

哺乳动物CHO细胞重组抗体表达的研究进展

吴俊源, 刘煜*

中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏 南京

收稿日期: 2026年4月15日; 录用日期: 2026年5月14日; 发布日期: 2026年5月21日

摘要

重组抗体药物在医药市场中的占比不断增大。哺乳动物细胞表达系统相比原核和真核表达系统能够高效表达重组抗体并进行近似人源蛋白的翻译后修饰, 使重组抗体具有更好的活性及稳定性, 因此被广泛用于重组抗体的生产, 其中以中国仓鼠卵巢细胞(Chinese Hamster Ovary, CHO)用途最为广泛。基于原有的CHO细胞表达平台, 抗体表达产量和质量并不一致。文章聚焦于载体设计、基因整合技术、糖基化修饰、筛选放大策略以及工艺优化等方面的进展并进行综述, 旨在探究CHO细胞表达平台面临的目的基因靶向整合效率低、高产克隆筛选繁重、工业放大产物质量不可控等不足, 为进一步促进CHO细胞表达系统的效率与一致性提供研究思路。

关键词

CHO细胞, 重组抗体, 靶向基因整合, 高通量筛选, 工艺优化

Research Progress on Recombinant Antibody Expression in Mammalian CHO Cells

Junyuan Wu, Yu Liu*

School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing Jiangsu

Received: April 15, 2026; accepted: May 14, 2026; published: May 21, 2026

Abstract

The proportion of recombinant antibody drugs in the pharmaceutical market is constantly increasing. Compared with prokaryotic and eukaryotic expression systems, mammalian cell expression systems can efficiently express recombinant antibodies and perform post-translational modifications similar to human proteins, endowing recombinant antibodies with better activity and stability. Therefore, they are widely used in the production of recombinant antibodies, among which Chinese hamster

*通讯作者。

ovary cells are the most widely used. Based on the existing CHO cell expression platform, the yield and quality of antibody expression are inconsistent. This article reviews the progress in vector design, gene integration technology, screening and scaling-up strategies, and process optimization, aiming to explore the shortcomings of the CHO cell expression platform, such as low targeting integration efficiency of target genes, heavy workload in screening high-yield clones, and uncontrollable product quality during industrial scaling-up, and to provide research ideas for further improving the efficiency and consistency of the CHO cell expression system.

Keywords

CHO Cells, Recombinant Antibody, Targeted Transgene Integration, High-Throughput Screening, Process Optimization

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

CHO 细胞是生物制药领域重组抗体生产的主要宿主之一。通过培养体系的调控与细胞驯化, CHO 细胞能够适应无血清悬浮培养环境, 并且其较强的剪切力和渗透压耐受能力, 使其适用于生物反应器中的大规模培养, 符合工业大规模生产需求。自 1987 年首个由 CHO 细胞表达的人组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)获 FDA 批准上市以来, 截止 2025 年, 在全球已获批的 191 种生物药物中, 由 CHO 细胞表达的药物占比达 80% [1]。

数十年来, 随着生物制药行业对重组蛋白、单克隆抗体等生物药的需求不断提高, 科研机构与生物制药企业始终致力于细胞系的优化。目前, 制药行业中使用的 CHO 细胞普遍存在基因组不稳定性问题, 易发生缺失、易位等基因组重排现象[2]。细胞在生产过程中承受着高密度培养带来的基因组复制与高负荷代谢压力, 这导致细胞基因组序列变异及表观修饰变化, 从而使得生产效率和产品质量下降[3]。

在稳定重组细胞系的构建与开发中(见图 1), 实现高效生产和克隆稳定性的动态平衡是关键。这需要通过对 CHO 细胞表达载体的设计、靶向目的基因整合技术的应用及培养工艺的优化等多维度策略协同推进[4][5]。上述优化措施目标始终聚焦于突破现有生产瓶颈: 一方面显著提升细胞的密度增殖能力与目的蛋白表达效率, 另一方面保障克隆的稳定性与产物质量一致性, 提高最终产量与品质, 从而更好地适配工业化大规模生产需求, 降低生物药研发与生产成本, 为全球患者提供更易获取的高质量治疗药物。

2. 表达载体的设计

目的基因在细胞中的表达会受到目的基因拷贝数、转录水平、翻译及翻译后修饰的调控水平, 以及目的基因整合至染色体的区域状态与具体位点等诸多因素制约[3]。载体作为外源基因导入哺乳动物细胞的重要工具, 其结构和组成直接影响目的基因的表达效率和稳定性。通过启动子、增强子和其他顺式作用元件(见图 2), 可以增强目标基因的表达, 并提高基因转录的效率以及对蛋白质分泌至关重要的信号序列, 从而显著提高目的蛋白的表达量和质量[6]。

