doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.09.011

# 补料优化降低抗体生产过程中宿主细胞蛋白残留的研究

支文标1 李巍巍1<sup>a</sup> 李士杭1 陶菊红1 Strubbe Steven<sup>2</sup>

(1 默克亚太区生物工艺开发中心 上海 201203;2 Merck End to End Biodevelopment center Martillac 33650 法国)

摘要目的:通过上游工艺中补料培养基优化以降低单克隆抗体生产中的宿主细胞蛋白(HCP)水平。方法:本文在3L反应器的工 艺开发过程中考察了不同的商品化补料培养基和细胞接种密度对 HCP 水平的影响,筛选出最优条件后,进行了补料工艺的优化 和金属离子的添加试验,最后将优化后的工艺放大至200L 中试规模。结果:在小试阶段发现 Cellvento 4Feed 可以显著降低 HCP,同时 CuSO4 可以进一步促进 HCP 降低的水平,最终将工艺放大至200L 中试进行生产并取得了相似的结果,验证了工艺的 稳定性和可放大性,中试规模的 HCP 水平相比最初的工艺降低了 65%左右。结论:补料培养基优化可以有效降低细胞对 HCP 的 比生产速率,使收获液中整体的 HCP 水平显著下降。

关键词:宿主细胞蛋白;补料优化;工艺放大;抗体生产;蛋白残留 中图分类号:R-33;Q813.1 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2020)09-1656-07

# Studies on Reducing Host Cell Protein by Feed Medium Optimization during Monoclonal Antibody Production Process

ZHI Wen-biao<sup>1</sup>, LI Wei-wei<sup>1∆</sup>, LI Shi-hang<sup>1</sup>, TAO Ju-hong<sup>1</sup>, STRUBBE Steven<sup>2</sup>
(1 Merck APAC End to End Biodevelopment Center, Shanghai, 201203, China;
2 Merck End to End Biodevelopment center, Martillac, 33650, France)

**ABSTRACT Objective:** Reduce host cell protein (HCP) level in monoclonal production process by feed medium optimization during upstream process. **Methods:** This work investigated the performance of different commercial feed media and different inoculation densities in 3 L bioreactors. Further study with feed medium optimization and supplement of inorganic salt was conducted based on the best combination. The final process was scaled-up to 200 L pilot production. **Results:** During the bench scale study, Cellvento 4Feed was proved to reduce HCP significantly and CuSO<sub>4</sub> can further reduce HCP. This process was scaled up to 200 L pilot production and similar results were achieved, which validated the robustness and scalability of the process. HCP level was reduced around 65% than the initial process. **Conclusions:** Optimization of feed medium could reduce the specific production rate of HCP of cells, and finally the HCP level in the harvest liquid is reduced significantly.

Key words: Host cell protein; Feed optimization; Process scale-up; Monoclonal antibody production; Residual protein Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q813.1 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2020)09-1656-07

## 前言

中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞被广泛应 用于单克隆抗体和 Fc 融合蛋白的治疗性重组蛋白生产<sup>[12]</sup>。近 年来,随着细胞工程、细胞系开发、培养基和培养条件优化技术 的不断进步,细胞的生产能力也在不断提高<sup>[34]</sup>。然而,随着工艺 水平的提高,更高的细胞密度以及更长的培养周期也产生了更 高水平的工艺相关杂质;而这些杂质往往会对产品质量产生负 面影响<sup>[5]</sup>,如 HCP、DNA、Protein A 等。

宿主细胞蛋白(Host cell protein,HCP)是一系列由宿主细胞分泌或从凋亡细胞中释放出来的、具有多种物理化学性能的混合物<sup>[0]</sup>。HCP可能会诱发受体的免疫响应,产生抗药抗体(Anti-drug antibody),从而影响药效;同时,部分蛋白酶和二硫还原酶催化降解产品,对其质量及稳定性产生负面影响<sup>[73]</sup>。因

此,中国药典、美国食品和药物管理局(FDA)、欧洲药品管理局 (EMA)以及国际人用药品注册技术协调会(ICH)都在其法规 或指南中对 HCP 有一定限制要求<sup>[9-12]</sup>。

