진탕 플라스크 세포 배양물 진행들에서 세포 성장에 미치는 소포제-c : 폴록사머-188의 효과를 시험하였다. 진탕 플라스크 세포 배양물을 차단(baffle)하여, 방울들을 수동적으로 발생시켜, 생물반응기를 시뮬레이션하였다. 각각의 세포 배양물 진행에서 생존가능한 세포 밀도 및 비 락테이트 데하이드로게나제 생성 속도를 잘 알려진 방법을 사용하여 배양 기간에 걸쳐 매일 확인하였다.

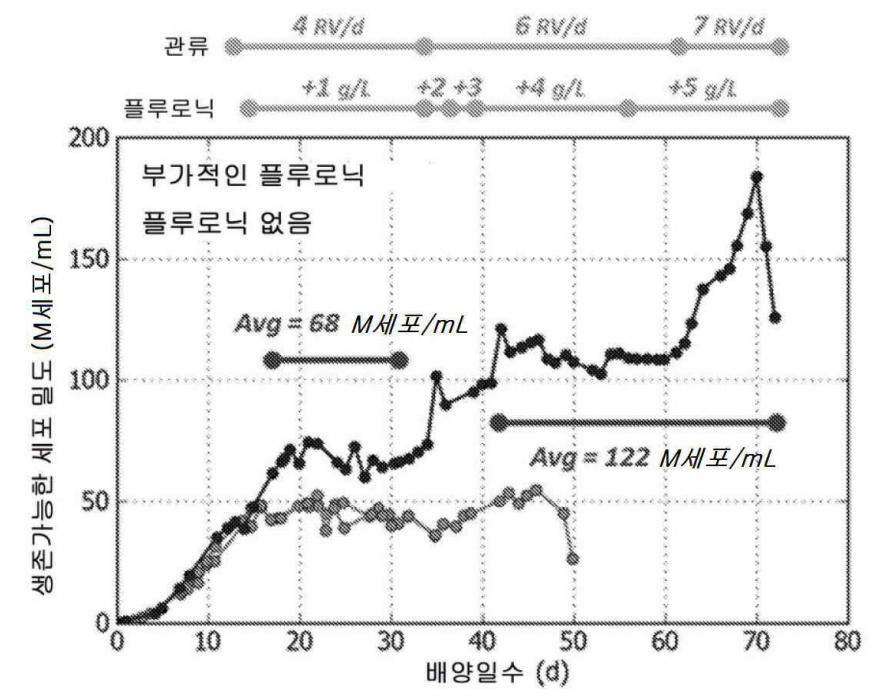
[0160] 데이터는, 더 낮은 소포제-c : 폴록사머-188 비율이 개선된 생존가능한 세포 밀도(도 14) 및 더 낮은 비 락테이트 데하이드로게나제 생성 속도(도 15)를 나타냄을 보여준다. 나아가, 이들 데이터는, 배양물 내에서 소포제-c : 폴록사머-188의 최적의 비율이 0% 내지 약 5% 미만(예, 약 1% 내지 약 3%)임을 제시한다.