2.1. 载体优化

2.1.1. 启动子和增强子

调控启动子与增强子的改造与替换, 是载体优化构建的核心[3]。在基因表达调控的复杂过程, 启动

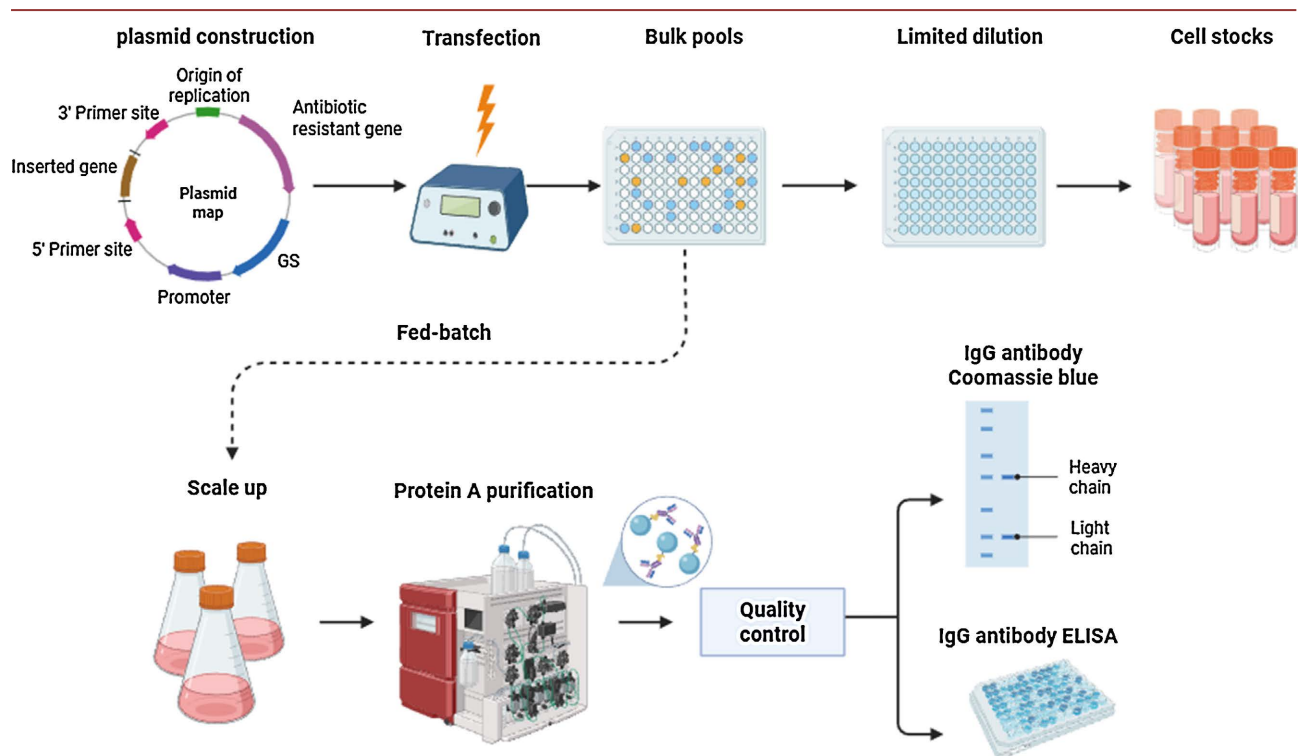


Figure 1. The process of CHO cell line development
图 1. CHO 细胞系开发的流程

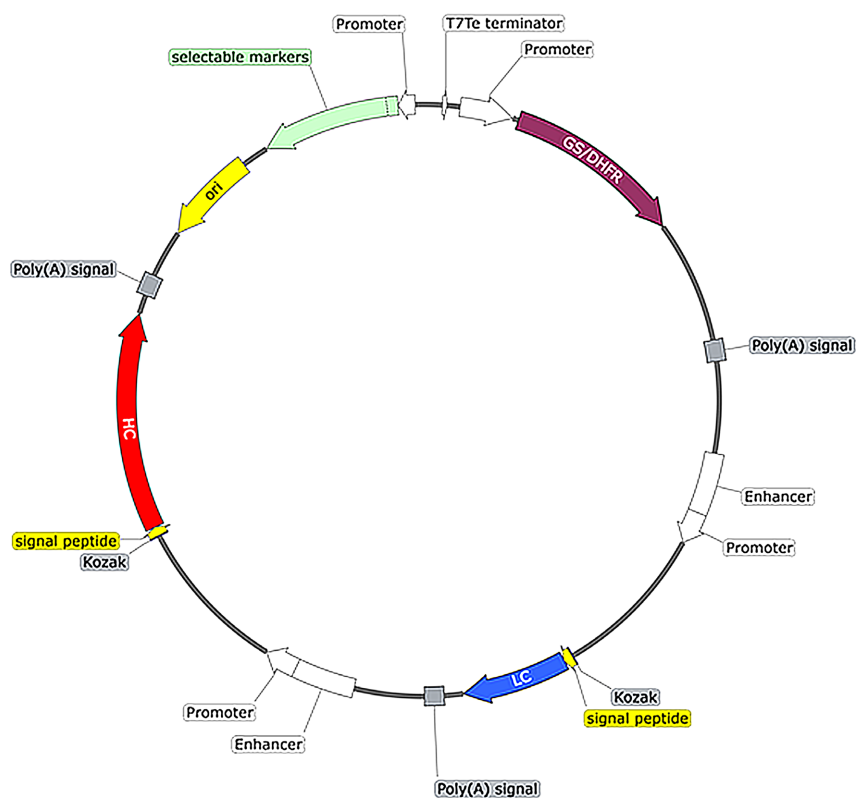


Figure 2. Plasmid expression vector map
图 2. 质粒表达载体图谱

子与增强子作为核心顺式作用元件,二者通过紧密的协同作用直接调控基因转录合成 RNA,然后进一步翻译形成功能蛋白质的过程。对于转基因表达研究与应用而言,选用与宿主细胞、目的基因特性相适配的启动子,是实现目的基因高效且长期稳定表达的重要前提条件。目前载体构建过程中应用的启动子种类多样,主要包含真核与病毒来源启动子两大类[7][8]。其中,真核来源启动子的典型代表有磷酸甘油酸激酶 1 (PGK)、人类延伸因子-1 α (EF-1 α)、人类泛素 C(UBC)等;病毒来源启动子则包括巨细胞病毒启动子(CMV)、猿猴病毒 40 启动子(SV40)等。在各类启动子中,CMV 启动子凭借其优异的转基因表达促进效能,是被广泛应用于商业化重组蛋白表达载体的元件[9]。Zhao 等[10]通过巨细胞病毒(CMV)或猿猴病毒(SV40)启动子驱动含有增强型绿色荧光蛋白(eGFP)载体,发现 CMV 启动子驱动基因表达水平显著高于 SV40 启动子。病毒启动子虽常被用于重组蛋白的表达体系中,却易受 DNA 甲基化介导的表观遗传沉默作用影响,进而造成重组蛋白的表达水平下降。Marx 等[11]使用 CRISPR/dCas9 对 CMV 启动子甲基化后发现,组蛋白标记普遍丢失,并且获得了明显的抑制性异染色质标记,导致 CHO 细胞中转基因表达降低。中国仓鼠延伸因子-1 (CHEF-1 α)启动子凭借与 CHO 细胞转录调控系统的天然适配性,展现出优于 CMV 病毒启动子及人源 EF-1 α 启动子的转录活性,能更高效且稳定地驱动目的基因表达。Ebadat 等[12]通过构建四种双顺反子载体,对 CMV 和 CHEF-1 α 两种启动子表达效率进行评估。结果表明,在 Furin/2A 肽介导的载体中,CHEF-1 α 启动子驱动的单克隆抗体表达量比 CMV 启动子高出 2.5 倍。