目前单克隆抗体生产工艺中,下游的亲和层析以及阴离子 层析是去除 HCP 的主要工艺步骤;然而,HCP 中的某些成分会 与产品本身发生相互作用,导致其无法通过纯化去除并保留至 最终产品中<sup>[13]</sup>,同时,越来越高的 HCP 残留水平也给下游纯化 工艺不断提出更高的挑战。因此,如何从上游工艺开始降低 HCP 水平逐渐受到重视。目前已经有研究从基因序列、细胞系、 细胞活率以及培养周期等角度对上游收获料液中 HCP 水平进 行探讨<sup>[1,6,14,15]</sup>,但总体上,文献报道相对较少。

在本研究中,我们首次报道了通过在小试反应器工艺开发 过程中的对比研究考察了两种不同的商品化补料对上游反应 器生产过程中细胞生长、代谢、蛋白表达和收获液中 HCP 水平

作者简介:支文标(1990-),男,硕士,研究方向:细胞培养工艺开发,E-mail:wenbiao.zhi@merckgroup.com

<sup>△</sup> 通讯作者:李巍巍,男,博士,研究方向:细胞培养工艺开发,E-mail:weiwei.li@merckgroup.com

<sup>(</sup>收稿日期:2019-09-30 接受日期:2019-10-23)

的影响;并通过补料体积优化以及金属离子添加,探讨其对降低 HCP 的影响。最终在中试规模进行了工艺的放大生产,成功验证了该商品化补料及其工艺的稳定性以及可放大性。希望为后续的基于 CHO 细胞的生物制药工艺开发和生产过程中宿主蛋白残留的控制提供数据基础和理论指导。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 细胞株 本研究所使用的细胞是基于 CHO 宿主细胞构 建的一个稳定单克隆细胞系,细胞表达的产品为治疗性单克隆 抗体(IgG1),经冻存建库于液氮气相中保存。

1.1.2 试剂及耗材 细胞培养使用的基础培养基为商品化培养基 Balan CD Growth A,货号为 94120,美国 Irvine Scientific;两种不同的补料培养基分别为:Cellvento 4Feed,货号为 1.03796,德国 Merck,以下简称补料 I;另一种为商品化培养基(包含 A、B 两种组分),以下简称补料 II。其他试剂耗材主要是包括:葡萄糖(货号:为 1.03748,德国 Merck)、谷氨酰胺(货号: 1.00286,德国 Merck)、碳酸氢钠(货号:1.06323,德国 Merck)、碳酸钠(货号:1.06398,德国 Merck)。

Protein A 层析柱为 POROS A/20 Colum (2.1 mm× 13 mm, 体积 0.104 mL),货号为 1502412,美国 Thermo Scientific。HCP 检测试剂盒为 CHO HCP ELISA Kit,货号为 F550,美国 Cygnus Technologies。3 L 反应器为 Cellready 3 L,货号为CR0003L200, 德国 Merck。波浪式生物反应袋为 Wave Cellbag 50 L,货号为 CB0050L11-31,美国 General Electric。200 L 反应器为 Cellready 200,货号为 CR0250L101,德国 Merck。

1.1.3 仪器设备 ThawSTAR 细胞复苏仪,美国 Biocision; X15R 离心机,美国 Beckman Coulter;LT-XC 细胞培养摇床,瑞 士 Adolf Kuhner;1374 II 级 A2 型生物安全柜,美国 Thermo Scientific;C-BIO 台式生物反应器控制器,法国 Global Process Concept;Vi-Cell XR 细胞计数仪,美国 Beckman Coulter; ABL90 FLEX 血气分析仪,丹麦 Radiometer;Wave25 波浪式反 应器,美国 General Electric;Mobius 200 L 一次性反应器,德国 Merck;E2695 alliance 高效液相色谱,美国 Waters;SpectraMax i3 酶标仪,美国 Molecular Devices;V1500AB 液氮罐,美国 Custom Biogenic Systems。