[0161] **다른 실시형태**

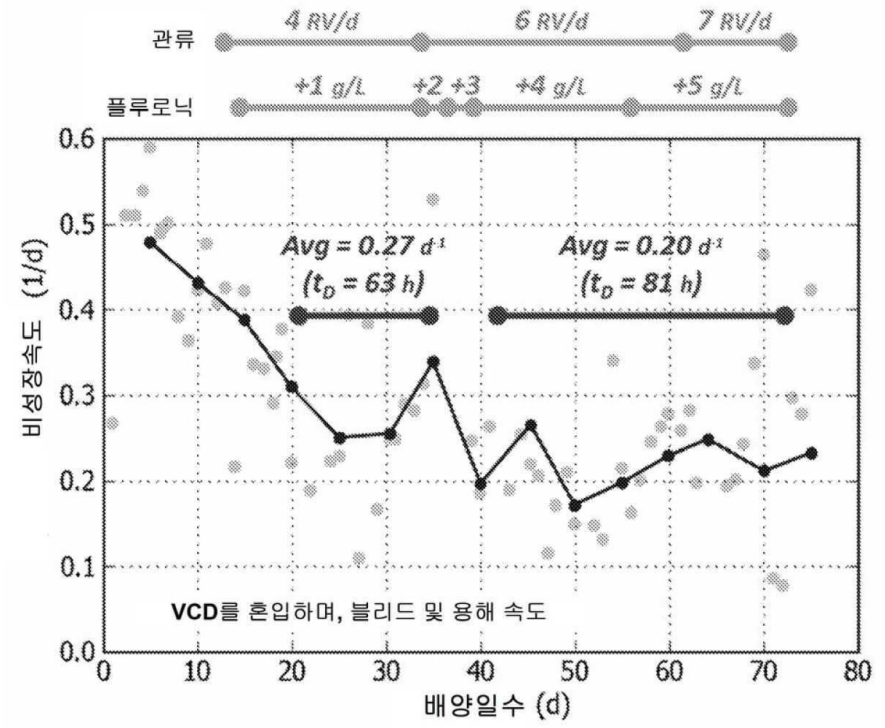
[0162] 본 발명이 이의 상세한 설명과 함께 기재되어 있긴 하지만, 상기 상세한 설명은 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 이의 범위를 제한하려는 것이 아니며, 본 발명의 범위는 첨부된 청구항의 범위에 의해 한정됨을 이해해야 한다. 다른 양태, 이점 및 변형들은 하기 청구항의 범위 내에 포함된다.

도면

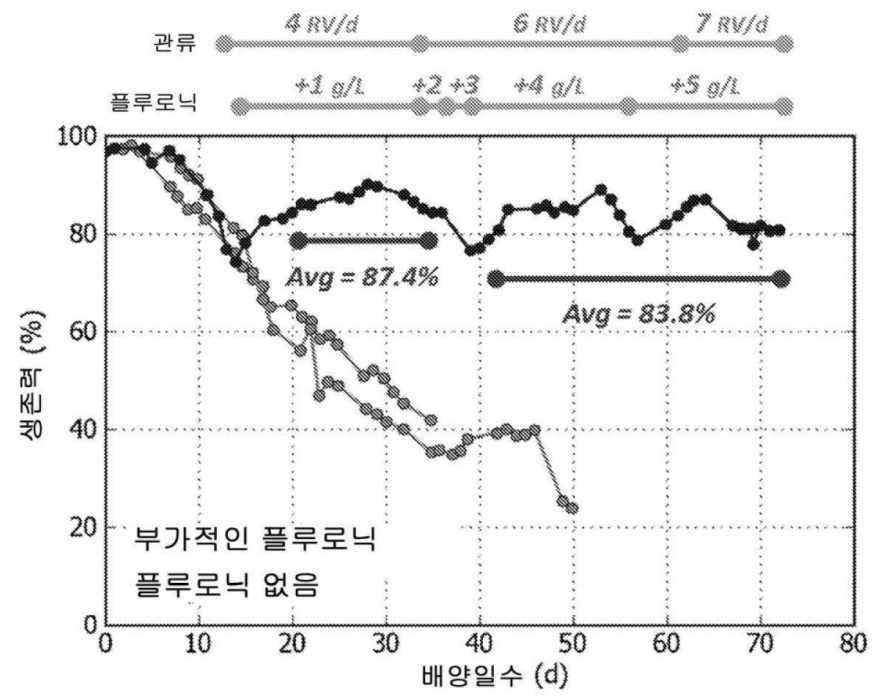
도면1


관류
4 RV/d
6 RV/d
7 RV/d
플루로닉
+1 g/L
+2 +3
+4 g/L
+5 g/L
부가적인 플루로닉
플루로닉 없음
Avg = 68 M세포/mL
Avg = 122 M세포/mL
생존가능한 세포 밀도 (M세포/mL)
배양일수 (d)

