

细胞培养工艺条件对抗体异质性影响的研究进展

段须杰, 刘睿, 徐卫涛, 任彤, 罗厚勇

江苏先声药业有限公司, 江苏 南京 210042

段须杰, 刘睿, 徐卫涛, 等. 细胞培养工艺条件对抗体异质性影响的研究进展. 生物工程学报, 2013, 29(12): 1880–1886.
Duan XJ, Liu R, Xu WT. Effect of cell culture conditions on antibody heterogeneity. Chin J Biotech, 2013, 29(12): 1880–1886.

摘 要: 抗体药物具有靶向明确、副作用小等优势, 近年来受到国内外药企的广泛关注。然而, 动物细胞大规模培养和抗体质量分析已然成为我国的抗体药物产业化的主要限制因素, 尤其是细胞培养工艺条件对抗体异质性的影响非常显著, 如何有效通过优化工艺条件来满足抗体药物开发要求成为迫在眉睫的问题。文中简要综述了近年来细胞培养工艺条件对抗体异质性影响的技术进展, 并对未来国内抗体药物开发作了展望。

关键词: 抗体, 细胞培养, 异质性, 质量, 工艺条件

Effect of cell culture conditions on antibody heterogeneity

Xujie Duan, Rui Liu, Weitao Xu, Tong Ren, and Houyong Luo

Jiangsu Simcere Pharmaceutical Group, Nanjing 210042, Jiangsu, China

Abstract: With the advantage of clear target and little side effect, antibody drug has attracted widely attention of worldwide pharmaceutical companies. However, large scale mammalian cell culture and antibody quality analysis are the bottlenecks of antibody drug industrialization in China. Especially due to the significant effect of cell culture conditions on antibody heterogeneity. Therefore, it is extremely urgent to optimize cell culture conditions to favor the demands of antibody drug development. This review summarized the most recent advances in the effect of cell culture conditions on antibody quality, followed by addressing the key issues that might be strategically important for domestic antibody drug development.

Keywords: antibody, cell culture, heterogeneity, quality, process condition

Received: May 8, 2013; **Accepted:** June 20, 2013

Supported by: National Major Scientific and Technological Special Project for “Significant New Drugs Development” (No. 2012ZX09105301).

Corresponding author: Xujie Duan. Tel: +86-25-85560000-3077; E-mail: duanxujie@simcere.com

“重大新药创制”科技重大专项 (No. 2012ZX09105301) 资助。

网络出版时间: 2013-08-08

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130808.0940.001.html>

抗体药物具有靶向明确、副作用小等优势,受到国内外药企的广泛关注。迄今为止, FDA 和 EMA 批准的抗体药物共有 35 个, 虽然数量不多, 但却占据 2012 年全球十大畅销药物市场的半壁江山^[1-2]。随着众多“重磅炸弹”药物的专利即将到期, 生物仿制药也受到全球制药行业的青睐^[3]。

放眼国内抗体开发领域, 竞争和矛盾似乎更加激烈和突出。由于靶点研究和抗体筛选技术国内实力与国际水平差距较大, 因此国内对抗体药物的开发主要集中在生物仿制药领域。尽管 EMA 和 FDA 已公布抗体药物仿制指导原则和指导意见草案, 但 CFDA 尚未颁布关于生物仿制药的指导原则^[4-5]。因此, 国内众多医药企业和生物技术公司对于生物仿制药的研究仍处于摸索阶段。

众所周知, 动物细胞大规模培养和抗体质量分析已然成为我国的抗体药物产业化的主要限制因素。近年来, 尽管国内抗体药物的表达水平有所提高 (1~2 g/L), 但与国际水平 (3~5 g/L) 仍有一定的差距。然而, 国内企业对于抗体的质量研究仍没有足够的关注度, 工艺优化仍以抗体产量为导向。尤其是对于动物细胞培养条件而言, 对抗体质量的影响非常显著, 如何有效地通过控制培养工艺来满足抗体药物 (特别是生物仿制药) 开发要求成为迫在眉睫的问题。因此, 本文将重点关注近年来国际上抗体研究的最新报告, 着重介绍细胞培养工艺条件对抗体异质性影响的研究进展, 以期对国内药企进行抗体研发起到指导作用, 并对未来抗体药物研发趋势进行展望。

1 抗体结构与功能

1.1 抗体结构

抗体基本结构是由四肽链构成的单体, 即由两条相同的重链和两条相同的轻链通过二硫键连接, 呈 Y 字形。完整抗体的分子量约为 150 kDa, 单个重链和单个轻链的分子量分别为 50 kDa 和 25 kDa。按照结构域可将轻重链和轻链分为可变

区和恒定区。在轻重链的可变区各有 3 个区域的氨基酸组成和排列顺序高度变化, 称为互补决定区 (Complementarity determining region, CDR)。Fab 片段表示抗体与抗原的结合片段 (Antigen-binding fragment), 由一条完整的轻链和部分重链组成。Fc 片段为可结晶片段 (Crystallizable fragment), 包括重链的恒定 2 区和 3 区, 该部分无抗原结合活性, 是抗体分子与效应分子或细胞相互作用的部位, 发挥多种生物学效应。

1.2 抗体功能

单克隆抗体药物的作用机制主要分为 3 种:

1) 通过 Fab 片段与相应抗原特异性结合; 2) 通过 Fc 片段与细胞表面 Fc 受体结合, 发挥多种生物学作用, 包括抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用 (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 效应, 调理作用, I 型超敏反应等; 3) 通过 Fc 片段激活补体, 产生补体依赖的细胞毒性作用 (Complement-dependent cytotoxicity, CDC) 效应^[6]。

2 抗体异质性

抗体在生产过程中由于受到复杂培养环境的影响, 诸如酶解反应或者自发性降解, 都会造成抗体的异质性, 而这种异质性必须通过质量研究进行衡量, 以保证产品的完整性和生产过程的一致性。抗体的异质性主要体现在翻译后修饰和降解, 主要包括糖基化、C 末端降解、天冬酰胺脱氨基、天冬氨酸异构化、甲硫氨酸氧化等。

2.1 糖基化

糖基化是一种重要的蛋白质翻译后修饰, 指在酶的催化下糖链被接到肽链上的特定糖基化位点。对于抗体而言, 主要是 N 连接的糖基化 (N-linked glycosylation)。糖基化的异质性主要体现在两个方面: 1) 糖基化位点是否存在糖链; 2) 糖基化位点存在的糖链是何种类型。抗体的糖基

化过程十分复杂, 起始于内质网, 结束于高尔基体, 涉及多种核苷酸前体、糖以及糖基转移酶。研究表明, 抗体的糖基化特点将直接影响到 Fc 片段的 3D 构象及功能^[7-9]。

2.2 C 末端降解

对于 IgG 而言, 重链的 C 末端是赖氨酸 (K) 残基, 而胞内的羧肽酶通常会将赖氨酸残基脱去, 但这种酶解往往不完全, 因此抗体中往往呈现出多种脱 K 异构体 (0K, 1K 和 2K)。截止到目前为止, 研究表明赖氨酸异构体不会对药物的有效性和安全性产生影响, 同时赖氨酸残基的去除也不会对 CDC 效应产生影响^[10-11]。

2.3 脱氨基和异构化

天冬酰胺脱氨基和天冬氨酸异构化也是蛋白降解的主要原因, 通常在温和的环境中便可发生^[12]。天冬酰胺脱氨基后会生成琥珀酰亚胺, 后者水解后生成天冬氨酸和异天冬氨酸的混合物。抗体的脱氨基主要发生在两个区域: CDR 区和 Fc 片段特定的氨基酸序列。其中, CDR 区域的脱氨基将直接影响到抗体和抗原的亲合力, 而 Fc 片段的脱氨基尚未有其对抗体功能影响的报道^[6]。天冬酰胺脱氨基和天冬氨酸异构化在抗体的整个生命周期都存在, 包括注射进入人体后^[13]。研究表明, 抗体制剂在储存过程中, 诸如高温和 pH 都将会增加蛋白降解的程度, 因此选择一个合适的制剂处方和保存温度都将有效地控制抗体的降解^[10]。

2.4 氧化

氧化也是一种常见的蛋白翻译后修饰。被氧化的氨基酸主要包括甲硫氨酸、半胱氨酸和色氨酸, 其中甲硫氨酸氧化在细胞培养、纯化、制剂以及储存过程中都有可能发生^[14]。Bertolotti-Ciarlet 等第一次报道了甲硫氨酸氧化对 Fc γ 受体和新生儿受体 (FcRn) 的影响。研究结果显示, 甲硫氨酸氧化使得抗体对 Fc γ RIIa 的亲合力略有下降, 而与 FcRn 的亲合力明显下降^[15]。此外, 甲硫氨酸氧化

还会导致抗体的稳定性降低, 免疫原性增加, 以及体内的半衰期减少等^[6]。

2.5 游离巯基

抗体通常包括多组链内和链间的二硫键。采用哺乳动物细胞表达的抗体可能会存在游离巯基, 而游离巯基的存在会破坏抗体结构, 进而对药物的有效性产生影响。Chaderjian 等研究表明, 可以通过改变细胞培养工艺 (添加硫酸铜) 降低游离巯基水平达 10 倍以上^[16]。

2.6 糖化

糖化是指糖类的还原基团与蛋白质的氨基发生的非酶催化反应。由于糖化位点分布在整个抗体分子, 没有潜在糖化位点, 因此发生糖化而导致的质量问题比较少见。Yuk 等研究发现, 在细胞培养过程中, 较高的葡萄糖浓度可能会增加抗体的糖化程度, 进而对药物的安全性、有效性以及稳定性产生影响, 可以通过降低糖浓度的办法达到控制抗体的糖化程度^[17]。

3 细胞培养工艺条件对抗体质量的影响

细胞培养工艺作为抗体生产过程中的重要环节, 对最终抗体质量影响十分显著。由于哺乳动物细胞培养对于培养环境的要求非常苛刻, 同时对表达抗体的质量要求极其严格, 因此如何通过工艺条件优化达到产品的质量要求显得尤为关键。通常, 培养环境包括营养物 (培养基)、培养条件 (温度、pH、溶解氧、搅拌转速)、代谢物 (乳酸、氨、CO₂)、培养周期以及培养方式、培养规模等。下面本文将重点阐述上述因素对抗体质量的影响。

3.1 培养基

动物细胞培养基成分复杂, 种类繁多, 但大体可分为碳源 (糖类、谷氨酰胺)、氮源 (氨基酸)、维生素、无机盐、微量元素、脂类、核苷类和其他物质等。培养基成分对抗体质量影响的研究主

要集中在糖基化方面,影响因素包括糖类、微量元素、寡糖前体以及诱导剂等。

Tachibana 等发现,采用果糖、甘露糖、半乳糖来代替葡萄糖对抗体糖基化水平产生显著影响,主要与细胞对不同种类糖的利用效率以及不同的糖代谢途径有关^[18]。Nyberg 和 Wong 等研究认为,缺乏葡萄糖和谷氨酰胺不仅会造成糖基化位点的减少,同时会对糖型结构产生改变^[19-20]。产生这种现象的主要原因是葡萄糖和谷氨酰胺的匮乏造成胞内 UDP-N-乙酰氨基葡萄糖(UDP-GlcNAc)浓度降低,因而无法进行后续的糖基化修饰,最终出现唾液酸化水平降低(降低抗体的抗炎能力),高甘露糖型比例升高(降低抗体体内的半衰期)^[21-22]。另外,Gramer 等在工艺转接过程中发现抗体的半乳糖基化水平发生明显改变,并通过在培养基中添加尿嘧啶、氯化锰和半乳糖实现对抗体糖基化的改变^[23]。

在糖基化过程中,金属离子在众多糖基转移酶中起到重要作用,诸如锰离子、钴离子、钙离子、锌离子、铜离子等^[24-26]。Crowell 等研究发现,锰离子的添加可以增加糖基化位点,并减少糖链分支^[24]。而 Pacis 等则通过添加氯化锰显著降低抗体高甘露糖型的比例^[27]。此外,培养基中添加氯化铜也可以增加糖蛋白的唾液酸含量^[26]。

丁酸钠作为一种诱导剂,常添加至培养基中用于提高抗体产量,同时丁酸钠的加入对抗体的糖基化水平也会产生影响。Borys 等通过添加丁酸钠可以显著降低 N-羟乙酰基神经氨酸(Neu5Gc)的含量,由于 Neu5Gc 在人体内并不表达,因此 Neu5Gc 含量的降低将会降低药物的免疫原性^[28]。此外,Jenkins 等发现添加牛血清白蛋白和脂类显著增加糖基化水平,可能是由于脂类的添加有利于糖基化修饰的进行^[29]。

3.2 培养温度

培养温度对抗体质量影响主要体现在 3 个方面:糖基化、C 末端降解和脱氨基。温度对糖基

化的影响被认为与细胞生长状态有关^[10]。研究者认为,低温有利于细胞保持较高的活率,而高活率的细胞有利于抗体糖基化修饰的进行。Ahn 等研究发现,降低培养温度将降低 EPO 的唾液酸含量,主要是由于寡糖前体 UDP-GlcNAc 和 UDP-N-乙酰氨基葡萄糖(UDP-GalNAc)在低温下胞内浓度较低造成^[30]。Borys 等进一步研究发现,在接近细胞生长稳定期降温比在对数期降温能够获得更低的 Neu5Ac 含量^[28]。

Dick 等考察了补料策略和培养温度对 C 末端降解的影响。他们认为,温度改变可以影响抗体的等电点,主要是由于 C 末端降解造成电荷分布改变。进一步研究发现,可能是由于细胞培养过程中不同温度下羧肽酶 B 的活性不同所造成^[31]。段须杰等研究发现,通过降低培养温度可以降低 C 末端降解,从而保证仿制药与原研药电荷分布的一致性^[32]。

3.3 pH

pH 对于抗体质量的影响主要在糖基化修饰方面。Müthing 等发现当 pH 7.4 时可以获得完全的半乳糖基化,而在 pH 6.9 时唾液酸化程度最低^[33]。然而 Yoon 等则发现了截然相反的现象,随着 pH 的升高(6.8~7.8),唾液酸化程度由 68% 降至 40%^[34]。pH 对糖基化的影响主要是由于改变了高尔基体内的 pH 值,进而影响到半乳糖转移酶(GalT)和唾液酸转移酶(SiaT)的酶活。

与此同时,细胞代谢产物如氨和 CO₂ 对于糖基化的影响也与 pH 联系紧密。Gawlizek 等发现,通过增加培养基中的铵离子浓度会降低蛋白的半乳糖基化和唾液酸化,最高可达 40%。其可能原因也是由于铵离子浓度影响到高尔基体内的 pH 值,进而对 GalT 和 SiaT 酶活产生影响^[35]。

Schmelzer 和 Miller 系统考察了 CO₂ 分压和渗透压对抗体电荷分布和糖基化的影响^[36]。研究表明,渗透压增高对于抗体的电荷分布影响较为显著。在渗透压一定(320 mOsm/kg)的前提下,提

高 CO₂ 分压将增加半乳糖基化；而保持 CO₂ 分压 (5.32×10³ Pa) 不变，渗透压的提高会降低半乳糖基化和甘露糖比例。然而，Pacis 等则发现渗透压的增高会显著提高高甘露糖的比例，与此同时，G0F 和 G1F 等其他糖型比例相应减少^[27]。

3.4 溶氧水平

溶氧水平是细胞培养过程中一个关键控制参数，合适的溶氧水平是细胞生长和抗体合成的重要保证。Trummer 等研究发现高溶氧水平 (100%) 会降低糖蛋白的唾液酸含量，而在 10%~90% 溶氧范围内对唾液酸含量没有影响^[37]。相反，Chotigeat 等发现随着溶氧水平的提高 (10%~90%)，唾液酸含量逐渐增加^[38]。与此同时，Kunkel 等试验结果表明，提高溶氧水平可以提高抗体的半乳糖基化水平，可能是由于胞内 UDP-半乳糖浓度随着溶氧水平的提高而增加导致^[39]。尽管半乳糖基化程度的差异对于抗体的功能 (如 ADCC 和 CDC 效应) 没有显著影响，但在进行生物仿制药研发过程中，保证仿制药与原研药糖基化水平的一致性也非常必要^[40]。此外，高溶氧水平也会增加甲硫氨酸的氧化程度，而后者将会对抗体的结构和功能产生重要影响^[41-42]。

3.5 搅拌转速

搅拌对于细胞培养至关重要，一方面满足气液传质和混合，同时搅拌所引起的剪切对细胞生长或抗体合成也会产生负面影响。然而关于搅拌对抗体质量影响的研究报道较少。Senger 等发现，搅拌转速的提高 (40~200 r/min) 会造成糖基化位点的减少，可能是由于高剪切条件下，蛋白合成速率较高，蛋白在内质网的停留时间下降所造成^[43]。

3.6 培养周期与培养方式

培养周期对于抗体质量的影响主要包括糖基化水平和电荷分布。Pacis 等发现，随着培养周期的延长，高甘露糖型的比例逐渐增加，而高甘露

糖型比例的增加可能会降低药物在体内的半衰期^[27]。Kaneno 等在试验中发现，培养过程中抗体的电荷分布随着时间发生改变，因此以电荷分布作为培养结束的判定标准，从而控制产品质量的一致性^[44]。段须杰等通过检测高甘露糖型比例作为控制细胞培养周期的标准，进而满足抗体的质量要求^[32]。

目前细胞培养方式的主流仍为流加培养。随着培养时间的延长，代谢产物逐渐累积，同时细胞裂解产生的酶逐渐增多，因此抗体质量在复杂的培养环境容易发生修饰或降解。特别对于生物仿制药开发而言，诸如 ReoPro、Remicade 等原研药物由于采用灌注培养，培养环境与流加培养差异较大，因此要特别留意培养周期或培养方式对抗体质量产生的影响。

3.7 培养规模

细胞培养工艺条件通常可以分为两类：体积依赖性参数 (搅拌，通气，培养体积) 和体积非依赖性参数 (培养温度，pH，溶氧水平)。因此在工艺放大过程中，需要保持体积非依赖性参数不变，同时适当地放大体积依赖性参数^[45]。特别是在大规模 (> 10 000 L)、高密度细胞培养条件下，氧气的充分供给和 CO₂ 的及时排出往往成为工艺成功放大的关键^[46]。由此可见，培养规模对抗体质量的影响归根结底还是工艺条件，如何保持在放大过程中工艺条件的一致性成为抗体质量一致性的前提。

4 结语与展望

抗体药物近年来的迅猛发展已经得到了国内外药企和生物技术公司的广泛关注，特别是“十二五”期间国家已进一步明确将生物医药产业作为重点发展的七大战略性新兴产业之一。“十二五”期间将投入 400 亿人民币进行重大新药创制，预计“十三五”期间将再投入 750 亿元资金进行

扶持。与此同时,越来越多的生物药“重磅炸弹”面临着“专利悬崖”,使得国内生物仿制药的竞争愈演愈烈。如何权衡抗体产量与质量的关系成为生物仿制药开发的关键。由于抗体本身存在异质性,细胞培养环境通过影响抗体糖基化、电荷分布等翻译后修饰,进而对抗体的功能产生显著影响^[47-48]。特别对培养基而言,国内大多数企业仍以使用商业化培养基为主,一旦出现产品质量问题,很难对培养基组分进行优化,如何掌握细胞培养的关键技术也是我们国内企业需要亟待解决的问题。从EMA生物仿制药指导原则和FDA对生物仿制药批准指导意见的草案来看,未来国内对生物仿制药的质量要求会日益严格,因此深入认识细胞培养工艺对抗体质量的影响将日益重要。

REFERENCES

- [1] Therapeutic monoclonal antibodies approved or in review in the European Union or United States [EB/OL]. [2013-04-05]. <http://antibodysociety.org/news/approved-mabs.php>.
- [2] TOP 20 Best-Selling Drugs of 2012 [EB/OL]. [2013-04-05]. <http://www.genengnews.com/insight-and-intelligence/top-20-best-selling-drugs-of-2012/77899775/?page=2>.
- [3] Biosimilar & FOB China 2011 [EB/OL]. [2013-04-05]. <http://www.bioon.com/z/Biosimilar/Introduction.shtml>.
- [4] Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies – non-clinical and clinical issues [EB/OL]. [2013-04-09]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/06/WC500128686.pdf.
- [5] Biosimilarity [EB/OL]. [2013-04-09]. <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm290967.htm>.
- [6] Correia IR. Stability of IgG isotypes in serum. *Mabs*, 2010, 2(3): 221–232.
- [7] Raju TS. Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. *Curr Opin Immunol*, 2008, 20(4): 471–478.
- [8] Biowa website [EB/OL]. [2013-04-11]. <http://www.biowa.com>.
- [9] Eureka Therapeutics website [EB/OL]. [2013-04-09]. <http://eurekainc.com/>.
- [10] Vlasak J, Ionescu R. Heterogeneity of monoclonal antibodies revealed by charge-sensitive methods. *Curr Pharm Biotech*, 2008, 9(6): 468–481.
- [11] Antes B, Amon S, Rizzi A, et al. Analysis of lysine clipping of a humanized Lewis-Y specific IgG antibody and its relation to Fc-mediated effector function. *Technol Biomed Life Sci*, 2007, 852(1/2): 250–256.
- [12] Aswas DW, Paranandi MV, Schurter BT. Isoaspartate in peptides and proteins: formation, significance, and analysis. *Pharm Biomed Anal*, 2000, 97(2): 775–790.
- [13] Huang L, Lu J, Wroblewski VJ, et al. *In vivo* deamination characterization of monoclonal antibody by LC/MS/MS. *Anal Chem*, 2005, 77(5): 1432–1439.
- [14] Harris RJ. Heterogeneity of recombinant antibodies: linking structure to function. *Dev Biol (Basel)*, 2005(0), 122: 117–127.
- [15] Bertolotti-Ciarlet A, Wang W, Lownes R, et al. Impact of methionine on binding of human IgG1 to FcRn and Fcγ receptors. *Mol Immunol*, 2009, 46(8/9): 1878–1882.
- [16] Chaderjian WB, Chin ET, Harris RJ, et al. Effect of copper sulfate on performance of serum-free CHO cell culture process and the level of free thiol in the recombinant antibody expressed. *Biotechnol Prog*, 2005, 21(2): 550–553.
- [17] Yuk IH, Zhang B, Yang Y, et al. Controlling glycation of recombinant antibody in fed-batch cell cultures. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108(11): 2600–2610.
- [18] Tachibana H, Taniguchi K, Ushio Y, et al. Changes of monosaccharide availability of human hybridoma lead to alteration of biological properties of human monoclonal antibody. *Cytotechnology*, 1994, 16(3): 151–157.
- [19] Nyberg GB, Balcarcel RR, Follstad BD, et al. Metabolic effects on recombinant interferon-gamma glycosylation in continuous culture of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 62(3): 336–347.
- [20] Wong CF, Wong TK, Goh LT, et al. Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell culture. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 89(2): 164–177.
- [21] Nimmerjahn F, Ravetch JV. Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin. *Annu Rev Immunol*. 2008, 26(1): 513–533.
- [22] Goetze AM, Liu YD, Zhang Z, et al. High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans. *Glycobiology*, 2011, 21(7): 949–959.
- [23] Gramer MJ, Eckblad JJ, Donahue R, et al. Modulation of antibody galactosylation through feeding of uridine, manganese chloride, and galactose. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108(7): 1591–1602.

- [24] Crowell CK, Grampp GE, Rogers GN, et al. Amino acid and manganese supplementation modulates the glycosylation state of erythropoietin in a CHO culture system. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 96(3): 538–549.
- [25] Fujiyama K, Ido Y, Misaki R, et al. Human N-acetylglucosaminyltransferase I. Expression in *Escherichia coli* as a soluble enzyme, and application as an immobilized enzyme for the chemoenzymatic synthesis of N-linked oligosaccharides. *J Biosci Bioeng*, 2001, 92(6): 569–574.
- [26] Ryll T. Mammalian cell culture process for producing glycoproteins: US, 6528286. 2003-03-04.
- [27] Pacis E, Yu M, Autsen J, et al. Effects of cell culture conditions on antibody N-linked glycosylation-what affects high mannose 5 glycoform. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108(10): 2348–2358.
- [28] Borys MC, Dalal NG, Abu-Absi NR, et al. Effects of culture conditions on N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) content of a recombinant fusion protein produced in CHO cells. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 105(6): 1048–1057.
- [29] Jenkins N, Castro P, Menon S, et al. Effect of lipid supplements on the production and glycosylation of recombinant interferon-gamma expressed in CHO cells. *Cytotechnology*, 1994, 15(1/3): 209–215.
- [30] Ahn WS, Jeon JJ, Jeong YR, et al. Effect of temperature on nucleotide pools and monoclonal antibody production in a mouse hybridoma. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 101(6): 1234–1244.
- [31] Dick LW, Qiu D, Mahon D, et al. C-terminal lysine variants in fully human monoclonal antibodies: investigation of test methods and possible causes. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 100(6): 1132–1143.
- [32] Duan XJ, Liu R, Xu WT. Methods for precise control monoclonal antibody quality using fed-batch mode for mammalian cells: CN, 201310055762.7. 2013-02-22. (in Chinese).
段须杰, 刘睿, 徐卫涛. 采用动物细胞流加培养方式精确控制单克隆抗体产品质量的方法: 中国专利, 申请号: 201310055762.7. 2013-02-22.
- [33] Müthing J, Kemminer SE, Conradt HS, et al. Effects of buffering conditions and culture pH on production rates and glycosylation of clinical phase I anti-melanoma mouse IgG3 monoclonal antibody R24. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 83(3): 321–334.
- [34] Yoon SK, Choi SL, Song JY, et al. Effect of culture pH on erythropoietin production by Chinese hamster ovary cells grown in suspension at 32.5 and 37.0 degrees C. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 89(3): 345–356.
- [35] Gawlitzek M, Ryll T, Lofgren J, et al. Ammonium alters N-glycan structures of recombinant TNFR-IgG: degradative versus biosynthetic mechanisms. *Biotechnol Bioeng*, 2000, 68(6): 637–646.
- [36] Schmelzer AE, Miller WM. Hyperosmotic stress and elevated pCO₂ alter monoclonal antibody charge distribution and monosaccharide content. *Biotechnol Prog*, 2002, 18(2): 346–353.
- [37] Trummer E, Fauland K, Seidinger S, et al. Process parameter shifting: Part I. Effect of DOT, pH, and temperature on the performance of Epo-Fc expressing CHO cells cultivated in controlled batch bioreactors. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 94(6): 1033–1044.
- [38] Chotigeat W, Watanapokasin Y, Mahler S, et al. Role of environmental conditions on the expression levels, glycoform pattern and levels of sialyltransferase for hFSH produced by recombinant CHO cells. *Cytotechnology*, 1994, 15(1/3): 217–221.
- [39] Kunkel JP, Jan DC, Jamieson JC, et al. Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody. *J Biotechnol*, 1998, 62(1): 55–71.
- [40] Raju TS, Jordan RE. Galactosylation variations in marketed therapeutic antibodies. *Mabs*, 2012, 4(3): 385–391.
- [41] Liu H, Gaza-Bulseco G, Xiang T, et al. Structural effect of deglycosylation and methionine oxidation on a recombinant monoclonal antibody. *Mol Immunol*, 2008, 45(3): 701–708.
- [42] Kozłowski S, Swann P. Current and future issues in the manufacturing and development of monoclonal antibodies. *Adv Drug Del Rev*, 2006, 58(5/6): 707–722.
- [43] Senger RS, Karim MN. Effect of shear stress on intrinsic CHO culture state and glycosylation of recombinant tissue-type plasminogen activator protein. *Biotechnol Prog*, 2003, 19(4): 1199–1209.
- [44] Kaneko Y, Sato R, Aoyagi H. Changes in the quality of antibodies produced by Chinese hamster ovary cells during the death phase of cell culture. *J Biosci Bioeng*, 2010, 109(3): 281–287.
- [45] Li F, Vijayasankaran N, Shen A, et al. Cell culture processes for monoclonal antibody. *Mabs*, 2010, 2(5): 1–14.
- [46] Nienow AW. Reactor engineering in large scale animal cell culture. *Cytotechnology*, 2006, 50(1/3): 9–33.
- [47] Hossler P, Khattak SF, Li ZJ. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology*, 2009, 19(9): 936–949.
- [48] Beck A, Wagner-Rousset E, Bussat MC, et al. Trends in glycosylation, glycoanalysis and glycoengineering of therapeutic antibodies and Fc-fusion proteins. *Curr Pharm Biotech*, 2008, 9(6): 482–501.

(本文责编 陈宏宇)