2.1.2. 密码子和信号肽

密码子具有简并性,即同一种氨基酸可由多种密码子编码。不同宿主细胞的密码子使用频率存在天然差异,这种差异会导致目的基因在宿主细胞中表达适配性不足[13]。为消除目的基因与宿主细胞之间的密码子偏好差异,进而提升目的基因的蛋白表达水平,密码子优化对于基因表达调控而言至关重要。研究表明,经密码子优化的 mRNA 的蛋白质表达量增加,是由于转录增强或 RNA 稳定性提高导致 mRNA 水平升高[14][15]。密码子优化的核心前提是精准获取宿主细胞的密码子偏好信息,最新 AI 算法研究涉及对密码子的全面评估。Fallahpour 等[16]开发的 Codon Transformer 深度学习模型能生成具有类自然密码子分布特征且含最少负面顺式调控元件的宿主特异性 DNA 序列。

信号肽(Signal Peptide, SP)是抗体分泌表达的关键元件,抗体需从核糖体合成后转运至内质网进行折叠、糖基化修饰,再经高尔基体加工后分泌至细胞外。选择合适的信号肽能够直接影响抗体的表达水平、折叠正确性及分泌效率。Ramezani 等[17]采用人白蛋白信号肽与天然 IgG 的 LC 信号肽相比,在 CHO-K1 细胞中帕妥珠单抗的表达量提高了两倍。Srila 等[18]利用开发的计算机程序对 SP 进行优化,能够简单高效确定信号肽并用于 CHO 细胞系的开发。

2.2. 基因整合技术

基因整合是 CHO 细胞稳定表达抗体等重组蛋白的核心步骤,直接决定细胞克隆的表达水平、稳定性及异质性。长期以来,CHO 细胞表达依赖随机整合的方式进行目的基因的基因插入[3]。由于随机插入宿主基因组的非特异性位点,导致拷贝数均不可控,克隆异质性差异大,生产力会随着时间的推移而减少。为了解决这些问题,以重组酶及 Cas9 核酸酶介导的位点特异性整合技术的新兴靶向基因整合技术(Targeted Transgene Integration, TTI),突破了传统随机整合策略的技术瓶颈,为细胞系开发领域的跨越式发展铺平了道路[19]。目前使用的基因整合技术如表 1 所示。

2.2.1. 重组酶系统

CHO 细胞中常用的系统重组酶系统包括:酪氨酸重组酶系统(Cre/LoxP、Flp/FRT)和丝氨酸重组酶(Bxb1、 ϕ C31)。重组酶通过识别并结合目的基因与 CHO 细胞基因组上的高转录率、稳定性的特定位置

Table 1. Random integration and targeted integration technologies**表 1.** 随机整合与靶向整合技术

| 整合类型 | 核心机制 | 主要优势 | 主要劣势 |
|-----------|---|---|---------------------------------------|
| 随机整合 | 外源基因无特异性靶向位点, 随机插入 CHO 细胞基因组任意区域。 | 操作简单、成本低廉, 无需复杂载体构建与基因编辑工具。 | 高产克隆筛选周期长、整合位点随机。 |
| 重组酶介导靶向整合 | 重组酶特异性识别基因组与载体上的同源靶点(loxP、FRT、attP/attB), 介导定点整合或重组酶介导盒式交换, 将外源基因精准插入预设的转录活跃安全位点。 | 脱靶风险低、整合效率高, 克隆稳定性优异, 适配大容量片段、多基因同步整合。 | 需提前构建含重组酶识别位点的 CHO 宿主细胞株, 宿主改造周期长。 |
| 核酸酶介导靶向整合 | 核酸酶切割基因组特定位点产生双链 DNA 断裂(DSB), 通过同源定向修复(HDR)或非同源末端连接(NHEJ), 实现外源基因定点插入。 | 靶向位点灵活, 无需提前改造宿主, 操作自由度高, 可同步实现基因敲除与定点整合。 | 存在脱靶突变风险, HDR 修复效率低, 需优化筛选策略提升阳性克隆得率。 |

(如 attP/attB、loxP、FRT), 从而提升整合精准性与表达稳定性[20][21]。Zhang 等[22]通过 Cre/lox 重组酶介导的盒式交换(RMCE)实现靶向整合, 构建的帕博利珠单抗稳定表达株能在无药物压力条件下至少能稳定维持 75 代。Crawford 等[23]利用 ϕ C31 整合酶与 Cre-Lox 技术相结合, 在使用化学成分确定的培养基的非优化补料分批摇瓶生产培养中, 所建立的两个 RMCE 宿主能够生产高达约 1.7 g/L 和 2 g/L 的抗体。Ghanbari 等[24]采用 CRISPR 介导的精准整合到目标染色体 CRIS-PITCh 系统, 结合 Bxb1 重组酶介导的 RMCE 系统, 将带有短至 30 bp 同源臂的 2.6 kb Bxb1 着陆垫靶向整合到 S100A 基因簇的上游区域, 靶向效率达到 10.4%。