1.2 方法

1.2.1 细胞复苏及传代 从液氮罐中取出细胞放入细胞复苏 仪解冻后,添加基础培养基稀释至最终细胞密度为 0.30× 10<sup>6</sup> cells/mL。用于 3 L 反应器工艺开发的细胞扩增流程:复苏 后每 2-3 天进行一次传代,依次扩增至 500 mL 摇瓶和 2 L 摇瓶, 至细胞活率高于 90%且细胞量足够后接种至 3 L 反应器中。

用于 200 L 反应器工艺放大的细胞扩增流程:复苏后每 2-3 天进行一次传代,依次扩增至 500 mL 摇瓶和 2 L 摇瓶,至 细胞活率高于 90%且细胞量足够后接种至 Wave25 波浪式反 应器,培养 3-4 天后,接种至 200 L 反应器。

摇瓶阶段培养条件为:温度 37 ℃,二氧化碳浓度 5.0 %,转 速 130 rpm。

1.2.2 3 L 反应器补料筛选 在第一轮 3 L 反应器工艺研究中 主要研究了两种不同的补料培养基和两种细胞接种密度的影 响,4 个反应器(B1-B4)的初始工作体积为 1.5 L;培养温度 37 ℃; 溶氧设定值 50 %;pH 设定值 6.8 至 7.2; 搅拌速度 160 rpm;底部通气 2 mL/min,顶部通气 40 mL/min。

其中 B1 和 B3 初始接种密度 0.30× 10<sup>6</sup> cells/mL,培养至 第 6 天时降温至 33 ℃;B3 添加补料 I,培养第 3、4、5、10、11、 12 天流加当前体积的 1.5%,第 6、7、8、9 天为 3%,共 21%;B1 添加补料 II,培养第 3、6、7、8、9、12 天流加当前体积的 5%,共 30%。B2 和 B4 初始接种密度 0.60× 10<sup>6</sup> cells/mL,培养至第 5 天时降温至 33℃;B4 添加补料 I,培养第 2、3、4、9、10、11 天流 加当前体积的 1.5%,第 5、6、7、8 天为 3%,共 21%;B2 添加补 料 II,培养第 2、5、6、7、8、11 天流加当前体积的 5%,共 30%。

从第3天开始葡萄糖浓度低于4g/L则补加300g/kg的葡 萄糖至终浓度6g/L;培养至第16天或者细胞活率低于75%时 收获。

1.2.3 3 L 反应器补料优化 在第二轮的补料培养基优化研究中,2个反应器 B5 和 B6 培养条件与 B4 相同,差别在于:B5 补料策略修改为第 2,3 天流加当前体积的 1.5 %,第 4、9、10、11、12 天为 2%,第 5、6、7、8 天为 3%,共 25%;B6 中额外向 1.5 L初始工作体积中加入了 CuSO<sub>4</sub> 母液至终浓度 1.6 μmol/L;

1.2.4 **工艺放大和生产** 工艺放大和生产在 200 L 一次性生物反应器中进行,初始工作体积 150 L;培养温度 37 ℃;溶氧设定值 50%;pH 设定值 6.8 至 7.2;搅拌速度 73 rpm;底部通气 0.2 L/min,顶部通气 2 L/min;培养至第 5 天降温至 33 ℃。补糖和补料策略与 3 L 反应器研究中最后选定的最佳方案相同;培养至第 16 天或者细胞活率低于 75 %时收获。

1.2.5 参数检测 活细胞密度(Viable cell density, VCD)和细胞活率使用细胞计数仪检测;葡萄糖浓度和乳酸浓度使用血气分析仪检测。Titer 使用高效液相色谱及 Protein A 色谱柱检测,进样体积 20 μL,流速 1.0 mL/min,流动相为 100 mM 磷酸钠溶液(含 150 mM 氯化钠, pH 7.00±0.05),检测波长 214 nm, 柱温为室温。HCP 使用 ELISA 试剂盒的标准方法检测。

1.2.6 **计算公式** 累计活细胞密度 (Integral viable cell density, IVCD),使用如下公式计算:

 $IVCD=\sum_{1}^{16} \frac{VCD_{t,1} \times V_{t,1} + VCD_{t} \times V_{t}}{2 \times V_{0}}$ 产物比表达速率(Qp)  $Q_{p} = \frac{Titer}{IVCD}$ HCP 生成速率(QHCP)  $Q_{HCP} = \frac{HCP}{IVCD}$ 

t 为培养时间(单位 d),VCD 为活细胞密度(单位cell/mL), VCD<sub>t</sub> 为培养第 t 天时的活细胞密度,V 为培养体积(单位 mL),V<sub>t</sub>为培养第 t 天时的培养体积,V<sub>0</sub> 为初始培养体积。Q<sub>p</sub>和 Q<sub>HCP</sub> 计算方法为当天 Titer 或 HCP 除以当天的 IVCD。

1.2.7 统计学分析 实验数据通过 Minitab 18 采用配对 T (Paired T)检验进行分析,置信水平为 95 %, *P* 值小于 0.05 表明在统计学上存在显著差异。

#### 2 结果与讨论

#### 2.1 补料培养基筛选

试验在 3 L 反应器上对两种商品化补料培养基进行了对 比研究;同时,为了考察细胞量带来的差异,同时对比了 0.30× 10<sup>6</sup> 和 0.60×10<sup>6</sup> cells/mL 两种初始接种密度。详细试验方案见 1.2.2。

如图 1 所示,细胞在补料 II 中(反应器 B1 和 B3):第 6~8 天达到最大活细胞密度(Peak viable cell density,PVCD)(图 1, A),使用补料 I(反应器 B2 和 B4)也在相同的培养天数时达到 最大活细胞密度(最大活细胞密度值比补料 II 有 10%左右的 下降),随后活细胞密度开始逐天下降。就细胞活率而言(图 1, B),使用补料 II 的反应器中细胞活率维持更加稳定,最终活率 为 89.2%和 82.5%(表 1)。使用补料 I 的反应器中细胞活率的 下降速度更快,从第 9 天开始,和使用补料 II 的反应器出现显 著性差异,最终活率为 85.8%和 77.0%。培养过程中 4 个反应器 的最低葡萄糖浓度均维持在 2.0 g/L 的正常水平以上葡萄糖消 耗速率均维持在 2.0~4.0 g/L 之内(图 1,C)。四个反应器中的乳 酸浓度也比较类似,在前 3 天的对数生长前期迅速上升,随后 进入乳酸净消耗期,乳酸水平逐渐下降并一直维持在 1 g/L 以 下的较低水平(图 1,D)。4 个反应器中细胞的葡萄糖和乳酸代 谢未表现出显著差异。

从图 1 和表 1 中的数据可以得出,不同接种密度(B1 和 B3,B2 和 B4)对 PVCD 无显著影响,较高的接种密度(B2 和 B4)对比低接种密度(B1 和 B3)会显著增加 IVCD,并降低培养 结束时的活率(都仍然维持在70%以上)。从补料的角度分析, 两种使用补料 I 的反应器(B2 和 B4)的 PVCD、IVCD 和培养结 束时的细胞活率显著低于使用补料 II 的反应器(B1 和 B3)。

从图 2 和表 1 中的数据可以得出,四种条件下反应器的表 达量都在 3.00 g/L 左右(图 2,E),不同接种密度和补料对产量 无显著影响。从补料的角度分析,两种使用补料 I 的反应器(B2 和 B4)的细胞 Qp(图 2,F)显著高于使用补料 II 的反应器(B1 和 B3),这表明补料 I 可以显著促进单个细胞的表达水平。补 料 I 相较于补料 II 可以显著的降低整体的宿主蛋白残留水平 和单个细胞产生宿主蛋白的水平(根据表 1 中的 HCP 检测结 果计算可得,B2 和 B4 的 HCP 总量分别比 B1 和 B3 中降低了 53.9 %和 61.7 %,QHCP 也分别降低了 41.3 %和 53.2%)(图 2 G,H)。同时,B4 中的 HCP 以及 QHCP 也明显低于 B2 中,这表 明细胞接种密度对于整个代谢过程也存在一定影响。

收获液中的 HCP 一方面来源于细胞分泌的胞外蛋白,另 一方面则来源于细胞衰亡后释放的胞内蛋白<sup>[16]</sup>,因此 HCP 可 能会受到细胞密度、活率和单个细胞释放水平的综合影响。因 此 QHCP 结果的差异也进一步证明了使用补料 I 造成的总 HCP 水平的下降是由于补料 I 降低了单个细胞的 HCP 释放水 平而非其它因素导致的。最终,补料 I 在使细胞保持同等产量 的前提下,降低了细胞分泌 HCP 的水平,从而使 HCP 总量显 著下降。

	表1补料筛选中各组的结界	具
Table1	Results of each run during feed	l screening

Table 1 Results of cach full during feed selecting									
	PVCD (10 <sup>6</sup> cell/mL)	Viability (%)	IVCD (10 <sup>6</sup> cells × day/mL)	Titer (g/L)	Q <sub>p</sub> (pg/cell/day)	HCP (ppm)	QHCP (pg/cell/day)		
B1	31.82	89.2	387.7	3.07	7.9	3.45×10 <sup>6</sup>	8.9		
B2	26.74	85.8	303.5	2.88	9.5	$1.59 \times 10^{6}$	5.2		
B3	30.84	82.5	431.5	3.17	7.3	3.47×10 <sup>6</sup>	8.0		
B4	27.46	77.0	352.8	3.23	9.2	1.33×10 <sup>6</sup>	3.8		

#### 2.2 补料工艺优化

在流加培养中,优化补料培养基的添加量会对细胞的生长、维持以及表达水平有一定的积极影响<sup>[17,18]</sup>;基于章节 2.1 中的结果,我们选择了 B4 作为基础进行进一步的研究。本组研究主要考察了两种不同的优化条件,分别为单独增加补料体积(B5)和添加补料体积同时增加 CuSO<sub>4</sub>(B6)。

结果如图 3,在单独提高补料体积的 B5 中,细胞的生长状态与提高补料体积前相比并无显著变化,收获时活率有了明显的提高,而提高补料体积同时额外加入 CuSO4 的 B6,细胞的生长状态也较为相似,最大活细胞密度和每天的活细胞密度与 B5 相比有一定程度的下降,此外细胞活率的维持和收获时的 细胞活率比 B5 低,但仍与增加补料体积前处于相同水平。在代谢方面,优化后的两个反应器的葡萄糖和乳酸的代谢水平与优化前并无显著性差异。

如图 4 所示在产品产量方面,添加补料培养基的 B5 未有效地提高产品产量和 B4 相比无显著差异,在添加 CuSO<sub>4</sub> 后

(B6),产品的产量相比 B4 有轻微显著的下降,此外 B5 和 B6 与 B4 的 Q<sub>p</sub> 相比无显著差异表明增加补料和 CuSO<sub>4</sub> 对此无显 著影响根据 Q<sub>p</sub> 的结果可以确认,产量的降低主要是由于添加 CuSO<sub>4</sub>后 IVCD 整体降低导致的。与产量的影响相反,和 B4 相比,单独提高补料比例的(B5)显著增加了 HCP 和 QHCP, 而额外添加了 CuSO<sub>4</sub> 的 B6 对此无显著影响(只有非常轻微 的降低)。总体而言,单独增加补料体积会显著提高 HCP 的水 平但不影响产量而额外添加虽然降低了部分产量,但更好的 控制和维持了 HCP 的水平。我们推测这一变化可能是 CuSO<sub>4</sub> 对细胞自身代谢的一些环节产生影响所导致的。根据上述结 果,考虑到本次工艺开发的主要目的是在后续中试生产中尽量 控制 HCP 水平,我们选择了 B6 作为最终的条件进行工艺放大 和生产。

#### 2.3 工艺放大

对于哺乳动物细胞培养体系来说,从小试规模放大到中试 甚至生产后,由于流体和气泡带来的剪切力、流体混匀速率<sup>109</sup>、



图 1 补料筛选中各组的过程参数图 (A:活细胞密度;B:细胞活率;C:葡萄糖浓度;D:乳酸浓度) Fig.1 Profiles of process parameters of each run during feed screening



(A: viable cell density; B: cell viability; C: concentration of glucose; D: concentration of lactate)



Fig.2 Results of each run during feed screening (E: titer of product; F: specific productivity of product;

G: concentration of HCP; H: specific productivity of HCP; The label "\*" means significant difference between the two data).

氧传质<sup>[20]</sup>、二氧化碳去除速率<sup>[21]</sup>等方面在工艺放大后都可能产 生变化,并对细胞生长产生负面影响,最终影响产品产量及质 量以及工艺的稳定性<sup>[22,23]</sup>。为了进一步研究工艺的稳定性以及可 放大性,我们在 200 L 规模的中试反应器上进行了放大生产。

在 200 L 中试生产过程中细胞生长和代谢的结果见图 5, 细胞密度变化曲线无显著差异,中试和小试的 PVCD 分别为 29.27×10<sup>6</sup> cells/mL 和 27.47×10<sup>6</sup> cells/mL,中试的 IVCD 比 B6 高出约 12%;细胞活率上,在工艺放大后,细胞活率从第 6 天开 始就低于小试 3L 反应器中的结果,最终的收获活率 70.7%,比

小试结果降低约 7%。葡萄糖和乳酸的代谢过程在放大前后并 未产生明显差异,葡萄糖和乳酸的代谢曲线基本重合。产品表达 量在放大后下降了约 10%,但差异不显著(P=0.494),基本一 致,属于正常的工艺波动。

除细胞生长、代谢和产量等结果外,收获时上清液中的 HCP浓度在放大后也保持了相同的水平。此外,放大前后所生 产的抗体的关键质量属性(Critical quality attributes,CQA,聚体 含量(SEC-HPLC),电荷异质性(cIEF)和纯度(CE-SDS))都具 有极高的相似性(数据未展示)。总体而言,中试放大生产的结





(A: viable cell density; B: cell viability; C: concentration of glucose; D: concentration of lactate)



图 4 补料优化中各组的结果(E:产品表达量;F:产品比生成速率;G:宿主细胞蛋白浓度; H:宿主细胞蛋白比生产速率"\*"标记表面两组数据间存在显著差异)

Fig.4 Results of each run during feed optimization (E: titer of product; F: specific productivity of product; G: concentration of HCP; H: specific productivity of HCP; The label **"\*"** means significant difference between the two data)

果表现出和小试结果的高度相似性,表明该工艺结果具有较好的稳定性以及可放大性。

发阶段 3 L 反应器上进行了两种商业化补料培养基的筛选试验,发现 Cellvento 4Feed 具有降低 HCP 的优势,并进一步进行 了补料优化试验以降低 HCP,最终将工艺放大至 200 L 的中试 规模,确认了结果的稳定性和可重现性。不仅如此,Cellvento 4Feed 在降低 HCP 的同时,保证了与另一补料培养基相同的蛋

### 3 结论

在本研究中,为了降低生产过程 HCP 水平,在上游工艺开





白产量,质量和更好的单个细胞比表达量。中试生产(200 L)与 小试(3 L)的结果表现出了高度的相似性,只有细胞活率和蛋白 产量略有降低,考虑到工艺的批次间正常波动以及工艺放大所 产生的负面影响(中试反应器的搅拌和混合的效果更加苛刻), 这一变化处于可接受范围内。最终,中试阶段 HCP 水平被降低 至 1.20× 10<sup>6</sup> ppm,相比于最初工艺(B1)中的 3.45× 10<sup>6</sup> ppm, 有了 65%的下降,达到了预期目标。另外,Cellvento 4Feed 对 HCP 降低的途径可能主要是通过改善细胞过度分泌 HCP 水平 完成。

目前,上游培养工艺的核心在于提高产品的表达量以及控制产品本身的关键质量属性,而对于工艺相关杂质的监控较少,其控制与去除主要依赖于下游纯化工艺。本研究通过对上游工艺中补料培养基的筛选,显著地降低了在上游收获阶段的HCP水平,使得下游工艺在未作出针对性优化的情况下,最终纯化完成后原液中的HCP水平于20ppm,满足了工艺要求,对提高最终产品的质量及收率具有积极意义。

此外,对于本研究中首次发现 Cellvento 4Feed 降低 HCP 的特性,我们又初步在其他项目中进行了类似的对比研究,并 在多个 CHO 细胞抗体工艺开发项目中获得了与本研究类似的 结果。这表明该补料培养基的这一特性可能具有普遍适用性, 这将给单克隆抗体生产工艺中降低 HCP 提供一个新的思路及 方法。

#### 参考文献(References)

- Hogwood C, Bracewell D, Smales C, et al. Measurement and control of host cell proteins (HCPs) in CHO cell bioprocesses[J]. Curr Opin Biotechnol, 2014, 30: 153-160
- [2] Valente K, Levy N, Lee K, et al. Applications of proteomic methods for CHO host cell protein characterization in biopharmaceutical manufacturing[J]. Curr Opin Biotechnol, 2018, 53: 144-150
- [3] Calmels C, McCann A, Malphettes L, et al. Application of a curated genome-scale metabolic model of CHO DG44 to an industrial fed-batch process[J]. Metab Eng, 2019, 51: 9-19
- [4] Jesus M, Wurm F. Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors[J]. Euro J Pharm Biopharm, 2011, 78: 184-188
- [5] Park J, Jin J, Lee G, et al. Proteomic Analysis of Host Cell Protein Dynamics in the Supernatant of Fc-Fusion Protein-Producing CHO DG44 and DUKX-B11 Cell Lines in Batch and Fed-Batch Cultures [J]. Biotechnol Bioeng, 2017, 114: 2267-2278
- [6] Jin M, Szapiel N, Zhang J, et al. Profiling of Host Cell Proteins by Two- Dimensional Difference Gel Electrophoresis (2D-DIGE):

Implications for Downstream Process Development [J]. Biotechnol. Bioeng, 2010, 105: 306-316

- [7] Aboulaich N, Chung W, Thompson J, et al. A Novel Approach to Monitor Clearance of Host Cell Proteins Associated with Monoclonal Antibodies[J]. Biotechnol Prog, 2014, 30: 1114-1124
- [8] Vanderlaan M, Zhu-Shimoni J, Lin S, et al. Experience with Host Cell Protein Impurities in Biopharmaceuticals[J]. Biotechnol Bioeng, 2018, 34: 828-837
- [9] 国家药典委员会. 中国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015, 41-43
- [10] Food and Drug Administration. Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use [J]. J. Immunother, 1997, 20(3): 214-43
- [11] European Medicines Agency. Guideline on development, production, characterization, and specification for mAb and related products[Z]. EMA/CHMP/BWP/532517/2008, 2016-7-21, 1-13
- [12] ICH: Guidance for Industry Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biotechnology Products[J]. Fed Reqist, 1999, 64(159): 44928-44935
- [13] Shukla A, Hinckley P. Host Cell Protein Clearance During Protein A Chromatography: Development of an Improved Column Wash Step [J]. Biotechnol. Prog, 2008, 24: 1115-1121
- [14] Gilgunn S, Bones J. Challenges to industrial mAb bioprocessing removal of host cell proteins in CHO cell bioprocesses [J]. Curr Opin Chem Eng, 2018, 22: 98-106
- [15] Mead E, Chiverton L, Smales C, et al. Identification of the limitations

on recombinant gene expression in CHO cell lines with varying luciferase production rates[J]. Biotechnol. Bioeng, 2009, 102: 1593-1602

- [16] Grzeskowiak J, Tscheliessnig A, Toh P, et al. 2-D DIGE to expedite downstream process development for human monoclonal antibody purification[J]. Protein Expression Purif, 2009, 66: 58-65
- [17] Yu M, Hu Z, Pacis E, et al. Understanding the Intracellular Effect of Enhanced Nutrient Feeding Toward High Titer Antibody Production Process[J]. Biotechnol. Bioeng, 2011, 108: 1078-1088
- [18] Khattak S, Xing Z, Kenty B, et al. Feed Development for Fed-Batch CHO Production Process by Semisteady State Analysis[J]. Biotechnol. Prog, 2010, 26: 797-804
- [19] Marks D. Equipment design considerations for large scale cell culture[J]. Cytotechnol, 2003, 42: 21-33
- [20] Hippach M, Schwartz I, Pei J, et al. Fluctuations in dissolved oxygen concentration during a CHO cell culture process affects monoclonal antibody productivity and the sulfhydryl-drug conjugation process[J]. Biotechnol Prog, 2018, 34: 1427-1437
- [21] Kirdar A, Conner J, Baclaski J, et al. Application of Multivariate Analysis toward Biotech Processes: Case Study of a Cell-Culture Unit Operation[J]. Biotechnol Prog, 2007, 23: 61-67
- [22] Xing Z, Kenty B, Li Z, et al. Scale-Up Analysis for a CHO Cell Culture Process in Large-Scale Bioreactors[J]. Biotechnol. Bioeng, 2009, 103: 733-746
- [23] Schmidt F. Optimization and scale up of industrial fermentation processes[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 68: 425-435

#### (上接第1641页)

- [23] ME Pennesi, KV Michaels, SS Magee, et al. Long-Term characterization of retinal degeneration inrd1andrd10Mice using spectral domain optical coherence tomography, [J]. Investigative Opthalmology and Visual Science, 2012, 53(8): 4644-4656
- [24] G. Moiseyev, Y Chen, Y Takahashi, B X Wu, et al. RPE65 is the isomerohydlase in the retinoid visual cycle [J]. Proceedings of National Academy of Science of the United States of America, vol. 102, no. 35, pp. 3088-3093, 2005
- [25] Crouch R K, Chader G J, Wiggert B, et al. Retinoids and the visual process[J]. Photochem Photobiol, 1996, 64: 613-621
- [26] Verbakel S K, van Huet R A C, Boon C J F, et al. Non-syndromic retinitis pigmentosa[J]. Prog Retin Eye Res, 2018, 66: 157-186
- [27] Hamel C. Retinitis pigmentosa[J]. Orphanet J Rare Dis, 2006, 1:40
- [28] Todd L, C Zelinka. Valproic Acid for a Treatment of Retinitis Pigmentosa: Reasons for Optimism and Caution[J]. J Neurosci, 2017, 37(21): 5215-5217
- [29] Hanus J, Anderson C, Sarraf D, et al. Retinal pigment epithelial cell necroptosis in response to sodium iodate[J]. Cell Death Discov, 2016, 2: 16054
- [30] Tao Zui, Dai Jia-man, He Jian-rong, et al. The Influence of NaIO<sub>3</sub>-Induced Retinal Degeneration on Intra-retinal Layer and the

Changes of Expression Profile/Morphology of DA-ACs and mRGCS [J]. Molecular Neurobiology, 2013, 47(1): 241-260

- [31] Carido M, Zhu Y, Postel K, et al. Characterization of a mouse model with complete RPE loss and its use for RPE cell transplantation [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(8): 5431-44
- [32] Wang J, Iacovelli J, Spencer C, et al. Direct effect of sodium iodate on neurosensory retina [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(3): 1941-53
- [33] Chen M, Rajapakse D, Fraczek M, et al. Retinal pigment epithelial cell multinucleation in the aging eye - a mechanism to repair damage and maintain homoeostasis[J]. Aging Cell, 2016, 15(3): 436-45
- [34] Machalinska A, Lejkowska R, Duchnik M, et al. Dose-dependent retinal changes following sodium iodate administration: application of spectral-domain optical coherence tomography for monitoring of retinal injury and endogenous regeneration[J]. Curr Eye Res, 2014, 39 (10): 1033-41
- [35] Tsujikawa M, Wada Y, Sukegawa M, et al. Age at onset curves of retinitis pigmentosa[J]. Arch Ophthalmol, 2008, 126(3): 337-40
- [36] Kannan R, D R Hinton. Sodium iodate induced retinal degeneration: new insights from an old model [J]. Neural Regen Res, 2014, 9(23): 2044-5