



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202305109 A

(43)公開日：中華民國 112 (2023) 年 02 月 01 日

(21)申請案號：111114321

(22)申請日：中華民國 111 (2022) 年 04 月 14 日

(51)Int. Cl. : C12M3/00 (2006.01) C12M1/00 (2006.01)  
C12N5/00 (2006.01)

(30)優先權：2021/04/14 美國 63/174,900

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

(72)發明人：巴瑞特 尚恩 BARRETT, SHAWN L. (CA)；布德 查爾斯 BUDDE, CHARLES  
(US)；包爾斯 戴瑞 POWERS, DARYL (US)

(74)代理人：陳彥希；何愛文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：120 項 圖式數：11 共 86 頁

(54)名稱

灌注培養哺乳類動物細胞的方法

(57)摘要

本文提供一種灌注培養哺乳類動物細胞之方法，其包括：提供一個容器，其含有哺乳類動物細胞，係安置在具有滲透壓約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg 之第一液體培養基；在約 32°C 至約 39°C 下培養該哺乳類動物細胞一段時間；及在這段時間期間，連續或定期移除第一體積之第一液體培養基，並對該第一液體培養基添加第二體積之第二液體培養基，其中第一與第二體積為約相等的，且容器中第一及第二液體培養基之滲透壓在這段時間中，係維持在約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg。

Provided herein are methods of perfusion culturing a mammalian cell that include: providing a vessel containing a mammalian cell disposed in a first liquid culture medium having an osmolality of about 270 mOsm/kg to about 380 mOsm/kg; incubating the mammalian cell for a period of time at about 32 °C to about 39 °C; and during the period of time, continuously or periodically removing a first volume of the first liquid culture medium and adding to the first liquid culture medium a second volume of a second liquid culture medium, wherein the first and second volumes are about equal and the osmolality of the first and second liquid culture medium in the vessel is maintained at about 270 mOsm/kg to about 380 mOsm/kg over the period of time.

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】灌注培養哺乳類動物細胞的方法

【英文發明名稱】METHODS OF PERFUSION CULTURING A MAMMALIAN CELL

### 【中文】

本文提供一種灌注培養哺乳類動物細胞之方法，其包括：提供一個容器，其含有哺乳類動物細胞，係安置在具有滲透壓約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg 之第一液體培養基；在約 32°C 至約 39°C 下培養該哺乳類動物細胞一段時間；及在這段時間期間，連續或定期移除第一體積之第一液體培養基，並對該第一液體培養基添加第二體積之第二液體培養基，其中第一與第二體積為約相等的，且容器中第一及第二液體培養基之滲透壓在這段時間中，係維持在約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg。

### 【英文】

Provided herein are methods of perfusion culturing a mammalian cell that include: providing a vessel containing a mammalian cell disposed in a first liquid culture medium having an osmolality of about 270 mOsm/kg to about 380 mOsm/kg; incubating the mammalian cell for a period of time at about 32 °C to about 39 °C; and during the period of time, continuously or periodically removing a first volume of the first liquid culture medium and adding to the first liquid culture medium a second volume of a second liquid culture medium, wherein the first and second volumes are about equal and the osmolality of the first and second liquid culture medium in the vessel is maintained at about 270 mOsm/kg to about 380 mOsm/kg over the period of time.

【指定代表圖】 無

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】灌注培養哺乳類動物細胞的方法

【英文發明名稱】METHODS OF PERFUSION CULTURING A MAMMALIAN CELL

### 【技術領域】

【0001】 相關申請案之交叉參考文獻

【0002】 本申請案主張 2021 年 4 月 14 日申請之美國臨時專利申請案序號 63/174,900 之優先權；其完整內容已以引用方式併入本文中。

【0003】 本發明係有關一種重組蛋白質之生物技術及製造方法。

### 【先前技術】

【0004】 包含編碼重組蛋白質之核酸之哺乳類動物細胞經常用於生產具有治療或商業重要性之蛋白質。在目前多種不同產品管道的環境中，越來越多生技公司致力於發展創新的解決方案，以高度彈性及有效成本來製造治療性蛋白質藥物。

### 【發明內容】

【0005】 本發明至少一部份基於發現一種灌注培養哺乳類動物細胞之方法，其包括：提供一個容器，其包含哺乳類動物細胞，哺乳類動物細胞係安置在具有滲透壓約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg 之第一液體培養基中；在約 32°C 至約 39°C 下培養哺乳類動物細胞一段時間；及在這段時間期間，連續或定期移除第一體積之第一液體培養基，並對第一液體培養基添加第二體積之第二液體培養基，其中第一與第二體積為約相等的，且容器中第一液體培養基之滲透壓及第二液體培養基之滲透壓隨著這段時間的推移，係維持在約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg，其相較於隨著這段時間的推移，滲透

壓未維持在約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg 之其他灌注細胞培養方法，能夠達成更改善之培養物生長及健康。

**【0006】** 本文提供一種灌注培養哺乳類動物細胞之方法，其包括：提供一個容器，其包含哺乳類動物細胞，哺乳類動物細胞係安置在具有滲透壓約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg(例如：其中任何子範圍)之第一液體培養基中；在約 32°C 至約 39°C(例如：其中任何子範圍)下培養哺乳類動物細胞一段時間；及在這段時間期間，連續或定期移除第一體積之第一液體培養基及對第一液體培養基添加第二體積之第二液體培養基，其中第一與第二體積為約相等的，且容器中第一及第二液體培養基之滲透壓隨著這段時間的推移，係維持在約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg (例如：其中任何子範圍)。

**【0007】** 在一些實施例中，第一液體培養基具有之滲透壓為約 270 mOsm/kg 至約 320 mOsm/kg。在一些實施例中，第二液體培養基包含超過 8 g/L 之泊洛沙姆(poloxamer)。在一些實施例中，第二液體培養基包含超過 10 g/L 之泊洛沙姆。在一些實施例中，第二液體培養基包含超過 12 g/L 之泊洛沙姆。在本文所說明任何方法之一些實施例中，泊洛沙姆為 Pluronic F68。在本文所說明任何方法之一些實施例中，第二液體培養基具有之 pH 值為約 6.8 至約 7.1。在本文所說明任何方法之一些實施例中，第二液體培養基包括氯化鈉。在本文所說明任何方法之一些實施例中，第二液體培養基具有之滲透壓為約 800 mOsm/kg 至約 2,500 mOsm/kg。在本文所說明任何方法之一些實施例中，第二液體培養基具有之滲透壓為約 1,200 mOsm/kg 至約 1,800 mOsm/kg。在本文所說明任何方法之一些實施例中，隨著這段時間的推移，提高所添加的第二液體培養基之第二體積。在本文所說明任何方法之一些實施例中，隨著這段時間的推移，依據活細胞密度提高所添加的第二液體培養基之第二體積。在本文所說明任何方法之一些實施例中，容器中第一及第二液體培養基滲透壓之維持包括在這段時間期間的某些時間點，調整第二液體培養基之流速。

【0008】 在一些實施例中，調整步驟包括在這段時間期間的某些時間點，提高第二液體培養基之流速。

【0009】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，該方法包括在這段時間期間的某些時間點，調整容器中第一及第二液體培養基之 Ph 值及  $pCO_2$  其中之一或二者。

【0010】 在一些實施例中，調整步驟包括在這段時間期間的某些時間點，降低第二液體培養基之流速。

【0011】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，該方法進一步包括隨著這段時間的推移，提高容器中第一及第二液體培養基之  $pCO_2$  及 pH 值。

【0012】 在一些實施例中，隨著這段時間的推移，依據活細胞密度提高容器中第一及第二液體培養基之  $pCO_2$  及 pH 值。

【0013】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，在這段時間期間，第一及第二液體培養基之活細胞密度達到超過  $60 \times 10^6$  個細胞/mL。在一些實施例中，在這段時間期間，第一及第二液體培養基之活細胞密度達到超過  $100 \times 10^6$  個細胞/mL。在一些實施例中，在這段時間期間，第一及第二液體培養基之活細胞密度達到超過  $120 \times 10^6$  個細胞/mL。

【0014】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，該方法進一步包括在這段時間期間，監測容器中第一及第二液體培養基之滲透壓。

【0015】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，在這段時間期間，第一體積之第一液體培養基之移除及第二體積之第二液體培養基之添加係同時執行的。在本文所說明任何方法之一些實施例中，在這段時間期間，第一體積之第一液體培養基之移除及第二體積之第二液體培養基之添加係連續執行的。在本文所說明任何方法之一些實施例中，隨著這段時間的推移，第一體積之第一液體培養基之移除及第二體積之第二液體培養基之添加係定期執行的。

【0016】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，該方法進一步包括在這段時間期間，定期添加第三體積之水溶液至容器中第一及第二液體培養基，其中第一體積與第二及第三份體積之總和為約相等的，且容器中第一、第二、及第三液體培養基之滲透壓在這段時間中，係維持在約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg。

【0017】 在一些實施例中，水溶液為鹽溶液。在一些實施例中，鹽溶液為氯化鈉溶液或氯化鉀溶液。

【0018】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，在這段時間期間，第一體積之第一液體培養基之移除、第二體積之第二液體培養基之添加、及第三體積之添加係同時執行的。在本文所說明任何方法之一些實施例中，在這段時間期間，第一體積之第一液體培養基之移除、第二體積之第二液體培養基之添加、及第三體積之添加係連續執行的。在本文所說明任何方法之一些實施例中，隨著這段時間的推移，第一體積之第一液體培養基之移除、第二體積之第二液體培養基之添加、及第三體積之添加係定期執行的。

【0019】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，該方法進一步包括連續或定期在第一液體培養基中添加第三體積之第三液體培養基，其中第一體積與第二及第三份體積之總和為約相等的，且容器中第一、第二、及第三液體培養基之滲透壓在這段時間中，係維持在約 270 mOsm/mg 至約 380 mOsm/kg。

【0020】 在一些實施例中，第三液體培養基具有之滲透壓為約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg。在本文所說明任何方法之一些實施例中，容器中第一、第二、及第三液體培養基滲透壓之維持包括在這段時間期間，調整第二液體培養基之流速。在本文所說明任何方法之一些實施例中，調整步驟包括在這段時間期間的某些時間點，提高第二液體培養基之流速。在本文所說明任何方法之在些實施例中，調整步驟包括在這段時間期間的某些時間點，降低第二液體培養基之流速。

【0021】 在一些實施例中，第三液體培養基具有之滲透壓為約 10 mOsm/kg 至約 270 mOsm/kg。在一些實施例中，第三液體培養基具有之滲透壓為約 50 mOsm/kg 至約 200 mOsm/kg。

【0022】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，容器中第一、第二、及第三液體培養基滲透壓之維持包括在這段時間期間，調整第三液體培養基之流速。

【0023】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，調整步驟包括在這段時間期間的某些時間點，提高第三液體培養基之流速。

【0024】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，調整步驟包括在這段時間期間的某些時間點，降低第三液體培養基之流速。

【0025】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，該方法進一步包括在這段時間期間的某些時間點，調整容器中第一、第二、及第三液體培養基之 pH 值及  $pCO_2$  其中之一或二者。在一些實施例中，該方法包括在這段時間期間的某些時間點，提高容器中第一、第二、及第三液體培養基之  $pCO_2$  及 pH 值。在一些實施例中，在這段時間期間的某些時間點，依據活細胞密度提高容器中第一、第二、及第三液體培養基之  $pCO_2$  及 pH 值。

【0026】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，在這段時間期間，第一、第二、及第三液體培養基中之活細胞密度達到超過  $60 \times 10^6$  個細胞/mL。在一些實施例中，在這段時間期間，第一、第二、及第三液體培養基中之活細胞密度達到超過  $100 \times 10^6$  個細胞/mL。在一些實施例中，在這段時間期間，第一、第二、及第三液體培養基中之活細胞密度達到超過  $120 \times 10^6$  個細胞/mL。

【0027】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，該方法進一步包括在這段時間期間，監測容器中第一、第二、及第三液體培養基之滲透壓。在本文所說明任何方法之一些實施例中，在這段時間期間，第一體積之第一液體培養基之移除、第二體積之第二液體培養基之添加、及第三體積之添加係同

時執行的。在本文所說明任何方法之一些實施例中，在這段時間期間，第一體積之第一液體培養基之移除、第二體積之第二液體培養基之添加、及第三體積之添加係連續執行的。在本文所說明任何方法之一些實施例中，在這段時間期間，第一體積之第一液體培養基之移除、第二體積之第二液體培養基之添加、及第三體積之添加係定期執行的。

**【0028】** 在本文所說明任何方法之一些實施例中，哺乳類動物細胞為 CHO 細胞。

**【0029】** 在本文所說明任何方法之一些實施例中，容器為生物反應器。在一些實施例中，生物反應器為灌注生物反應器。

**【0030】** 本文亦提供一種產生重組蛋白質之方法，其包括：提供一個容器，其包含含有編碼重組蛋白質之核酸之哺乳類動物細胞，哺乳類動物細胞係安置在具有滲透壓約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg(例如：其中任何子範圍)之第一液體培養基中；在約 32°C 至約 39°C(例如：其中任何子範圍)下培養哺乳類動物細胞一段時間；及在這段時間期間，連續或定期移除第一體積之第一液體培養基，及對第一液體培養基添加第二體積之第二液體培養基，其中第一與第二體積為約相等的，且容器中第一及第二液體培養基之滲透壓在這段時間中，係維持在約 270 mOsm/kg(例如：其中任何子範圍)至約 380 mOsm/kg；及從哺乳類動物細胞或從第一及/或第二液體培養基中回收重組蛋白質。

**【0031】** 在一些實施例中，第一液體培養基具有之滲透壓為約 270 mOsm/kg 至約 320 mOsm/kg。在一些實施例中，第二液體培養基包含超過 8 g/L 之泊洛沙姆。在一些實施例中，第二液體培養基包含超過 10 g/L 之泊洛沙姆。在一些實施例中，第二液體培養基包含超過 12 g/L 之泊洛沙姆。在本文所說明任何方法之一些實施例中，泊洛沙姆為 Pluronic F68。在本文所說明任何方法之一些實施例中，第二液體培養基具有之 pH 值為約 6.8 至約 7.1。在本文所說明任何方法之一些實施例中，第二液體培養基包括氯化鈉。

【0032】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，第二液體培養基具有之滲透壓為約 800 mOsm/kg 至約 2,500 mOsm/kg。在一些實施例中，第二液體培養基具有之滲透壓為約 1,200 mOsm/kg 至約 1,800 mOsm/kg。在本文所說明任何方法之一些實施例中，隨著這段時間的推移，提高所添加的第二體積之第二液體培養基。在一些實施例中，隨著這段時間的推移，依據活細胞密度提高所添加的第二液體培養基之第二體積。

【0033】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，容器中第一及第二液體培養基滲透壓之維持包括在這段時間期間的某些時間點，調整第二液體培養基之流速。在一些實施例中，調整步驟包括在這段時間期間的某些時間點，提高第二液體培養基之流速。在一些實施例中，該方法進一步包括在這段時間期間的某些時間點，調整容器中第一及第二液體培養基之 pH 值及  $pCO_2$  其中之一或二者。在一些實施例中，調整步驟包括在這段時間期間的某些時間點，降低第二液體培養基之流速。

【0034】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，該方法進一步包括隨著這段時間的推移，提高容器中第一及第二液體培養基之  $pCO_2$  及 pH 值。在一些實施例中，隨著這段時間的推移，依據活細胞密度提高容器中第一及第二液體培養基之  $pCO_2$  及 pH 值。

【0035】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，在這段時間期間，第一及第二液體培養基之活細胞密度達到超過  $60 \times 10^6$  個細胞/mL。在一些實施例中，在這段時間期間，第一及第二液體培養基之活細胞密度達到超過  $100 \times 10^6$  個細胞/mL。在一些實施例中，在這段時間期間，第一及第二液體培養基之活細胞密度達到超過  $120 \times 10^6$  個細胞/mL。

【0036】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，該方法進一步包括在這段時間期間，監測容器中第一及第二液體培養基之滲透壓。在本文所說明任何方法之一些實施例中，在這段時間期間，第一體積之第一液體培養基之移除及第二體積之第二液體培養基之添加係同時執行的。在本文所說明任何

方法之一些實施例中，在這段時間期間，第一體積之第一液體培養基之移除及第二體積之第二液體培養基之添加係連續執行的。在本文所說明任何方法之一些實施例中，隨著這段時間的推移，第一體積之第一液體培養基之移除及第二體積之第二液體培養基之添加係定期執行的。

**【0037】** 在本文所說明任何方法之一些實施例中，重組蛋白質係分泌至第一及/或第二液體培養基。在一些實施例中，從第一及/或第二液體培養基中回收重組蛋白質。

**【0038】** 在本文所說明任何方法之一些實施例中，該方法進一步包括在這段時間期間，連續或定期添加第三體積之水溶液至容器中第一及第二液體培養基中，其中第一體積與第二及第三體積之總和為約相等的，且容器中第一、第二、及第三液體培養基之滲透壓在這段時間中，係維持在約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg。在一些實施例中，水溶液為鹽溶液。在一些實施例中，鹽溶液為氯化鈉溶液或氯化鉀溶液。

**【0039】** 在本文所說明任何方法之一些實施例中，在這段時間期間，第一體積之第一液體培養基之移除、第二體積之第二液體培養基之添加、及第三體積之添加係同時執行的。在本文所說明任何方法之一些實施例中，在這段時間期間，第一體積之第一液體培養基之移除、第二體積之第二液體培養基之添加、及第三體積之添加係連續執行的。在本文所說明任何方法之一些實施例中，隨著這段時間的推移，第一體積之第一液體培養基之移除、第二體積之第二液體培養基之添加、及第三體積之添加係定期執行的。

**【0040】** 在本文所說明任何方法之一些實施例中，該方法進一步包括連續或定期在第一液體培養基中添加第三體積之第三液體培養基，其中第一體積與第二及第三體積之總和為約相等的，且容器中第一、第二、及第三液體培養基之滲透壓在這段時間中，係維持在約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg。

**【0041】** 在一些實施例中，第三液體培養基具有之滲透壓為約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg。在本文所說明任何方法之一些實施例中，容器

中第一、第二、及第三液體培養基滲透壓之維持包括在這段時間期間，調整第二液體培養基之流速。在本文所說明任何方法之一些實施例中，調整步驟包括在這段時間期間的某些時間點，提高第二液體培養基之流速。在本文所說明任何方法之一些實施例中，調整步驟包括在這段時間期間的某些時間點，降低第二液體培養基之流速。在一些實施例中，第三液體培養基具有之滲透壓為約 0 mOsm/kg 至約 270 mOsm/kg。在一些實施例中，第三液體培養基具有之滲透壓為約 50 mOsm/kg 至約 200 mOsm/kg。在本文所說明任何方法之一些實施例中，容器中第一、第二、及第三液體培養基滲透壓之維持包括在這段時間期間，調整第三液體培養基之流速。在本文所說明任何方法之一些實施例中，調整步驟包括在這段時間期間的某些時間點，提高第三液體培養基之流速。在本文所說明任何方法之一些實施例中，調整步驟包括在這段時間期間的某些時間點，降低第三液體培養基之流速。在本文所說明任何方法之一些實施例中，該方法進一步包括在這段時間期間的某些時間點，調整容器中第一、第二、及第三液體培養基之 pH 值及  $pCO_2$  其中之一或二者。

**【0042】** 在一些實施例中，該方法包括隨著這段時間的推移，提高容器中第一、第二、及第三液體培養基之  $pCO_2$  及 pH 值。在一些實施例中，隨著這段時間的推移，依據活細胞密度，提高容器中第一、第二、及第三液體培養基之  $pCO_2$  及 pH 值。在本文所說明任何方法之一些實施例中，在這段時間期間，第一、第二、及第三液體培養基中之活細胞密度達到超過  $60 \times 10^6$  個細胞/mL。在一些實施例中，在這段時間期間，第一、第二、及第三液體培養基中之活細胞密度達到超過  $100 \times 10^6$  個細胞/mL。在一些實施例中，在這段時間期間，第一、第二、及第三液體培養基中之活細胞密度達到超過  $120 \times 10^6$  個細胞/mL。

**【0043】** 在本文所說明任何方法之一些實施例中，該方法進一步包括在這段時間期間，監測容器中第一、第二、及第三液體培養基之滲透壓。在本文所說明任何方法之一些實施例中，在這段時間期間，第一體積之第一液體

培養基之移除、第二體積之第二液體培養基之添加、及第三體積之添加係同時執行的。在本文所說明任何方法之一些實施例中，在這段時間期間，第一體積之第一液體培養基之移除、第二體積之第二液體培養基之添加、及第三體積之添加係連續執行的。在本文所說明任何方法之一些實施例中，隨著這段時間的推移，第一體積之第一液體培養基之移除、第二體積之第二液體培養基之添加、及第三體積之添加係定期執行的。在本文所說明任何方法之一些實施例中，重組蛋白質係分泌至第一、第二、及/或第三液體培養基。在一些實施例中，從第一、第二、及/或第三液體培養基中回收重組蛋白質。

**【0044】** 在本文所說明任何方法之一些實施例中，哺乳類動物細胞為 CHO 細胞。在本文所說明任何方法之一些實施例中，容器為生物反應器。在一些實施例中，生物反應器為灌注生物反應器。在本文所說明任何方法之一些實施例中，重組蛋白質為免疫球蛋白、酵素、生長因子、蛋白質片段、或工程化蛋白質。在本文所說明任何方法之一些實施例中，從哺乳類動物細胞中回收重組蛋白質。

**【0045】** 在本文所說明任何方法之一些實施例中，該方法進一步包括分離重組蛋白質。在一些實施例中，該方法進一步包括調配經分離之重組蛋白質。

**【0046】** 本文提供一種由本文所說明任何方法產生之重組蛋白質。本文亦提供一種醫藥組成物，其包括本文所說明的任何重組蛋白質；及套組，其包括本文所說明的任何醫藥組成物。

**【0047】** 本文亦提供一種治療有需要之受試者之方法，其包括對該受試者投予治療有效量之本文所說明的任何醫藥組成物。

**【0048】** 本文在名詞前面所採用的用語「一個(種)」代表一或多個(種)該特定名詞。例如：片語「一個(種)哺乳類動物細胞」代表「一或多個(種)哺乳類動物細胞」。

【0049】術語「哺乳類動物細胞」意指來自或衍生自任何哺乳動物(例如：人類、倉鼠、小鼠、綠猴、大鼠、豬、牛、或兔)之任何細胞。例如：哺乳類動物細胞可為永生化細胞。在一些實施例中，哺乳類動物細胞為分化或未分化的細胞。哺乳類動物細胞之非限制性實例說明於本文中。哺乳類動物細胞之其他實例係為本領域已知的。

【0050】術語「培養」或「細胞培養」意指哺乳類動物細胞在一組受控制之物理條件下之維持或增殖。

【0051】術語「哺乳類動物細胞之培養物」、「培養物」、或「細胞培養物」意指包含在一組受控制之物理條件下維持或增殖之複數個哺乳類動物細胞之液體培養基。

【0052】術語「液體培養之培養基」或「液體培養基」意指包含足量營養素可以讓細胞(例如：哺乳類動物細胞)於活體外生長或增殖之流體。例如：液體培養基可包含以下一或多者：胺基酸(例如：20 種胺基酸)、嘌呤(次黃嘌呤)、嘧啶(例如：胸苷)、膽鹼、肌醇、硫胺素、葉酸、生物素、鈣、菸鹼醯胺、吡哆醇、核黃素、胸苷、氰鈷胺、丙酮酸鹽、硫辛酸、鎂、葡萄糖、鈉、鉀、鐵、銅、鋅、及碳酸氫鈉。在一些實施例中，液體培養基可包含來自哺乳類動物之血清。在一些實施例中，液體培養基不包含來自哺乳類動物之血清或另一種萃取物(所界定的液體培養基)。在一些實施例中，液體培養基可包含微量金屬、哺乳類動物生長激素、及/或哺乳類動物生長因子。液體培養基之另一實例為基本培養基(例如：僅包含無機鹽類、碳源、及水之培養基)。液體培養基之非限制性實例說明於本文中。液體培養基之其他實例係本領域已知的，且可商購取得。液體培養基可包含任何密度之哺乳類動物細胞。例如：如本文所採用，從生物反應器中移除之一體積之液體培養基可以實質上不含哺乳類動物細胞。

【0053】術語「無動物衍生組份之液體培養基」意指液體培養基不包含動物所衍生之任何組份(例如：蛋白質或血清)。

【0054】術語「無血清液體培養基」意指不包含哺乳類動物血清之液體培養基。

【0055】術語「含血清液體培養基」意指包含哺乳類動物血清之液體培養基。

【0056】術語「化學性界定液體培養基」為本領域之術語，且意指液體培養基中所有化學組份均為已知者。例如：化學性界定液體培養基不包含胎牛血清、牛血清白蛋白、或人類血清白蛋白，因為此等製劑通常包含白蛋白脂質之複雜混合物。

【0057】術語「無蛋白質液體培養基」意指不包含任何蛋白質(例如：任何可檢測的蛋白質)之液體培養基。

【0058】術語「澄清化液體培養基」意指得自細菌或酵母細胞培養物之液體培養基實質上不含(例如：排除至少 80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%、或 99%)細菌或酵母細胞。

【0059】術語「攪動」意指在生物反應器中攪拌或移動一部份液體培養基。此舉係為了例如：增加生物反應器中液體培養基之溶解 O<sub>2</sub> 濃度。可以採用任何本領域已知方法進行攪動，例如：儀器或螺槳。可用於在生物反應器之一部份液體培養基中進行攪動之裝置及方法係本領域已知的。

【0060】術語「免疫球蛋白」意指包含免疫球蛋白蛋白質(例如：可變結構域序列、框架序列、或恆定結構域序列)之至少 15 個胺基酸(例如：至少 20、30、40、50、60、70、80、90、或 100 個胺基酸)之胺基酸序列的多肽。免疫球蛋白可以例如：包括輕鏈免疫球蛋白之至少 15 個胺基酸，例如：重鏈免疫球蛋白之至少 15 個胺基酸。免疫球蛋白可能為分離的抗體(例如：IgG、IgE、IgD、IgA、或 IgM)。免疫球蛋白可能為抗體片段，例如：Fab 片段、F(ab')<sub>2</sub> 片段、或 scFv 片段。免疫球蛋白亦可為雙特異性抗體或三特異性抗體、或二聚體、三聚體、多聚體抗體、或雙功能抗體、Affibody®、或 Nanobody®。免疫球蛋白亦可為包含至少一個免疫球蛋白結構域之工程化蛋白質(例如：融合

蛋白)。免疫球蛋白之非限制性實例已說明於本文中，及免疫球蛋白之其他實例係本領已知的。重組免疫球蛋白可採用本文所說明任何方法產生。

**【0061】** 術語「工程化蛋白質」意指由存在於生物體(例如：哺乳類動物)內之內源性核酸編碼之非天然多肽。工程化蛋白質的實例包括酵素(例如：具有一或多個胺基酸取代、缺失、插入、或添加，結果可提高工程化酵素之安定性及/或催化活性)、融合蛋白質、抗體(例如：二價抗體、三價抗體、或雙功能抗體)、及包含至少一個重組骨架序列之抗原結合性蛋白質。

**【0062】** 術語「分泌之蛋白質」或「分泌之重組蛋白質」意指原始包含至少一個分泌訊號序列之蛋白質(例如：重組蛋白質)，當其在哺乳類動物細胞內轉譯，且在哺乳類動物細胞中至少部份透過酶促裂解該分泌訊號序列時，至少部份分泌至細胞外空間(例如：液體培養基)。習此相關技藝者咸了解，「分泌」的蛋白質不須與細胞完全解離，即可被視為分泌之蛋白質。

**【0063】** 術語「灌注生物反應器」意指在第一液體培養基中包含複數個細胞(例如：哺乳類動物細胞)之生物反應器，其中存在於生物反應器中細胞之培養包括定期或連續移除第一液體培養基，且同時或緊接在後即添加實質上相同體積之第二液體培養基至生物反應器中。在一些實例中，在培養期間，隨時間拉長(例如：約 24 小時的時間、約 1 分鐘至約 24 小時之間的時間、或超過 24 小時的時間)而漸進式改變(例如：增加或減少)第一液體培養基之移除及添加體積(例如：每天的液體培養基補給速率)。培養基的每一天移除與置換的比例可隨所培養的特定細胞、初始的接種密度、及特定時間的細胞密度而變化。「RV」或「反應器體積」意指培養過程開始時存在的液體培養基體積(例如：接種後存在的液體培養基總體積)。

**【0064】** 「單位生產率」或「SP」為本領域之用語，在本文中係指每個哺乳類動物細胞每天產生之重組治療性蛋白質之質量或酵素活性。重組治療性抗體之 SP 通常係量測質量/細胞/天。重組治療性酵素之 SP 通常係量測單位/細胞/天或(單位/質量)/細胞/天。

【0065】「體積生產率」或「VP」為本領域之用語，在本文中係指每單位培養物體積(例如：每 L 生物反應器、容器、或試管體積)每天產生之重組治療性蛋白質之質量或酵素活性。重組治療性抗體之 VP 通常係量測質量/L/天。重組治療性酵素之 VP 通常係量測單位/L/天或質量/L/天。

【0066】片語「泊洛沙姆之濃度」及「泊洛沙姆濃度」在本文中可互換使用。片語「X g/L 或更高之泊洛沙姆」及「X g/L 或更高濃度 X g/L 之泊洛沙姆」在本文中可互換使用。

【0067】除非另有其他說明，否則本文所採用所有技術及科學術語係熟悉本發明所屬領域者咸了解之相同定義。本發明所採用方法及材料已說明於本文中，亦可採用本領域習知的其他合適方法及材料。該等材料、方法及實例僅供例示，而非限制性的。本文述及之所有公開案、專利申請案、專利案、序列、登錄資料、及其他參考文獻之內容均已以全文引用方式併入本文中。若有矛盾，則以本說明書(包括定義)為準。

【0068】本發明之其他特徵及優點將可由下列詳細說明及圖式、及申請專利範圍加以了解。

#### 【圖式簡單說明】

【0069】圖 1A 為在不同滲透壓(mOsm/kg)之振盪瓶中進行批次細胞培養操作之活細胞密度(VCD)(百萬個細胞/mL)隨時間之圖表(n = 2)。第 0、4、及 7 天之平均滲透壓係以 mOsm 表示。

【0070】圖 1B 為在不同滲透壓(mOsm/kg)之 Ambr15 微型生物反應器中進行批次細胞培養操作之活細胞密度(VCD)(百萬個細胞/mL)隨時間之圖表(n = 2)。第 0、2、5、7、及 9 天之平均滲透壓係以 mOsm 表示。

【0071】圖 2A 為振盪瓶中第 4 天之平均細胞直徑( $\mu\text{m}$ )與滲透壓(mOsm/kg)之關係圖。

【0072】圖 2B 為 Ambr15 微型生物反應器中第 5 天之平均細胞直徑( $\mu\text{m}$ )與滲透壓(mOsm/kg)之關係圖。

【0073】圖 3A 為在生物反應器中進行灌注細胞培養操作之滲透壓(mOsm/kg)隨時間變化之圖表。操作 V22(「V22」)具有之濃縮細胞培養基進料與水進料之比例造成生物反應器中高滲透壓。

【0074】圖 3B 為在生物反應器中進行灌注細胞培養操作之活細胞密度(VCD)(百萬個細胞/mL)(實線)及 Vi-細胞平均直徑( $\mu\text{m}$ )(虛線)隨時間變化之圖表。操作 V22(「V22」)經歷的高滲透壓造成生長速率下降及活力下降。

【0075】圖 3C 為在生物反應器中進行灌注細胞培養操作之收成體積生產率(VP)(g/L/天)(實線)及收成效價(g/L)(虛線)隨時間變化之圖表。操作 V22(「V22」)具有高滲透壓，其會降低生產率。

【0076】圖 3D 為在生物反應器中進行灌注細胞培養操作之活力(%) (實線)及乳酸鹽脫氫酶(LDH)產率(U/L/天)(虛線)隨時間變化之圖表。操作 V22(「V22」)具有高滲透壓，造成高產量 LDH，其表示培養物健康狀況不良。

【0077】圖 3E 為在生物反應器中進行灌注細胞培養操作之葡萄糖濃度(g/L)(實線)及乳酸鹽濃度(g/L)(虛線)隨時間變化之圖表。操作 V22(「V22」)具有高滲透壓，造成乳酸鹽產量增加。

【0078】圖 4A 為在 Protein 3 生物反應器中進行灌注細胞培養操作之活細胞密度(VCD)(百萬個細胞/mL)(實線)及活力(%) (虛線)隨時間變化之圖表。高滲透壓造成 VCD 及培養物活力下降。

【0079】圖 4B 為在生物反應器中進行灌注細胞培養操作之乳酸鹽濃度(g/L)(實線)及乳酸鹽滲透壓(mOsm/kg)(虛線)隨時間變化之圖表。高滲透壓造成乳酸鹽產量增加。

【0080】圖 5A 為在一組顯示不同滲透壓型態之灌注細胞培養生物反應器中之滲透壓(mOsm/kg)隨時間變化之圖表。

【0081】圖 5B 為在生物反應器中進行灌注細胞培養操作之活細胞密度(VCD)(百萬個細胞/mL)(實線)及 Vi-細胞平均直徑( $\mu\text{m}$ )(虛線)隨時間變化之圖表。不同 VCD 型態對應於不同培養滲透壓。

【0082】圖 6A 為在生物反應器中使用所有數據進行灌注細胞培養操作之滲透壓(mOsm/kg)與電導率(mS/cm)之關係圖。

【0083】圖 6B 為在生物反應器中使用以反應器規模及培養期(低或高生物質量)為特徵之數據進行灌注細胞培養操作之滲透壓(mOsm/kg)與電導率(mS/cm)之關係圖。

【0084】圖 7 為在生物反應器中使用自動化電導率反饋控制進行灌注細胞培養操作之電導率(mS/cm)(實線)及滲透壓(mOsm/kg)(個別數據點)隨時間變化之圖表。

【0085】圖 8A 為在使用自動化電導率反饋控制之 10L 生物反應器中進行灌注細胞培養操作之滲透壓(mOsm/kg)隨時間變化之圖表。

【0086】圖 8B 為在顯示一致 VCD 型態之 10L 生物反應器中進行灌注細胞培養操作之活細胞密度(VCD)(百萬個細胞/mL)(實線)及 Vi-細胞平均直徑( $\mu\text{m}$ )(虛線)隨時間變化之圖表。

【0087】圖 9 為採用不同探針型式量測滲透壓標準物之電導率(mS/cm)與滲透壓(mOsm/kg)之關係圖。

【0088】圖 10 為在利用拉曼光譜(Raman spectroscopy)量測法預估滲透壓之 100L 生物反應器中進行灌注細胞培養操作之滲透壓(mOsm/kg)隨時間變化之圖表。

【0089】圖 11 為在 10L 生物反應器之 60 天灌注細胞培養過程中第 30 天之活細胞密度(VCD)(百萬個細胞/mL)與滲透壓(mOsm/kg)之關係圖。

# 【實施方式】

【0090】本文提供一種灌注培養哺乳類動物細胞之方法，其包括：提供一個容器，其包含哺乳類動物細胞，哺乳類動物細胞係安置在具有滲透壓約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg 之第一液體培養基中；在約 32°C 至約 39°C 下培養哺乳類動物細胞一段時間；及在這段時間期間，連續或定期移除第一體積之第一液體培養基，並對第一液體培養基添加第二體積之第二液體培養

基，其中第一與第二體積為約相等的，且容器中第一及第二液體培養基之滲透壓在這段時間中，係維持在約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg。此等方法之一些實施例進一步包括在這段時間期間，連續或定期添加第三體積之水溶液至容器中第一及第二液體培養基中，其中第一體積與第二與第三體積之總和為約相等的，且容器中第一、第二、及第三液體培養基之滲透壓在這段時間中，係維持在約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg。此等方法之一些實施例進一步包括連續或定期在第一液體培養基中添加第三體積之第三液體培養基，其中第一體積與第二及第三體積之總和為約相等的，且容器中第一、第二、及第三液體培養基之滲透壓在這段時間中，係維持在約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg。在一些實例中，第三液體培養基包括氯化鈉(NaCl)或氯化鉀(KCl)。在一些實例中，容器中第一、第二、及第三液體培養基滲透壓之維持包括在這段時間期間，調整第三液體培養基之流速。在其他實例中，藉由第三液體培養基之流速來控制滲透壓。在其他實例中，第三液體培養基可具有之滲透壓為約 0 mOsm/kg 至約 270 mOsm/kg。例如：當第二液體培養基具有滲透壓超過 380 mOsm/kg 時，可使用具有滲透壓約 0 mOsm/kg 至約 100 mOsm/kg 之第三液體培養基。在一些實例中，容器中第一、第二、及第三液體培養基滲透壓之維持包括在這段時間期間，調整第三液體培養基之流速。

**【0091】** 本文亦提供一種產生重組蛋白質之方法，其包括：提供一個容器，其包含含有編碼重組蛋白質之核酸之哺乳類動物細胞，哺乳類動物細胞係安置在具有滲透壓約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg 之第一液體培養基中；在約 32°C 至約 39°C 下培養哺乳類動物細胞一段時間；及在這段時間期間，連續或定期移除第一體積之第一液體培養基，並對第一液體培養基添加第二體積之第二液體培養基，其中第一與第二體積為約相等的，且容器中第一及第二液體培養基之滲透壓在這段時間中，係維持在約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg；及從哺乳類動物細胞或從第一及/或第二液體培養基中回收重組蛋白質。此等方法之一些實施例進一步包括在這段時間期間，連續或定期添加

第三體積之水溶液至容器中第一及第二液體培養基中，其中第一體積與第二與第三體積之總和為約相等的，且容器中第一、第二、及第三液體培養基之滲透壓在這段時間中，係維持在約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg。此等方法之一些實施例進一步包括連續或定期在第一液體培養基中添加第三體積之第三液體培養基，其中第一體積與第二與第三體積之總和為約相等的，且容器中第一、第二、及第三液體培養基之滲透壓在這段時間中，係維持在約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg。在一些實例中，第三液體培養基包括氯化鈉(NaCl)或氯化鉀(KCl)。在一些實例中，容器中第一、第二、及第三液體培養基滲透壓之維持包括在這段時間期間，調整第三液體培養基之流速。在其他實例中，第三液體培養基可具有之滲透壓為約 0 mOsm/kg 至約 270 mOsm/kg。例如：當第二液體培養基具有滲透壓超過 380 mOsm/kg 時，可使用具有滲透壓約 0 mOsm/kg 至約 100 mOsm/kg 之第三液體培養基。在一些實例中，容器中第一、第二、及第三液體培養基滲透壓之維持包括在這段時間期間，調整第三液體培養基之流速。

**【0092】** 在一些實施例中，本文所提供方法可在這段時間期間，在第一及第二液體培養基、或第一、第二、及第三液體培養基中，達成活細胞密度超過  $60 \times 10^6$  個細胞/mL 之細胞培養物。測定細胞培養物之活細胞密度之方法係本領域所習知者。

**【0093】** 在一些實施例中，本文所說明方法提供一種細胞培養物，其歷經至少 5 天(例如：至少 10 天、至少 15 天、至少 20 天、至少 25 天、至少 30 天、至少 35 天、至少 40 天、至少 45 天、至少 50 天、至少 55 天、至少 60 天、至少 65 天、或至少 70 天)之培養期，具有超過 75%(例如：超過 80%、超過 85%、或超過 90%)之細胞活力百分比。

**培養體積(10L-10,000L 批次進料, 50-500L-2000L、50L、500L、1000L、2000L)**

**【0094】** 本文所說明任何方法可包括培養，其提供一個容器(例如：本文所說明的任何容器)，其含有哺乳類動物細胞(例如：本文所說明的任何哺乳類

動物細胞)安置於第一液體培養基中，第一液體培養基的體積(在該段時間開始時)在約 10 L 與約 10,000 L 之間(例如：約 10 L 與約 8,000L 之間、約 10 L 與約 7,000 L 之間、約 10 L 與約 6,000 L 之間、約 10 L 與約 5,000 L 之間、約 10 L 與約 4,000 L 之間、約 10 L 與約 3,000 L 之間、約 10 L 與約 2,500 L 之間、約 10 L 與約 2,000 L 之間、約 10 L 與約 1,500 L 之間、約 10 L 與約 1,000 L 之間、約 10 L 與約 500 L 之間、約 10 L 與約 200 L 之間、約 10 L 與約 100 L 之間、約 20 L 與約 10,000L 之間、約 20 L 與約 8,000 L 之間、約 20 L 與約 7,000 L 之間、約 20 L 與約 6,000 L 之間、約 20 L 與約 5,000 L 之間、約 20 L 與約 4,000 L 之間、約 20 L 與約 3,000 L 之間、約 20 L 與約 2,500 L 之間、約 20 L 與約 2,000 L 之間、約 20 L 與約 1,500 L 之間、約 20 L 與約 1,000 L 之間、約 20 L 與約 500 L 之間、約 20 L 與約 200 L 之間、約 20 L 與約 100 L 之間、約 100 L 與約 10,000 L 之間、約 100 L 與約 8,000 L 之間、約 100 L 與約 7,000 L 之間、約 100 L 與約 6,000 L 之間、約 100 L 與約 5,000 L 之間、約 100 L 與約 4,000 L 之間、約 100 L 與約 3,000 L 之間、約 100 L 與約 2,000 L 之間、約 100 L 與約 1,500 L 之間、約 100 L 與約 1,000 L 之間、約 100 L 與約 800 L 之間、約 100 L 與約 700 L 之間、約 100 L 與約 600 L 之間、約 100 L 與約 500 L 之間、約 100 L 與約 400 L 之間、約 100 L 與約 300 L 之間、約 100 L 與約 200 L 之間、約 500 L 與約 10,000 L 之間、約 500 L 與約 8,000 L 之間、約 500 L 與約 7,000 L 之間、約 500 L 與約 6,000 L 之間、約 500 L 與約 5,000 L 之間、約 500 L 與約 4,000 L 之間、約 500 L 與約 3,000 L 之間、約 500 L 與約 2,000 L 之間、約 500 L 與約 1,500 L 之間、約 500 L 與約 1,000 L 之間、約 500 L 與約 750 L 之間、約 1,000 L 與約 10,000 L 之間、約 1,000 L 與約 8,000 L 之間、約 1,000 L 與約 7,000 L 之間、約 1,000 L 與約 6,000 L 之間、約 1,000 L 與約 5,000 L 之間、約 1,000 L 與約 4,000 L 之間、約 1,000 L 與約 3,000 L 之間、約 1,000 L 與約 2,000 L 之間、約 1,000 L 與約 1,500 L 之間、約 2,000 L 與約 10,000 L 之間、約 2,000 L 與約 8,000 L 之間、約 2,000 L 與約 7,000 L 之間、約 2,000 L 與約

6,000 L 之間、約 2,000 L 與約 5,000 L 之間、約 2,000 L 與約 4,000 L 之間、約 2,000 L 與約 3,000 L 之間、約 3,000 L 與約 10,000 L 之間、約 3,000 L 與約 8,000 L 之間、約 3,000 L 與約 7,000 L 之間、約 3,000 L 與約 6,000 L 之間、約 3,000 L 與約 5,000 L 之間、約 3,000 L 與約 4,000 L 之間、約 4,000 L 與約 10,000 L 之間、約 4,000 L 與約 8,000 L 之間、約 4,000 L 與約 7,000 L 之間、約 4,000 L 與約 6,000 L 之間、約 4,000 L 與約 5,000 L 之間、約 5,000 L 與約 10,000 L 之間、約 5,000 L 與約 8,000 L 之間、約 5,000 L 與約 7,000 L 之間、約 5,000 L 與約 6,000 L 之間、約 6,000 L 與約 10,000 L 之間、約 6,000 L 與約 8,000 L 之間、約 6,000 L 與約 7,000 L、約 7,000 L 與約 10,000 L 之間、約 7,000 L 與約 8,000 L 之間、或約 8,000 L 與約 10,000 L 之間，或 10 L、20 L、50 L、100 L、500 L、1,000 L、或 2,000 L)。培養哺乳類動物細胞之步驟係在可以讓細胞維持及增殖之條件下進行。

【0095】第一液體培養基可具有之滲透壓為約 270 mOsm/kg 至約 320 mOsm/kg (例如：約 270 mOsm/kg 至約 315 mOsm/kg、約 270 mOsm/kg 至約 310 mOsm/kg、約 270 mOsm/kg 至約 305 mOsm/kg、約 270 mOsm/kg 至約 300 mOsm/kg、約 270 mOsm/kg 至約 295 mOsm/kg、約 270 mOsm/kg 至約 290 mOsm/kg、約 270 mOsm/kg 至約 285 mOsm/kg、約 270 mOsm/kg 至約 280 mOsm/kg、約 270 mOsm/kg 至約 275 mOsm/kg、約 275 mOsm/kg 至約 320 mOsm/kg、約 275 mOsm/kg 至約 315 mOsm/kg、約 275 mOsm/kg 至約 310 mOsm/kg、約 275 mOsm/kg 至約 305 mOsm/kg、約 275 mOsm/kg 至約 300 mOsm/kg、約 275 mOsm/kg 至約 295 mOsm/kg、約 275 mOsm/kg 至約 290 mOsm/kg、約 275 mOsm/kg 至約 285 mOsm/kg、約 275 mOsm/kg 至約 280 mOsm/kg、約 280 mOsm/kg 至約 320 mOsm/kg、約 280 mOsm/kg 至約 315 mOsm/kg、約 280 mOsm/kg 至約 310 mOsm/kg、約 280 mOsm/kg 至約 305 mOsm/kg、約 280 mOsm/kg 至約 300 mOsm/kg、約 280 mOsm/kg 至約 295 mOsm/kg、約 280 mOsm/kg 至約 290 mOsm/kg、約 280 mOsm/kg 至約 285

mOsm/kg、約 285 mOsm/kg 至約 320 mOsm/kg、約 285 mOsm/kg 至約 315 mOsm/kg、約 285 mOsm/kg 至約 310 mOsm/kg、約 285 mOsm/kg 至約 305 mOsm/kg、約 285 mOsm/kg 至約 300 mOsm/kg、約 285 mOsm/kg 至約 295 mOsm/kg、約 285 mOsm/kg 至約 290 mOsm/kg、約 290 mOsm/kg 至約 320 mOsm/kg、約 290 mOsm/kg 至約 315 mOsm/kg、約 290 mOsm/kg 至約 310 mOsm/kg、約 290 mOsm/kg 至約 305 mOsm/kg、約 290 mOsm/kg 至約 300 mOsm/kg、約 290 mOsm/kg 至約 295 mOsm/kg、約 295 mOsm/kg 至約 320 mOsm/kg、約 295 mOsm/kg 至約 315 mOsm/kg、約 295 mOsm/kg 至約 310 mOsm/kg、約 295 mOsm/kg 至約 305 mOsm/kg、約 295 mOsm/kg 至約 300 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 320 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 315 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 310 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 305 mOsm/kg、約 305 mOsm/kg 至約 320 mOsm/kg、約 305 mOsm/kg 至約 315 mOsm/kg、約 305 mOsm/kg 至約 310 mOsm/kg、約 310 mOsm/kg 至約 320 mOsm/kg、約 310 mOsm/kg 至約 315 mOsm/kg、或約 315 mOsm/kg 至約 320 mOsm/kg)。第一液體培養基之非限制性態樣及實例已說明於本文中。

【0096】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，在這段時間期間，添加至第一液體培養基(例如：本文所說明的任何第一液體培養基實例)(及視需要地選用之第三液體培養基)中之第二體積之第二液體培養基(例如：本文所說明的任何第二液體培養基實例)相較於在這段時間期間的稍早時間點所添加的第二體積之第二液體培養基係增加至少 10% (例如：至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 45%、至少 50%、至少 75%、至少 100%、至少 200%、至少 300%、至少 400%、或至少 500%、或約 10%至約 500%、約 10%至約 400%、約 10%至約 300%、約 10%至約 200%、約 10%至約 100%、約 10%至約 50%、約 10%至約 20%、約 20%至約 500%、約 20%至約 400%、約 20%至約 300%、約 20%至約 200%、約 20%至約 100%、約 20%至約 50%、約 20%至約 40%、約 20%至約 30%、約 30%至約 500%、約 30%至約 400%、約 30%至約 300%、

約 30%至約 200%、約 30%至約 100%、約 30%至約 50%、約 30%至約 40%、約 40%至約 500、約 40%至約 400%、約 40%至約 300%、約 40%至約 200%、約 40%至約 100%、約 40%至約 50%、約 50%至約 500%、約 50%至約 400%、約 50%至約 300%、約 50%至約 200%、約 50%至約 100%、約 50%至約 60%、約 60%至約 500%、約 60%至約 400%、約 60%至約 300%、約 60%至約 200%、約 60%至約 100%、約 60%至約 80%、約 60%至約 70%、約 70%至約 500%、約 70%至約 400%、約 70%至約 300%、約 70%至約 200%、約 70%至約 100%、約 70%至約 80%、約 80%至約 500%、約 80%至約 400%、約 80%至約 300%、約 80%至約 200%、約 80%至約 100%、約 80%至約 90%、約 90%至約 500%、約 90%至約 400%、約 90%至約 300%、約 90%至約 200%、約 90%至約 100%、約 100%至約 500%、約 100%至約 400%、約 100%至約 300%、約 100%至約 200%、約 100%至約 150%、約 200%至約 500%、約 200%至約 400%、約 200%至約 300%、約 200%至約 250%、約 300%至約 500%、約 300%至約 400%、約 400%至約 500%、或約 450%至約 500%)。

【0097】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，相較於在這段時間期間的稍早時間點所添加的第二體積之第二液體培養基，隨著這段時間的推移，依據活細胞密度添加至第一液體培養基(例如：本文所說明的任何第一液體培養基實例)(及視需要地選用之第三液體培養基)中之第二體積之第二液體培養基(例如：本文所說明任何第二液體培養基實例)係增加至少 10% (例如：至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 100%、至少 120%、至少 140%、至少 160%、至少 180%、至少 200%、至少 220%、至少 240%、至少 260%、至少 280%、至少 300%、至少 320%、至少 340%、至少 360%、至少 380%、至少 400%、至少 420%、至少 440%、至少 460%、至少 480%、或至少 500%、或約 10%至約 500%(例如：或本文所說明此範圍之任何子範圍)。

【0098】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，相較於在這段時間期間的稍早時間點之第二液體培養基流速，在這段時間期間，添加至第一液體培養基(及視需要地選用之第三液體培養基)中之第二液體培養基流速係提高至少 10% (例如：至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 100%、至少 120%、至少 140%、至少 160%、至少 180%、至少 200%、至少 220%、至少 240%、至少 260%、至少 280%、或至少 300%、或約 10%至約 300%、約 10%至約 250%、約 10%至約 200%、約 10%至約 150%、約 10%至約 100%、約 10%至約 90%、約 10%至約 80%、約 10%至約 70%、約 10%至約 60%、約 10%至約 50%、約 10%至約 40%、約 10%至約 30%、約 10%至約 20%、約 20%至約 300%、約 20%至約 250%、約 20%至約 200%、約 20%至約 150%、約 20%至約 100%、約 20%至約 90%、約 20%至約 80%、約 20%至約 70%、約 20%至約 60%、約 20%至約 50%、約 20%至約 40%、約 20%至約 30%、約 30%至約 300%、約 30%至約 250%、約 30%至約 200%、約 30%至約 150%、約 30%至約 100%、約 30%至約 90%、約 30%至約 80%、約 30%至約 70%、約 30%至約 60%、約 30%至約 50%、約 30%至約 40%、約 40%至約 300%、約 40%至約 250%、約 40%至約 200%、約 40%至約 150%、約 40%至約 100%、約 40%至約 90%、約 40%至約 80%、約 40%至約 70%、約 40%至約 60%、約 40%至約 50%、約 50%至約 300%、約 50%至約 250%、約 50%至約 200%、約 50%至約 150%、約 50%至約 100%、約 50%至約 90%、約 50%至約 80%、約 50%至約 70%、約 50%至約 60%、約 60%至約 300%、約 60%至約 250%、約 60%至約 200%、約 60%至約 150%、約 60%至約 100%、約 60%至約 90%、約 60%至約 80%、約 60%至約 70%、約 70%至約 300%、約 70%至約 250%、約 70%至約 200%、約 70%至約 150%、約 70%至約 100%、約 70%至約 90%、約 70%至約 80%、約 80%至約 300%、約 80%至約 250%、約 80%至約 200%、約 80%

至約 150%、約 80%至約 100%、約 80%至約 90%、約 90%至約 300%、約 90%至約 250%、約 90%至約 200%、約 90%至約 150%、約 90%至約 100%、約 100%至約 300%、約 100%至約 250%、約 100%至約 200%、約 100%至約 150%、約 150%至約 300%、約 150%至約 250%、約 150%至約 200%、約 200%至約 300%、約 200%至約 250%、或約 250%至約 300%)。

【0099】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，相較於在這段時間期間的稍早時間點之第二液體培養基流速，在這段時間期間，添加至第一液體培養基(及視需要地選用之第三液體培養基)中之第二液體培養基流速係下降至少 10% (例如：至少 12%、至少 14%、至少 15%、至少 16%、至少 18%、至少 20%、至少 22%、至少 24%、至少 25%、至少 26%、至少 28%、至少 30%、至少 32%、至少 34%、至少 35%、至少 36%、至少 38%、至少 40%、至少 42%、至少 44%、至少 45%、至少 46%、至少 48%、至少 50%、至少 52%、至少 54%、至少 55%、至少 56%、至少 58%、至少 60%、至少 62%、至少 64%、至少 65%、至少 66%、至少 68%、至少 70%、至少 72%、至少 74%、至少 76%、至少 78%、至少 80%、至少 82%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 88%、至少 90%、至少 92%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%、或約 1%至約 100%、約 1%至約 90%、約 1%至約 80%、約 1%至約 70%、約 1%至約 60%、約 1%至約 50%、約 1%至約 45%、約 1%至約 40%、約 1%至約 35%、約 1%至約 30%、約 1%至約 25%、約 1%至約 20%、約 1%至約 15%、約 1%至約 10%、約 1%至約 5%、約 5%至約 100%、約 5%至約 90%、約 5%至約 80%、約 5%至約 70%、約 5%至約 60%、約 5%至約 50%、約 5%至約 45%、約 5%至約 40%、約 5%至約 35%、約 5%至約 30%、約 5%至約 25%、約 5%至約 20%、約 5%至約 15%、約 5%至約 10%、約 10%至約 100%、約 10%至約 90%、約 10%至約 80%、約 10%至約 70%、約 10%至約 60%、約 10%至約 50%、約 10%至約 45%、約 10%至約 40%、約 10%至約 35%、約 10%至約 30%、約 10%至約 25%、約 10%至約 20%、約 10%至約 15%、約 15%至約 100%、

約 15%至約 90%、約 15%至約 80%、約 15%至約 70%、約 15%至約 60%、約 15%至約 50%、約 15%至約 45%、約 15%至約 40%、約 15%至約 35%、約 15%至約 30%、約 15%至約 25%、約 15%至約 20%、約 20%至約 100%、約 20%至約 90%、約 20%至約 80%、約 20%至約 70%、約 20%至約 60%、約 20%至約 50%、約 20%至約 45%、約 20%至約 40%、約 20%至約 35%、約 20%至約 30%、約 20%至約 25%、約 25%至約 100%、約 25%至約 90%、約 25%至約 80%、約 25%至約 70%、約 25%至約 60%、約 25%至約 50%、約 25%至約 45%、約 25%至約 40%、約 25%至約 35%、約 25%至約 30%、約 30%至約 100%、約 30%至約 90%、約 30%至約 80%、約 30%至約 70%、約 30%至約 60%、約 30%至約 50%、約 30%至約 45%、約 30%至約 40%、約 30%至約 35%、約 35%至約 100%、約 35%至約 90%、約 35%至約 80%、約 35%至約 70%、約 35%至約 60%、約 35%至約 50%、約 35%至約 45%、約 35%至約 40%、約 40%至約 100%、約 40%至約 90%、約 40%至約 80%、約 40%至約 70%、約 40%至約 60%、約 40%至約 50%、約 40%至約 45%、約 45%至約 100%、約 45%至約 90%、約 45%至約 80%、約 45%至約 70%、約 45%至約 60%、約 45%至約 50%、約 50%至約 100%、約 50%至約 90%、約 50%至約 80%、約 50%至約 70%、約 50%至約 60%、約 60%至約 100%、約 60%至約 90%、約 60%至約 80%、約 60%至約 70%、約 70%至約 100%、約 70%至約 90%、約 70%至約 80%、約 80%至約 100%、約 80%至約 90%、或約 90%至約 100%)。第二液體培養基之非限制性態樣及實例已說明於本文中。

### 時間期間(30 至 60 天；7 至 90 天、45 天、60 天)

【0100】 在本文所說明任何方法之一些實例中，該段時間期間為約 5 天與約 100 天之間(例如：約 5 天與約 95 天之間、約 5 天與約 90 天之間、約 5 天與約 85 天之間、約 5 天與約 80 天之間、約 5 天與約 75 天之間、約 5 天與約 70 天之間、約 5 天與約 65 天之間、約 5 天與約 60 天之間、約 5 天與約 55 天之間、約 5 天與約 50 天之間、約 5 天與約 45 天之間、約 5 天與約 40 天之

間、約 5 天與約 35 天之間、約 5 天與約 30 天之間、約 5 天與約 25 天之間、約 5 天與約 20 天之間、約 5 天與約 15 天之間、約 5 天與約 10 天之間、約 5 天與約 7 天之間、約 7 天與約 95 天之間、約 7 天與約 90 天之間、約 7 天與約 85 天之間、約 7 天與約 80 天之間、約 7 天與約 75 天之間、約 7 天與約 70 天之間、約 7 天與約 65 天之間、約 7 天與約 60 天之間、約 7 天與約 55 天之間、約 7 天與約 50 天之間、約 7 天與約 45 天之間、約 7 天與約 40 天之間、約 7 天與約 35 天之間、約 7 天與約 30 天之間、約 7 天與約 25 天之間、約 7 天與約 20 天之間、約 7 天與約 15 天之間、約 7 天與約 10 天之間、約 10 天與約 100 天之間、約 10 天與約 95 天之間、約 10 天與約 90 天之間、約 10 天與約 85 天之間、約 10 天與約 80 天之間、約 10 天與約 75 天之間、約 10 天與約 70 天之間、約 10 天與約 65 天之間、約 10 天與約 60 天之間、約 10 天與約 55 天之間、約 10 天與約 50 天之間、約 10 天與約 45 天之間、約 10 天與約 40 天之間、約 10 天與約 35 天之間、約 10 天與約 30 天之間、約 10 天與約 25 天之間、約 10 天與約 20 天之間、約 10 天與約 15 天之間、約 15 天與約 100 天之間、約 15 天與約 95 天之間、約 15 天與約 90 天之間、約 15 天與約 85 天之間、約 15 天與約 80 天之間、約 15 天與約 75 天之間、約 15 天與約 70 天之間、約 15 天與約 65 天之間、約 15 天與約 60 天之間、約 15 天與約 55 天之間、約 15 天與約 50 天之間、約 15 天與約 45 天之間、約 15 天與約 40 天之間、約 15 天與約 35 天之間、約 15 天與約 30 天之間、約 15 天與約 25 天之間、約 15 天與約 20 天之間、約 30 天與約 100 天之間、約 30 天與約 90 天之間、約 30 天與約 80 天之間、約 30 天與約 70 天之間、約 30 天與約 60 天之間、約 30 天與約 50 天之間、約 30 天與約 40 天之間、約 40 天與約 100 天之間、約 40 天與約 90 天之間、約 40 天與約 80 天之間、約 40 天與約 70 天之間、約 40 天與約 60 天之間、約 40 天與約 50 天之間、約 50 天與約 100 天之間、約 50 天與約 90 天之間、約 50 天與約 80 天之間、約 50 天與約 70 天之間、約 50 天與約 60 天之間、約 60 天與約 100 天之間、約 60 天與約 90 天之間、約 60 天與約 80 天之間、

間、約 60 天與約 70 天之間、約 70 天與約 100 天之間、約 70 天與約 90 天之間、約 70 天與約 80 天之間、約 80 天與約 100 天之間、約 80 天與約 90 天之間、或約 90 天與約 100 天之間，或 7 天、21 天、28 天、30 天、31 天、45 天、60 天、或 90 天)。

## 哺乳類動物細胞

【0101】 在於本文所提供方法中培養之哺乳類動物細胞(例如：灌注培養)可為呈懸浮或貼附型細胞生長之細胞。可於本文所說明任何方法中培養之哺乳類動物細胞之非限制性實例包括：中國倉鼠卵巢(CHO)細胞(例如：CHO DG44 細胞或 CHO-K1 細胞)、Sp2.0、骨髓瘤細胞(例如：NS/0)、B-細胞、融合瘤細胞、T-細胞、人類胚胎腎(HEK)細胞(例如：HEK 293E 及 HEK 293F)、非洲綠猴腎上皮細胞(Vero)細胞、NSO 細胞、幼倉鼠腎(BHK)細胞、PerC6 細胞、Vero 細胞、HT-1080 細胞、及馬達二氏犬(Madin-Darby Canine)(Cocker Spaniel)腎上皮細胞(MDCK)細胞。在一些培養貼附型細胞之實例中，該培養物亦可包含複數個微載體(例如：包含一或多個孔的微載體)。可於本文所說明任何方法中培養之其他哺乳類動物細胞係本領域已知的。

【0102】 哺乳類動物細胞可包含編碼重組蛋白質(例如：本文所說明的任何重組蛋白質實例)之重組核酸(例如：於哺乳類動物細胞之基因體中穩定整合之核酸)。編碼所例示重組蛋白質之重組核酸之非限制性實例說明於下文，如：可以採用本文所說明方法產生之重組蛋白質。在一些例子中，於生物反應器(例如：本文所說明的任何生物反應器)中培養之哺乳類動物細胞係衍生自較大型培養。

【0103】 編碼重組蛋白質之核酸可以採用分子生物及分子遺傳學已知之多種不同方法引至哺乳類動物細胞中。其非限制性實例包括轉染(例如：脂染法)、轉導(例如：慢病毒、腺病毒、或反轉錄病毒感染)、及電穿孔法。在一些例子中，編碼重組蛋白質之核酸並未穩定整合至哺乳類動物細胞之染色體中(暫時轉染)，而其他例子的核酸則已整合。或者或另外，編碼重組蛋白質

之核酸可存在於質體及/或哺乳類動物人造染色體(例如：人類人造染色體)中。或者或另外，該核酸可以利用病毒載體(例如：慢病毒、反轉錄病毒、或腺病毒載體)引至細胞中。核酸可依可操作方式連接至啟動子序列(例如：強啟動子，如： $\beta$ -肌動蛋白啟動子及 CMV 啟動子、或可誘導啟動子)。若需要時，包含核酸之載體亦可包含可選擇的標記物(例如：為哺乳類動物細胞賦予潮黴素、嘌呤黴素、或新黴素抗性之基因)。

【0104】 在一些例子中，重組蛋白質為分泌之蛋白質，且係由哺乳類動物細胞釋放至細胞外培養基中(例如：灌注培養之第一及/或第二液體培養基或批次進料培養之第一液體培養基及/或進料液體培養基)。例如：編碼可溶性重組蛋白質之核酸序列可包含編碼重組蛋白質 N-或 C-末端之分泌訊號肽之序列，其可被存在於哺乳類動物細胞中之酵素裂解，隨後釋放至細胞外培養基(例如：第一及/或第二液體培養基)。

**容器(10 L-10,000 L 批次進料，50 L-500 L-2,000 L、50 L、500 L、1,000 L、2,000 L)**

【0105】 本文所說明任何方法之培養步驟可以使用容器進行，例如：生物反應器(例如：灌注生物反應器)。生物反應器(例如：灌注生物反應器)可具有的內部體積(容量)為約 10 L 與約 10,000 L 之間(例如：約 10 L 與約 8,000 L 之間、約 10 L 與約 7,000 L 之間、約 10 L 與約 6,000 L 之間、約 10 L 與約 5,000 L 之間、約 10 L 與約 4,000 L 之間、約 10 L 與約 3,000 L 之間、約 10 L 與約 2,500 L 之間、約 10 L 與約 2,000 L 之間、約 10 L 與約 1,500 L 之間、約 10 L 與約 1,000 L 之間、約 10 L 與約 500 L 之間、約 10 L 與約 200 L 之間、約 10 L 與約 100 L 之間、約 20 L 與約 10,000 L 之間、約 20 L 與約 8,000 L 之間、約 20 L 與約 7,000 L 之間、約 20 L 與約 6,000 L 之間、約 20 L 與約 5,000 L 之間、約 20 L 與約 4,000 L 之間、約 20 L 與約 3,000 L 之間、約 20 L 與約 2,500 L 之間、約 20 L 與約 2,000 L 之間、約 20 L 與約 1,500 L 之間、約 20 L 與約 1,000 L 之間、約 20 L 與約 500 L 之間、約 20 L 與約 200 L 之間、約 20 L 與約 100 L

之間、約 100 L 與約 10,000 L 之間、約 100 L 與約 8,000 L 之間、約 100 L 與約 7,000 L 之間、約 100 L 與約 6,000 L 之間、約 100 L 與約 5,000 L 之間、約 100 L 與約 4,000 L 之間、約 100 L 與約 3,000 L 之間、約 100 L 與約 2,000 L 之間、約 100 L 與約 1,500 L 之間、約 100 L 與約 1,000 L 之間、約 100 L 與約 800 L 之間、約 100 L 與約 700 L 之間、約 100 L 與約 600 L 之間、約 100 L 與約 500 L 之間、約 100 L 與約 400 L 之間、約 100 L 與約 300 L 之間、約 100 L 與約 200 L 之間、約 500 L 與約 10,000 L 之間、約 500 L 與約 8,000 L 之間、約 500 L 與約 7,000 L 之間、約 500 L 與約 6,000 L 之間、約 500 L 與約 5,000 L 之間、約 500 L 與約 4,000 L 之間、約 500 L 與約 3,000 L 之間、約 500 L 與約 2,000 L 之間、約 500 L 與約 1,500 L 之間、約 500 L 與約 1,000 L 之間、約 500 L 與約 750 L 之間、約 1,000 L 與約 10,000 L 之間、約 1,000 L 與約 8,000 L 之間、約 1,000 L 與約 7,000 L 之間、約 1,000 L 與約 6,000 L 之間、約 1,000 L 與約 5,000 L 之間、約 1,000 L 與約 4,000 L 之間、約 1,000 L 與約 3,000 L 之間、約 1,000 L 與約 2,000 L 之間、約 1,000 L 與約 1,500 L 之間、約 2,000 L 與約 10,000 L 之間、約 2,000 L 與約 8,000 L 之間、約 2,000 L 與約 7,000 L 之間、約 2,000 L 與約 6,000 L 之間、約 2,000 L 與約 5,000 L 之間、約 2,000 L 與約 4,000 L 之間、約 2,000 L 與約 3,000 L 之間、約 3,000 L 與約 10,000 L 之間、約 3,000 L 與約 8,000 L 之間、約 3,000 L 與約 7,000 L 之間、約 3,000 L 與約 6,000 L 之間、約 3,000 L 與約 5,000 L 之間、約 3,000 L 與約 4,000 L 之間、約 4,000 L 與約 10,000 L 之間、約 4,000 L 與約 8,000 L 之間、約 4,000 L 與約 7,000 L 之間、約 4,000 L 與約 6,000 L 之間、約 4,000 L 與約 5,000 L 之間、約 5,000 L 與約 10,000 L 之間、約 5,000 L 與約 8,000 L 之間、約 5,000 L 與約 7,000 L 之間、約 5,000 L 與約 6,000 L 之間、約 6,000 L 與約 10,000 L 之間、約 6,000 L 與約 8,000 L 之間、約 6,000 L 與約 7,000 L 之間、約 7,000 L 與約 10,000 L 之間、約 7,000 L 與約 8,000 L 之間、或約 8,000 L 與約 10,000 L 之間、或約 10 L、約 20 L、約 50 L、約 100 L、約 500 L、約 1,000 L、或約 2,000 L)。

## 培養系統

【0106】 一些本文所說明方法使用之系統(例如：灌注培養系統)包括容器及安置在容器內之第一液體培養基(例如：本文說明之任何培養基)。容器可具有內部體積(容量)約 10 L 至約 25,000 L 之間(例如：或本文所說明此範圍之任何子範圍)。容器可以由金屬(例如：不鏽鋼)、塑膠、或玻璃、或其任何組合製成。

【0107】 該系統可包括供攪動安置在容器內之液體培養基之裝置(例如：葉輪與轉動葉輪的馬達)。容器可包括一或多個接口(及視需要地選用之幫浦)，以便讓材料(例如：液體培養基、泊洛沙姆-188、鹼或酸(依需要調整 pH 值))添加至安置在容器中之液體培養基中及/或移除液體培養基(例如：澄清化液體培養基或細胞培養物之樣本)。

【0108】 培養系統亦可包括一或多個感測器來監測液體培養基在培養期間之 pH 值、 $\text{dO}_2$ 、溫度、及  $\text{pCO}_2$ 。在一些實施例中，培養系統可包括一或多個感測器，其包括電容感測器、電導率感測器、及/或拉曼(Raman)感測器。在一些實施例中，生物反應器可包括一或多個感測器，其包括電容感測器、電導率感測器、及/或拉曼感測器。在一些實施例中，通過濾器可包括一或多個感測器，其包括電容感測器、電導率感測器、及/或拉曼感測器。培養系統可包括過濾裝置(例如：執行交替切向過濾或切向流過濾之裝置)，其處理一定量體積之細胞培養物，提供實質上不含細胞之澄清化液體培養基。培養系統可包括加熱/冷卻裝置，供調整安置在容器中之液體培養基之溫度。細胞培養物系統之其他特徵係本領域習知者。

## 灌注培養

【0109】 在一些實例中，灌注培養包括在一段時間期間，從容器(例如：生物反應器)中移除第一體積之第一液體培養基，及在生物反應器中添加第二體積之第二液體培養基，其中第一體積及第二體積為約相等的。

【0110】 在其他實例中，灌注培養包括從容器(例如：生物反應器)中移除第一體積之第一液體培養基，及在容器中添加第二體積之第二液體培養基及第三體積之第三液體培養基，其中第一體積與第二及第三體積之總和為約相等的。

【0111】 哺乳類動物細胞可以利用一些細胞截留裝置或透過諸如：於沉降錐之細胞沉降，而保留在生物反應器中。

【0112】 灌注培養中培養基之移除及添加可以同時或依序進行，或有時組合此二者進行。此外，該移除與添加可以連續進行，如：其速率可以移除及置換生物反應器體積之 0.1%至 400%之間、約 25%至 400%之間、約 25%至約 300%之間、約 25%至約 200%之間、約 25%至約 100%之間、約 25%至約 50%之間、約 50%至約 400%之間、約 50%至約 100%之間、約 50%至約 200%之間、約 50%至約 300%之間、約 50%至約 400%之間、約 100%至約 400%之間、約 100%至約 300%之間、約 100%至約 200%、或約 25%、約 50%、約 75%、約 100%、約 150%、約 200%、約 250%、約 300%、約 350%、或約 400%之體積。

【0113】 在一些例子中，隨著每 24 小時期間的推移，所移除的第一體積之第一液體培養基與所添加的第二體積之第二液體培養基(及視需要地添加之第三液體培養基)可以是保持約相同的。如本領域已知的，第一體積之第一液體培養基之移除速率(體積/單位時間)與第二體積之第二液體培養基之添加速率(體積/單位時間)(及視需要地第三體積之第三液體培養基之添加速率(體積/單位時間))可以變化，且依特定細胞培養系統之條件而定。

【0114】 第一體積之第一液體培養基之移除速率(體積/單位時間)與第二體積之第二液體培養基之添加速率(體積/單位時間)(及視需要地第三體積之第三液體培養基之添加速率(體積/單位時間))可以約相同或可以不同。

【0115】 或者，可以隨著每 24 小時期間的推移，逐漸提高改變移除及添加之體積。例如：可以隨著培養期間的推移，在每 24 小時期間內提高第一

液體培養基之移除體積與第二液體培養基之添加體積(及視需要地第三液體培養基之添加體積)。可以隨著培養期間的推移提高的體積為生物反應器體積之 0.5%至約 20%之間的體積。可以隨著培養期的推移提高體積至生物反應器容量之約 25%至約 150%或培養期開始時之細胞培養體積。

【0116】 在本文所說明方法之一些實施例中，在培養期第一個 48 至 96 小時後，依每 24 小時期間(培養期間內)所移除第一體積之第一液體培養基及所添加第二體積之第二液體培養基(以及視需要添加的第三體積之第三液體培養基)為培養期間開始時之細胞培養物體積之約 10%至約 95%、約 10%至約 20%、約 20%至約 30%、約 30%至約 40%、約 40%至約 50%、約 50%至約 60%、約 60%至約 70%、約 70%至約 80%、約 80%至約 90%、約 85%至約 95%、約 60%至約 80%、或約 70%。

【0117】 習此相關技藝者咸了解，第一液體培養基與第二液體培養基可以為相同型態之培養基。在其他例子中，第一液體培養基與第二液體培養基可以為不同型態之液體培養基或不同濃度之液體培養基。相較於第一液體培養基與第三液體培養基，第二液體培養基可能在一或多個培養基組份方面更濃縮。

【0118】 第一體積之第一液體培養基可以採用任何自動化系統移除。例如：可採用交替切向流過濾。或者，可以由第一體積之第一液體培養基通過具有可以排除哺乳類動物細胞之分子量截斷值之無菌膜，藉由滲出或重力流移除第一體積之第一液體培養基。或者，第一體積之第一液體培養基之移除可以藉由停止或顯著降低攪動速率一段至少 1 分鐘、至少 2 分鐘、3 分鐘、4 分鐘、5 分鐘、10 分鐘、15 分鐘、20 分鐘、25 分鐘、30 分鐘、40 分鐘、50 分鐘、或 1 小時的時間，及從生物反應器頂部移除或吸出第一體積之第一液體培養基。

【0119】 第二體積之第二液體培養基(及視需要地第三體積之第三液體培養基)可以利用幫浦加至第一液體培養基中。可以利用移液或注射第二體積

之第二液體培養基(及視需要地第三份體積之第三液體培養基)直接加至第一液體培養基上或以自動化方式添加，即可將第二液體培養基(及視需要地選用之第三液體培養基)添加至第一液體培養基中。

【0120】 在本文所說明方法之一些實施例中，包括由容器在約 32°C 至約 39°C 之溫度間，在攪動下培養一段至少約 7 天的時間；及在這段時間期間，連續或定期移除第一體積之第一液體培養基，並對第一液體培養基添加第二體積之第二液體培養基，其中第一與第二體積為約相等的，且容器中第一及第二液體培養基之滲透壓在這段時間中，係維持在約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg。

【0121】 在本文所說明方法之一些實施例中，包括由容器在約 32°C 至約 39°C 之溫度間，在攪動下培養一段至少約 7 天的時間；及在這段時間期間，連續或定期移除第一體積之第一液體培養基，並對第一液體培養基添加第二體積之第二液體培養基及第三體積之第三液體培養基，其中第一體積與第二及第三體積之總和為約相等的，且容器中第一、第二、及第三液體培養基之滲透壓在這段時間中，係維持在約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg。

【0122】 灌注培養之一些實例包括由包含第一液體培養基之培養系統在約 32°C 至約 39°C 之溫度間，在攪動下培養一段至少約 7 天的培養期間；及連續或定期移除第一體積之第一液體培養基，並對第一液體培養基添加第二體積之第二液體培養基，其中第一與第二體積為約相等的，且容器中第一及第二液體培養基之滲透壓在這段時間中，係維持在約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg。

【0123】 灌注培養之一些實例包括由包含第一液體培養基之培養系統在約 32°C 至約 39°C 之溫度間，在攪動下培養一段至少約 7 天的培養期間；及連續或定期移除第一體積之第一液體培養基，並對第一液體培養基添加第二體積之第二液體培養基及第三體積之第三液體培養基，其中第一體積與第

二及第三體積之總和為約相等的，且容器中第一、第二、及第三液體培養基之滲透壓在這段時間中，係維持在約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg。

【0124】 在一些實施例中，第一液體培養基可具有之滲透壓為約 260 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg (例如：約 260 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg、約 260 mOsm/kg 至約 360 mOsm/kg、約 260 mOsm/kg 至約 350 mOsm/kg、約 260 mOsm/kg 至約 340 mOsm/kg、約 260 mOsm/kg 至約 320 mOsm/kg、約 260 mOsm/kg 至約 300 mOsm/kg、約 280 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 270 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg、約 270 mOsm/kg 至約 360 mOsm/kg、約 270 mOsm/kg 至約 350 mOsm/kg、約 270 mOsm/kg 至約 340 mOsm/kg、約 270 mOsm/kg 至約 320 mOsm/kg、約 270 mOsm/kg 至約 300 mOsm/kg、約 280 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg、約 280 mOsm/kg 至約 360 mOsm/kg、約 280 mOsm/kg 至約 350 mOsm/kg、約 280 mOsm/kg 至約 340 mOsm/kg、約 280 mOsm/kg 至約 320 mOsm/kg、約 280 mOsm/kg 至約 300 mOsm/kg、約 290 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 290 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg、約 290 mOsm/kg 至約 360 mOsm/kg、約 290 mOsm/kg 至約 350 mOsm/kg、約 290 mOsm/kg 至約 340 mOsm/kg、約 290 mOsm/kg 至約 320 mOsm/kg、約 290 mOsm/kg 至約 300 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 360 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 350 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 340 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 320 mOsm/kg、約 310 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 310 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg、約 310 mOsm/kg 至約 360 mOsm/kg、約 310 mOsm/kg 至約 350 mOsm/kg、約 310 mOsm/kg 至約 340 mOsm/kg、約 310 mOsm/kg 至約 320 mOsm/kg、約 320 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 320 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg、約 320 mOsm/kg 至約 360 mOsm/kg、約 320 mOsm/kg 至約 350 mOsm/kg、約 320 mOsm/kg 至約 340 mOsm/kg、約 330 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 330

mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg、約 330 mOsm/kg 至約 360 mOsm/kg、約 330 mOsm/kg 至約 350 mOsm/kg、約 330 mOsm/kg 至約 340 mOsm/kg、約 340 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 340 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg、約 340 mOsm/kg 至約 360 mOsm/kg、約 340 mOsm/kg 至約 350 mOsm/kg、約 350 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 350 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg、約 350 mOsm/kg 至約 360 mOsm/kg、約 360 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 360 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg、約 370 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 370 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg、約 380 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 380 mOsm/kg 至約 390 mOsm/kg、或約 390 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg)。

【0125】 在一些實施例中，第一液體培養基可具有之滲透壓為約 260 mOsm/kg、約 270 mOsm/kg、約 280 mOsm/kg、約 290 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg、約 310 mOsm/kg、約 320 mOsm/kg、約 330 mOsm/kg、約 340 mOsm/kg、約 350 mOsm/kg、約 360 mOsm/kg、約 380 mOsm/kg、約 390 mOsm/kg、或約 400 mOsm/kg。

【0126】 在一些實施例中，第二液體培養基可具有之滲透壓為約 260 mOsm/kg 至約 2,500 mOsm/kg (例如：約 260 mOsm/kg 至約 2,400 mOsm/kg、約 260 mOsm/kg 至約 2,200 mOsm/kg、約 260 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 260 mOsm/kg 至約 1,800 mOsm/kg、約 260 mOsm/kg 至約 1,600 mOsm/kg、約 260 mOsm/kg 至約 1,500 mOsm/kg、約 260 mOsm/kg 至約 1,400 mOsm/kg、約 260 mOsm/kg 至約 1,200 mOsm/kg、約 260 mOsm/kg 至約 1,000 mOsm/kg、約 260 mOsm/kg 至約 800 mOsm/kg、約 260 mOsm/kg 至約 700 mOsm/kg、約 260 mOsm/kg 至約 600 mOsm/kg、約 260 mOsm/kg 至約 500 mOsm/kg、約 260 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 260 mOsm/kg 至約 300 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 2,500 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 2,400 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 2,200 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 1,800 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 1,600 mOsm/kg、約 300

mOsm/kg 至約 1,500 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 1,400 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 1,200 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 1,000 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 800 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 700 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 600 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 500 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 2,500 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 2,400 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 2,200 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 1,800 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 1,600 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 1,500 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 1,400 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 1,200 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 1,000 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 800 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 700 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 600 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 2,500 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 2,400 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 2,200 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 1,800 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 1,600 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 1,500 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 1,400 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 1,200 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 1,000 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 800 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 700 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 600 mOsm/kg、約 600 mOsm/kg 至約 2,500 mOsm/kg、約 600 mOsm/kg 至約 2,400 mOsm/kg、約 600 mOsm/kg 至約 2,200 mOsm/kg、約 600 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 600 mOsm/kg 至約 1,800 mOsm/kg、約 600 mOsm/kg 至約 1,600 mOsm/kg、約 600 mOsm/kg 至約 1,500 mOsm/kg、約 600 mOsm/kg 至約 1,400 mOsm/kg、約 600 mOsm/kg 至約 1,200 mOsm/kg、約 600 mOsm/kg 至約 1,000 mOsm/kg、約 600 mOsm/kg 至約 800 mOsm/kg、約 600 mOsm/kg 至約 700 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 2,500 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 2,400 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 2,200 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 1,800 mOsm/kg、約 800

mOsm/kg 至約 1,600 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 1,500 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 1,400 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 1,200 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 1,000 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 2,400 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 2,200 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 1,800 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 1,600 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 1,500 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 1,400 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 1,200 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 1,000 mOsm/kg、約 1,000 mOsm/kg 至約 2,500 mOsm/kg、約 1,000 mOsm/kg 至約 2,400 mOsm/kg、約 1,000 mOsm/kg 至約 2,200 mOsm/kg、約 1,000 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 1,000 mOsm/kg 至約 1,800 mOsm/kg、約 1,000 mOsm/kg 至約 1,600 mOsm/kg、約 1,000 mOsm/kg 至約 1,500 mOsm/kg、約 1,000 mOsm/kg 至約 1,400 mOsm/kg、約 1,000 mOsm/kg 至約 1,200 mOsm/kg、約 1,200 mOsm/kg 至約 2,500 mOsm/kg、約 1,200 mOsm/kg 至約 2,400 mOsm/kg、約 1,200 mOsm/kg 至約 2,200 mOsm/kg、約 1,200 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 1,200 mOsm/kg 至約 1,800 mOsm/kg、約 1,200 mOsm/kg 至約 1,600 mOsm/kg、約 1,200 mOsm/kg 至約 1,500 mOsm/kg、約 1,200 mOsm/kg 至約 1,400 mOsm/kg、約 1,400 mOsm/kg 至約 2,500 mOsm/kg、約 1,400 mOsm/kg 至約 2,400 mOsm/kg、約 1,400 mOsm/kg 至約 2,200 mOsm/kg、約 1,400 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 1,400 mOsm/kg 至約 1,800 mOsm/kg、約 1,400 mOsm/kg 至約 1,600 mOsm/kg、約 1,400 mOsm/kg 至約 1,500 mOsm/kg、約 1,500 mOsm/kg 至約 2,500 mOsm/kg、約 1,500 mOsm/kg 至約 2,400 mOsm/kg、約 1,500 mOsm/kg 至約 2,200 mOsm/kg、約 1,500 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 1,500 mOsm/kg 至約 1,800 mOsm/kg、約 1,500 mOsm/kg 至約 1,600 mOsm/kg、約 1,600 mOsm/kg 至約 2,500 mOsm/kg、約 1,600 mOsm/kg 至約 2,400 mOsm/kg、約 1,600 mOsm/kg 至約 2,200 mOsm/kg、約 1,600 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 1,800 mOsm/kg 至約 2,500 mOsm/kg、約 1,800 mOsm/kg 至約 2,400 mOsm/kg、約 1,800 mOsm/kg 至約 2,200 mOsm/kg、約 1,800 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 2,000

mOsm/kg 至約 2,500 mOsm/kg、約 2,000 mOsm/kg 至約 2,400 mOsm/kg、約 2,000 mOsm/kg 至約 2,200 mOsm/kg、約 2,200 mOsm/kg 至約 2,500 mOsm/kg、約 2,200 mOsm/kg 至約 2,400 mOsm/kg、或約 2,400 mOsm/kg 至約 2,500 mOsm/kg)。

【0127】 在一些實施例中，第二液體培養基具有之滲透壓為約 260 mOsm/kg、約 280 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg、約 320 mOsm/kg、約 340 mOsm/kg、約 350 mOsm/kg、約 360 mOsm/kg、約 380 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg、約 420 mOsm/kg、約 440 mOsm/kg、約 450 mOsm/kg、約 460 mOsm/kg、約 480 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg、約 520 mOsm/kg、約 540 mOsm/kg、約 550 mOsm/kg、約 560 mOsm/kg、約 580 mOsm/kg、約 600 mOsm/kg、約 620 mOsm/kg、約 640 mOsm/kg、約 650 mOsm/kg、約 660 mOsm/kg、約 680 mOsm/kg、約 700 mOsm/kg、約 720 mOsm/kg、約 740 mOsm/kg、約 750 mOsm/kg、約 760 mOsm/kg、約 780 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg、約 820 mOsm/kg、約 840 mOsm/kg、約 850 mOsm/kg、約 860 mOsm/kg、約 880 mOsm/kg、約 900 mOsm/kg、約 920 mOsm/kg、約 940 mOsm/kg、約 950 mOsm/kg、約 960 mOsm/kg、約 980 mOsm/kg、約 1000 mOsm/kg、約 1,100 mOsm/kg、約 1,200 mOsm/kg、約 1,300 mOsm/kg、約 1,400 mOsm/kg、約 1,500 mOsm/kg、約 1,600 mOsm/kg、約 1,700 mOsm/kg、約 1,800 mOsm/kg、約 1,900 mOsm/kg、約 2,000 mOsm/kg、約 2,100 mOsm/kg、約 2,200 mOsm/kg、約 2,300 mOsm/kg、約 2,400 mOsm/kg、或約 2,500 mOsm/kg。

【0128】 測定液體培養基滲透壓之方法係本領域所習知者。藉由離線取樣之凝固點下降來量測滲透壓。市售滲透壓計商品亦係相本領域已知的，例如：OsmoTECH®多樣本微滲透壓計。可透過拉曼光譜連續監測滲透壓。參見例如：Moretto 等人之 *Am Pharma Rev.*, 14(3), 2011，及 Whelan 等人之 *Biotechnol. Prog.*, 28(5): 1355-1362, September-October 2012 年 9-10 月。

【0129】 本文所說明任何方法之一些實施例進一步包括在這段時間期間，添加第三體積之水溶液至容器中第一及第二液體培養基中，其中第一體

積與第二及第三體積之總和為約相等的，且容器中第一及第二液體培養基、及水溶液之滲透壓在這段時間中，係維持在約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg (例如：或本文所說明此範圍之任何子範圍)。例如：水溶液可為鹽溶液，例如：氯化鈉溶液及氯化鉀溶液。在一些實施例中，第一液體培養基可為本文說明之任何第一液體培養基，及第二液體培養基可為本文說明之任何第二液體培養基。

【0130】 本文所說明任何方法之一些實施例進一步包括連續或定期在第一液體培養基中添加第三體積之第三液體培養基，其中第一體積與第二及第三體積之總和為約相等的，且容器中第一、第二、及第三液體培養基之滲透壓在這段時間中，係維持在約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg (例如：或此範圍之任何子範圍)。此等方法之一些實施例中，第一液體培養基可為本文所說明的任何第一液體培養基實例，且第二液體培養基可為本文所說明任何第二液體培養基實例。此等方法之一些實施例中，容器中第一、第二、及第三液體培養基滲透壓之維持包括在這段時間期間，調整第二液體培養基之流速。在一些實施例中，調整步驟包括在這段時間期間的某些時間點，提高第二液體培養基之流速。在一些實例中，調整步驟包括在這段時間期間的某些時間點，降低第二液體培養基之流速。

【0131】 在一些實例中，第三液體培養基可具有之滲透壓為約 0 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg (例如：約 0 mOsm/kg 至約 11,000 mOsm/kg、約 0 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 0 mOsm/kg 至約 9,000 mOsm/kg、約 0 mOsm/kg 至約 8,000 mOsm/kg、約 0 mOsm/kg 至約 7,000 mOsm/kg、約 0 mOsm/kg 至約 6,000 mOsm/kg、約 0 mOsm/kg 至約 5,000 mOsm/kg、約 0 mOsm/kg 至約 4,000 mOsm/kg、約 0 mOsm/kg 至約 3,000 mOsm/kg、約 0 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 0 mOsm/kg 至約 1,000 mOsm/kg、約 0 mOsm/kg 至約 800 mOsm/kg、約 0 mOsm/kg 至約 600 mOsm/kg、約 0 mOsm/kg 至約 500 mOsm/kg、約 0 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 0 mOsm/kg 至約 350

mOsm/kg、約 0 mOsm/kg 至約 300 mOsm/kg、約 0 mOsm/kg 至約 250 mOsm/kg、  
 約 0 mOsm/kg 至約 200 mOsm/kg、約 0 mOsm/kg 至約 150 mOsm/kg、約 0  
 mOsm/kg、至約 100 mOsm/kg、約 0 mOsm/kg 至約 80 mOsm/kg、約 0 mOsm/kg  
 至約 60 mOsm/kg、約 0 mOsm/kg、至約 40 mOsm/kg、約 0 mOsm/kg 至約 20  
 mOsm/kg、約 0 mOsm/kg 至約 10 mOsm/kg、約 0 mOsm/kg 至約 5 mOsm/kg、  
 約 0 mOsm/kg 至約 1 mOsm/kg、約 1 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg、約 1  
 mOsm/kg 至約 11,000 mOsm/kg、約 1 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 1  
 mOsm/kg 至約 9,000 mOsm/kg、約 1 mOsm/kg 至約 8,000 mOsm/kg、約 1  
 mOsm/kg 至約 7,000 mOsm/kg、約 1 mOsm/kg 至約 6,000 mOsm/kg、約 1  
 mOsm/kg 至約 5,000 mOsm/kg、約 1 mOsm/kg 至約 4,000 mOsm/kg、約 1  
 mOsm/kg 至約 3,000 mOsm/kg、約 1 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 1  
 mOsm/kg 至約 1,000 mOsm/kg、約 1 mOsm/kg 至約 800 mOsm/kg、約 1 mOsm/kg  
 至約 600 mOsm/kg、約 1 mOsm/kg 至約 500 mOsm/kg、約 1 mOsm/kg 至約 400  
 mOsm/kg、約 1 mOsm/kg 至約 350 mOsm/kg、約 1 mOsm/kg 至約 300 mOsm/kg、  
 約 1 mOsm/kg 至約 250 mOsm/kg、約 1 mOsm/kg 至約 200 mOsm/kg、約 1  
 mOsm/kg 至約 150 mOsm/kg、約 1 mOsm/kg 至約 100 mOsm/kg、約 1 mOsm/kg  
 至約 80 mOsm/kg、約 1 mOsm/kg 至約 60 mOsm/kg、約 1 mOsm/kg、至約 40  
 mOsm/kg、約 1 mOsm/kg 至約 20 mOsm/kg、約 1 mOsm/kg 至約 10 mOsm/kg、  
 約 1 mOsm/kg 至約 5 mOsm/kg、約 5 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg、約 5  
 mOsm/kg 至約 11,000 mOsm/kg、約 5 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 5  
 mOsm/kg 至約 9,000 mOsm/kg、約 5 mOsm/kg 至約 8,000 mOsm/kg、約 5  
 mOsm/kg 至約 7,000 mOsm/kg、約 5 mOsm/kg 至約 6,000 mOsm/kg、約 5  
 mOsm/kg 至約 5,000 mOsm/kg、約 5 mOsm/kg 至約 4,000 mOsm/kg、約 5  
 mOsm/kg 至約 3,000 mOsm/kg、約 5 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 5  
 mOsm/kg 至約 1,000 mOsm/kg、約 5 mOsm/kg 至約 800 mOsm/kg、約 5 mOsm/kg  
 至約 600 mOsm/kg、約 5 mOsm/kg 至約 500 mOsm/kg、約 5 mOsm/kg 至約 400

mOsm/kg、約 5 mOsm/kg 至約 350 mOsm/kg、約 5 mOsm/kg 至約 300 mOsm/kg、  
 約 5 mOsm/kg 至約 250 mOsm/kg、約 5 mOsm/kg 至約 200 mOsm/kg、約 5  
 mOsm/kg 至約 150 mOsm/kg、約 5 mOsm/kg 至約 100 mOsm/kg、約 5 mOsm/kg  
 至約 80 mOsm/kg、約 5 mOsm/kg 至約 60 mOsm/kg、約 5 mOsm/kg、至約 40  
 mOsm/kg、約 5 mOsm/kg 至約 20 mOsm/kg、約 5 mOsm/kg 至約 10 mOsm/kg、  
 約 10 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg、約 10 mOsm/kg 至約 11,000 mOsm/kg、  
 約 10 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 10 mOsm/kg 至約 9,000 mOsm/kg、  
 約 10 mOsm/kg 至約 8,000 mOsm/kg、約 10 mOsm/kg 至約 7,000 mOsm/kg、約  
 10 mOsm/kg 至約 6,000 mOsm/kg、約 10 mOsm/kg 至約 5,000 mOsm/kg、約 10  
 mOsm/kg 至約 4,000 mOsm/kg、約 10 mOsm/kg 至約 3,000 mOsm/kg、約 10  
 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 10 mOsm/kg 至約 1,000 mOsm/kg、約 10  
 mOsm/kg 至約 800 mOsm/kg、約 10 mOsm/kg 至約 600 mOsm/kg、約 10 mOsm/kg  
 至約 500 mOsm/kg、約 10 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 10 mOsm/kg 至約  
 350 mOsm/kg、約 10 mOsm/kg 至約 300 mOsm/kg、約 10 mOsm/kg 至約 250  
 mOsm/kg、約 10 mOsm/kg 至約 200 mOsm/kg、約 10 mOsm/kg 至約 150 mOsm/kg、  
 約 10 mOsm/kg 至約 100 mOsm/kg、約 10 mOsm/kg 至約 80 mOsm/kg、約 10  
 mOsm/kg 至約 60 mOsm/kg、約 10 mOsm/kg、至約 40 mOsm/kg、約 10 mOsm/kg  
 至約 20 mOsm/kg、約 20 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg、約 20 mOsm/kg 至  
 約 11,000 mOsm/kg、約 20 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 20 mOsm/kg 至  
 約 9,000 mOsm/kg、約 20 mOsm/kg 至約 8,000 mOsm/kg、約 20 mOsm/kg 至約  
 7,000 mOsm/kg、約 20 mOsm/kg 至約 6,000 mOsm/kg、約 20 mOsm/kg 至約 5,000  
 mOsm/kg、約 20 mOsm/kg 至約 4,000 mOsm/kg、約 20 mOsm/kg 至約 3,000  
 mOsm/kg、約 20 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 20 mOsm/kg 至約 1,000  
 mOsm/kg、約 20 mOsm/kg 至約 800 mOsm/kg、約 20 mOsm/kg 至約 600 mOsm/kg、  
 約 20 mOsm/kg 至約 500 mOsm/kg、約 20 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 20  
 mOsm/kg 至約 350 mOsm/kg、約 20 mOsm/kg 至約 300 mOsm/kg、約 20

mOsm/mg 至約 250 mOsm/kg、約 20 mOsm/kg 至約 200 mOsm/kg、約 20 mOsm/kg 至約 150 mOsm/kg、約 20 mOsm/kg 至約 100 mOsm/kg、約 20 mOsm/kg 至約 80 mOsm/kg、約 20 mOsm/kg 至約 60 mOsm/kg、約 20 mOsm/kg 至約 40 mOsm/kg、約 40 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg、約 40 mOsm/kg 至約 11,000 mOsm/kg、約 40 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 40 mOsm/kg 至約 9,000 mOsm/kg、約 40 mOsm/kg 至約 8,000 mOsm/kg、約 40 mOsm/kg 至約 7,000 mOsm/kg、約 40 mOsm/kg 至約 6,000 mOsm/kg、約 40 mOsm/kg 至約 5,000 mOsm/kg、約 40 mOsm/kg 至約 4,000 mOsm/kg、約 40 mOsm/kg 至約 3,000 mOsm/kg、約 40 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 40 mOsm/kg 至約 1,000 mOsm/kg、約 40 mOsm/kg 至約 800 mOsm/kg、約 40 mOsm/kg 至約 600 mOsm/kg、約 40 mOsm/kg 至約 500 mOsm/kg、約 40 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 40 mOsm/kg 至約 350 mOsm/kg、約 40 mOsm/kg 至約 300 mOsm/kg、約 40 mOsm/kg 至約 250 mOsm/kg、約 40 mOsm/kg 至約 200 mOsm/kg、約 40 mOsm/kg 至約 150 mOsm/kg、約 40 mOsm/kg 至約 100 mOsm/kg、約 40 mOsm/kg 至約 80 mOsm/kg、約 40 mOsm/kg 至約 60 mOsm/kg、約 60 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg、約 60 mOsm/kg 至約 11,000 mOsm/kg、約 60 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 60 mOsm/kg 至約 9,000 mOsm/kg、約 60 mOsm/kg 至約 8,000 mOsm/kg、約 60 mOsm/kg 至約 7,000 mOsm/kg、約 60 mOsm/kg 至約 6,000 mOsm/kg、約 60 mOsm/kg 至約 5,000 mOsm/kg、約 60 mOsm/kg 至約 4,000 mOsm/kg、約 60 mOsm/kg 至約 3,000 mOsm/kg、約 60 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 60 mOsm/kg 至約 1,000 mOsm/kg、約 60 mOsm/kg 至約 800 mOsm/kg、約 60 mOsm/kg 至約 600 mOsm/kg、約 60 mOsm/kg 至約 500 mOsm/kg、約 60 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 60 mOsm/kg 至約 350 mOsm/kg、約 60 mOsm/kg 至約 300 mOsm/kg、約 60 mOsm/kg 至約 250 mOsm/kg、約 60 mOsm/kg 至約 200 mOsm/kg、約 60 mOsm/kg 至約 150 mOsm/kg、約 60 mOsm/kg 至約 100 mOsm/kg、約 60 mOsm/kg 至約 80 mOsm/kg、約 80 mOsm/kg 至約 12,000

mOsm/kg、約 80 mOsm/kg 至約 11,000 mOsm/kg、約 80 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 80 mOsm/kg 至約 9,000 mOsm/kg、約 80 mOsm/kg 至約 8,000 mOsm/kg、約 80 mOsm/kg 至約 7,000 mOsm/kg、約 80 mOsm/kg 至約 6,000 mOsm/kg、約 80 mOsm/kg 至約 5,000 mOsm/kg、約 80 mOsm/kg 至約 4,000 mOsm/kg、約 80 mOsm/kg 至約 3,000 mOsm/kg、約 80 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 80 mOsm/kg 至約 1,000 mOsm/kg、約 80 mOsm/kg 至約 800 mOsm/kg、約 80 mOsm/kg 至約 600 mOsm/kg、約 80 mOsm/kg 至約 500 mOsm/kg、約 80 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 80 mOsm/kg 至約 350 mOsm/kg、約 80 mOsm/kg 至約 300 mOsm/kg、約 80 mOsm/kg 至約 250 mOsm/kg、約 80 mOsm/kg 至約 200 mOsm/kg、約 80 mOsm/kg 至約 150 mOsm/kg、約 80 mOsm/kg 至約 100 mOsm/kg、約 100 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg、約 100 mOsm/kg 至約 11,000 mOsm/kg、約 100 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 100 mOsm/kg 至約 9,000 mOsm/kg、約 100 mOsm/kg 至約 8,000 mOsm/kg、約 100 mOsm/kg 至約 7,000 mOsm/kg、約 100 mOsm/kg 至約 6,000 mOsm/kg、約 100 mOsm/kg 至約 5,000 mOsm/kg、約 100 mOsm/kg 至約 4,000 mOsm/kg、約 100 mOsm/kg 至約 3,000 mOsm/kg、約 100 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 100 mOsm/kg 至約 1,000 mOsm/kg、約 100 mOsm/kg 至約 800 mOsm/kg、約 100 mOsm/kg 至約 600 mOsm/kg、約 100 mOsm/kg 至約 500 mOsm/kg、約 100 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 100 mOsm/kg 至約 350 mOsm/kg、約 100 mOsm/kg 至約 300 mOsm/kg、約 100 mOsm/kg 至約 250 mOsm/kg、約 100 mOsm/kg 至約 200 mOsm/kg、約 100 mOsm/kg 至約 150 mOsm/kg、約 150 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg、約 150 mOsm/kg 至約 11,000 mOsm/kg、約 150 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 150 mOsm/kg 至約 9,000 mOsm/kg、約 150 mOsm/kg 至約 8,000 mOsm/kg、約 150 mOsm/kg 至約 7,000 mOsm/kg、約 150 mOsm/kg 至約 6,000 mOsm/kg、約 150 mOsm/kg 至約 5,000 mOsm/kg、約 150 mOsm/kg 至約 4,000 mOsm/kg、約 150 mOsm/kg 至約 3,000 mOsm/kg、約 150 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg

mOsm/kg、約 150 mOsm/kg 至約 1,000 mOsm/kg、約 150 mOsm/kg 至約 800 mOsm/kg、約 150 mOsm/kg 至約 600 mOsm/kg、約 150 mOsm/kg 至約 500 mOsm/kg、約 150 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 150 mOsm/kg 至約 350 mOsm/kg、約 150 mOsm/kg 至約 300 mOsm/kg、約 150 mOsm/kg 至約 250 mOsm/kg、約 150 mOsm/kg 至約 200 mOsm/kg、約 200 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg、約 200 mOsm/kg 至約 11,000 mOsm/kg、約 200 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 200 mOsm/kg 至約 9,000 mOsm/kg、約 200 mOsm/kg 至約 8,000 mOsm/kg、約 200 mOsm/kg 至約 7,000 mOsm/kg、約 200 mOsm/kg 至約 6,000 mOsm/kg、約 200 mOsm/kg 至約 5,000 mOsm/kg、約 200 mOsm/kg 至約 4,000 mOsm/kg、約 200 mOsm/kg 至約 3,000 mOsm/kg、約 200 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 200 mOsm/kg 至約 1,000 mOsm/kg、約 200 mOsm/kg 至約 800 mOsm/kg、約 200 mOsm/kg 至約 600 mOsm/kg、約 200 mOsm/kg 至約 500 mOsm/kg、約 200 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 200 mOsm/kg 至約 350 mOsm/kg、約 200 mOsm/kg 至約 300 mOsm/kg、約 200 mOsm/kg 至約 250 mOsm/kg、約 250 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg、約 250 mOsm/kg 至約 11,000 mOsm/kg、約 250 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 250 mOsm/kg 至約 9,000 mOsm/kg、約 250 mOsm/kg 至約 8,000 mOsm/kg、約 250 mOsm/kg 至約 7,000 mOsm/kg、約 250 mOsm/kg 至約 6,000 mOsm/kg、約 250 mOsm/kg 至約 5,000 mOsm/kg、約 250 mOsm/kg 至約 4,000 mOsm/kg、約 250 mOsm/kg 至約 3,000 mOsm/kg、約 250 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 250 mOsm/kg 至約 1,000 mOsm/kg、約 250 mOsm/kg 至約 800 mOsm/kg、約 250 mOsm/kg 至約 600 mOsm/kg、約 250 mOsm/kg 至約 500 mOsm/kg、約 250 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 250 mOsm/kg 至約 350 mOsm/kg、約 250 mOsm/kg 至約 300 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 11,000 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 9,000 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 8,000 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 7,000 mOsm/kg

mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 6,000 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 5,000 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 4,000 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 3,000 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 1,000 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 800 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 600 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 500 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 300 mOsm/kg 至約 350 mOsm/kg、約 350 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg、約 350 mOsm/kg 至約 11,000 mOsm/kg、約 350 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 350 mOsm/kg 至約 9,000 mOsm/kg、約 350 mOsm/kg 至約 8,000 mOsm/kg、約 350 mOsm/kg 至約 7,000 mOsm/kg、約 350 mOsm/kg 至約 6,000 mOsm/kg、約 350 mOsm/kg 至約 5,000 mOsm/kg、約 350 mOsm/kg 至約 4,000 mOsm/kg、約 350 mOsm/kg 至約 3,000 mOsm/kg、約 350 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 350 mOsm/kg 至約 1,000 mOsm/kg、約 350 mOsm/kg 至約 800 mOsm/kg、約 350 mOsm/kg 至約 600 mOsm/kg、約 350 mOsm/kg 至約 500 mOsm/kg、約 350 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 11,000 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 9,000 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 8,000 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 7,000 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 6,000 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 5,000 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 4,000 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 3,000 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 1,000 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 800 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 600 mOsm/kg、約 400 mOsm/kg 至約 500 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 11,000 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 9,000 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 8,000 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 7,000 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 6,000 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 5,000 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 4,000 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 3,000 mOsm/kg

mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 1,000 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 800 mOsm/kg、約 500 mOsm/kg 至約 600 mOsm/kg、約 600 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg、約 600 mOsm/kg 至約 11,000 mOsm/kg、約 600 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 600 mOsm/kg 至約 9,000 mOsm/kg、約 600 mOsm/kg 至約 8,000 mOsm/kg、約 600 mOsm/kg 至約 7,000 mOsm/kg、約 600 mOsm/kg 至約 6,000 mOsm/kg、約 600 mOsm/kg 至約 5,000 mOsm/kg、約 600 mOsm/kg 至約 4,000 mOsm/kg、約 600 mOsm/kg 至約 3,000 mOsm/kg、約 600 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 600 mOsm/kg 至約 1,000 mOsm/kg、約 600 mOsm/kg 至約 800 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 11,000 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 9,000 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 8,000 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 7,000 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 6,000 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 5,000 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 4,000 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 3,000 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 800 mOsm/kg 至約 1,000 mOsm/kg、約 1,000 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg、約 1,000 mOsm/kg 至約 11,000 mOsm/kg、約 1,000 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 1,000 mOsm/kg 至約 9,000 mOsm/kg、約 1,000 mOsm/kg 至約 8,000 mOsm/kg、約 1,000 mOsm/kg 至約 7,000 mOsm/kg、約 1,000 mOsm/kg 至約 6,000 mOsm/kg、約 1,000 mOsm/kg 至約 5,000 mOsm/kg、約 1,000 mOsm/kg 至約 4,000 mOsm/kg、約 1,000 mOsm/kg 至約 3,000 mOsm/kg、約 1,000 mOsm/kg 至約 2,000 mOsm/kg、約 2,000 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg、約 2,000 mOsm/kg 至約 11,000 mOsm/kg、約 2,000 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 2,000 mOsm/kg 至約 9,000 mOsm/kg、約 2,000 mOsm/kg 至約 8,000 mOsm/kg、約 2,000 mOsm/kg 至約 7,000 mOsm/kg、約 2,000 mOsm/kg 至約 6,000 mOsm/kg、約 2,000 mOsm/kg 至約 5,000 mOsm/kg、約 2,000 mOsm/kg 至約 4,000 mOsm/kg、約 2,000 mOsm/kg 至約 3,000 mOsm/kg、約 3,000 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg、

約 3,000 mOsm/kg 至約 11,000 mOsm/kg、約 3,000 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 3,000 mOsm/kg 至約 9,000 mOsm/kg、約 3,000 mOsm/kg 至約 8,000 mOsm/kg、約 3,000 mOsm/kg 至約 7,000 mOsm/kg、約 3,000 mOsm/kg 至約 6,000 mOsm/kg、約 3,000 mOsm/kg 至約 5,000 mOsm/kg、約 3,000 mOsm/kg 至約 4,000 mOsm/kg、約 4,000 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg、約 4,000 mOsm/kg 至約 11,000 mOsm/kg、約 4,000 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 4,000 mOsm/kg 至約 9,000 mOsm/kg、約 4,000 mOsm/kg 至約 8,000 mOsm/kg、約 4,000 mOsm/kg 至約 7,000 mOsm/kg、約 4,000 mOsm/kg 至約 6,000 mOsm/kg、約 4,000 mOsm/kg 至約 5,000 mOsm/kg、約 5,000 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg、約 5,000 mOsm/kg 至約 11,000 mOsm/kg、約 5,000 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 5,000 mOsm/kg 至約 9,000 mOsm/kg、約 5,000 mOsm/kg 至約 8,000 mOsm/kg、約 5,000 mOsm/kg 至約 7,000 mOsm/kg、約 5,000 mOsm/kg 至約 5,000 mOsm/kg、約 6,000 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg、約 6,000 mOsm/kg 至約 11,000 mOsm/kg、約 6,000 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 6,000 mOsm/kg 至約 9,000 mOsm/kg、約 6,000 mOsm/kg 至約 8,000 mOsm/kg、約 6,000 mOsm/kg 至約 7,000 mOsm/kg、約 7,000 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg、約 7,000 mOsm/kg 至約 11,000 mOsm/kg、約 7,000 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 7,000 mOsm/kg 至約 9,000 mOsm/kg、約 7,000 mOsm/kg 至約 8,000 mOsm/kg、約 8,000 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg、約 8,000 mOsm/kg 至約 11,000 mOsm/kg、約 8,000 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 8,000 mOsm/kg 至約 9,000 mOsm/kg、約 9,000 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg、約 9,000 mOsm/kg 至約 11,000 mOsm/kg、約 9,000 mOsm/kg 至約 10,000 mOsm/kg、約 10,000 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg、或約 11,000 mOsm/kg 至約 12,000 mOsm/kg)。

在一些實施例中，第三液體培養基包括氯化鈉(NaCl)或氯化鉀(KCl)。

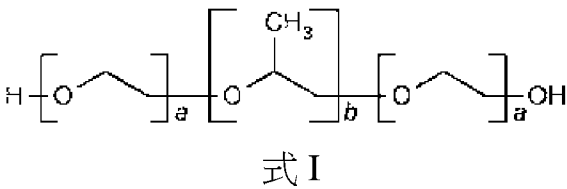
【0132】一些實施例進一步包括在這段時間期間的某些時間點，調整容器中第一、第二、及第三液體培養基之 pH 值及  $p\text{CO}_2$  其中之一或二者。在一

些實例中，該方法包括隨著這段時間的推移，提高容器中第一、第二、及第三液體培養基之  $pCO_2$  及  $pH$  值。在一些實例中，隨著這段時間的推移，量測容器中第一、第二、及第三液體培養基之  $pCO_2$  及  $pH$  值。

【0133】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，由以下一或多項來控制第一及/或第二液體培養基之滲透壓：第一及/或第二液體培養基與水溶液(例如：水)之比例、第一及/或第二液體培養基與濃縮滲透物(例如：氯化鈉)之比例、容器(例如：本文所說明任何容器(例如：生物反應器))之活細胞密度、第一及/或第二液體培養基之  $pH$  值、容器(例如：本文所說明的任何容器(例如：生物反應器))中之  $CO_2$  溶解量( $dCO_2$ )、加至容器(例如：本文所說明的任何容器(例如：生物反應器))中之碳(例如：葡萄糖)。

**Pluronic® F-68 (泊洛沙姆-188)**

【0134】 泊洛沙姆-188 為本領域已知之分子。泊洛沙姆-188 為環氧乙烷與氧化丙烯之非離子性合成嵌段共聚物。泊洛沙姆-188 具有之平均分子量在 7680 至約 9510 之間，且環氧乙烷佔其組成物重量約 81.8% 1.9%。例如：泊洛沙姆-188 具有下式 I 所示之結構，其中  $a$  為 80 及  $b$  為 27。泊洛沙姆-188 具有 CAS 編號 9003-11-6。



【0135】 泊洛沙姆-188 可自許多不同供應商商購取得，包括例如：Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)、Mediatech, Inc. (Manassas, VA)、MAST Therapeutics, Inc. (San Diego, CA)、EMD Millipore (Billerica, MA)、BASF (Ludwigshafen, Germany)、Pluronic® F-68 Life Technologies (Carlsbad, CA)、及 PhytoTechnology Laboratories、LLC (Shawnee Mission, KS)。

【0136】 在一些實施例中，第二液體培養基可包括超過約 8 g/L 之濃度之泊洛沙姆-188 (例如：約 9.0 g/L 之濃度或超過 9.0 g/L 之濃度、約 10.0 g/L 之濃度或超過 10.0 g/L 之濃度、約 12.0 g/L 之濃度或超過 12.0 g/L 之濃度、約 14.0 g/L 之濃度或超過 14.0 g/L 之濃度、或約 16.0 g/L 之濃度或超過 16.0 g/L 之濃度)。

【0137】 在一些實施例中，第二液體培養基可包括濃度約 8 g/L 與約 16 g/L 之間之泊洛沙姆-188(例如：約 8.0 g/L 與約 14.0 g/L 之間、約 8.0 g/L 與約 12.0 g/L 之間、約 8.0 g/L 與約 10.0 g/L 之間、約 10.0 g/L 與約 16.0 g/L 之間、約 10.0 g/L 與約 12.0 g/L 之間、約 12.0 g/L 與約 16.0 g/L 之間、約 12.0 g/L 與約 14.0 g/L 之間、約 14.0 g/L 與約 16.0 g/L 之間、或約 15.0 g/L 與約 16.0 g/L 之間)。

【0138】 在一些實施例中，第三液體培養基可包括濃度約 0 g/L 與約 8 g/L 之間之泊洛沙姆-188(例如：約 0 g/L 與約 6 g/L 之間、約 0 g/L 至約 4 g/L、約 0 g/L 至約 2 g/L、約 0 g/L 至約 1 g/L、約 0.5 g/L 與約 8 g/L 之間、約 0.5 g/L 與約 6.0 g/L 之間、約 0.5 g/L 與約 4.0 g/L 之間、約 0.5 g/L 與約 2.0 g/L 之間、約 1.0 g/L 與約 8 g/L 之間、約 1.0 g/L 與約 6.0 g/L 之間、約 1.0 g/L 與約 4.0 g/L 之間、約 2.0 g/L 與約 8 g/L 之間、約 2.0 g/L 與約 6.0 g/L 之間、約 2.0 g/L 與約 4.0 g/L 之間、約 5.0 g/L 與約 8 g/L 之間、約 5.0 g/L 與約 6.0 g/L 之間、約 6.0 g/L 與約 8 g/L 之間、或約 7.0 g/L 與約 8 g/L 之間)。

【0139】 本文所提供任何方法之一些實施例包括隨時間提高培養物之泊洛沙姆-188 濃度。在一些實施例中，培養基包括之泊洛沙姆-188 濃度係依據選自以下一或多個因子所選擇的培養基中氣體流速及活細胞密度之群組中。此等方法中，要達成培養基中所選擇之泊洛沙姆-188 濃度可以在培養步驟之前先添加泊洛沙姆-188 至培養基中，及/或在培養步驟期間添加泊洛沙姆-188 至培養基中。所選擇之泊洛沙姆-188 濃度可為本文舉例說明泊洛沙姆-188 之任何濃度或範圍。

## 培養基

【0140】液體培養基係本領域已知的。液體培養基(例如：第一、第二、及/或第三液體培養基)可以補充有哺乳類動物血清(例如：胎牛血清及牛血清)、及/或生長激素或生長因子(例如：胰島素、轉鐵蛋白、及表皮生長因子)。或者或此外，液體培養基(例如：第一、第二、及/或第三液體培養基)可為化學性界定液體培養基、無動物衍生組份之液體培養基、無血清液體培養基、或含血清液體培養基。化學性界定液體培養基、無動物衍生組份之液體培養基、無血清液體培養基、及含血清液體培養基之非限制性實例可商購取得。

【0141】液體培養基通常包含能量來源(例如：碳水化合物，如：葡萄糖)、必需胺基酸(例如：二十種胺基酸之基本組合加半胱胺酸)、維生素及/或其他需要低濃度之有機化合物、游離之脂肪酸、及/或微量元素。若需要時，可在液體培養基(例如：第一、第二、及/或第三液體培養基)中補充例如：哺乳類動物激素或生長因子(例如：胰島素、轉鐵蛋白、或表皮生長因子)、鹽類及緩衝劑(例如：鈣鹽、鎂鹽、及磷酸鹽類)、核苷與鹼基(例如：腺苷、胸苷、及次黃嘌呤)、蛋白質及組織水解物、及/或此等添加物之任何組合。

【0142】本領域已知有許多種不同液體培養基可用於本文所說明任何方法中來培養細胞(例如：哺乳類動物細胞)。亦適用於本方法之培養基組份包括(但不限於)：化學性界定(CD)水解物，例如：CD 蛋白腴、CD 多肽(兩個或更多個胺基酸)、及 CD 生長因子。其他液體培養基及培養基組份的實例係本領域已知的。

【0143】本領域通常知識者咸了解，本文所說明的第一液體培養基、第二液體培養基、及第三液體培養基可為相同型態或不同型態之培養基。

【0144】從細胞培養物取得之液體培養基可以過濾或澄清化，以得到實質上不含細胞及/或病毒之液體培養基。過濾或澄清化液體培養基以去除細胞之方法(例如：0.2- $\mu\text{m}$  過濾法及採用交替切向流(Alternating Tangential Flow)(ATFTM)系統之過濾法)為本領域已知的。哺乳類動物細胞亦可採用離心

法從液體培養基中去除，並移除上清液，其係實質上不含細胞之液體培養基；或讓細胞依重力沉降至包含液體培養基之容器或生物反應器底部，並移除遠離沉降之重組細胞移除的液體培養基(實質上不含細胞之液體培養基)。

【0145】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，第一、第二、及/或第三液體培養基具有之 pH 值為約 6.0 至約 6.8 (例如：其中任何子範圍)。

【0146】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，第一、第二及/或第三液體培養基包括氯化鈉或氯化鉀。在本文所說明任何方法之一些實施例中，第一、第二及/或第三液體培養基進一步包括以下一或多者：L-精胺酸、L-天冬醯胺、L-麩醯胺、L-組胺酸、羥基-L-脯胺酸、L-異白胺酸、L-白胺酸、L-離胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯基丙胺酸、L-脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-纈胺酸、膽鹼、肌醇、生物素、鈣、葉酸、菸醯胺、吡哆醇、核黃素、硫胺素、維生素 B12、硫辛酸、麩胱甘肽、亞麻油酸、丙酮酸鹽、HEPES、亞鐵、檸檬酸、鋅、銅、透石膏(selenite)、乙醇胺、腐胺、精胺、鉀、磷酸鹽、鎂、鋁、釩酸鹽、鉬酸鹽、錳、鎳、矽酸鹽、及錫。

### **pH 值 (6-8、6.5-7.5)**

【0147】 本文所說明方法係在 pH 值約 6.8 至約 7.1 下進行。

【0148】 第一、第二、及/或第三液體培養基可具有 pH 值約 6.8 至約 7.1 (例如：約 6.8 至約 7.0、約 6.8 至約 6.9、約 6.9 至約 7.1、約 6.9 至約 7.0、或約 7.0 至約 7.2)。

【0149】 在一些實施例中，第一、第二、及/或第三液體培養基可具有 pH 值為約 6.8、約 6.9、約 7.0、或約 7.1。

### **溫度(30 °C-40 °C；37 °C)**

【0150】 培養哺乳類動物細胞之步驟可在約 32°C 至約 39°C 之溫度下進行(例如：約 32°C 至約 38°C、約 32°C 至約 36°C、約 32°C 至約 35°C、約 32°C 至約 34°C、約 34°C 至約 39°C、約 34°C 至約 38°C、約 34°C 至約 36°C、約 35°C

至約 39°C、約 35°C 至約 38°C、約 35°C 至約 37°C、約 36°C 至約 39°C、約 36°C 至約 38°C、或約 37°C 至約 39°C)。

【0151】 在一些實施例中，培養哺乳類動物細胞之步驟係在約 32°C、約 33°C、約 34°C、約 35°C、約 36°C、約 37°C、約 38°C、或約 39°C 之溫度下進行。

【0152】 習此相關技藝者咸了解，可在培養步驟期間，在特定(多個)時間點改變溫度，例如：依每小時或每天。例如：可在將細胞(例如：哺乳類動物細胞)開始接種至生物反應器後約一天、兩天、三天、四天、五天、六天、七天、八天、九天、十天、十一天、十二天、十四天、十五天、十六天、十七天、十八天、十九天、或約二十天或更多天，改變或遷移溫度(例如：提高或降低)。例如：溫度可以向上遷移(例如：改變至多或約 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、或至多約 10°C)。例如：溫度可以向下遷移(例如：改變至多或約 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或至多或約 20°C)。

**CO<sub>2</sub> (控制溶解之 CO<sub>2</sub> 至分壓在 20-200 mmHg 之範圍內；80-140 mmHg)**

【0153】 培養步驟可包括讓生物反應器中之液體培養基曝露在包含最高或約 15% CO<sub>2</sub> 之蒙氣中(例如：最高或約 14% CO<sub>2</sub>、12% CO<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>、8% CO<sub>2</sub>、6% CO<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、4% CO<sub>2</sub>、3% CO<sub>2</sub>、2% CO<sub>2</sub>、或最高或約 1% CO<sub>2</sub>)。

【0154】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，該方法進一步包括在這段時間期間的某些時間點，提高容器(例如：本文所說明的任何容器(例如：生物反應器))中第一及第二液體培養基之 pCO<sub>2</sub> 至少 10% (例如：至少 12%、至少 14%、至少 15%、至少 16%、至少 18%、至少 20%、至少 22%、至少 24%、至少 25%、至少 26%、至少 28%、至少 30%、至少 32%、至少 34%、至少 35%、至少 36%、至少 38%、至少 40%、至少 42%、至少 44%、至少 45%、至少 46%、

至少 48%、至少 50%、至少 52%、至少 54%、至少 55%、至少 56%、至少 58%、至少 60%、至少 62%、至少 64%、至少 65%、至少 66%、至少 68%、至少 70%、至少 72%、至少 74%、至少 76%、至少 78%、至少 80%、至少 82%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 88%、至少 90%、至少 92%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%)且提高 pH 值至少 8% (例如：至少 10%、至少 12%、至少 14%、至少 15%、至少 16%、至少 18%、至少 20%、至少 22%、至少 24%、至少 25%、至少 26%、至少 28%、至少 30%、至少 32%)。

【0155】 在本文所說明任何方法之一些實施例中，隨著這段時間的推移，依據活細胞密度提高容器(例如：本文所說明任何容器(例如：生物反應器))中第一、第二、及/或第三液體培養基之  $pCO_2$  及 pH 值(例如：至少 12%、至少 14%、至少 15%、至少 16%、至少 18%、至少 20%、至少 22%、至少 24%、至少 25%、至少 26%、至少 28%、至少 30%、至少 32%、至少 34%、至少 35%、至少 36%、至少 38%、至少 40%、至少 42%、至少 44%、至少 45%、至少 46%、至少 48%、至少 50%、至少 52%、至少 54%、至少 55%、至少 56%、至少 58%、至少 60%、至少 62%、至少 64%、至少 65%、至少 66%、至少 68%、至少 70%、至少 72%、至少 74%、至少 76%、至少 78%、至少 80%、至少 82%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 88%、至少 90%、至少 92%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或至少 99%)。

## 重組蛋白質

【0156】 可由本文所提供方法產生之重組蛋白質的非限制性實例包括免疫球蛋白(包括輕鏈及重鏈免疫球蛋白、抗體、或抗體片段(例如：本文所說明的任何抗體片段)、酵素(例如：半乳糖苷酶(例如： $\alpha$ -半乳糖苷酶)、美而贊(Myozyme)、或伊米苷酶(Cerezyme))、蛋白質(例如：人類促紅血球生成素、腫瘤壞死因子(TNF)、或干擾素  $\alpha$  或  $\beta$ )、或免疫原性或抗原性蛋白質或蛋白質片段(例如：用於疫苗之蛋白質)。重組蛋白質可為包含至少一個多功能重組蛋白質骨架之工程化抗原結合性多肽(參見例如：Gebauer 等人之 *Current Opin.*

*Chem. Biol.* 13:245-255, 2009；及美國專利申請案公告案號 2012/0164066 (其完整內容已以引用方式併入本文中)所述之重組抗原結合性蛋白質)。

【0157】重組蛋白質之非限制性實例包括以下之抗體：帕尼單抗(panitumumab)、奧馬珠單抗(omalizumab)、阿巴沃單抗(abagovomab)、阿昔單抗(abciximab)、阿克托舒單抗(actoxumab)、阿達木單抗(adalimumab)、阿卡土穆單抗(adecatumumab)、依法利珠單抗(afelimomab)、阿夫土珠單抗(afutuzumab)、阿珠單抗(alacizumab)、阿珠單抗(alacizumab)、阿輪單抗(alemtuzumab)、阿利洛單抗(alirocumab)、阿特莫單抗(altumomab)、阿瑪圖單抗(amatuximab)、阿瑪圖單抗(amatuximab)、阿納圖單抗(anatumomab)、阿路克單抗(anrukinzumab)、阿波利珠單抗(apolizumab)、阿西莫單抗(arcitumomab)、阿特努單抗(atinumab)、托珠單抗(tocilizumab)、巴里昔單抗(basilizimab)、貝妥莫單抗(bectumomab)、貝利莫單抗(belimomab)、貝伐珠單抗(bevacizumab)、貝西索單抗(besilesomab)、貝索特單抗(bezlotoxumab)、比西單抗(bicirumab)、卡那單抗(canakinumab)、希特珠單抗(certolizumab)、希特昔單抗(cetuximab)、希特莫單抗(cixutumumab)、達利珠單抗(daclizumab)、單尼舒單抗(denosumab)、單舒單抗(densumab)、抑克珠單抗(eculizumab)、依決洛單抗(edrecolomab)、依法利珠單抗(efalizumab)、依芬古單抗(efungumab)、依帕珠單抗(epratuzumab)、依特莫蘇單抗(ertumaxomab)、依達珠單抗(etaracizumab)、非吉單抗(figitumumab)、戈利木單抗(golimumab)、必替莫單抗金屬螯合劑(ibritumomab tiuxetan)、奧戈伏單抗(igovomab)、伊加圖珠單抗(imgatuzumab)、英夫利西單抗(infliximab)、伊諾莫單抗(inolimomab)、伊諾特珠單抗(inotuzumab)、拉司他珠單抗(labetuzumab)、來必珠單抗(lebrikizumab)、莫西圖單抗(moxetumomab)、納塔利珠單抗(natalizumab)、歐比努珠單抗(obinutuzumab)、奧戈伏單抗(oregovomab)、帕利珠單抗(palivizumab)、帕尼單抗(panitumumab)、帕妥珠單抗(pertuzumab)、蘭尼單抗(ranibizumab)、利妥昔單抗(rituximab)、托珠單抗(tocilizumab)、托西莫單抗(tositumomab)、托樂基單抗(tralokinumab)、圖土珠

單抗(tucotuzumab)、曲妥珠單抗(trastuzumab)、維妥珠單抗(veltuzumab)、扎魯目單抗(zalutumumab)、及西妥昔單抗(zatuximab)。

【0158】 可由本文所說明方法產生之其他重組抗體的實例係本領域已知的。可由本方法產生之重組蛋白質之其他非限制性實例包括：阿糖苷酶  $\alpha$ (alglucosidase  $\alpha$ )、拉羅尼酶(laronidase)、阿巴西普(abatacept)、嘉硫酶(galsulfase)、黃體素  $\alpha$ (lutropin  $\alpha$ )、抗血友病因子(antihemophilic factor)、乙型無半乳糖苷酶(agalsidase  $\beta$ )、干擾素  $\beta$ -1a、阿法達貝泊汀(darbepoetin  $\alpha$ )、替奈普酶(tenecteplase)、依那西普(etanercept)、凝血因子 IX、濾泡刺激激素、干擾素  $\beta$ -1a、伊米苷酶(imiglucerase)、去氧核糖酶  $\alpha$ (dornase  $\alpha$ )、紅血球生成素  $\alpha$ (epoetin  $\alpha$ )、胰島素或胰島素類似物、美卡舍明(mecasermin)、因子 VIII、因子 VIIa、抗凝血酶 III、蛋白質 C、人類白蛋白、促紅血球生成素、顆粒性白血球群落刺激因子、顆粒性白血球巨噬細胞群落刺激因子、介白素-11、拉羅尼酶(laronidase)、艾杜硫酶(idursuphase)、嘉硫酶(galsulphase)、 $\alpha$ -1-蛋白酶抑制劑、乳糖酶、腺苷脫胺酶、組織纖維蛋白溶酶原活化劑、促甲狀腺素  $\alpha$ (thyrotropin  $\alpha$ )(例如：Thyrogen®)及阿替普酶(alteplase)。可由本方法產生之其他重組蛋白質的實例包括酸性  $\alpha$ -葡萄糖苷酶、阿糖苷酶  $\alpha$ (alglucosidase  $\alpha$ )(例如：Myozyme®及 Lumizyme®)、 $\alpha$ -L-艾杜糖醛酸酶(iduronidase)(例如：Aldurazyme®)、艾杜糖醛酸硫酸酯酶(iduronate sulfatase)、乙醯肝素 N-硫酸酯酶、半乳糖-6-硫酸酯酶、酸性  $\beta$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶、N-乙醯基葡萄糖胺-1-磷酸轉移酶、 $\alpha$ -N-乙醯基半乳糖胺酶、酸性脂酶、溶酶體酸性神經醯胺酶、酸性神經鞘磷脂酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶(例如：Cerezyme®及 Ceredase®)、半乳糖基神經醯胺酶、 $\alpha$ -半乳糖苷酶-A (例如：Fabrazyme®)、酸性  $\beta$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、神經胺酸酶、己糖胺酶 A、及己糖胺酶 B。

【0159】 藉由從細胞(例如：哺乳類動物細胞)中移除或物理性分離液體培養基(例如：第一、第二、及第三液體培養基中的一或多個)，即可從液體培養基回收分泌之可溶性重組蛋白質。許多種從細胞(例如：哺乳類動物細胞)

中移除液體培養基之不同方法是本領域已知的，包括例如：離心、過濾、移液、及/或抽吸。然後可以利用多種不同生物技術，包括各種不同型態之層析法(例如：親和性層析法、分子篩層析法、陽離子交換層析法、或陰離子交換層析法)及/或過濾(例如：分子量截斷過濾)，從液體培養基回收分泌之重組蛋白質並進一步純化。

## 回收重組蛋白質

**【0160】** 本文所說明方法之一些實施例進一步包括從哺乳類動物細胞及/或第一、第二、及第三液體培養基中的一或多個中回收重組蛋白質(例如：本文所說明的任何重組蛋白質)。在一些實例中，該回收包括裂解哺乳類動物細胞。在其他實例中，該回收可包括從培養基(例如：第一、第二、及第三液體培養基中的一或多個)中收集重組蛋白質。

**【0161】** 可在培養物達到以下活細胞密度後進行收集，例如：達到超過約  $60 \times 10^6$  個細胞/mL、 $62 \times 10^6$  個細胞/mL、 $64 \times 10^6$  個細胞/mL、 $66 \times 10^6$  個細胞/mL、 $68 \times 10^6$  個細胞/mL、 $70 \times 10^6$  個細胞/mL、 $72 \times 10^6$  個細胞/mL、 $74 \times 10^6$  個細胞/mL、 $76 \times 10^6$  個細胞/mL、 $78 \times 10^6$  個細胞/mL、 $80 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $82 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $84 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $86 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $88 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $90 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $92 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $94 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $96 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $98 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $100 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $102 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $104 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $106 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $108 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $110 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $112 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $114 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $116 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $118 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $120 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $122 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $124 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $126 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $128 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $130 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $132 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $134 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $136 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $138 \times 10^6$  個細胞/mL、超過

約  $140 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $142 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $144 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $146 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $148 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $150 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $152 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $154 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $156 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $158 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $160 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $162 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $164 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $166 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $168 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $170 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $172 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $174 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $176 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $178 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $180 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $182 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $184 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $186 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $188 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $190 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $192 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $194 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $196 \times 10^6$  個細胞/mL、超過約  $198 \times 10^6$  個細胞/mL、或超過約  $200 \times 10^6$  個細胞/mL)。

## 調配重組蛋白質

【0162】 本文所說明任何方法之一些實施例進一步包括由重組蛋白質(例如：由本文所說明任何方法產生之重組蛋白質，例如：回收之重組蛋白質或回收且純化之重組蛋白質)調配成醫藥組成物之步驟。舉例來說，該調配可包括添加醫藥上可接受之賦形劑至重組蛋白質(例如：由本文所說明任何方法產生之重組蛋白質，例如：回收之重組蛋白質或回收且純化之重組蛋白質)中。該調配可包括混合醫藥上可接受之賦形劑與重組蛋白質(例如：由本文所說明任何方法產生之重組蛋白質，例如：回收之重組蛋白質或回收且純化之重組蛋白質)。醫藥上可接受之賦形劑(例如：非天然發生之醫藥上可接受之賦形劑)之實例係本領域習知者。在一些實施例中，重組蛋白質(例如：由本文所說明任何方法產生之重組蛋白質，例如：回收之重組蛋白質或回收且純化之重組蛋白質)係調配成供經靜脈內、經動脈內、皮下、腹膜內、或肌內投藥。

## 醫藥組成物及套組

【0163】 本文亦提供一種醫藥組成物，其包括至少一種本文所說明的任何重組蛋白質(例如：由本文所說明的任何方法產生)。醫藥組成物可依本領域已知之任何方式調配。醫藥組成物係調配成與其等計畫投藥途徑相容者(例如：經靜脈內、經動脈內、皮下、腹膜內、或肌內投藥)。

【0164】 在一些實施例中，醫藥組成物可包括醫藥上可接受之載劑(例如：磷酸鹽緩衝生理鹽水)。可依例如：受試者所需要及可耐受之劑量及頻率，單次或多次投予調配物。

【0165】 本文亦提供一種套組，其包括醫藥組成物(例如：本文所說明的任何醫藥組成物)。在一些實施例中，該套組包括執行本文所說明的任何方法之說明書。在一些實施例中，該套組可包括至少一個劑量(例如：2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個劑量)之本文所說明的任何醫藥組成物。

## 治療方法

【0166】 本文提供一種治療有需要之受試者之方法，其包括：對受試者投予治療有效量之本文所說明的任何醫藥組成物，其包括至少一種本文所說明的任何重組蛋白質(由本文所說明的任何方法產生)。

【0167】 該投藥法可以例如：一週進行至少一次(例如：至少 2 次、至少 3 次、至少 4 次、至少 5 次、至少 6 次、至少 7 次、至少 8 次、至少 9 次、至少 10 次、至少 11 次、或至少 12 次)。

【0168】 下列實例進一步說明本發明，其實例並未限制申請專利範圍中說明之本發明範圍。

## 實例

### 實例 1. 控制滲透壓之方法

【0169】 涉及灌注培養之方法係採用大量液體培養基且每一批的製備均需要大量成本。大部份液體培養基為水。然而，完整的高細胞密度灌注過

程中不可以僅使用單一液體培養基，因為細胞密度高，滲透壓會隨營養素消耗而顯著下降。例如：消耗 12 g/L 葡萄糖會造成滲透壓下降 67 mOsm/kg。

【0170】 使用具有典型滲透壓(290 mOsm/kg 至 320 mOsm/kg)之單一液體培養基時，會在高細胞密度時造成低滲透壓。滲透壓過低的情況下會造成細胞健康不良及生產力下降。然而，從開始進行細胞培養(例如：灌注細胞培養)即使用單一高滲透壓液體培養基時，可能造成乳酸鹽產生失控及細胞培養物減少。

【0171】 本文所說明的第二液體培養基(4x 液體培養基調配物)(加至第一液體培養基中)可以具有相對高之滲透壓(相對於分批進料培養之進料液體培養基)，且可具有低於 7 之 pH 值，以防止沉澱。此第二液體培養基可以於室溫下，即使在 pH 6 至 pH 7 下，在一週內保持安定。至少可利用兩個替代選項來提高第二液體培養基的安定性：1)排除半胱胺酸及酪胺酸，或 2)採用半胱胺酸及酪胺酸之替代型式(例如：分別為丙酮酸鹽/半胱胺酸及甘胺酸-酪胺酸)。

【0172】 為了控制灌注細胞培養之滲透壓，可以使用濃縮之第二液體培養基，並可使用不同量之第三低滲透壓液體(例如：水)稀釋。若需要提高滲透壓時，亦可視需要地添加濃縮氯化鈉(NaCl)溶液。此外，可以變化培養物之溶解的 CO<sub>2</sub> 濃度及 pH 值，來調控滲透壓。

## 實例 2. 滲透壓對細胞培養效能之影響

【0173】 為了測定滲透壓對細胞培養效能(例如：活細胞密度)之影響，哺乳類動物細胞生長在具有滲透壓約 290 mOsm/kg 至約 400 mOsm/kg 之間之液體培養基中。圖 1A 及 1B 分別顯示表現蛋白質 1 及蛋白質 2 之哺乳類動物細胞之活細胞密度隨時間變化之圖表。圖 1A 及 1B 之數據顯示，當哺乳類動物細胞在滲透壓超過 380 mOsm/kg 之液體培養基中生長時，觀察到該哺乳類動物細胞之生長較慢。

【0174】 分別顯示在第 4 天及第 5 天時，在所測試滲透壓下之平均細胞直徑(圖 2A 及 2B)。圖 2A 及 2B 之數據顯示滲透壓越高時，平均細胞尺寸越大，表示滲透壓會影響細胞型態。

【0175】 圖 3A 及 3B 分別顯示兩個以濃縮細胞培養基(滲透壓 1320 mOsm/kg)及水為進料之生物反應器之滲透壓及細胞培養物的生長。濃縮培養基進料與水進料之比例會隨培養之生長期變化。容器 22(「V22」)中水與培養基之比例低於容器 27(「V27」)，結果在培養第 10 天開始產生高滲透壓(圖 3A)。此結果造成 V22 之生長速率相對於 V27 下降(圖 3B)。高滲透壓亦造成生產率降低(圖 3C)及乳酸鹽脫氫酶產量增加，表示培養物健康下降(圖 3D)。一種對高滲透壓的反應為 V22 中乳酸鹽產量增加(圖 3E)，其將繼續推高乳酸鹽產生(「失控之乳酸鹽產生」)。

【0176】 圖 4A 及 4B 顯示產生高量乳酸鹽之培養物，結果造成提高之滲透壓。一旦滲透壓達到>400 mOsm/kg，乳酸鹽之生產速率即上升且細胞生長及活力下降。

### 實例 3. 控制滲透壓之選項

【0177】 安全操作灌注培養之滲透壓閥值為在高端的 360 – 420 mOsm/kg 之範圍內。可以透過各種不同方式控制滲透壓，例如：1)送進濃縮之細胞培養基並配合反饋控制來調控水稀釋速率，2)當需要較高滲透壓時，改變過程參數來影響鹼的添加，例如：高 pH 值及  $pCO_2$ ，3)在生物反應器運作中使用至少兩種不同液體培養基，例如：低滲透壓之生長液體培養基及高滲透壓之生產液體培養基，4)在高細胞密度時，利用反饋控制來添加鹽，以提高滲透壓，例如：NaCl 及/或 KCl。可以依據離線量測無細胞之培養通透液之滲透壓，手動改變製程來控制滲透壓。或者，可依據連線滲透壓預估值，執行自動化反饋控制。可由連線電容量測值、連線電導率量測值、或拉曼光譜量測值，配合適當模式來預估連線滲透壓。

【0178】圖 5A 及 5B 顯示從生長期至生產期改變進料培養基滲透壓之步驟。針對每一個生物反應器，在指定時間點手工啟動添加 NaCl，然後在實驗期間保持恆定 NaCl 流。圖 5A 及 5B 之數據顯示，儘管設定在相同電容點下，不同滲透壓下會出現不同 VCD 型態。此表示使用恆定 NaCl 進料速率來控制滲透壓的效果仍然有限。

【0179】圖 6A 及 6B 顯示，當需要控制滲透壓時，在收成期間之高細胞密度下，滲透壓與電導率呈良好相關性。

【0180】採用 ABER 探針量測電導率，且以兩個量測值之平均值作圖，示於圖 7 中。為了維持設定點，依據電導率反饋控制，送進 5 M NaCl 至生物反應器中。如圖 7 所示，於第 5 天開始控制，在培養期早期不需要添加鹽。在約第 10 天開始添加 NaCl。依據電導率反饋控制添加 NaCl，在培養的收成期全程達成恆定電導率及滲透壓。此外，相對於採用恆定 NaCl 添加的製程，依據電導率反饋控制添加 NaCl 時，有助於在程序失穩期間降低滲透壓偏差。

【0181】圖 8A 及 8B 之數據顯示，在相同電容設定點下的所有四個實驗性運作呈類似活細胞密度型態，其中自動化電導率控制產生類似的滲透壓傾向。

【0182】圖 9 顯示使用兩種不同探針型態之電導率與滲透壓之間的良好相關性。

【0183】圖 10 顯示可以使用拉曼光譜準確預估滲透壓，且拉曼探針可以置入生物反應器中或置入無細胞之灌注收成物中。

【0184】如圖 11 所示，觀察到灌注細胞培養過程之活細胞密度會在製程中途達到低點的傾向。此點歸因於當控制生物質濃度以維持恆定電容值(如生物反應器中電容感測器所量測)時，細胞會變大。在此等培養的後半段中，細胞會變小，而活細胞密度會上升。

【0185】當整合來自多批的數據時，發現滲透壓與培養物中達到之最低活細胞密度呈相關性，滲透壓越高與細胞密度越低相關。此結果示於圖中，

其中由 60 天製程中第 30 天之 VCD 相對於第 30 天之培養滲透壓作圖。控制滲透壓在所需程度下之能力可以讓製程期間之 VCD 變化最小化並改善製程中之一致性。

### 其他實施例

【0186】 咸了解，雖然本發明已配合其詳細說明來闡述，但上述說明僅供例示，而非限制本發明範圍，本發明範圍係由附錄之申請專利範圍所界定。其他態樣、優點、及修飾均在下列申請專利範圍內。

【符號說明】 無

【生物材料寄存】 無

## 【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種灌注培養哺乳類動物細胞之方法，該方法包括：

提供一個容器，其包含哺乳類動物細胞，該哺乳類動物細胞係安置在具有滲透壓約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg 之第一液體培養基中；

在約 32°C 至約 39°C 下培養哺乳類動物細胞一段時間；及

在該段時間期間，連續或定期移除第一體積之第一液體培養基，並對該第一液體培養基添加第二體積之第二液體培養基，其中該第一體積與該第二體積為約相等的，且該容器中該第一及該第二液體培養基之滲透壓在該段時間中，係維持在約270 mOsm/kg至約380 mOsm/kg。

【請求項2】 如請求項1所述之方法，其中該第一液體培養基具有之滲透壓為約270 mOsm/kg至約320 mOsm/kg。

【請求項3】 如請求項1所述之方法，其中該第二液體培養基包含超過8 g/L之泊洛沙姆(poloxamer)。

【請求項4】 如請求項3所述之方法，其中該第二液體培養基包含超過10 g/L之泊洛沙姆。

【請求項5】 如請求項4所述之方法，其中該第二液體培養基包含超過12 g/L之泊洛沙姆。

【請求項6】 如請求項3至5中任一項所述之方法，其中該泊洛沙姆為 Pluronic F68。

【請求項7】 如請求項1至6中任一項所述之方法，其中該第二液體培養基具有之 pH 值為約 6.8 至約 7.1。

【請求項8】 如請求項1至7中任一項所述之方法，其中該第二液體培養基包含氯化鈉。

【請求項9】 如請求項1至8中任一項所述之方法，其中該第二液體培養基具有之滲透壓為約 800 mOsm/kg 至約 2,500 mOsm/kg。

【請求項10】 如請求項9所述之方法，其中該第二液體培養基具有之滲透壓為約 1,200 mOsm/kg 至約 1,800 mOsm/kg。

【請求項11】 如請求項1至10中任一項所述之方法，其中隨著該段時間的推移，提高所添加的該第二液體培養基之該第二體積。

【請求項12】 如請求項 11 所述之方法，其中隨著該段時間的推移，依據活細胞密度提高所添加的該第二液體培養基之該第二體積。

【請求項13】 如請求項 1 至 12 中任一項所述之方法，其中該容器中該第一及該第二液體培養基滲透壓之維持包括在該段時間期間的某些時間點，調整該第二液體培養基之流速。

【請求項14】 如請求項 13 所述之方法，其中該調整步驟包括在該段時間期間的某些時間點，提高該第二液體培養基之流速。

【請求項15】 如請求項 14 所述之方法，其中該方法進一步包括在該段時間期間的某些時間點，調整該容器中該第一及該第二液體培養基之 pH 值及  $pCO_2$  其中之一或二者。

【請求項16】 如請求項 15 所述之方法，其中該調整步驟包括在該段時間期間的某些時間點，降低該第二液體培養基之流速。

【請求項17】 如請求項 1 至 16 中任一項所述之方法，其中該方法進一步包括隨著該段時間的推移，提高該容器中該第一及該第二液體培養基之  $pCO_2$  及 pH 值。

【請求項18】 如請求項 17 所述之方法，其中隨著該段時間的推移，依據活細胞密度提高該容器中該第一及該第二液體培養基之  $pCO_2$  及 pH 值。

【請求項19】 如請求項 1 至 18 中任一項所述之方法，其中在該段時間期間，該第一及該第二液體培養基之活細胞密度達到超過  $60 \times 10^6$  個細胞/mL。

【請求項20】 如請求項 19 所述之方法，其中在該段時間期間，該第一及該第二液體培養基之活細胞密度達到超過  $100 \times 10^6$  個細胞/mL。

【請求項21】 如請求項 20 所述之方法，其中在該段時間期間，該第一及該第二液體培養基之活細胞密度達到超過  $120 \times 10^6$  個細胞/mL。

【請求項22】 如請求項 1 至 21 中任一項所述之方法，其中該方法進一步包括在該段時間期間，監測該容器中該第一及該第二液體培養基之滲透壓。

【請求項23】 如請求項 1 至 22 中任一項所述之方法，其中在該段時間期間，該第一體積之該第一液體培養基之移除及該第二體積之該第二液體培養基之添加係同時執行的。

【請求項24】 如請求項 1 至 23 中任一項所述之方法，其中在該段時間期間，該第一體積之該第一液體培養基之移除及該第二體積之該第二液體培養基之添加係連續執行的。

【請求項25】 如請求項 1 至 24 中任一項所述之方法，其中隨著該段時間的推移，該第一體積之該第一液體培養基之移除及該第二體積之該第二液體培養基之添加係定期執行的。

【請求項26】 如請求項 1 至 25 中任一項所述之方法，其中該方法進一步包括在該段時間期間，定期添加第三體積之水溶液至該容器中的該第一及該第二液體培養基中，其中該第一體積與該第二及該第三體積之總和為約相等的，且該容器中該第一、該第二、及該第三液體培養基之滲透壓在段時間中，係維持在約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg。

【請求項27】 如請求項 26 所述之方法，其中該水溶液為鹽溶液。

【請求項28】 如請求項 27 所述之方法，其中該鹽溶液為氯化鈉溶液或氯化鉀溶液。

【請求項29】 如請求項 26 至 28 中任一項所述之方法，其中在該段時間期間，該第一體積之該第一液體培養基之移除、該第二體積之該第二液體培養基之添加、及該第三體積之添加係同時執行的。

【請求項30】 如請求項 26 至 28 中任一項所述之方法，其中在該段時間期間，該第一體積之該第一液體培養基之移除、該第二體積之該第二液體培養基之添加、及該第三體積之添加係連續執行的。

【請求項31】 如請求項 26 至 28 中任一項所述之方法，其中隨著該段時間的推移，該第一體積之該第一液體培養基之移除、該第二體積之該第二液體培養基之添加、及該第三體積之添加係定期執行的。

【請求項32】 如請求項 1 至 25 中任一項所述之方法，其中該方法進一步包括連續或定期的對該第一液體培養基添加第三體積之第三液體培養基，其中該第一體積與該第二及該第三體積之總和為約相等的，且該容器中該第一、該第二、及該第三液體培養基之滲透壓在該段時間中，係維持在約 270 mOsm/mg 至約 380 mOsm/kg。

【請求項33】 如請求項 32 所述之方法，其中該第三液體培養基具有之滲透壓為約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg。

【請求項34】 如請求項 32 或 33 所述之方法，其中該容器中該第一、該第二、及該第三液體培養基滲透壓之維持包括在該段時間期間，調整該第二液體培養基之流速。

【請求項35】 如請求項 32 至 34 中任一項所述之方法，其中該調整步驟包括在該段時間期間的某些時間點，提高該第二液體培養基之流速。

【請求項36】 如請求項 32 至 34 中任一項所述之方法，其中該調整步驟包括在該段時間期間的某些時間點，降低該第二液體培養基之流速。

【請求項37】 如請求項 32 所述之方法，其中該第三液體培養基具有之滲透壓為約 10 mOsm/kg 至約 270 mOsm/kg。

【請求項38】 如請求項 37 所述之方法，其中該第三液體培養基具有之滲透壓為約 50 mOsm/kg 至約 200 mOsm/kg。

【請求項39】 如請求項 37 或 38 所述之方法，其中該容器中該第一、該第二、及該第三液體培養基滲透壓之維持包括在該段時間期間，調整該第三液體培養基之流速。

【請求項40】 如請求項 37 至 39 中任一項所述之方法，其中該調整步驟包括在該段時間期間的某些時間點，提高該第三液體培養基之流速。

【請求項41】 如請求項 37 至 40 中任一項所述之方法，其中該調整步驟包括在該段時間期間的某些時間點，降低該第三液體培養基之流速。

【請求項42】 如請求項 32 至 41 中任一項所述之方法，其中該方法進一步包括在該段時間期間的某些時間點，調整該容器中該第一、該第二、及該第三液體培養基之 pH 值及 pCO<sub>2</sub> 其中之一或二者。

【請求項43】 如請求項 42 所述之方法，其中該方法包括隨著該段時間的推移，提高該容器中該第一、該第二、及該第三液體培養基之 pCO<sub>2</sub> 及 pH 值。

【請求項44】 如請求項 43 所述之方法，其中隨著該段時間的推移，依據活細胞密度提高該容器中該第一、該第二、及該第三液體培養基之 pCO<sub>2</sub> 及 pH 值。

【請求項45】 如請求項 32 至 44 中任一項所述之方法，其中在該段時間期間，該第一、該第二、及該第三液體培養基中之活細胞密度達到超過 60 x 10<sup>6</sup> 個細胞/mL。

【請求項46】 如請求項 45 所述之方法，其中在該段時間期間，該第一、該第二、及該第三液體培養基中之活細胞密度達到超過  $100 \times 10^6$  個細胞/mL。

【請求項47】 如請求項 46 所述之方法，其中在該段時間期間，該第一、該第二、及該第三液體培養基中之活細胞密度達到超過  $120 \times 10^6$  個細胞/mL。

【請求項48】 如請求項 32 至 47 中任一項所述之方法，其中該方法進一步包括在該段時間期間，監測該容器中該第一、該第二、及該第三液體培養基之滲透壓。

【請求項49】 如請求項 32 至 48 中任一項所述之方法，其中在該段時間期間，該第一體積之該第一液體培養基之移除、該第二體積之該第二液體培養基之添加、及該第三體積之添加係同時執行的。

【請求項50】 如請求項 32 至 48 中任一項所述之方法，其中在該段時間期間，該第一體積之該第一液體培養基之移除、該第二體積之該第二液體培養基之添加、及該第三體積之添加係連續執行的。

【請求項51】 如請求項 32 至 48 中任一項所述之方法，其中隨著該段時間的推移，該第一體積之該第一液體培養基之移除、該第二體積之該第二液體培養基之添加、及該第三體積之添加係定期執行的。

【請求項52】 如請求項 1 至 51 中任一項所述之方法，其中該哺乳類動物細胞為 CHO 細胞。

【請求項53】 如請求項 1 至 52 中任一項所述之方法，其中該容器為生物反應器。

【請求項54】 如請求項 53 所述之方法，其中該生物反應器為灌注生物反應器。

【請求項55】 一種產生重組蛋白質之方法，該方法包括：

提供一個容器，其包含含有編碼重組蛋白質之核酸之哺乳類動物細胞，該哺乳類動物細胞係安置在具有滲透壓約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg 之第一液體培養基中；

在約 32°C 至約 39°C 下培養該哺乳類動物細胞一段時間；及

在該段時間期間，連續或定期移除第一體積之該第一液體培養基，並對該第一液體培養基添加第二體積之第二液體培養基，其中該第一與該第二體積為約

相等的，且該容器中該第一及該第二液體培養基之滲透壓在該段時間中，係維持在約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg；及

從該哺乳類動物細胞或從該第一及/或該第二液體培養基中回收該重組蛋白質。

【請求項56】 如請求項 55 所述之方法，其中該第一液體培養基具有之滲透壓為約 270 mOsm/kg 至約 320 mOsm/kg。

【請求項57】 如請求項 55 所述之方法，其中該第二液體培養基包含超過 8 g/L 之泊洛沙姆。

【請求項58】 如請求項 57 所述之方法，其中該第二液體培養基包含超過 10 g/L 之泊洛沙姆。

【請求項59】 如請求項 58 所述之方法，其中該第二液體培養基包含超過 12 g/L 之泊洛沙姆。

【請求項60】 如請求項 57 至 59 中任一項所述之方法，其中該泊洛沙姆為 Pluronic F68。

【請求項61】 如請求項 55 至 60 中任一項所述之方法，其中該第二液體培養基具有之 pH 值為約 6.8 至約 7.1。

【請求項62】 如請求項 55 至 61 中任一項所述之方法，其中該第二液體培養基包含氯化鈉。

【請求項63】 如請求項 55 至 62 中任一項所述之方法，其中該第二液體培養基具有之滲透壓為約 800 mOsm/kg 至約 2,500 mOsm/kg。

【請求項64】 如請求項 63 所述之方法，其中該第二液體培養基具有之滲透壓為約 1,200 mOsm/kg 至約 1,800 mOsm/kg。

【請求項65】 如請求項 55 至 64 中任一項所述之方法，其中隨著該段時間的推移，提高所添加的該第二液體培養基之該第二體積。

【請求項66】 如請求項 65 所述之方法，其中隨著該段時間的推移，依據活細胞密度提高所添加的該第二液體培養基之該第二體積。

【請求項67】 如請求項 55 至 66 中任一項所述之方法，其中該容器中該第一及該第二液體培養基滲透壓之維持包括在該段時間期間的某些時間點，調整該第二液體培養基之流速。

【請求項68】 如請求項 67 所述之方法，其中該調整步驟包括在該段時間期間的某些時間點，提高該第二液體培養基之流速。

【請求項69】 如請求項 68 所述之方法，其中該方法進一步包括在該段時間期間的某些時間點，調整該容器中該第一及該第二液體培養基之 pH 值及 pCO<sub>2</sub> 其中之一或二者。

【請求項70】 如請求項 67 所述之方法，其中該調整步驟包括在該段時間期間的某些時間點，降低該第二液體培養基之流速。

【請求項71】 如請求項 55 至 70 中任一項所述之方法，其中該方法進一步包括隨著該段時間的推移，提高該容器中該第一及該第二液體培養基之 pCO<sub>2</sub> 及 pH 值。

【請求項72】 如請求項 71 所述之方法，其中隨著該段時間的推移，依據活細胞密度，提高該容器中該第一及該第二液體培養基之 pCO<sub>2</sub> 及 pH 值。

【請求項73】 如請求項 55 至 72 中任一項所述之方法，其中在該段時間期間，該第一及該第二液體培養基之活細胞密度達到超過  $60 \times 10^6$  個細胞/mL。

【請求項74】 如請求項 73 所述之方法，其中在該段時間期間，該第一及該第二液體培養基之活細胞密度達到超過  $100 \times 10^6$  個細胞/mL。

【請求項75】 如請求項 74 所述之方法，其中在該段時間期間，該第一及該第二液體培養基之活細胞密度達到超過  $120 \times 10^6$  個細胞/mL。

【請求項76】 如請求項 55 至 75 中任一項所述之方法，其中該方法進一步包括在該段時間期間，監測該容器中該第一及該第二液體培養基之滲透壓。

【請求項77】 如請求項 55 至 76 中任一項所述之方法，其中在該段時間期間，該第一體積之該第一液體培養基之移除及該第二體積之該第二液體培養基之添加係同時執行的。

【請求項78】 如請求項 55 至 77 中任一項所述之方法，其中在該段時間期間，該第一體積之該第一液體培養基之移除及該第二體積之該第二液體培養基之添加係連續執行的。

【請求項79】 如請求項 55 至 77 中任一項所述之方法，其中隨著該段時間的推移，該第一體積之該第一液體培養基之移除及該第二體積之該第二液體培養基之添加係定期執行的。

【請求項80】 如請求項 55 至 79 中任一項所述之方法，其中該重組蛋白質係分泌至該第一及/或該第二液體培養基中。

【請求項81】 如請求項 80 所述之方法，其中從該第一及/或該第二液體培養基中回收該重組蛋白質。

【請求項82】 如請求項 55 至 81 中任一項所述之方法，其中該方法進一步包括在該段時間期間，連續或定期添加第三體積之水溶液至該容器中的該第一及該第二液體培養基中，其中該第一體積與該第二及該第三體積之總和為約相等的，且該容器中該第一、該第二、及該第三液體培養基之滲透壓在該段時間中，係維持在約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg。

【請求項83】 如請求項 82 所述之方法，其中該水溶液為鹽溶液。

【請求項84】 如請求項 83 所述之方法，其中該鹽溶液為氯化鈉溶液或氯化鉀溶液。

【請求項85】 如請求項 82 至 84 中任一項所述之方法，其中在該段時間期間，該第一體積之該第一液體培養基之移除、該第二體積之該第二液體培養基之添加、及該第三體積之添加係同時執行的。

【請求項86】 如請求項 82 至 84 中任一項所述之方法，其中在該段時間期間，該第一體積之該第一液體培養基之移除、該第二體積之該第二液體培養基之添加、及該第三體積之添加係連續執行的。

【請求項87】 如請求項 82 至 84 中任一項所述之方法，其中隨著該段時間的推移，該第一體積之該第一液體培養基之移除、該第二體積之該第二液體培養基之添加、及該第三體積之添加係定期執行的。

【請求項88】 如請求項 55 至 81 中任一項所述之方法，其中該方法進一步包括連續或定期的對該第一液體培養基添加第三體積之第三液體培養基，其中該第一體積與該第二及該第三體積之總和為約相等的，且該容器中該第一、該第二、及該第三液體培養基之滲透壓在該段時間中，係維持在約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg。

【請求項89】 如請求項 88 所述之方法，其中該第三液體培養基具有之滲透壓為約 270 mOsm/kg 至約 380 mOsm/kg。

【請求項90】 如請求項 88 或 89 所述之方法，其中該容器中該第一、該第二、及該第三液體培養基滲透壓之維持包括在該段時間期間，調整該第二液體培養基之流速。

【請求項91】 如請求項 88 至 90 中任一項所述之方法，其中該調整步驟包括在該段時間期間的某些時間點，提高該第二液體培養基之流速。

【請求項92】 如請求項 88 至 90 中任一項所述之方法，其中該調整步驟包括在該段時間期間的某些時間點，降低該第二液體培養基之流速。

【請求項93】 如請求項 88 所述之方法，其中該第三液體培養基具有之滲透壓為約 0 mOsm/kg 至約 270 mOsm/kg。

【請求項94】 如請求項 93 所述之方法，其中該第三液體培養基具有之滲透壓為約 50 mOsm/kg 至約 200 mOsm/kg。

【請求項95】 如請求項 93 或 94 所述之方法，其中該容器中該第一、該第二、及該第三液體培養基滲透壓之維持包括在該段時間期間，調整該第三液體培養基之流速。

【請求項96】 如請求項 93 至 95 中任一項所述之方法，其中該調整步驟包括在該段時間期間的某些時間點，提高該第三液體培養基之流速。

【請求項97】 如請求項 93 至 96 中任一項所述之方法，其中該調整步驟包括在該段時間期間的某些時間點，降低該第三液體培養基之流速。

【請求項98】 如請求項 88 至 97 中任一項所述之方法，其中該方法進一步包括在該段時間期間的某些時間點，調整該容器中該第一、該第二、及該第三液體培養基之 pH 值及 pCO<sub>2</sub> 其中之一或二者。

【請求項99】 如請求項 98 所述之方法，其中該方法包括隨著該段時間的推移，提高該容器中該第一、該第二、及該第三液體培養基之 pCO<sub>2</sub> 及 pH 值。

【請求項100】 如請求項 99 之方法，其中隨該段時間的推移，依據活細胞密度提高該容器中該第一、該第二、及該第三液體培養基之 pCO<sub>2</sub> 及 pH 值。

【請求項101】 如請求項 88 至 100 中任一項所述之方法，其中在該段時間期間，該第一、該第二、及該第三液體培養基中之活細胞密度達到超過 60 x 10<sup>6</sup> 個細胞/mL。

【請求項102】 如請求項 101 所述之方法，其中在該段時間期間，該第一、該第二、及該第三液體培養基中之活細胞密度達到超過 100 x 10<sup>6</sup> 個細胞/mL。

【請求項103】 如請求項 102 所述之方法，其中在該段時間期間，該第一、該第二、及該第三液體培養基中之活細胞密度達到超過  $120 \times 10^6$  個細胞/mL。

【請求項104】 如請求項 88 至 103 中任一項所述之方法，其中該方法進一步包括在該段時間期間，監測該容器中該第一、該第二、及該第三液體培養基之滲透壓。

【請求項105】 如請求項 88 至 104 中任一項所述之方法，其中在該段時間期間，該第一體積之該第一液體培養基之移除、該第二體積之該第二液體培養基之添加、及該第三體積之添加係同時執行的。

【請求項106】 如請求項 88 至 104 中任一項所述之方法，其中在該段時間期間，該第一體積之該第一液體培養基之移除、該第二體積之該第二液體培養基之添加、及該第三份體積之添加係連續執行的。

【請求項107】 如請求項 88 至 104 中任一項所述之方法，其中隨著該段時間的推移，該第一體積之該第一液體培養基之移除、該第二體積之該第二液體培養基之添加、及該第三體積之添加係定期執行的。

【請求項108】 如請求項 88 至 107 中任一項所述之方法，其中該重組蛋白質係分泌至該第一、該第二、及/或該第三液體培養基中。

【請求項109】 如請求項 108 所述之方法，其中從該第一、該第二、及/或該第三液體培養基中回收該重組蛋白質。

【請求項110】 如請求項 55 至 109 中任一項所述之方法，其中該哺乳類動物細胞為 CHO 細胞。

【請求項111】 如請求項 55 至 110 中任一項所述之方法，其中該容器為生物反應器。

【請求項112】 如請求項 111 所述之方法，其中該生物反應器為灌注生物反應器。

【請求項113】 如請求項 55 至 112 中任一項所述之方法，其中該重組蛋白質為免疫球蛋白、酵素、生長因子、蛋白質片段、或工程化蛋白質。

【請求項114】 如請求項 55 至 113 中任一項所述之方法，其中從該哺乳類動物細胞中回收該重組蛋白質。

【請求項115】 如請求項 55 至 114 中任一項所述之方法，其中該方法進一步包括分離該重組蛋白質。

【請求項116】 如請求項 115 所述之方法，其中該方法進一步包括調配該經分離之重組蛋白質。

【請求項117】 一種重組蛋白質，其係由如請求項 55 至 114 中任一項所述之方法產生。

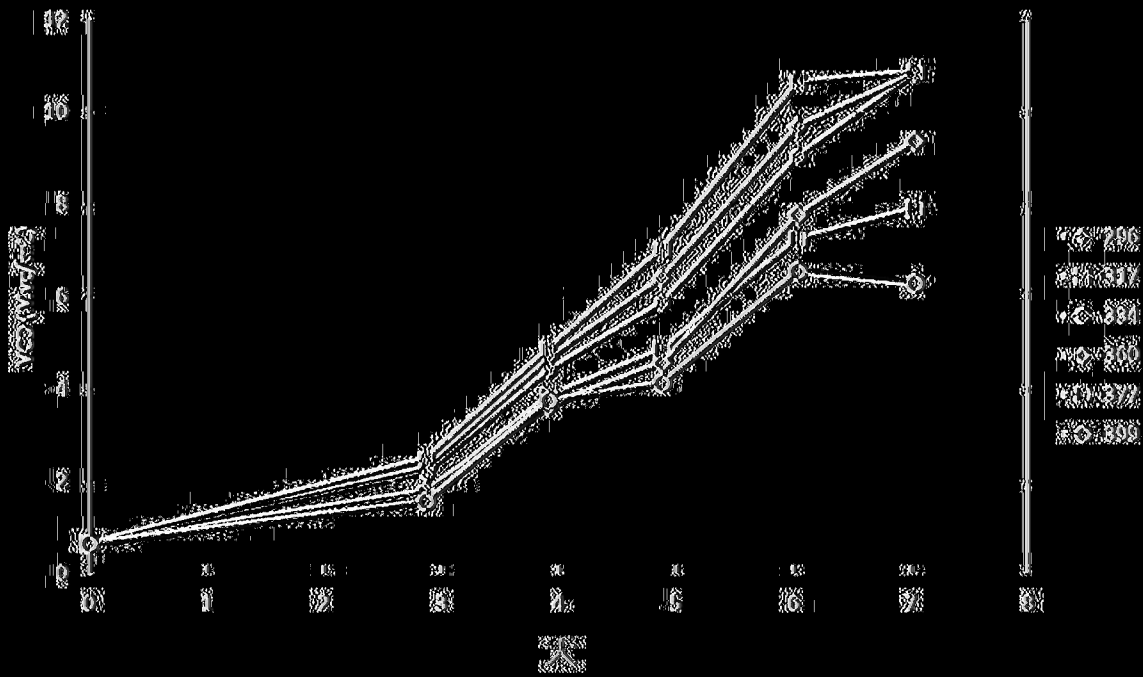
【請求項118】 一種醫藥組成物，其包含如請求項 117 所述之重組蛋白質。

【請求項119】 一種套組，其包含如請求項 118 所述之醫藥組成物。

【請求項120】 一種治療有需要之受試者之方法，其包括對該受試者投予治療有效量之如請求項 118 所述之醫藥組成物。

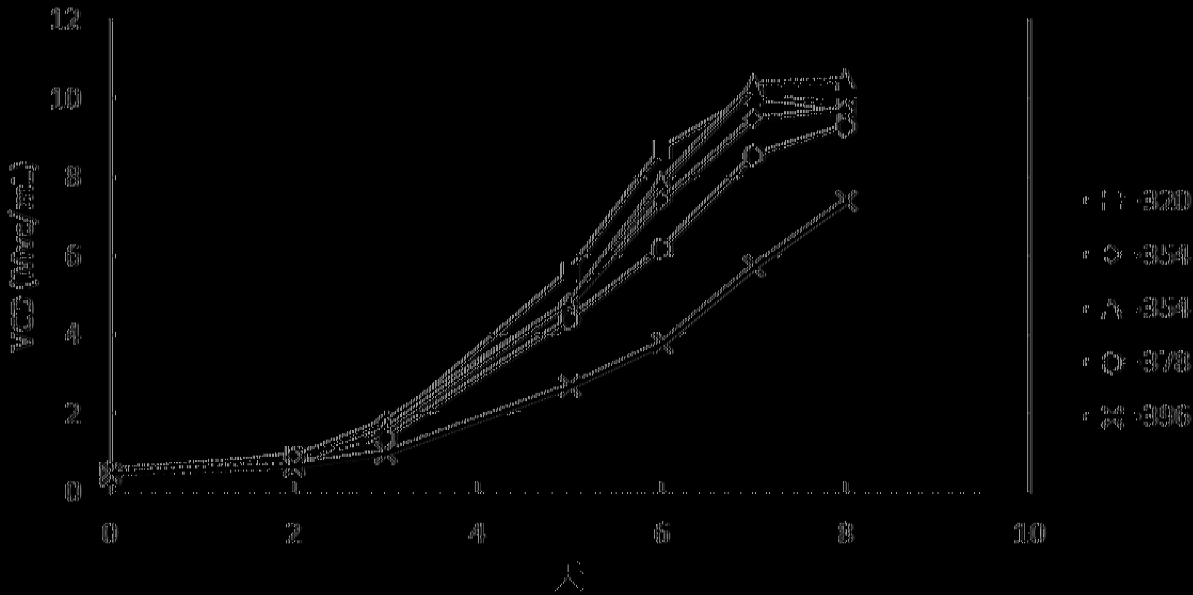
[(發明圖式)]

不同滲透壓下之生長曲線，振盪洗瓶

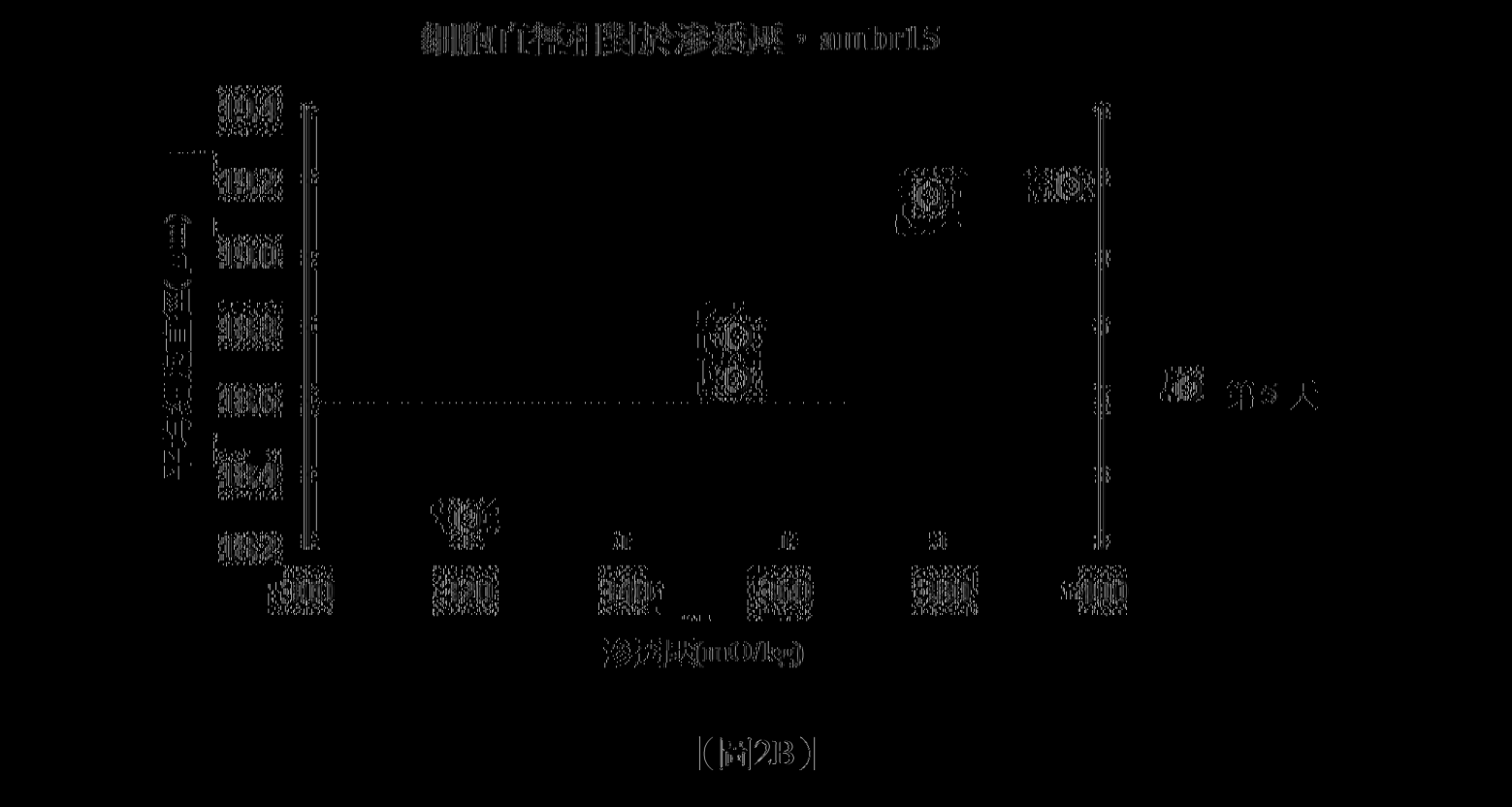
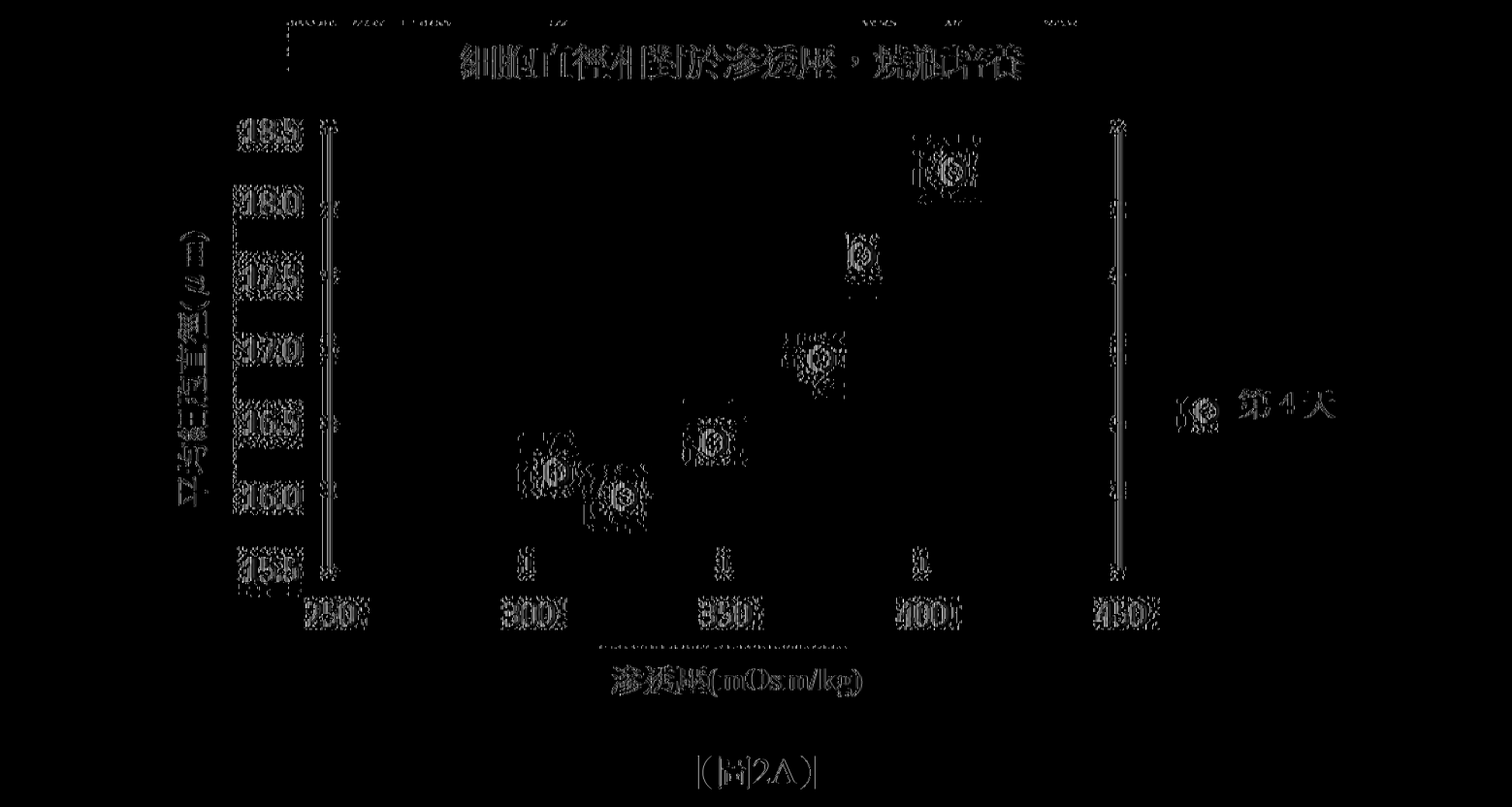


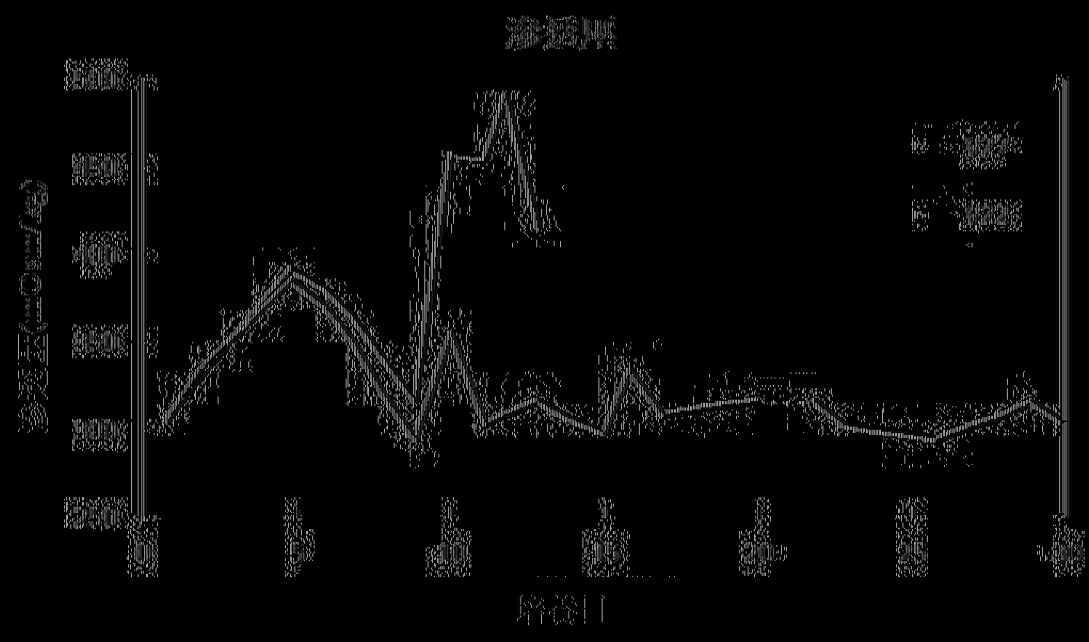
[(圖1A)]

不同滲透壓下之生長曲線，ambic15

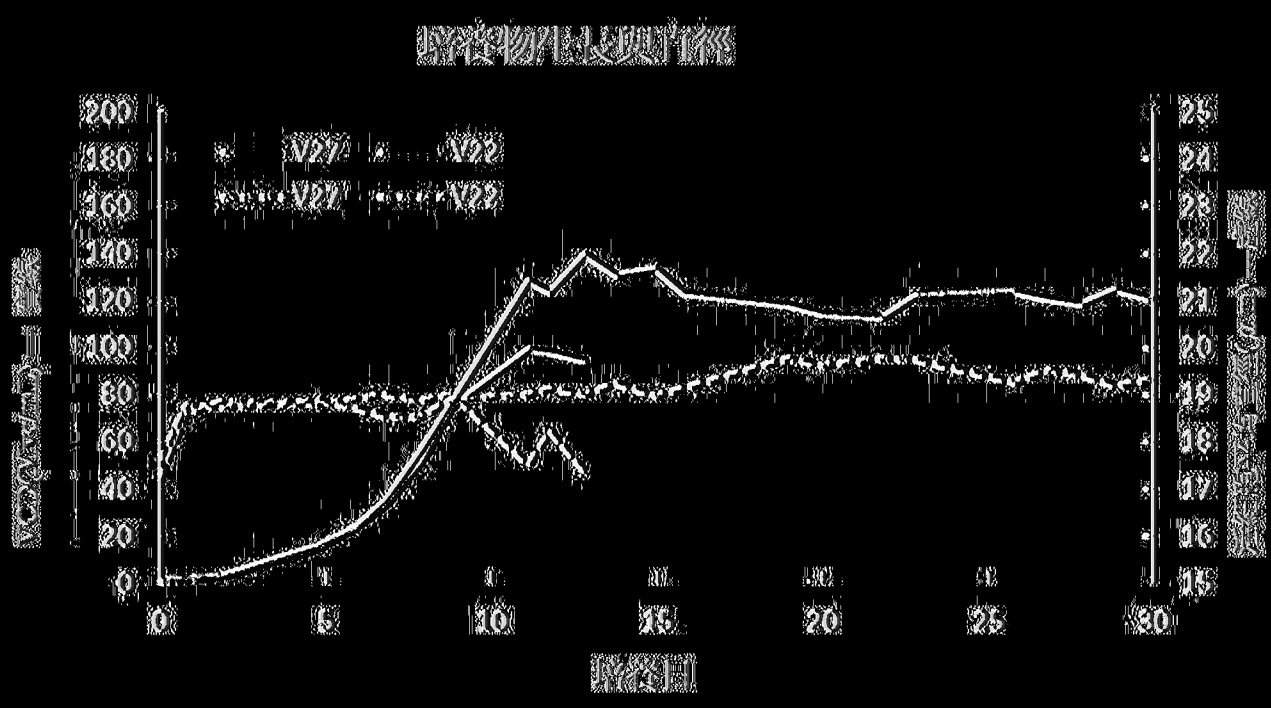


[(圖1B)]

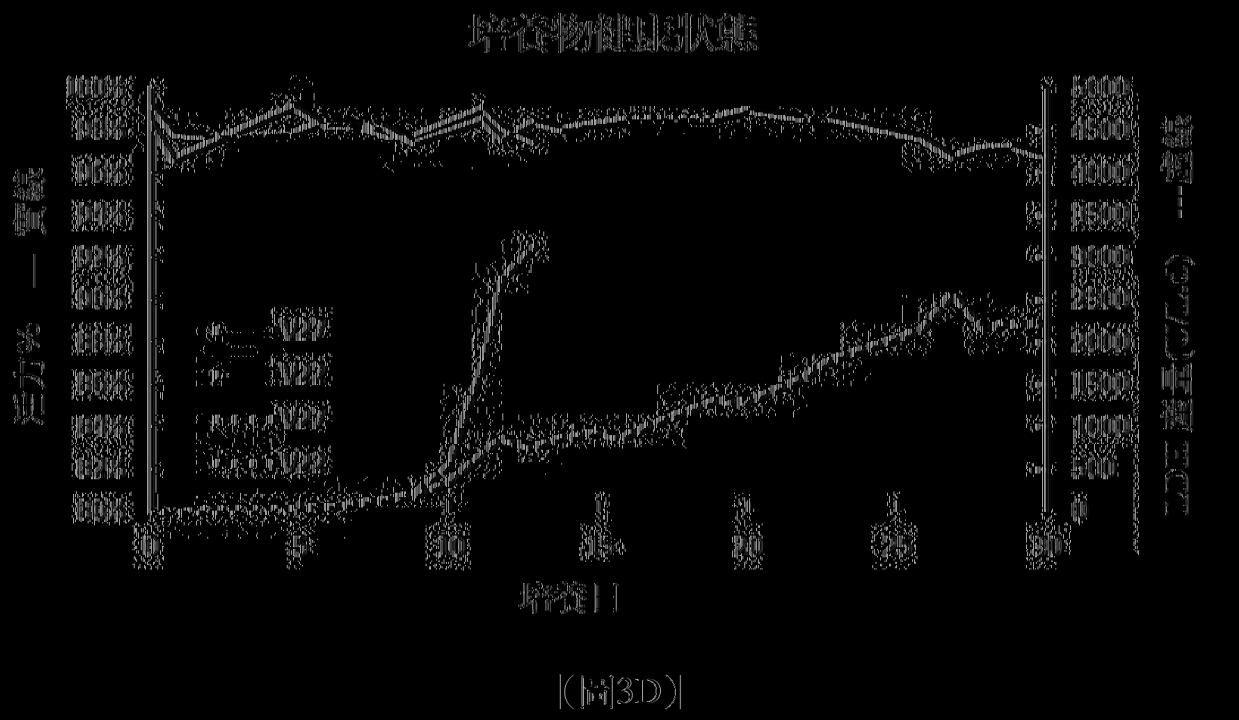
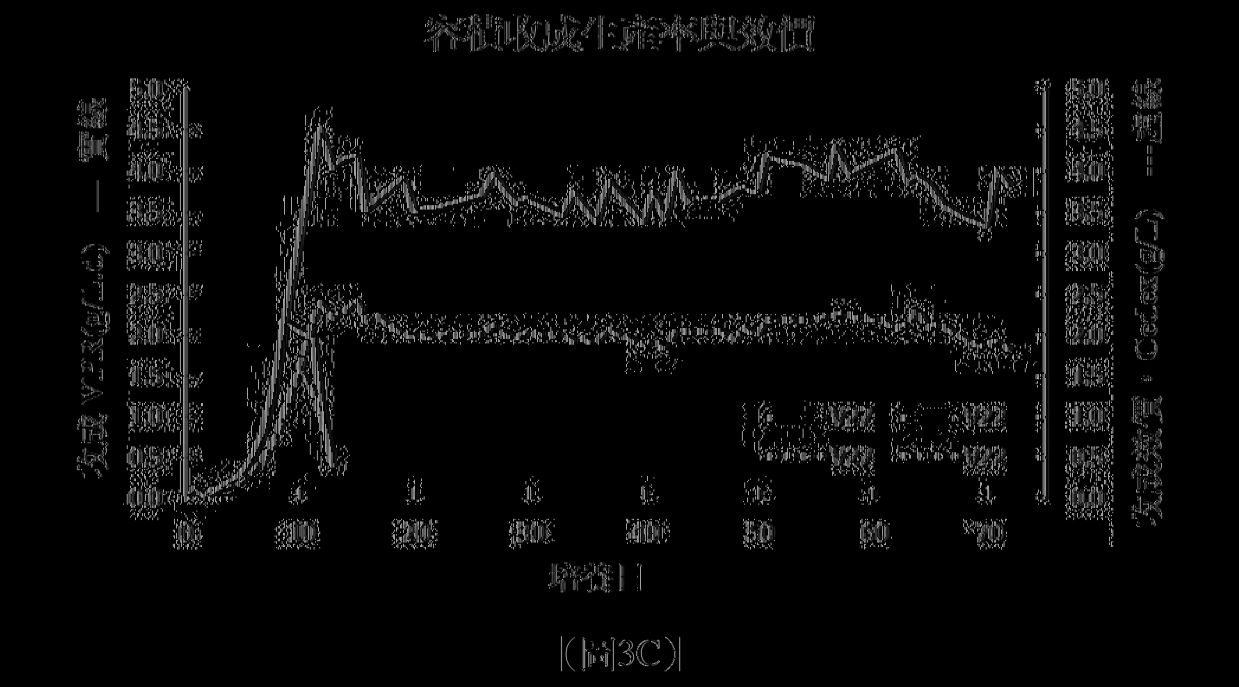


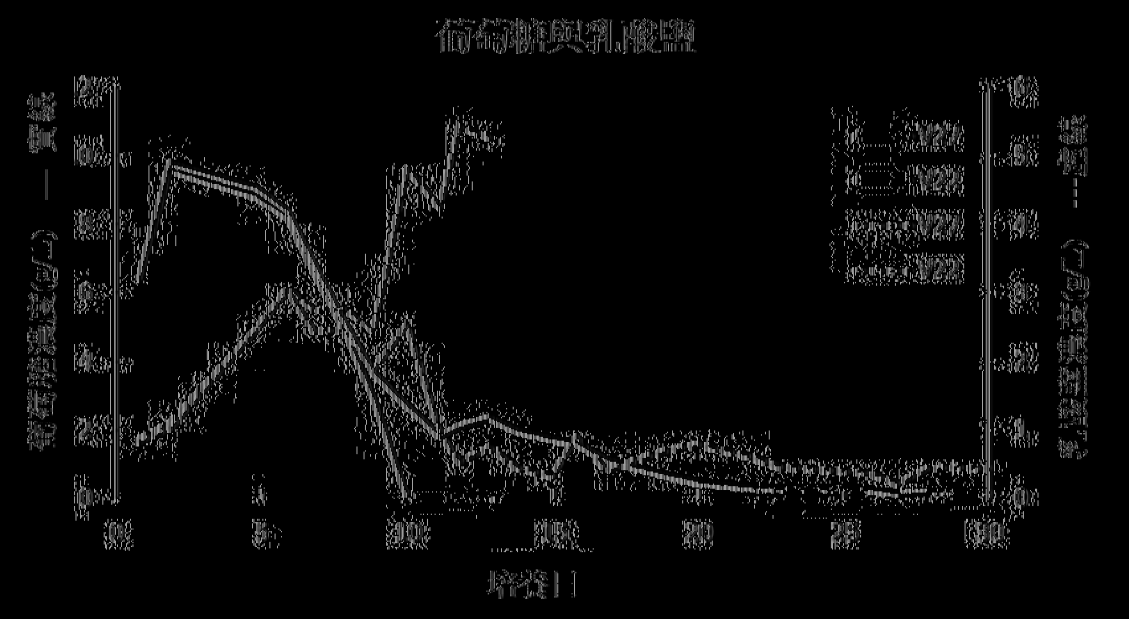


[(同)3A)]

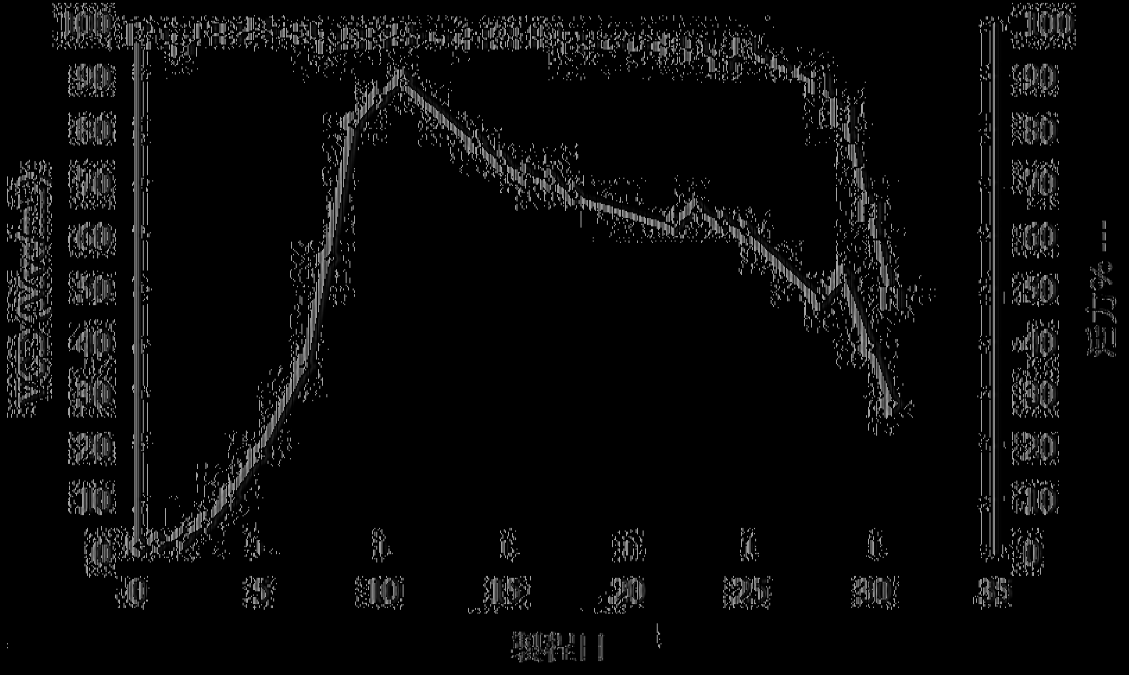


[(同)3B)]

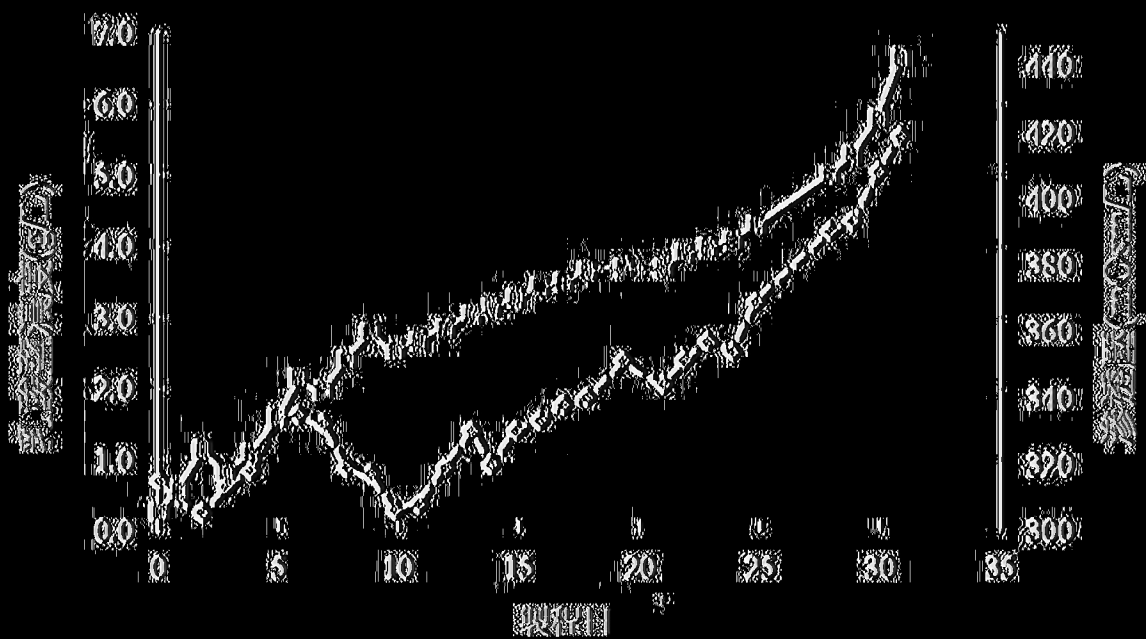




[(圖3B)]

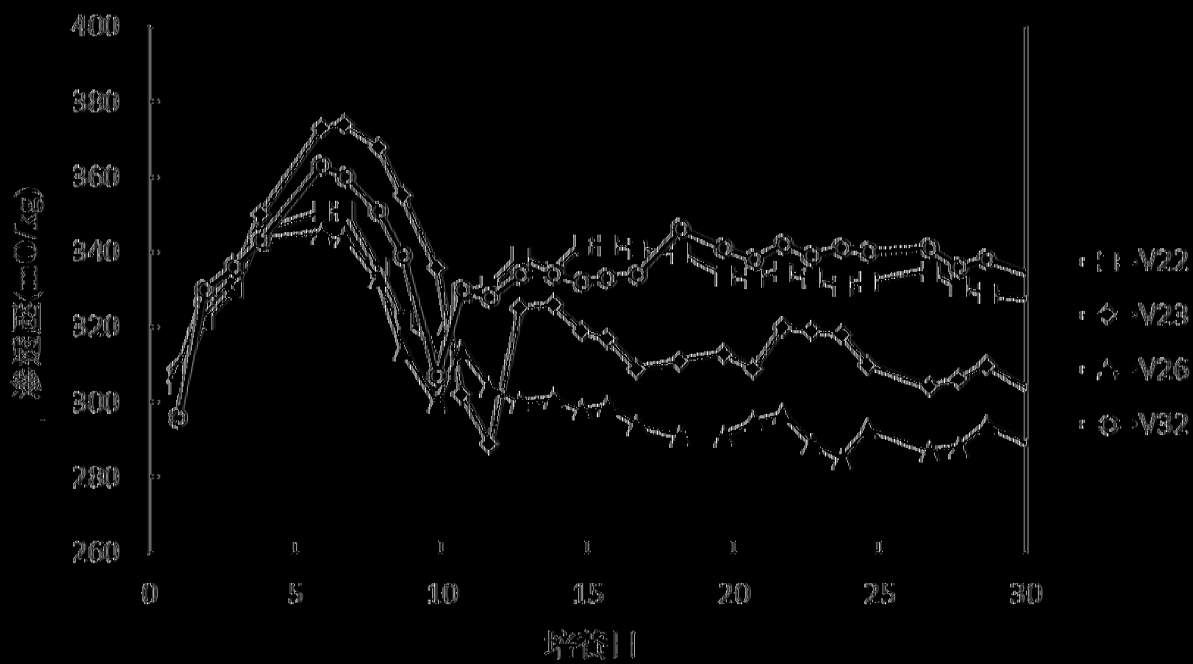


[(圖4A)]

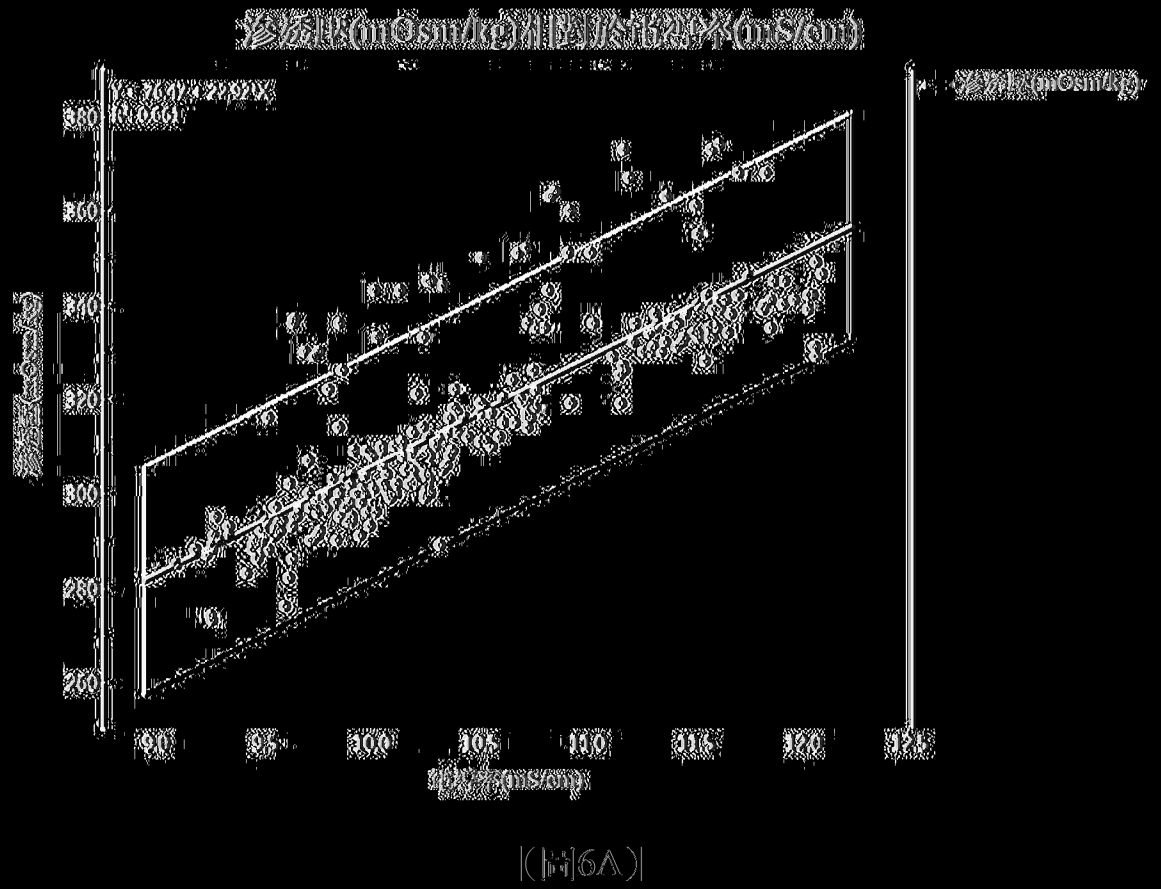
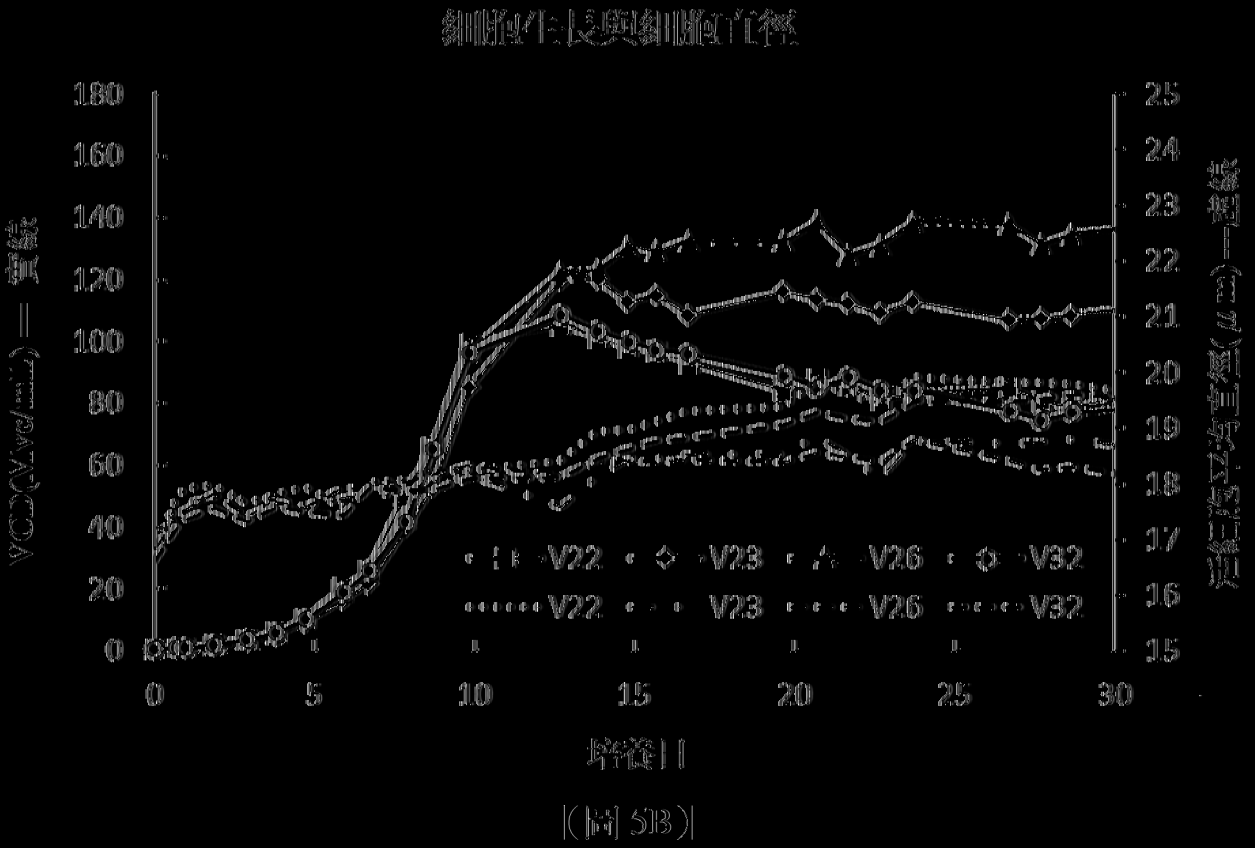


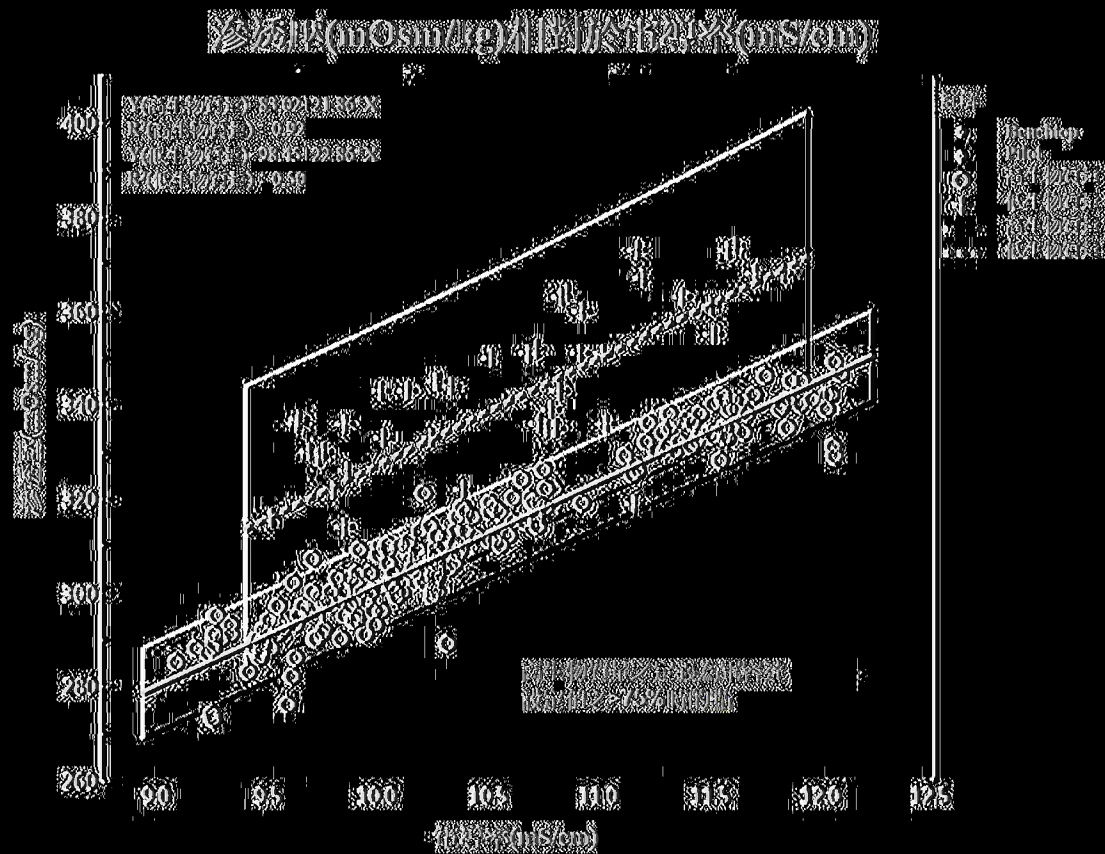
|(同4B)|

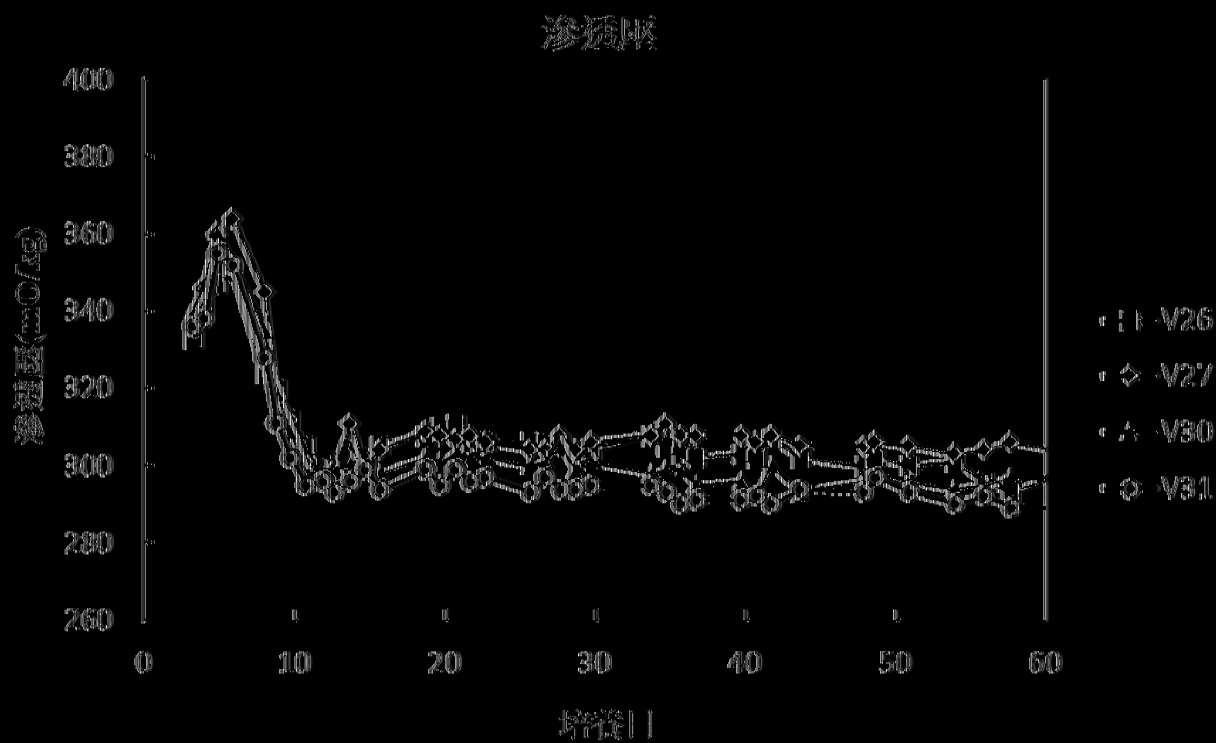
滲透壓



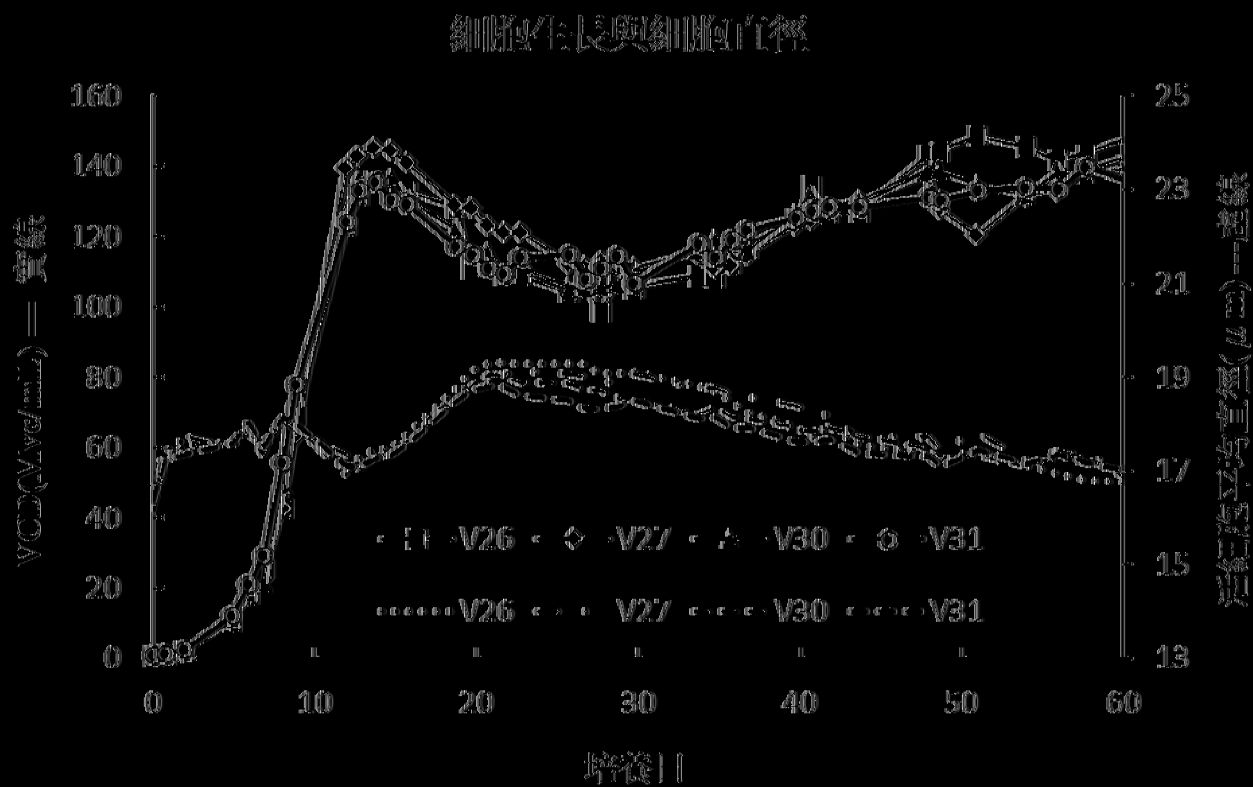
|(同5A)|



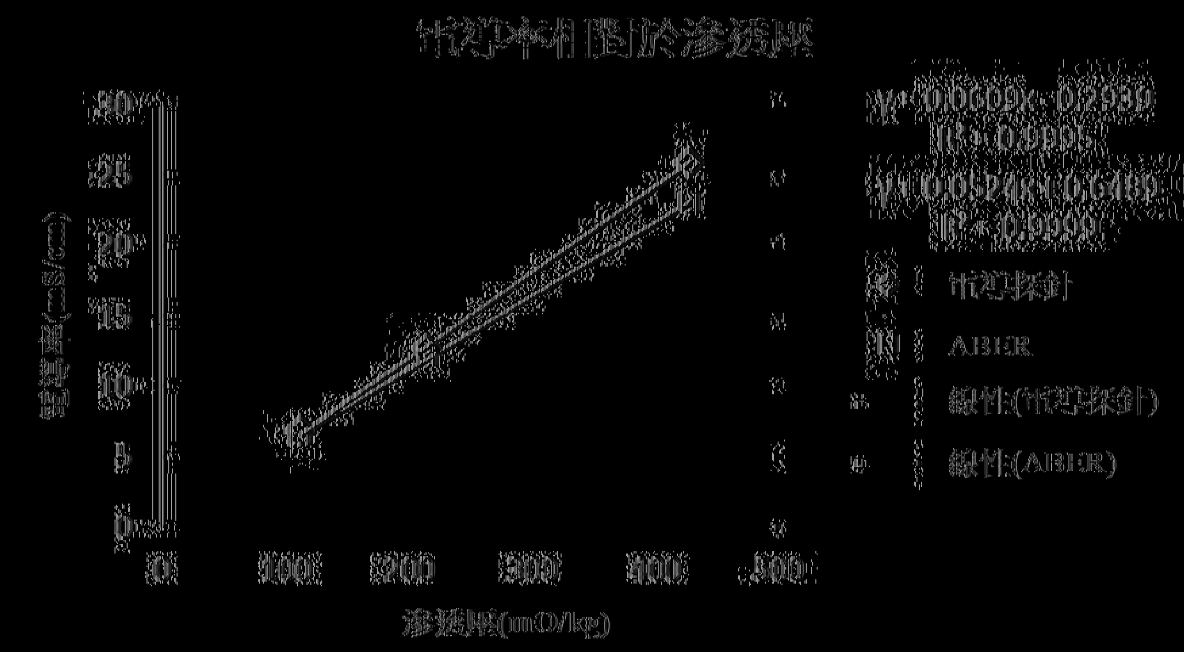




[(同8A)]

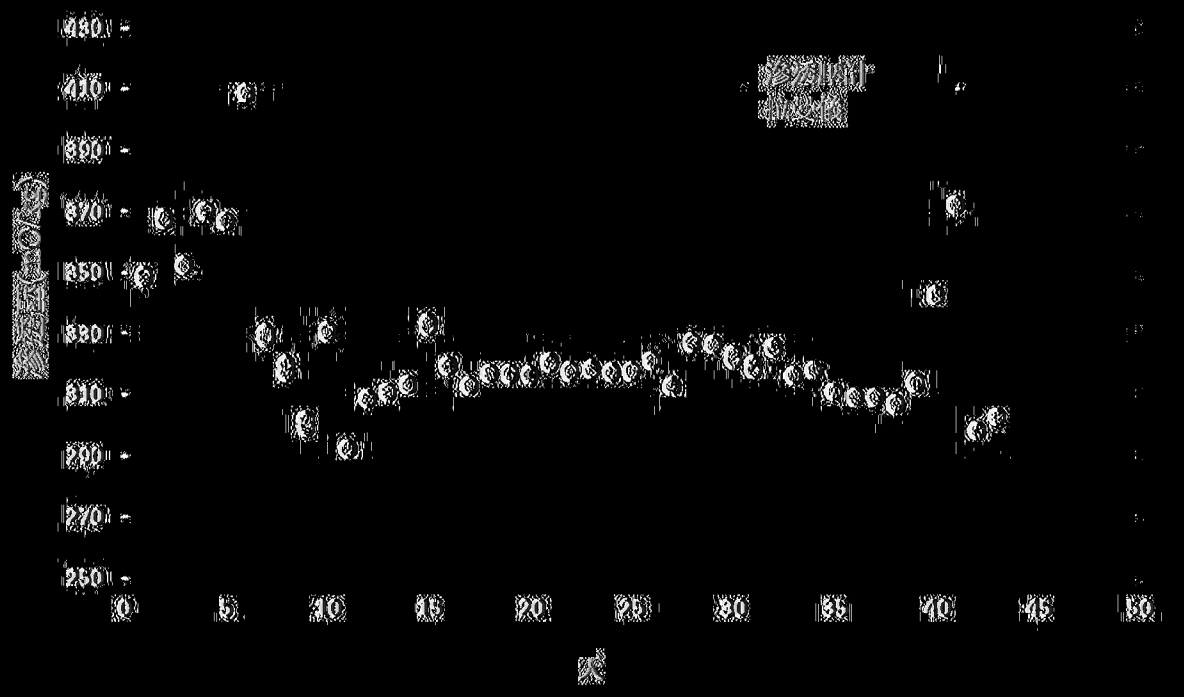


[(同8B)]

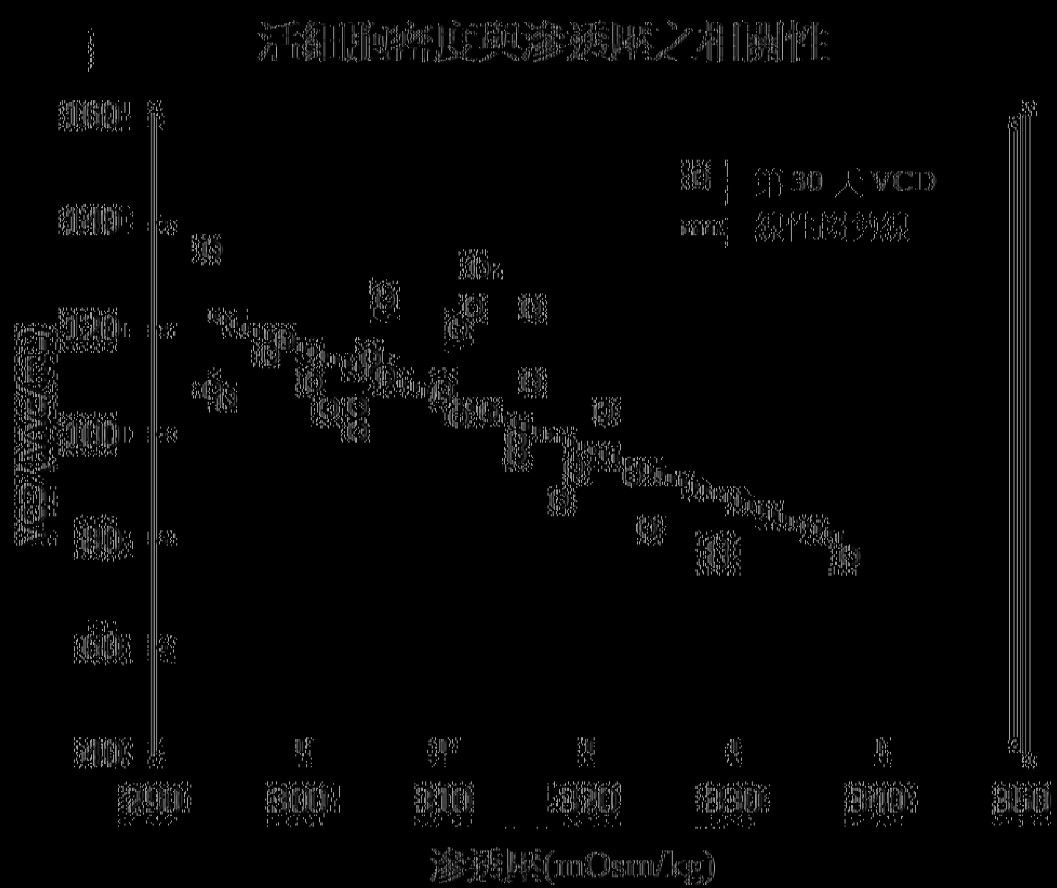


[(圖)9]

針孔數



[(圖)10]



|(14)11|