2.2.2. 核酸酶

CRISPR/Cas9 RNA 引导核酸酶、锌指核酸酶(ZFNs)及转录激活因子样效应核酸酶(TALENs), 可通过诱导特异性双链 DNA 断裂(DSB), 借助同源定向修复(HDR)、非同源末端连接(NHEJ)等 DNA 修复机制, 将编码重组蛋白基因能够插入到转录活跃的基因组位点中[25]。Zhao 等[26]通过 CRISPR/Cas9 技术, 分别将编码 mCherry 蛋白和抗 PD1 单克隆抗体的基因整合进 C12orf35、HPRT 和 GRIK1 基因座中, 与随机整合对照组相比, 所有靶向整合细胞系均表现出更高的生产力。Min 等[27]基于 CRISPR/Cas9 的重组酶介导的 RMCE 着陆平台, 将 EGFP 表达盒整合进 C12orf35 基因座中, 靶向整合体的比单克隆抗体生产力提高了 2.8 倍。Cao 等[28]利用 CRISPR/Cas9 技术构建重组 CHO 细胞系, 促红细胞生成素(EPO)在胞苷单磷酸 N-乙酰神经氨酸羟化酶(CMAH)位点的整合使表达水平更稳定, 异质性更低。

3. 糖基化修饰

糖基化是 CHO 细胞翻译后修饰的核心, 抗体糖基化修饰多数为 Fc 段 N-糖基化修饰, Fc 聚糖分子主要由岩藻糖、甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺、半乳糖、唾液酸等组成[29]。Fc 段的 N-糖基化修饰能够影响抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用(ADCC)、补体依赖的细胞毒性作用(CDC)、抗体依赖的细胞吞噬作用(ADCP)及体内半衰期。CHO 细胞表达的抗体糖基化存在异质性, 对抗体的质量和稳定性带来了较大的挑战[30]。因此, 对抗体糖型的精准调控, 成为优化抗体质量的关键方向。

3.1. 核心岩藻糖

核心岩藻糖能够阻碍 FC 区与 Fc γ 受体(Fc γ R)结合, 从而降低 ADCC 效应。 α -1,6-岩藻糖基转移酶(FUT8)是催化抗体 Fc 段核心岩藻糖修饰的关键限速酶, 敲除 CHO 细胞中的 FUT8 基因, 可抑制核心岩藻糖合成, 从而增强 ADCC 活性[31]。Wong 等[32]利用 ZFNs 技术在 CHO 细胞系中构建了 FUT8 敲除

(FUT8KO)细胞系,通过瞬时转染生产去岩藻糖基化抗体,显著提高了 ADCC 活性,且不影响抗体的表达产量与结构稳定性。Moore 等[33]通过敲除 FUT8 基因生产的莫格利珠单抗,去除岩藻糖后其显著提高了 NK 细胞表面的 Fc γ RIIIA 的结合能力和 ADCC 活性,在治疗各种 T 细胞淋巴瘤中显示出较好的活性。

3.2. 末端唾液酸

唾液酸是构成抗体糖基化糖链末端的核心,其修饰类型主要包含两种类型,分别为 N-乙酰基神经氨酸(NANA)和 N-羟乙基神经氨酸(NGNA) [29]。在人免疫球蛋白中,仅存在 NANA 型唾液酸修饰,CHO 细胞所表达的重组抗体中除了 NANA 型唾液酸修饰之外,还存在 NGNA 型唾液酸修饰。抗体的唾液酸化水平,不仅可能会导致人体免疫原性反应,而且会对抗体在体内的代谢产生显著影响。相较于人体细胞,CHO 细胞能够表达 α -2,3-唾液酸转移酶(ST3GAL),但缺乏 α -2,6-唾液酸转移酶(ST6GAL) [34]。因此,野生型 CHO 细胞不能产生与人类细胞相似的末端唾液酸丰度。Onitsuka 等[35]成为克隆了 CHO 细胞来源的 ST6GAL 的 cDNA,并将 ST6GAL 表达载体转染到 CHO 细胞中,通过高效液相色谱和唾液酸酶消化评估抗体的 N-糖基化模式。结果发现,在转染的细胞系中,约 70% 的总 N-连接寡糖为 α -2,6-唾液酸化,而在未转染的细胞系中未观察到唾液酸化。

4. 筛选和放大

4.1. 筛选系统

将目的基因通过转染技术导入宿主细胞后,并通过特定的筛选压力进行连续传代,最终形成高产且稳定的克隆。目前哺乳动物表达体系常用筛选标记分为两类,一类是扩增型基因筛选标记,另一类是非扩增型基因筛选标记。非扩增型基因筛选标记(如抗生素)无法诱导目的基因扩增,目的基因拷贝数通常较低,在长期传代培养后,目的基因易发生丢失或沉默,导致目的蛋白表达量下降,无法保障长期稳定表达。因此,目前工业生产中通常使用二氢叶酸还原酶(DHFR)系统和谷氨酰胺合成酶(GS)系统生产重组蛋白 [36] [37]。

4.1.1. DHFR/MTX 系统

二氢叶酸还原酶(Dihydrofolate Reductase, DHFR)通过将二氢叶酸还原为四氢叶酸是细胞合成 DNA、RNA 所必需的酶。利用 DHFR 抑制剂甲氨蝶呤(Methotrexate, MTX)筛选得到的高产克隆与低产克隆相比,高产克隆不仅具有更高的重链和轻链转基因拷贝数及 mRNA 水平,而且重链与轻链转基因拷贝数的比例更优,重组抗体表达量提高了 10~20 倍[38]。但值得注意的是,经 MTX 加压筛选获得的高产克隆往往存在稳定性缺陷。MTX 诱导的基因扩增易引发染色体重排,进而触发重复序列诱导的基因沉默,最终导致不同克隆在细胞生长特性、重组蛋白生产力及遗传稳定性等方面出现显著异质性[39]。

4.1.2. GS/MSX 系统

谷氨酰胺合成酶(Glutathione Synthetase, GS)可催化谷氨酸与氨合成谷氨酰胺,是 CHO 细胞合成谷氨酰胺的唯一途径。蛋氨酸亚氨基代砒(Methionine Sulfoximine, MSX)能够有效抑制 CHO 细胞内源性 GS 的活性,只有整合了目的基因与 GS 基因的细胞可在无谷氨酰胺培养基中存[40]。Fan 等[41]利用 ZFNs 技术敲除 GS 基因构建的 CHO-K1SV 细胞系,抗体表达水平较野生型提升 2~3 倍,且高产单克隆细胞株的筛选周期缩短至传统方法的 1/6,显著提高了重组抗体药物的开发效率。GS 系统的高生产力依赖于 MSX 的筛选压力维持,通常当从系统中移除 MSX 时,部分细胞会出现目的基因拷贝数减少的情况,进而导致生产力下降。Noh 等[42]使用不同浓度 MSX 进行筛选,发现在 50 μ M MSX 浓度下筛选出的克隆平均比生长速率最低,且毒性代谢废物(乳酸和氨)的平均比生成速率最高,而使用 GS 敲除 CHO 细胞系能够有效

规避 MSX 诱导的细胞生长抑制与代谢废物过量累积问题。

4.2. 高通量筛选

将目的基因转染到 CHO 细胞所形成的克隆池(Pool), 通过 GS/MSX 和 DHFR/MTX 筛选系统, 淘汰未整合外源基因的细胞, 获得阳性细胞池(Bulk Pool)。Bulk Pool 中细胞的基因整合位点、表达量、生长速率存在具有很大的异质性, 需分离单个细胞培养获得遗传和表型一致的单克隆细胞株。有限稀释法(Limiting Dilution Cloning, LDC)因成本低廉、操作简便, 是传统单克隆筛选的常用手段[43]。该方法的原理在于对细胞悬液进行梯度稀释, 使接种至 96 孔板的每个孔内小于 1 个细胞。随着对筛选效率和细胞系申报要求的提升, 流式细胞仪分选法(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS)逐渐成为主流的克隆筛选技术。Lindgren 等[44]使用 Cello 机器人系统(采用自动显微镜、液体处理器和平板培养箱)自动化监测细胞生长和滴度, 相比传统方法, Cello 系统完成的项目数量和选择 IgG 最大滴度更高的细胞系增加了 3 倍。Fieder 等[45]通过荧光标记的二抗与分泌抗体的 CHO 细胞混合孵育, 经流式细胞仪的检测系统识别, 克隆率 > 99.99%。

5. 工艺优化

5.1. 培养基和补料优化

培养基与补料策略的优化是提升重组蛋白、抗体等生物制品表达量的核心技术手段之一, 直接影响工程细胞的生长代谢效率与目标产物的合成积累[46] [47]。为适应 CHO、HEK293 和 NS0 细胞等工程细胞的高密度悬浮培养及重组蛋白的高水平表达, 培养基已经采用化学成分确定的培养基(Chemically Defined Medium, CDM)不含成分未知的动物源性或植物源性杂质, 避免了天然培养基因批次差异导致实验偏差或生产波动, 最终影响重组蛋白的质量[48] [49]。CDM 配方包含 100 多种满足细胞生长需求的营养物质, 包括水、氨基酸、维生素、无机盐、微量元素、脂质、碳源和氮源[50]。CDM 的优化是提高表达量的一个关键因素, Burky 等[51]选择三种基础培养基(BM-3, BM-4、BM-5)和三种补料(FM-2、FM-3、FM-4)培养 NS0 细胞表达抗体, 结果表明使用 FBP-1 (BM-3 和 FM-2)与其他培养基和补料相比, 抗体表达量提高了 3 倍。然而, 不同细胞对营养需求差异较大, 选择 CDM 配方会非常复杂且耗时, 实验设计(DOE)将有助于减少优化时间并提高培养基筛选流程效率。Xiao 等[52]使用 DOE 方法, 同时对培养基和补料进行优化, 用高通量微型生物反应器系统(SimCell™)在单次流加培养使蛋白质表达提高了 3~6 倍。

5.2. 环境参数

温度是影响细胞生长状态与代谢活动的关键环境因素之一, 选择最适宜的温度直接关系到培养效率与目的蛋白的生产质量。实施分阶段的温度调控策略, 从而满足 CHO 细胞表达过程不同生长阶段的需求, 能够显著提升生产效率[53]。37℃是哺乳动物细胞的生长最适温度, 此时细胞内的生长相关酶活性最优, 能够加速细胞分裂进程, 促进细胞数量快速增殖。当 CHO 细胞处于表达阶段时, 通过下调温度可以在不影响抗体质量的情况下提高重组蛋白的产量[54]。Mason 等[55]人通过圆二色性法对抗体的二级和三级结构进行分析, 发现培养温度的降低会导致抗体的基本结构产生差异。在较低温度下, 蛋白质折叠和组装得到改善, 从而降低了错误折叠蛋白质的表达。Mellahi 等[56]在 2L 生物反应器中, 利用高细胞密度(1×10^7 /mL)CHO 细胞表达利妥昔单抗。通过将培养温度从 37℃下调至 30℃, 获得了 1.8 g/L 的最大产量。

pH 对细胞生长代谢、产物表达及产物质量具有显著的调控作用。对于哺乳动物细胞而言, 适宜的 pH 环境通常为 7.2~7.4。在 CHO 细胞表达过程中, pH 易偏酸性, 这主要是因为细胞在生长增殖过程中会持续消耗葡萄糖等碳源物质, 同时代谢产生乳酸、CO₂ 等酸性副产物, 这些物质在培养基中积累会导致 pH

值逐步下降[57]。为维持发酵过程中 pH 的稳定, 通常采用补加碱性物质(如碳酸钠)的方法, 然而碱液的加入会引起 pH 的波动, 从而影响细胞的生长和产物质量[58]。Jiang 等[59]通过在大规模生物反应器中批量添加碱, 发现渗透压、二氧化碳分压($p\text{CO}_2$)和乳酸生成量增加, 且 pH 波动导致抗体糖基化水平显著升高。Reddy 等[60]将 CHO 细胞分别置于不同 pH 条件下的生物反应器中培养, 利用糖肽图谱对 N-糖基化分析表明, pH 会影响 IgG1 Fab 区的岩藻糖基化和唾液酸化, 以及 Fc 区的半乳糖基化, 而 Fc 区的岩藻糖基化未受影响, 这表明 pH 对位点特异性 N-糖基化的影响是复杂的。

5.3. 灌流培养与代谢分析

灌流培养是近年来抗体等重组蛋白规模化生产的核心培养工艺, 区别于传统补料分批培养, 其通过持续向生物反应器内补给新鲜培养基、同步移除代谢废物与上清液, 实现 CHO 细胞高密度、长周期、连续化培养, 彻底突破传统批次培养的产量与效率瓶颈, 成为高产抗体、难表达抗体规模化生产的首选工艺[61]。通过交替式切向流系统和动态灌流速率调控的灌流培养方法, 可有效缓解滤膜堵塞、实现细胞截留, 同时降低剪切力并且保护细胞活性。Gomez 等[62]为解决双特异性抗体在补料分批培养过程中不断聚集的问题, 采用灌流培养极大降低了抗体聚集, 活细胞密度提高到原来的 3 倍, 并且抗体表达量增加了 4 倍。目前, 灌流培养已实现从实验室研发到 2000 L 以上工业化 GMP 生产的转化, 在单抗和双抗等生物药生产中广泛应用, 逐渐成为 CHO 细胞表达的主流工艺。

CHO 细胞等工程细胞类似肿瘤细胞具有瓦博格效应(Warburg Effect), 在有氧条件下, 细胞增殖过程中仍优先通过糖酵解将葡萄糖转化为乳酸, 导致代谢废物积累、pH 波动与营养浪费, 代谢分析可精准定位代谢瓶颈, 指导工艺优化[63]。通过 ^{13}C 标记葡萄糖追踪发现, 高产克隆中大部分碳流入磷酸戊糖途径(PPP), 生成充足 NADPH 为蛋白折叠、糖基化提供还原力, 同时降低糖酵解通量与乳酸生成; 而低产克隆碳则过度集中于糖酵解, 三羧酸循环(TCA)循环效率低下, 能量与前体物质供给不足[64]。基于代谢分析数据的工艺优化, 主要通过靶向调控碳氮代谢, 优化补料策略分流糖酵解通量, 强化 TCA 循环, 减少乳酸、氨等毒性代谢物积累。结合动态代谢监控, 实时调整灌流速率、温度、pH 等参数, 维持代谢稳态。灌流培养与代谢分析的结合能极大提升 CHO 细胞表达工艺的稳定性与可放大性。

6. 总结与展望

本文较为系统地梳理了 CHO 细胞表达重组抗体在载体设计、基因整合、糖基化修饰、筛选放大及工艺优化五个方向上的研究进展。载体设计上, 通过启动子与增强子改造、密码子优化及信号肽筛选, 显著提升了目的基因转录与翻译效率; 重组酶系统与核酸酶实现了目的基因从随机整合到靶向整合, 增强了克隆稳定性; 糖基化修饰工程聚焦抗体 Fc 段功能优化, 通过核心岩藻糖敲除、唾液酸化修饰调控, 解决了糖型异质性带来的质量管控难题; 以 DHFR/MTX 和 GS/MSX 为核心的筛选系统, 运用高通量技术大幅提升了高产细胞株筛选效率; 培养基优化与温度、pH 等环境参数调控, 有效改善了细胞生长代谢状态, 提高了抗体产量与质量。上述进展有效缓解了 CHO 细胞表达平台中存在的产量与质量不一致的问题, 为重组抗体工业化大规模生产提供了关键技术支撑, 也为后续研究奠定了坚实基础。随着科学技术的不断进步, 重组抗体药物有望通过 CHO 细胞表达系统实现更高效、更经济的临床转化, 从而满足全球患者的治疗需求。

参考文献

- [1] Coulet, M., Kepp, O., Kroemer, G. and Basmaciogullari, S. (2022) Metabolic Profiling of CHO Cells during the Production of Biotherapeutics. *Cells*, **11**, Article No. 1929. <https://doi.org/10.3390/cells11121929>
- [2] Majumdar, S., Desai, R., Hans, A., Dandekar, P. and Jain, R. (2025) From Efficiency to Yield: Exploring Recent Advances

- in CHO Cell Line Development for Monoclonal Antibodies. *Molecular Biotechnology*, **67**, 369-392. <https://doi.org/10.1007/s12033-024-01060-6>
- [3] Zeh, N., Schmidt, M., Schulz, P. and Fischer, S. (2024) The New Frontier in CHO Cell Line Development: From Random to Targeted Transgene Integration Technologies. *Biotechnology Advances*, **75**, Article ID: 108402. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108402>
- [4] Xu, W., Lin, Y., Mi, C., Pang, J. and Wang, T. (2023) Progress in Fed-Batch Culture for Recombinant Protein Production in CHO Cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **107**, 1063-1075. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12342-x>
- [5] Tihanyi, B. and Nyitray, L. (2020) Recent Advances in CHO Cell Line Development for Recombinant Protein Production. *Drug Discovery Today: Technologies*, **38**, 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2021.02.003>
- [6] Poulain, A., Mullick, A., Massie, B. and Durocher, Y. (2019) Reducing Recombinant Protein Expression during CHO Pool Selection Enhances Frequency of High-Producing Cells. *Journal of Biotechnology*, **296**, 32-41. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.03.009>
- [7] Wang, T. and Guo, X. (2020) Expression Vector Cassette Engineering for Recombinant Therapeutic Production in Mammalian Cell Systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **104**, 5673-5688. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10640-w>
- [8] Brown, A.J., Sweeney, B., Mainwaring, D.O. and James, D.C. (2015) NF- κ B, CRE and YY1 Elements Are Key Functional Regulators of CMV Promoter-driven Transient Gene Expression in CHO Cells. *Biotechnology Journal*, **10**, 1019-1028. <https://doi.org/10.1002/biot.201400744>
- [9] Wang, D., Dai, W., Wu, J. and Wang, J. (2018) Improving Transcriptional Activity of Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Promoter by Mutating NF- κ B Binding Sites. *Protein Expression and Purification*, **142**, 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.09.008>
- [10] Zhao, C.P., Guo, X., Chen, S., Li, C., Yang, Y., Zhang, J., *et al.* (2017) Matrix Attachment Region Combinations Increase Transgene Expression in Transfected Chinese Hamster Ovary Cells. *Scientific Reports*, **7**, Article No. 42805. <https://doi.org/10.1038/srep42805>
- [11] Marx, N., Dhiman, H., Schmieder, V., Freire, C.M., Nguyen, L.N., Klanert, G., *et al.* (2021) Enhanced Targeted DNA Methylation of the CMV and Endogenous Promoters with dCas9-DNMT3A3L Entails Distinct Subsequent Histone Modification Changes in CHO Cells. *Metabolic Engineering*, **66**, 268-282. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.04.014>
- [12] Ebadat, S., Ahmadi, S., Ahmadi, M., Nematpour, F., Barkhordari, F., Mahdian, R., *et al.* (2017) Evaluating the Efficiency of CHEF and CMV Promoter with IRES and Furin/2A Linker Sequences for Monoclonal Antibody Expression in CHO Cells. *PLoS ONE*, **12**, e0185967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185967>
- [13] Mauro, V.P. and Chappell, S.A. (2018) Considerations in the Use of Codon Optimization for Recombinant Protein Expression. In: Hacker, D.L., Ed., *Recombinant Protein Expression in Mammalian Cells*, Springer, 275-288. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8730-6_18
- [14] Newman, Z.R., Young, J.M., Ingolia, N.T. and Barton, G.M. (2016) Differences in Codon Bias and GC Content Contribute to the Balanced Expression of TLR7 and TLR9. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113**, E1362-E1371. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518976113>
- [15] Zhou, M., Wang, T., Fu, J., Xiao, G. and Liu, Y. (2015) Nonoptimal Codon Usage Influences Protein Structure in Intrinsically Disordered Regions. *Molecular Microbiology*, **97**, 974-987. <https://doi.org/10.1111/mmi.13079>
- [16] Fallahpour, A., Gureghian, V., Filion, G.J., Lindner, A.B. and Pandi, A. (2025) Codontransformer: A Multispecies Codon Optimizer Using Context-Aware Neural Networks. *Nature Communications*, **16**, Article No. 3205. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-58588-7>
- [17] Ramezani, A., Mahmoudi Maymand, E., Yazdanpanah-Samani, M., Hosseini, A., Toghraie, F.S. and Ghaderi, A. (2017) Improving Pertuzumab Production by Gene Optimization and Proper Signal Peptide Selection. *Protein Expression and Purification*, **135**, 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.04.013>
- [18] Srila, W., Oli, D. and Yamabhai, M. (2024) Codon and Signal Peptide Optimization to Enhance Therapeutic Antibody Production from CHO Cells. In: Meleady, P., Ed., *Heterologous Protein Production in CHO Cells*, Springer US, 33-48. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-4104-0_4
- [19] Dangi, A.K., Sinha, R., Dwivedi, S., Gupta, S.K. and Shukla, P. (2018) Cell Line Techniques and Gene Editing Tools for Antibody Production: A Review. *Frontiers in Pharmacology*, **9**, Article No. 630. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00630>
- [20] Hosur, V., Low, B.E. and Wiles, M.V. (2022) Programmable RNA-Guided Large DNA Transgenesis by CRISPR/Cas9 and Site-Specific Integrase Bxb1. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **10**, Article ID: 910151. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.910151>
- [21] Pandey, S., Gao, X.D., Krasnow, N.A., McElroy, A., Tao, Y.A., Duby, J.E., *et al.* (2025) Efficient Site-Specific Integration of Large Genes in Mammalian Cells via Continuously Evolved Recombinases and Prime Editing. *Nature Biomedical*

- Engineering*, **9**, 22-39. <https://doi.org/10.1038/s41551-024-01227-1>
- [22] Zhang, C., Chang, F., Miao, H., Fu, Y., Tong, X., Feng, Y., *et al.* (2023) Construction and Application of a Multifunctional CHO Cell Platform Utilizing Cre/Lox and Dre/Rox Site-Specific Recombination Systems. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **11**, Article ID: 1320841. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1320841>
- [23] Crawford, Y., Zhou, M., Hu, Z., Joly, J., Snedecor, B., Shen, A., *et al.* (2013) Fast Identification of Reliable Hosts for Targeted Cell Line Development from a Limited-Genome Screening Using Combined ϕ C31 integrase and CRE-Lox Technologies. *Biotechnology Progress*, **29**, 1307-1315. <https://doi.org/10.1002/btpr.1783>
- [24] Ghanbari, S., Bayat, E., Azizi, M., Fard-Esfahani, P., Modarressi, M.H. and Davami, F. (2022) Targeted Integration in CHO Cells Using CRIS-PITCh/Bxb1 Recombinase-Mediated Cassette Exchange Hybrid System. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **107**, 769-783. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12322-1>
- [25] Gupta, S.K. and Shukla, P. (2017) Gene Editing for Cell Engineering: Trends and Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, **37**, 672-684. <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1214557>
- [26] Zhao, M., Wang, J., Luo, M., Luo, H., Zhao, M., Han, L., *et al.* (2018) Rapid Development of Stable Transgene CHO Cell Lines by CRISPR/Cas9-Mediated Site-Specific Integration into C12orf35. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **102**, 6105-6117. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9021-6>
- [27] Min, H., Kim, S.M., Kim, D., Lee, S., Lee, S. and Lee, J.S. (2022) Hybrid Cell Line Development System Utilizing Site-Specific Integration and Methotrexate-Mediated Gene Amplification in Chinese Hamster Ovary Cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **10**, Article ID: 977193. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.977193>
- [28] Cao, X., Yuan, J., Bai, Z., Zhang, M., Yun, Y., Wang, X., *et al.* (2025) Effect of CHO Cell Line Constructed with CMAH Gene-Directed Integration on the Recombinant Protein Expression. *International Journal of Biological Macromolecules*, **292**, Article ID: 139274. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.139274>
- [29] Tejwani, V., Andersen, M.R., Nam, J.H. and Sharfstein, S.T. (2018) Glycoengineering in CHO Cells: Advances in Systems Biology. *Biotechnology Journal*, **13**, e1700234. <https://doi.org/10.1002/biot.201700234>
- [30] Heffner, K.M., Wang, Q., Hizal, D.B., Can, Ö. and Betenbaugh, M.J. (2021) Glycoengineering of Mammalian Expression Systems on a Cellular Level. In: Rapp, E. and Reichl, U., Eds., *Advances in Glycobiotechnology*, Springer International Publishing, 37-69. https://doi.org/10.1007/10_2017_57
- [31] Shivatare, S.S., Shivatare, V.S. and Wong, C. (2022) Glycoconjugates: Synthesis, Functional Studies, and Therapeutic Developments. *Chemical Reviews*, **122**, 15603-15671. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c01032>
- [32] Wong, A.W., Baginski, T.K. and Reilly, D.E. (2010) Enhancement of DNA Uptake in FUT8-Deleted CHO Cells for Transient Production of Afucosylated Antibodies. *Biotechnology and Bioengineering*, **106**, 751-763. <https://doi.org/10.1002/bit.22749>
- [33] Moore, D.C., Elmes, J.B., Shibu, P.A., Larck, C. and Park, S.I. (2020) Mogamulizumab: An Anti-CC Chemokine Receptor 4 Antibody for T-Cell Lymphomas. *Annals of Pharmacotherapy*, **54**, 371-379. <https://doi.org/10.1177/1060028019884863>
- [34] Lin, N., Mascarenhas, J., Sealover, N.R., George, H.J., Brooks, J., Kayser, K.J., *et al.* (2015) Chinese Hamster Ovary (CHO) Host Cell Engineering to Increase Sialylation of Recombinant Therapeutic Proteins by Modulating Sialyltransferase Expression. *Biotechnology Progress*, **31**, 334-346. <https://doi.org/10.1002/btpr.2038>
- [35] Onitsuka, M., Kim, W., Ozaki, H., Kawaguchi, A., Honda, K., Kajjura, H., *et al.* (2012) Enhancement of Sialylation on Humanized IgG-Like Bispecific Antibody by Overexpression of α 2,6-Sialyltransferase Derived from Chinese Hamster Ovary Cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **94**, 69-80. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3814-1>
- [36] Heinzlmann, D., Michelarakis, N., Reuss, F., Lindner, B., Karow-Zwick, A.R., Bauer, J., *et al.* (2025) Bacterial Glutamine Synthetases as a Novel Metabolic Selection Marker to Improve CHO Cell Culture Performance through Selection Stringency Modulation. *Biotechnology Journal*, **20**, e70119. <https://doi.org/10.1002/biot.70119>
- [37] Srila, W., Baumann, M., Riedl, M., Rangnoi, K., Borth, N. and Yamabhai, M. (2023) Glutamine Synthetase (GS) Knockout (KO) Using CRISPR/Cpf1 Diversely Enhances Selection Efficiency of CHO Cells Expressing Therapeutic Antibodies. *Scientific Reports*, **13**, Article No. 10473. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37288-6>
- [38] Chusainow, J., Yang, Y.S., Yeo, J.H.M., Toh, P.C., Asvadi, P., Wong, N.S.C., *et al.* (2009) A Study of Monoclonal Antibody-Producing CHO Cell Lines: What Makes a Stable High Producer? *Biotechnology and Bioengineering*, **102**, 1182-1196. <https://doi.org/10.1002/bit.22158>
- [39] Lee, J.H., Park, J.H., Park, S.H., Kim, S., Kim, J.Y., Min, J., *et al.* (2018) Co-Amplification of EBNA-1 and PyLT through Dhfr-Mediated Gene Amplification for Improving Foreign Protein Production in Transient Gene Expression in CHO Cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **102**, 4729-4739. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8977-6>
- [40] Lin, P., Chan, K.F., Kiess, I.A., Tan, J., Shahreel, W., Wong, S., *et al.* (2019) Attenuated Glutamine Synthetase as a Selection Marker in CHO Cells to Efficiently Isolate Highly Productive Stable Cells for the Production of Antibodies and Other Biologics. *mAbs*, **11**, 965-976. <https://doi.org/10.1080/19420862.2019.1612690>

- [41] Fan, L., Kadura, I., Krebs, L.E., Hatfield, C.C., Shaw, M.M. and Frye, C.C. (2012) Improving the Efficiency of CHO Cell Line Generation Using Glutamine Synthetase Gene Knockout Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, **109**, 1007-1015. <https://doi.org/10.1002/bit.24365>
- [42] Noh, S.M., Shin, S. and Lee, G.M. (2018) Comprehensive Characterization of Glutamine Synthetase-Mediated Selection for the Establishment of Recombinant CHO Cells Producing Monoclonal Antibodies. *Scientific Reports*, **8**, Article No. 5361. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23720-9>
- [43] Tejwani, V., Chaudhari, M., Rai, T. and Sharfstein, S.T. (2021) High-Throughput and Automation Advances for Accelerating Single-Cell Cloning, Monoclonality and Early Phase Clone Screening Steps in Mammalian Cell Line Development for Biologics Production. *Biotechnology Progress*, **37**, e3208. <https://doi.org/10.1002/btpr.3208>
- [44] Lindgren, K., Salmén, A., Lundgren, M., Bylund, L., Ebler, Å., Fältdt, E., *et al.* (2009) Automation of Cell Line Development. *Cytotechnology*, **59**, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s10616-009-9187-y>
- [45] Fieder, J., Schulz, P., Gorr, I., Bradl, H. and Wenger, T. (2017) A Single-Step FACS Sorting Strategy in Conjunction with Fluorescent Vital Dye Imaging Efficiently Assures Clonality of Biopharmaceutical Production Cell Lines. *Biotechnology Journal*, **12**, Article ID: 1700002. <https://doi.org/10.1002/biot.201700002>
- [46] Zhang, Y. (2009) