

不同亚型CHO宿主细胞对抗体表达的影响

曹辉, 董静, 贾宇, 江一帆*

华北制药集团新药研究开发有限责任公司, 抗体药物河北省工程研究中心, 抗体药物研究国家重点实验室, 石家庄 050015

摘要: CHO细胞作为宿主细胞广泛应用于生物药工业化生产中。其中, CHO-K1、CHO-DG44和CHO-S是最常见的3种亚型。虽然这些亚型是从共同的原始CHO细胞分离出来的,但在不同的实验室或生物医药公司、研究人员、培养基或培养方式下连续传代、驯化和保存,使得CHO细胞积累了大量变异,导致宿主细胞应用于抗体药生产时会在细胞生长状态、抗体表达量及以糖型为代表的质量属性方面表现出较大差异。综述了CHO细胞不同亚型的染色体差异、生长状态、表达差异以及糖型差异,以期为抗体药物研发中宿主细胞的选择提供参考。

关键词: CHO细胞; 抗体; 表达量; 糖型

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2023.0064

中图分类号: Q28, R392-33 文献标志码: A

Effects of Different Sources of CHO Host Cells on Antibody Expression

CAO Hui, DONG Jing, JIA Yu, JIANG Yifan*

State Key Laboratory of Antibody Drug Development, Hebei Engineering Research Center of Antibody Medicine, New Drug Research and Development Co. Ltd., North China Pharmaceutical Corporation, Shijiazhuang 050015, China

Abstract: CHO cells comprise a variety of lineages including CHO-K1, CHO-DG44 and CHO-S, which have been widely used in the industrial production of biological drugs. All CHO cell lines share a common ancestor, however, during the process of cell passage cultivation, cell domesticated, and preservation by different laboratories or companies, substantial genetic heterogeneity among them has been produced, that showed great differences in cell growth state, antibody titer, glycosylation and other product quality attributes. This article reviewed the difference in chromosome, growing status and expression, and glycoform in different sources of CHO host cells, which was expected to be helpful in host cell selection during antibody drug research and development process.

Key words: CHO cells; monoclonal antibody; antibody titer; glycosylation

生物药物在国际医药市场中占据主导地位,截至2023年,全球范围内已有100多个抗体药物被批准上市,近1200个抗体药物处于不同临床试验阶段^[1]。2021年全球畅销药品Top10中,生物药品占了7个,其中单克隆抗体药物4个,这些单抗药物均由重组中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞表达^[2]。

CHO细胞在单抗工业生产中具有明显的优势,如表达产品具有和人类抗体类似的翻译后修饰;重组蛋白可胞外表达,便于目的蛋白分离纯

化;CHO细胞由于非人源,可以减少人类病毒交叉污染的风险;同时CHO细胞具有较长的培养周期,可以进行无血清、高密度、悬浮大规模培养,从而获得高纯度目的蛋白^[3-4]。随着CHO细胞的广泛应用,围绕CHO细胞开发的培养基、培养用设备、耗材种类日益丰富^[5-7],越来越多的开发项目也使得CHO细胞表达产品质量研究相对透彻,CHO细胞也成为目前市场上超过84%蛋白药物的首选宿主细胞^[7]。

1957年,Puck通过中国仓鼠卵巢组织分离获

收稿日期:2023-05-06; 接受日期:2023-06-07

基金项目:河北省科技重大专项(21282401Z)。

联系方式:曹辉 E-mail: 610753996@qq.com; *通信作者 江一帆 E-mail: jyifan@126.com

得CHO细胞,1970年野生型CHO-K1保存于ATCC,1985年分离得到的CHO-K1亚克隆保存于ECACC^[8-9]。此后多家药企使用悬浮培养基将野生型CHO-K1细胞悬浮驯化并作为宿主细胞使用,比如Merck、Lonza等公司。1973年Thompson从原始细胞中分离了1株可用于悬浮培养的CHO细胞,1980年Gibco公司将此细胞驯化至CD CHO培养基中,建立了CHO-S细胞和GMP细胞库。1983年,Urlaub等^[9-10]通过突变一个基因,筛选出双等位DHFR基因敲除的CHO宿主细胞,并命名为CHO-DG44。图1展示了CHO细胞谱系。然而,由于培养条件、筛选方式等不同,不同CHO细胞在基因组、新陈代谢乃至细胞形态、生长方式、蛋白表达等方面具有较大的差异。

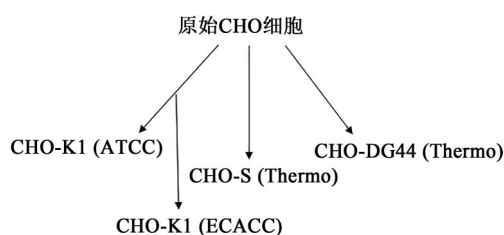


图1 CHO细胞谱系图

Fig. 1 CHO cell lineage

1 CHO细胞不同亚型染色体差异

研究表明,ATCC保存的野生型CHO-K1细胞和中国仓鼠基因组相比,已经产生了25 711个染色体结构多样性,包含13 735个插入和11 976个缺失^[11]。在随后的细胞系建立及培养过程中,突变仍然在不断产生。CHO细胞可能的突变贯穿于长期传代过程中的每次细胞分裂,包括插入、缺失、点突变等序列变异以及染色体结构变异,足够量突变的积累可能产生染色体结构变异,导致染色体不平衡重排,致使CHO细胞染色体重排成为一种常见现象^[12-13]。由于整个染色体的丢失或获得,这些染色体结构的变异还会被非整倍体补充,进而表现为染色体非整倍性和结构改变,因此成为永生细胞的特征性标志^[14-15]。

由于上述原因,CHO细胞没有明确的染色体数目^[16]。大量文献显示,CHO-S细胞具有和原始中国仓鼠细胞相似的染色体数目(22条),长期传代时染色体数目没有变化;CHO-DG44有20条染

色体(19~21条染色体);CHO-K1细胞在传代过程中染色体数目明显减少(18~20条染色体),CHO-K1在有谷氨酰胺培养基长期传代情况下,染色体数目下降到19条,而在无谷氨酰胺的培养基中长期传代,染色体数下降到18条^[17-20]。但随着培养时间的推移,细胞株染色体数目没有再发生明显变化。因此,虽然每个细胞株都有其特征性的染色体数,但细胞群体内染色体数的变化是随机发生且不可预测的,发生机制还未彻底揭示^[21]。其原因可能是,细胞在体外人工高氧、富营养的培养条件下,快速分裂、增殖,积累大量突变造成染色体变异。另外,CHO细胞有较多的端粒序列重复,序列相似性增加了染色体易位发生的可能性。随着培养时间的增加,这些变异会随机积累,从而产生较大的染色体突变^[22-25]。

CHO细胞在染色体突变过程中,有些染色体相对保守,围绕这些相对保守染色体的研究对于细胞转染及获得稳定克隆具有重要意义^[26]。不同的培养基和传代过程会导致观察到的未变异染色体不完全相同。CHO-DG44细胞所有染色体中有5条或者7条是正常染色体,包括Chr1的2个拷贝,以及Chr2、Chr4、Chr5、Chr8和Chr9的1个拷贝,且Chr4存在染色体缺失或延长情况。在CHO-K1细胞的所有染色体中,有8条左右是正常的,包括Chr1和Chr5的2个拷贝,Chr2、Chr3、Chr8和Chr9的1个拷贝,其他染色体均发生重排。综上所述,CHO-K1和CHO DG44相对保守的染色体,包括Chr1、Chr2、Chr8和Chr9^[26-27]。这些保守的染色体可以作为定点整合或随机整合的理想靶点^[28-30]。

2 CHO细胞不同亚型生长状态和表达差异性

CHO细胞常见的几种亚型中,CHO-S被认为是比生长速度(specific growth rate)最高的细胞,具有最短的倍增时间^[31]。有研究发现,CHO-K1、CHO-DG44和CHO-S 3种宿主细胞的倍增时间分别为 24 ± 2 、 27 ± 2 和 18 ± 2 h^[32]。本团队培养的宿主细胞CHO-K1、CHO-DG44(使用CD CHO培养基)倍增时间分别为 19.49 ± 0.38 和 17.80 ± 0.97 h,与Xu等^[31]报道的培养倍增时间不同,这可能是相

同亚型宿主细胞在不同实验室长期传代积累发生突变造成的差异,也可能是培养条件引起的。

有研究发现,CHO-S细胞中糖酵解及三羧酸循环中重要的酶类蛋白、与细胞生长相关蛋白(如肌球蛋白)和细胞周期依赖性激酶表达水平较高。其中,肌球蛋白可能和细胞分裂、细胞运动、细胞形态维持等有关,细胞周期依赖性激酶与细胞周期、转录、mRNA加工有关,同时CHO-S细胞具有最高的葡萄糖消耗速率,以上结果可能是CHO-S细胞生长速度快的原因^[32-33]。而CHO-DG44细胞中与细胞生长相关蛋白表达水平及葡萄糖消耗速率相对较低可能导致了CHO-DG44的生长速度最慢。在长期培养过程中,持续的培养一般会使细胞生长速率增加,但是细胞生长速率增加现象是随机出现的,说明染色体突变是随机的。

转入目的基因后,比生长速率最快的依然是CHO-S细胞。CHO-K1、CHO-DG44和CHO-S 3种宿主细胞转染携带相同目的基因的相同质粒,单克隆通过不同的方式培养,无论是批式培养(batch culture)、批式补料培养(fed-batch culture),还是灌注培养(perfusion culture),CHO-S细胞都有最快的比生长速率,并能最快到达最高密度。而所有培养方式中,CHO-K1细胞比生长速率最慢;在最高密度方面,批式培养获得的CHO-S细胞和CHO-DG44细胞比CHO-K1细胞有更高的密度;批式补料培养和灌注培养中,CHO-DG44细胞密度最高,CHO-K1最高密度相对最低^[10, 34]。基因组研究表明,CHO细胞为了适应无血清条件下的高密度生长,其促细胞凋亡基因的表达比中国仓鼠细胞明显下降,抗凋亡基因表达明显上升^[11]。除基因表达水平外,凋亡相关基因拷贝数的改变也可以影响细胞生长,CHO细胞亦不例外^[11, 35]。

CHO-K1、CHO-DG44和CHO-S 3种宿主细胞在抗体表达和密度方面的表现是相反的,与宿主细胞相比,不同培养基对于抗体比生长速率的影响较小。在批式补料培养中,抗体比生产率由高到低依次是:CHO-K1细胞、CHO-DG44细胞、CHO-S细胞,其中CHO-K1细胞的抗体比生产率是DG44细胞的2~3倍,是CHO-S细胞的6~8倍,且补料并没有给CHO-S细胞带来很大的表达提升^[34]。因此,CHO-K1细胞作为工程细胞表达抗体,具有低密度、高表达的特点。

研究表明,CHO-DG44细胞在转录速率方面

可能存在瓶颈,其与转录及糖酵解过程相关的蛋白表达水平平均次于CHO-K1。蛋白质组学研究发现,CHO-K1细胞中与转录相关的几种蛋白表达水平较高,如核糖核苷二磷酸还原酶、核仁素蛋白、核仁素相关蛋白NRP等^[32]。同时,CHO-K1细胞有更大的内质网,更丰富的线粒体基因组变异和异质性以及与之对应的高细胞特异性抗体表达量^[36]。内质网对于分泌蛋白的折叠组装非常关键,如果内质网里不可逆地错误折叠蛋白超过一定限度,细胞将启动未折叠蛋白响应机制,最终发生细胞凋亡。因此,大内质网有利于分泌蛋白的高产率,也有利于高产细胞的存活和蛋白加工。丰富的线粒体基质有利于细胞自我供能,便于内质网加工处理未折叠的蛋白^[37-39]。由于内质网和线粒体占据了细胞内大量的空间,因此抗体表达量也反映在细胞体积上。研究发现,灌注培养时高产的CHO-K1细胞直径 $15.7 \pm 0.7 \mu\text{m}$,CHO-DG44细胞直径 $14.2 \pm 0.5 \mu\text{m}$,CHO-S细胞直径 $13.7 \pm 1.1 \mu\text{m}$ ^[34, 40]。

热稳定性的增加可提高抗体表达水平,而热稳定性与宿主细胞有关^[41-42]。研究表明,CHO-DG44和CHO-K1表达抗体热稳定性接近,均明显高于CHO-S表达抗体热稳定性^[34]。然而,热稳定性差异影响蛋白质表达的机制尚未明确,IgG1链间二硫键附近LC端丝氨酸的有无可能是影响抗体稳定性的原因之一^[43]。

3 CHO细胞不同亚型的糖型差异

抗体糖基化位点的组成主要是G0F、G1F、G2F,偶尔会有1个或2个唾液酸残基,甘露糖基化、岩藻糖基化和无糖基化,这些受培养基影响较小,主要受细胞株影响^[44]。CHO-DG44细胞表达单克隆抗体,相对于CHO-K1细胞和CHO-S细胞表达的抗体甘露糖基化程度高(CHO-S:2%~3%; CHO-K1:5%~9%; CHO-DG44:11%~13%);抗体产物岩藻糖基化在CHO-S细胞中最高(94%~96%),其次是CHO-K1细胞(82%~84%)和CHO-DG44细胞(71%~83%);抗体无糖基化修饰在CHO-K1细胞(2%~5%)和CHO-S细胞(1%)中含量较低,且在CHO-DG44培养物中未检测到^[34-45]。

半乳糖基化很大程度上受培养基影响,比如培养基里的尿苷、氯化锰和半乳糖等成分,但同时细胞株对其也有一定程度影响^[46-47]。CHO-K1细

胞相对于CHO-DG44细胞和CHO-S细胞可以达到较高的抗体半乳糖基化水平,而CHO-S细胞半乳糖基化水平最低。唾液酸化水平较高的是CHO-K1细胞(21%~36%),其次是CHO-DG44(15%~19%)和CHO-S细胞(6%~15%),原因可能是唾液酸形成相关酶类在CHO-K1中表达水平较高,如ST3GAL1、ST3GAL2、ST3GAL5、ST3GAL6等^[34, 48]。

不同宿主细胞存在糖基化之间的差异^[49]。CHO-K1细胞虽然仅有3个糖型相关酶且与人类没有同源性,糖型修饰与人类仍具有一定的差别,如CHO基因组中N-乙酰葡萄糖胺相关酶类基因不会全部表达,因此CHO细胞不会生产含有二等分N-乙酰葡萄糖胺残基的糖型蛋白;另一方面,CHO细胞基因组相对简单,因此容易进行基因修饰,如仅通过敲除岩藻糖转移酶8(fucosyltransferase 8, FUT8)基因即可去除蛋白的N-糖岩藻糖修饰,从而增加抗体ADCC效应,原因在于CHO-K1细胞岩藻糖转移酶中仅有该基因表达^[11, 50-52]。CHO-DG44和CHO-S细胞来源于CHO-K1,在此基础上,糖型结构又发生了一些变化。

有研究发现,中国仓鼠有256种酶,CHO-K1细胞、CHO-DG44细胞和CHO-S细胞分别至少突变13%、2%、25%,虽然不是所有的突变都影响酶活或者存在底物偏好,但在漫长的糖型演化过程中,这些突变增加了最终糖型变化的可能性^[11, 34]。这就是不同的CHO表达系统会产生不同糖型的原因。

4 展望

在构建不同CHO细胞系的过程中,基因乃至染色体已经发生了明显变化,这些改变进一步影响了不同细胞系的代谢和生长方式。CHO-S细胞染色体数目和原始中国仓鼠细胞相似,但是CHO-S细胞中糖酵解和三羧酸循环中重要酶类的高水平表达表现为CHO-S产生最高的葡萄糖消耗速率,从而使得CHO-S细胞表现出较快的生长速率;*Dhfr*基因的敲除可能导致该细胞系细胞周期相关蛋白表达量下降,从而导致CHO-DG44生长较慢;CHO-K1数目可能较少,但含有丰富的能量代谢关键物质,因此生长较快^[27, 31, 48]。

除细胞系的建立过程外,长期传代和培养过程中,CHO细胞也会持续积累变异,甚至造成染色体结构变异,并且这些变异具有随机性,是不可

预测和不可控的^[12]。内在遗传不稳定性是CHO的蛋白表达可能出现不稳定性的因素之一,持续变异是否影响产品质量,需持续关注并展开相关研究。除保证细胞系的单克隆源性及稳健的控制策略外,CHO细胞中存在的相对保守的DNA序列使得目的基因定点整合到保守基因序列成为一个较好的选择^[12, 53-55]。但是目前大部分项目都是使用相对成熟的随机整合方式,整合位点所在区域如果不是保守区域,则需要评估基因突变以及染色体变异与重组蛋白表达的稳定性之间有无直接的相关性。无论定点整合还是随机整合,均需进行细胞株稳定性实验以证明重组细胞不同代次表达产品质量的一致性。

除不同培养基和培养方式外,细胞系本身也可以影响抗体表达量及质量。CHO-K1细胞有利于抗体表达,CHO-S有利于细胞量积累,而CHO-DG44表达能力和细胞生长表现居中^[34]。高培养密度会带来高耗氧,高消耗营养物质,从而给培养过程带来压力,因此从便于培养和提高目的产物积累效率角度来看,CHO-K1细胞的表现最优秀,具有高抗体比生产率、高表达和低细胞密度的特点^[34, 56-57]。同时,CHO-K1的低密度特点给工艺和培养开发留出了更大的可操作空间,比如在CHO-K1细胞低密度基础上进行培养基和培养工艺开发,以便于带来更大的抗体收获量。

不同宿主细胞由于遗传背景不同会影响抗体产量和质量,因此宿主细胞选型需要结合目的蛋白预期的质量属性。糖型也可能影响生物药物的药效,因此需要将生物药的安全性、有效性和糖型结果关联,进而指导宿主细胞选择^[58]。糖型本身也可能影响抗体电荷异质性,CHO细胞系建立过程中产生了大量基因变异,这些变异可能影响目的蛋白翻译后修饰,因此宿主细胞可能通过多种方式对抗体电荷异质性产生影响,但具体机制仍需要进一步研究^[59]。

参 考 文 献

- [1] KAPLON H, CHENOWETH A, CRESCIOLI S. Antibodies to watch in 2023[J/OL]. mAbs, 2023, 15(1): e2153410[2022-12-06]. <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.2153410>.
- [2] 药智网. 2021全球药品销售TOP10: 药王“修美乐”跌落榜首,新冠疫苗大卖367亿[EB/OL]. [2023-05-30]. <https://news.yaosh.com/archive/36257.html>.
- [3] 郑惠惠, 江洪. CHO细胞表达系统研究进展[J]. 生物技术进

- 展, 2016, 6(4): 239-243.
- [4] 陶维红, 秦民民, 张哲如. CHO细胞株开发技术策略探讨[J]. 生物技术进展, 2014, 4(6): 394-399.
 - [5] LAI T, YANG Y, NG S K. Advances in mammalian cell line development technologies for recombinant protein production[J]. Pharmaceuticals, 2013, 6(5): 579-603.
 - [6] FISCHER S, HANDRICK R, OTTE K. The art of CHO cell engineering: a comprehensive retrospect and future perspectives[J]. Biotechnol. Adv., 2015, 33(8): 1878-1896.
 - [7] WEINGUNY M, KLANERT G, EISENHUT P, *et al.*. Directed evolution approach to enhance efficiency and speed of outgrowth during single cell subcloning of Chinese *Hamster* Ovary cells[J]. Comput. Struct. Biotechnol. J., 2020, 18: 1320-1329.
 - [8] PUCK T T, CIECIURA S J, ROBINSON A. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects[J]. J. Exp. Med., 1958, 108(6): 945-956.
 - [9] TIHANYI B, NYITRAY L. Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production[J]. Drug Discov. Today Technol., 2020, 38: 25-34.
 - [10] WURM F. CHO quasiespecies-implications for manufacturing processes[J]. Processes, 2013, 1(3): 296-311.
 - [11] LEWIS N E, LIU X, LI Y, *et al.*. Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the *Cricetulus griseus* draft genome[J]. Nat. Biotechnol., 2013, 31(8): 759-765.
 - [12] HUHN S, CHANG M, KUMAR A, *et al.*. Chromosomal instability drives convergent and divergent evolution toward advantageous inherited traits in mammalian CHO bioproduction lineages[J/OL]. iScience, 2022, 25(4): 104074[2023-01-15]. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104074>.
 - [13] PASSERINI V, OZERI-GALAI E, DE PACTER M S, *et al.*. The presence of extra chromosomes leads to genomic instability[J/OL]. Nat. Commun., 2016, 7: 10754[2023-01-15]. <https://doi.org/10.1038/ncomms10754>.
 - [14] DREWS R M, HERNANDO B, TARABICHI M, *et al.*. A pan-cancer compendium of chromosomal instability[J]. Nature, 2022, 606(7916): 976-983.
 - [15] TAKADA H, MIURA T, FUJIBAYASHI S, *et al.*. Detailed chromosome analysis of wild-type, immortalized fibroblasts with SV40T, E6E7, combinational introduction of cyclin dependent kinase 4, cyclin D1, telomerase reverse transcriptase[J]. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim., 2021, 57(10): 998-1005.
 - [16] TURILOVA V I, GORYACHAYA T S, YAKOVLEVA T K. Chinese hamster ovary cell line DXB-11: chromosomal instability and karyotype heterogeneity[J/OL]. Mol. Cytogenet., 2021, 14(1): 11[2023-03-24]. <https://doi.org/10.1186/s13039-021-00528-3>.
 - [17] RAY M, MOHANDAS T. Proposed banding nomenclature for the Chinese hamster chromosomes (*Cricetulus griseus*)[J]. Cytogenet. Cell Genet., 1976, 16(1-5): 83-91.
 - [18] YAMANO N, KUMAMOTO T, TAKAHASHI M, *et al.*. Stability difference of each chromosome in Chinese *Hamster* Ovary cell line[J]. BMC Proc., 2015, 9(9): P1 [2023-03-08]. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-9-S9-P1>.
 - [19] VCELAR S, MELCHER M, AUER N, *et al.*. Changes in chromosome counts and patterns in CHO cell lines upon generation of recombinant cell lines and subcloning[J/OL]. Biotechnol. J., 2018, 13(3): e1700495[2023-03-08]. <https://doi.org/10.1002/biot.201700495>.
 - [20] DEROUAZI M, MARTINET D, BESUCHET SCHMUTZ N, *et al.*. Genetic characterization of CHO production host DG44 and derivative recombinant cell lines[J]. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, 340(4): 1069-1077.
 - [21] OGATA N, NISHIMURA A, MATSUDA T, *et al.*. Single-cell transcriptome analyses reveal heterogeneity in suspension cultures and clonal markers of CHO-K1 cells[J]. Biotechnol. Bioeng., 2021, 118(2): 944-951.
 - [22] BAEZ A, SHILOACH J. Effect of elevated oxygen concentration on bacteria, yeasts, and cells propagated for production of biological compounds[J/OL]. Microb. Cell Fact., 2014, 13: 181 [2023-03-06]. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0181-5>.
 - [23] LIN K W, YAN J. Endings in the middle: current knowledge of interstitial telomeric sequences[J]. Mutat. Res., 2008, 658(1-2): 95-110.
 - [24] SCARCELLI J J, HONE M, BEAL K, *et al.*. Analytical subcloning of a clonal cell line demonstrates cellular heterogeneity that does not impact process consistency or robustness[J]. Biotechnol. Prog., 2018, 34(3): 602-612.
 - [25] ARBEITHUBER B, HESTER J, CREMONA M A, *et al.*. Age-related accumulation of *de novo* mitochondrial mutations in mammalian oocytes and somatic tissues[J/OL]. PLoS Biol., 2020, 18(7): e3000745[2023-02-14]. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000745>.
 - [26] SOHN S H, CHO E J, JANG I S. Cytogenetic characteristics of Chinese *Hamster* ovarian cell CHO-K1[J]. Reprod Dev Biol., 2006, 30: 263-270.
 - [27] VCELAR S, JADHAV V, MELCHER M, *et al.*. Karyotype variation of CHO host cell lines over time in culture characterized by chromosome counting and chromosome painting[J]. Biotechnol. Bioeng., 2018, 115(1): 165-173.
 - [28] SRIRANGAN K, LOIGNON M, DUROCHER Y. The use of site-specific recombination and cassette exchange technologies for monoclonal antibody production in Chinese *Hamster* Ovary cells: retrospective analysis and future directions[J]. Crit. Rev. Biotechnol., 2020, 40(6): 833-851.
 - [29] WURM F, WURM M. Cloning of CHO cells, productivity and genetic stability-discussion[J/OL]. Processes, 2017, 5(2): 20 [2023-03-29]. <https://doi.org/10.3390/pr5020020>.
 - [30] KIMURA S, OMASA T. Genome sequence comparison between Chinese *Hamster* Ovary (CHO) DG44 cells and mouse using end sequences of CHO BAC clones based on BAC-FISH results[J]. Cytotechnology, 2018, 70(5): 1399-1407.
 - [31] SOMMEREGGER W, GILI A, STEROVSKY T, *et al.*. Powerful expression in Chinese *Hamster* Ovary cells using bacterial artificial chromosomes: parameters influencing productivity[J]. BMC Proc., 2013, 7(6): 1-2.
 - [32] XU N, MA C, OU J, *et al.*. Comparative proteomic analysis of three Chinese *Hamster* Ovary (CHO) host cells[J]. Biochem. Eng. J., 2017, 124: 122-129.
 - [33] PECCI A, MA X, SAVOIA A, *et al.*. MYH9: Structure, func-

- tions and role of non-muscle myosin II A in human disease[J]. *Gene*, 2018, 664: 152-167.
- [34] REINHART D, DAMJANOVIC L, KAISERMAYER C, *et al.* Bioprocessing of recombinant CHO-K1, CHO-DG44, and CHO-S: CHO expression hosts favor either MAb production or biomass synthesis[J/OL]. *Biotechnol. J.*, 2019, 14(3): e1700686 [2023-02-16]. <https://doi.org/10.1002/biot.201700686>.
- [35] VALLA M, OPDAHL S, YTTERHUS B, *et al.* DTX3 copy number increase in breast cancer: a study of associations to molecular subtype, proliferation and prognosis[J]. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2021, 187(1): 57-67.
- [36] HU Z, GUO D, YIP S S M, *et al.* Chinese *Hamster Ovary* K1 host cell enables stable cell line development for antibody molecules which are difficult to express in DUXB11-derived dihydrofolate reductase deficient host cell[J]. *Biotechnol. Prog.*, 2013, 29(4): 980-985.
- [37] FAN Y, SIMMEN T. Mechanistic connections between endoplasmic reticulum (ER) redox control and mitochondrial metabolism[J/OL]. *Cells*, 2019, 8(9): 1071[2023-04-18]. <https://doi.org/10.3390/cells8091071>.
- [38] CSORDÁS G, WEAVER D, HAJNÓCZKY G. Endoplasmic reticulum-mitochondrial contactology: structure and signaling functions[J]. *Trends Cell Biol.*, 2018, 28(7): 523-540.
- [39] HETZ C, ZHANG K, KAUFMAN R J. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response[J]. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2020, 21(8): 421-438.
- [40] PAN X, DALM C, WIJFFELS R H, *et al.* Metabolic characterization of a CHO cell size increase phase in fed-batch cultures[J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2017, 101(22): 8101-8113.
- [41] BUCHANAN A, CLEMENTEL V, WOODS R, *et al.* Engineering a therapeutic IgG molecule to address cysteinylolation, aggregation and enhance thermal stability and expression[J]. *mAbs*, 2013, 5(2): 255-262.
- [42] GARBER E, DEMAREST S J. A broad range of Fab stabilities within a host of therapeutic IgGs[J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, 355(3): 751-757.
- [43] SHEN Y, ZENG L, ZHU A, *et al.* Removal of a C-terminal serine residue proximal to the inter-chain disulfide bond of a human IgG1 lambda light chain mediates enhanced antibody stability and antibody dependent cell-mediated cytotoxicity[J]. *mAbs*, 2013, 5(3): 418-431.
- [44] KUANG B, DHARA V G, HOANG D, *et al.* Identification of novel inhibitory metabolites and impact verification on growth and protein synthesis in mammalian cells[J/OL]. *Metab. Eng. Commun.*, 2021, 13: e00182[2023-04-06]. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2021.e00182>.
- [45] REINHART D, DAMJANOVIC L, SOMMEREGGER W, *et al.* Influence of cell culture media and feed supplements on cell metabolism and quality of IgG produced in CHO-K1, CHO-S, and CHO-DG44[J]. *BMC Proc.*, 2015, 9(9): P36[2023-03-06]. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-9-S9-P36>.
- [46] EHRET J, ZIMMERMANN M, EICHHORN T, *et al.* Impact of cell culture media additives on IgG glycosylation produced in Chinese *Hamster Ovary* cells[J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2019, 116(4): 816-830.
- [47] HOSSLER P, RACICOT C, CHUMSAE C, *et al.* Cell culture media supplementation of infrequently used sugars for the targeted shifting of protein glycosylation profiles[J]. *Biotechnol. Prog.*, 2017, 33(2): 511-522.
- [48] LAKSHMANAN M, KOK Y J, LEE A P, *et al.* Multi-omics profiling of CHO parental hosts reveals cell line-specific variations in bioprocessing traits[J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2019, 116(9): 2117-2129.
- [49] 江一帆, 贾宇, 王龙, 等. 细胞培养过程对单克隆抗体糖基化修饰的影响和调控[J]. *中国生物工程杂志*, 2019, 39(8): 95-103.
- [50] SHA S, AGARABI C, BRORSON K, *et al.* N-glycosylation design and control of therapeutic monoclonal antibodies[J]. *Trends Biotechnol.*, 2016, 34(10): 835-846.
- [51] BOUNE S, HU P, EPSTEIN A L, *et al.* Principles of N-linked glycosylation variations of IgG-based therapeutics: pharmacokinetic and functional considerations[J/OL]. *Antibodies*, 2020, 9(2): 22[2022-02-18]. <https://doi.org/10.3390/antib9020022>.
- [52] XU X, NAGARAJAN H, LEWIS N E, *et al.* The genomic sequence of the Chinese *Hamster Ovary* (CHO)-K1 cell line[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2011, 29(8): 735-741.
- [53] LEE J S, KALLEHAUGE T B, PEDERSEN L E, *et al.* Site-specific integration in CHO cells mediated by CRISPR/Cas9 and homology-directed DNA repair pathway[J/OL]. *Sci. Rep.*, 2015, 5: 8572[2023-04-06]. <https://doi.org/10.1038/srep08572>.
- [54] 瞿丽丽, 丁学峰, 蔡燕飞, 等. CHO细胞基因组NW-003614092.1内稳定表达位点的发现[J]. *中国生物工程杂志*, 2022, 42(6): 12-19.
- [55] O'BRIEN S A, OJHA J, WU P, *et al.* Multiplexed clonality verification of cell lines for protein biologic production[J/OL]. *Biotechnol. J.*, 2020, 36(4): e2978[2022-12-06]. <https://doi.org/10.1002/btpr.2978>.
- [56] CHUSAINOW J, YANG Y S, YEO J H M, *et al.* A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: what makes a stable high producer? [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2009, 102(4): 1182-1196.
- [57] ZEH N, SCHLOSSBAUER P, RAAB N, *et al.* Cell line development for continuous high cell density biomanufacturing: exploiting hypoxia for improved productivity[J/OL]. *Metab. Eng. Commun.*, 2021, 13: e00181[2023-03-06]. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2021.e00181>.
- [58] LIU L. Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fe-fusion proteins[J]. *J. Pharm. Sci.*, 2015, 104(6): 1866-1884.
- [59] 王欢, 牛昆, 江一帆, 等. 重组单克隆抗体电荷异质性和工艺调控[J]. *生物技术进展*, 2020, 10(5): 456-462.