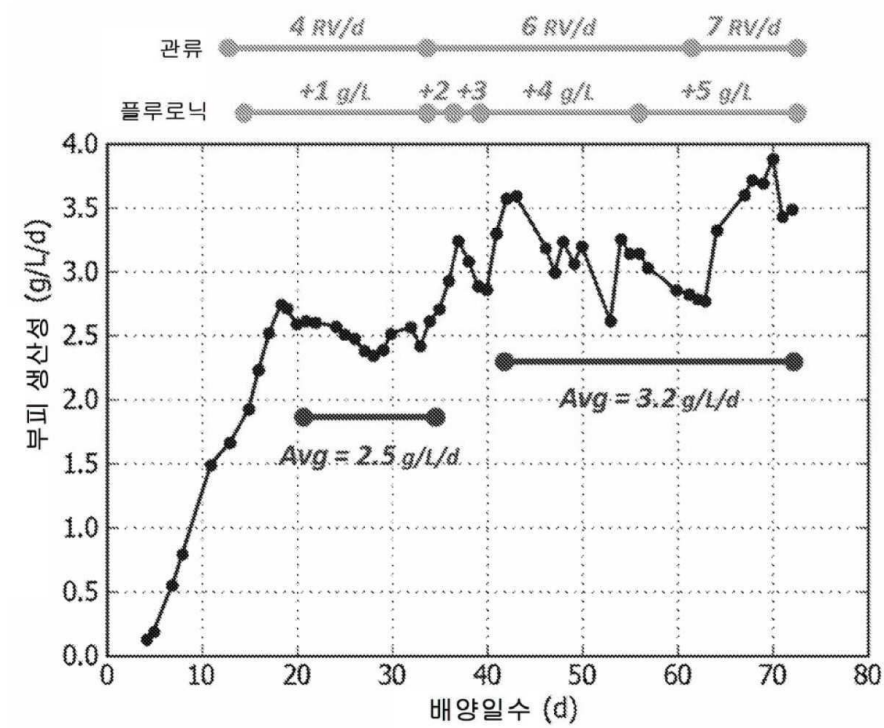
도면2


관류
4 RV/d
6 RV/d
7 RV/d
플루로닉
+1 g/L
+2 +3
+4 g/L
+5 g/L
Avg = 0.27 d⁻¹
(tD = 63 h)
Avg = 0.20 d⁻¹
(tD = 81 h)
VCD를 혼입하며, 블리드 및 용해 속도
비성장속도 (1/d)
배양일수 (d)

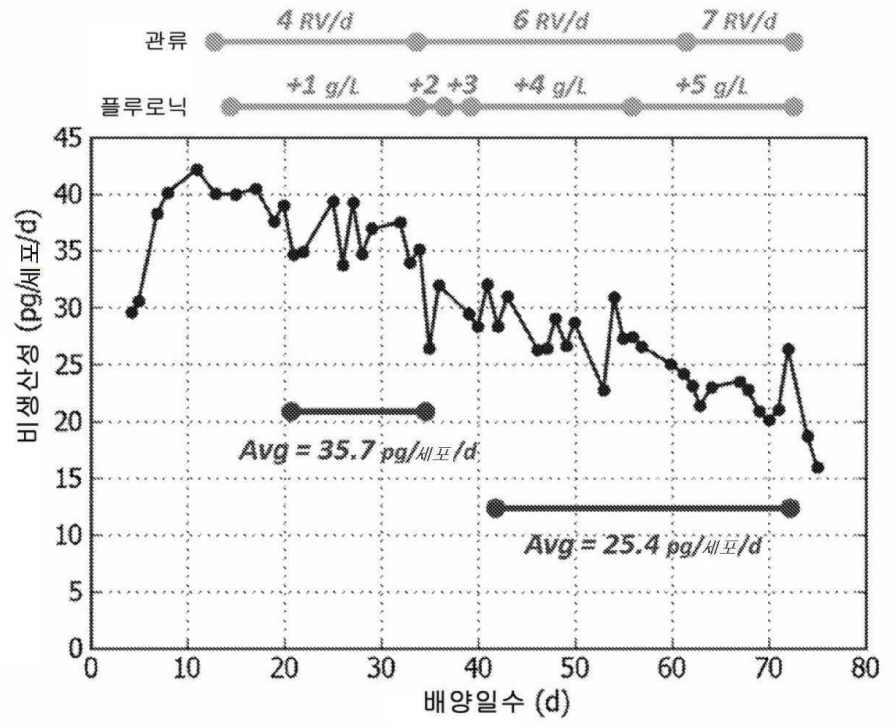
도면3


관류
4 RV/d
6 RV/d
7 RV/d
플루로닉
+1 g/L
+2 +3
+4 g/L
+5 g/L
생존력 (%)
Avg = 87.4%
Avg = 83.8%
부가적인 플루로닉
플루로닉 없음
배양일수 (d)

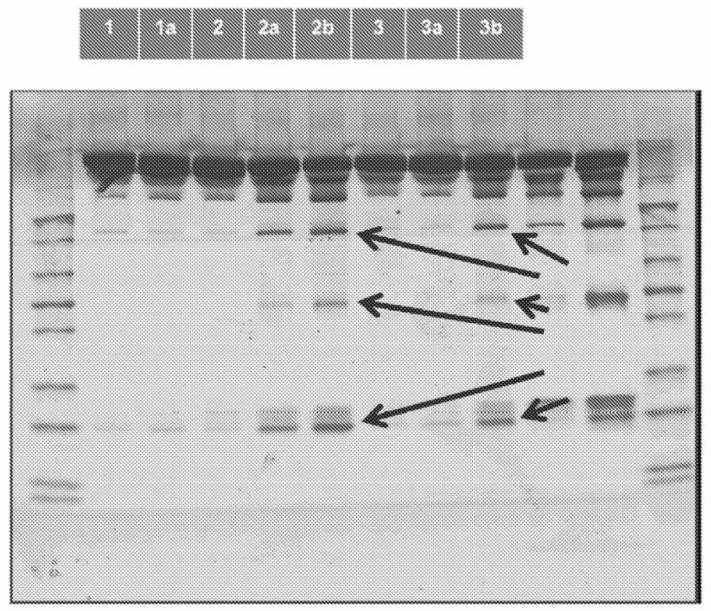
도면4


관류
4 RV/d
6 RV/d
7 RV/d
플루로닉
+1 g/L
+2 +3
+4 g/L
+5 g/L
부피 생산성 (g/L/d)
Avg = 3.2 g/L/d
Avg = 2.5 g/L/d
배양일수 (d)

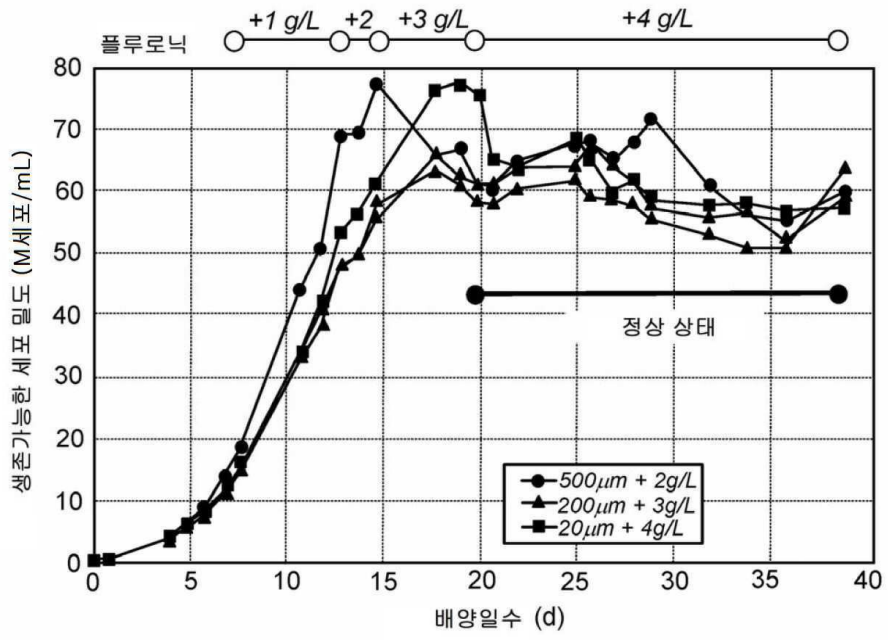
도면5


관류
4 RV/d
6 RV/d
7 RV/d
플루로닉
+1 g/L
+2 +3
+4 g/L
+5 g/L
비생산성 (pg/세포/d)
배양일수 (d)
Avg = 35.7 pg/세포/d
Avg = 25.4 pg/세포/d

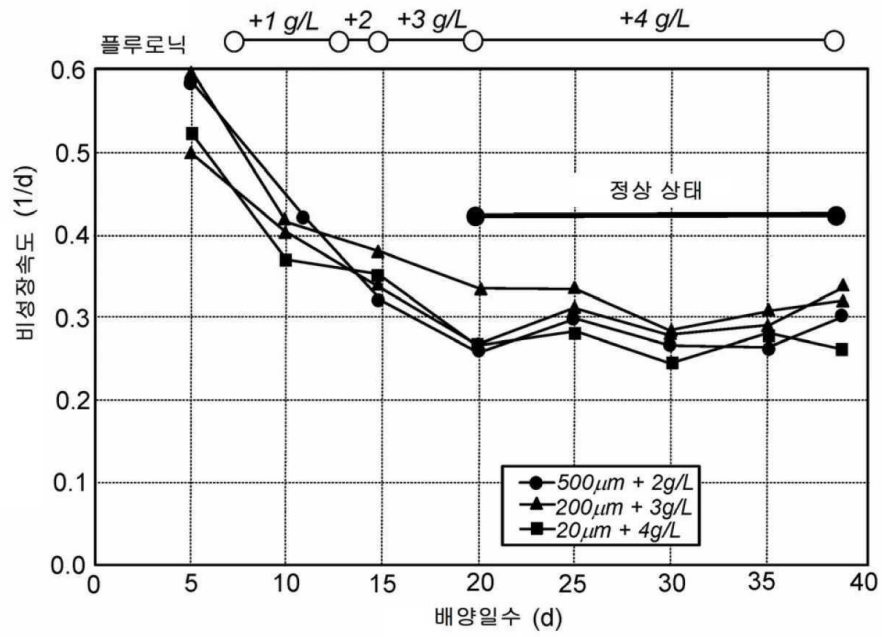
도면6


1
1a
2
2a
2b
3
3a
3b

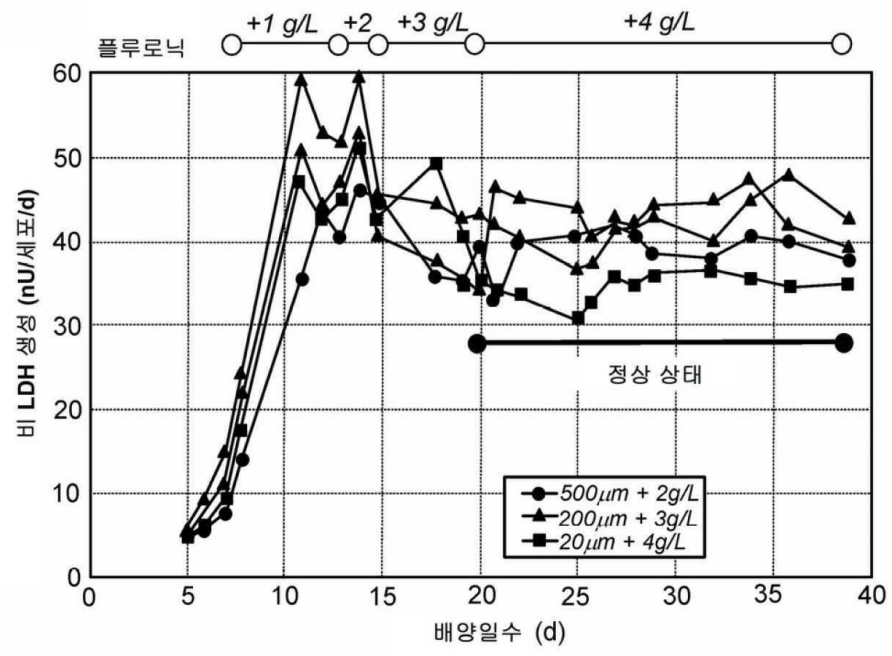
도면7


플루로닉
+1 g/L
+2
+3 g/L
+4 g/L
생존가능한 세포 밀도 (M세포/mL)
배양일수 (d)
정상 상태
500㎛ + 2g/L
200㎛ + 3g/L
20㎛ + 4g/L

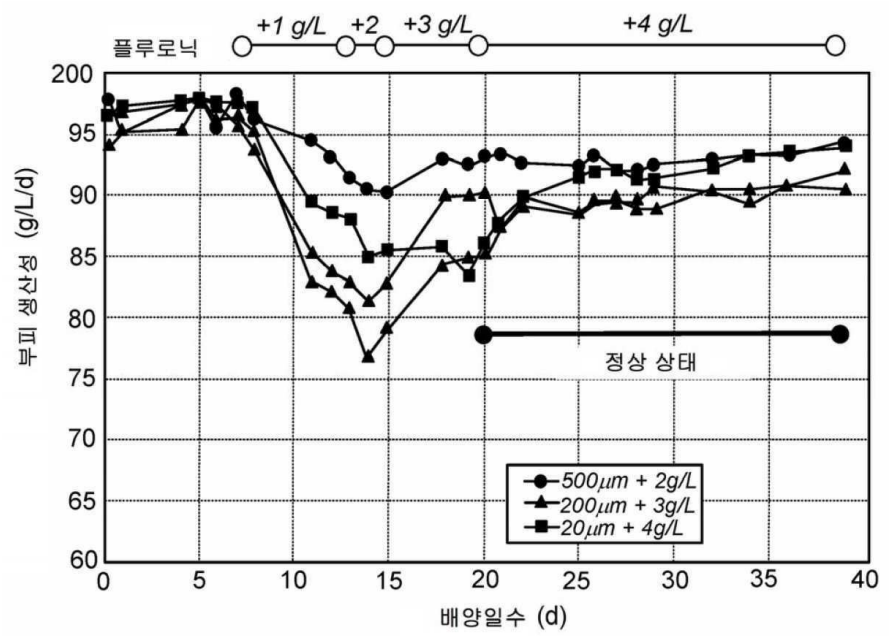
도면8


플루로닉
+1 g/L
+2
+3 g/L
+4 g/L
비성장속도 (1/d)
배양일수 (d)
정상 상태
500㎛ + 2g/L
200㎛ + 3g/L
20㎛ + 4g/L

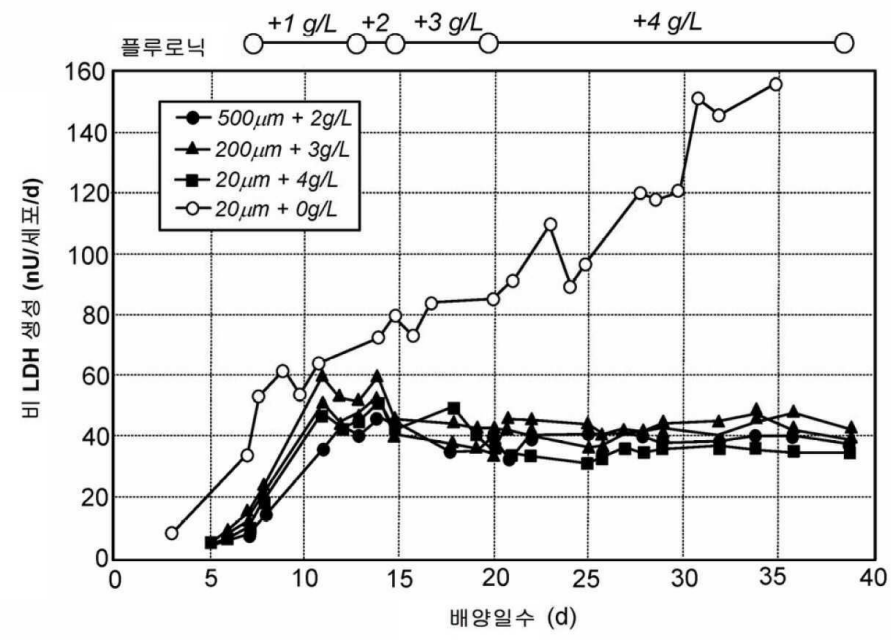
도면9


플루로닉
+1 g/L
+2
+3 g/L
+4 g/L
비 LDH 생성 (nU/세포/d)
배양일수 (d)
정상 상태
500㎛ + 2g/L
200㎛ + 3g/L
20㎛ + 4g/L

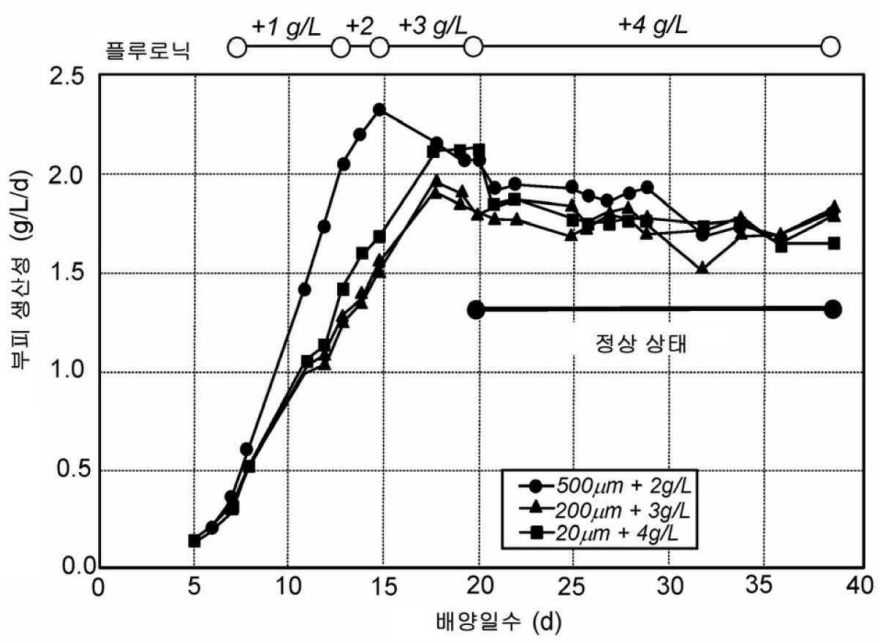
도면10


플루로닉
+1 g/L
+2
+3 g/L
+4 g/L
부피 생산성 (g/L/d)
배양일수 (d)
정상 상태
500㎛ + 2g/L
200㎛ + 3g/L
20㎛ + 4g/L

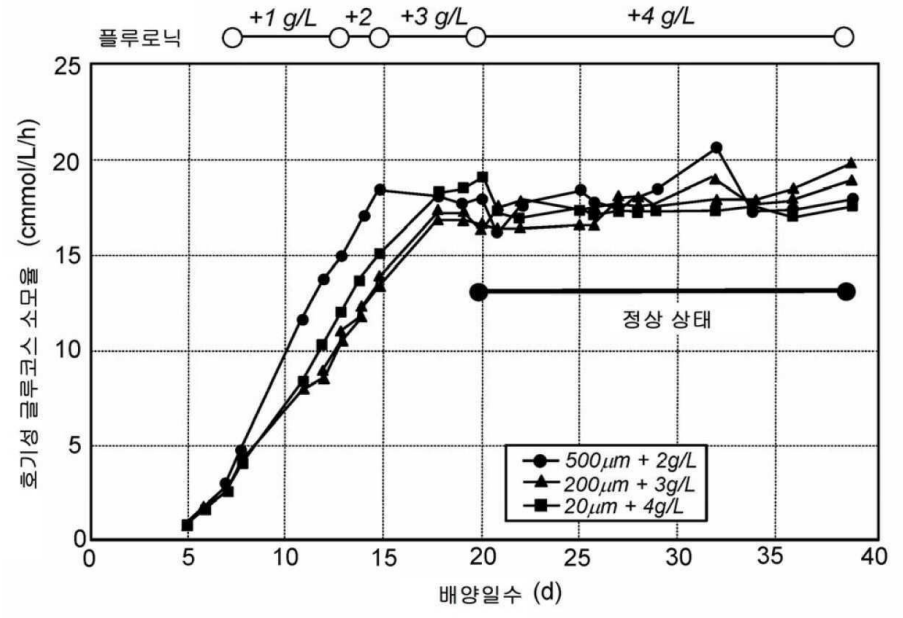
도면11


플루로닉
+1 g/L
+2
+3 g/L
+4 g/L
500㎛ + 2g/L
200㎛ + 3g/L
20㎛ + 4g/L
20㎛ + 0g/L
비 LDH 생성 (nU/세포/d)
배양일수 (d)

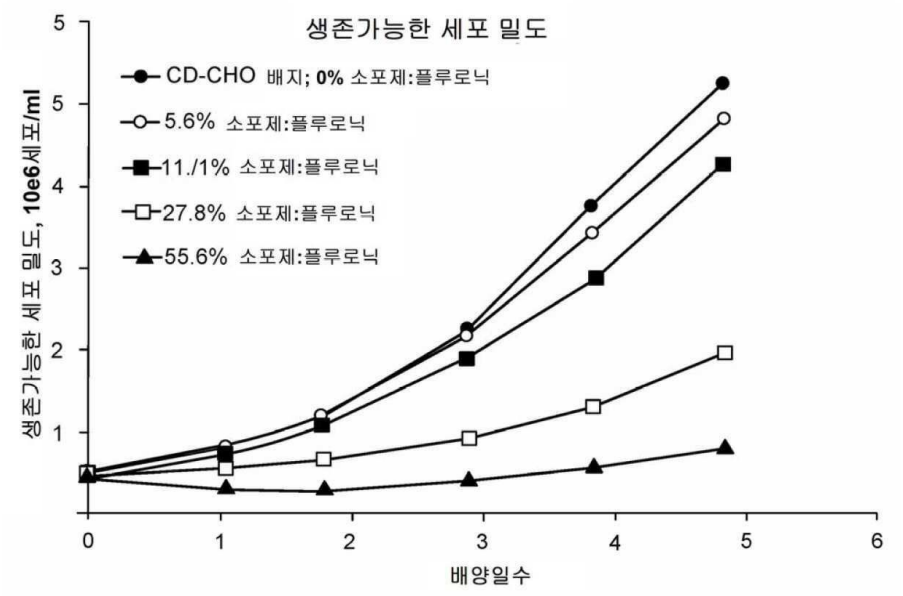
도면12


플루로닉
+1 g/L
+2
+3 g/L
+4 g/L
정상 상태
500㎛ + 2g/L
200㎛ + 3g/L
20㎛ + 4g/L
부피 생산성 (g/L/d)
배양일수 (d)

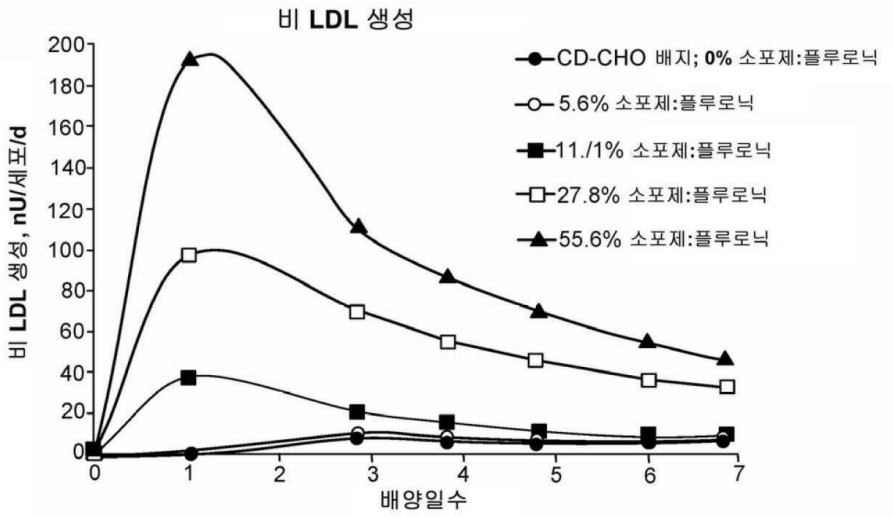
도면13


플루로닉
+1 g/L
+2
+3 g/L
+4 g/L
호기성 글루코스 소모율 (cmmol/L/h)
배양일수 (d)
정상 상태
500㎛ + 2g/L
200㎛ + 3g/L
20㎛ + 4g/L

도면14


생존가능한 세포 밀도
CD-CHO 배지; 0% 소포제:플루로닉
5.6% 소포제:플루로닉
11./1% 소포제:플루로닉
27.8% 소포제:플루로닉
55.6% 소포제:플루로닉
생존가능한 세포 밀도, 10e6세포/ml
배양일수

도면15


비 LDL 생성
비 LDL 생성, nU/세포/d
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
6
7
배양일수
CD-CHO 배지; 0% 소포제:플루로닉
5.6% 소포제:플루로닉
11./1% 소포제:플루로닉
27.8% 소포제:플루로닉
55.6% 소포제:플루로닉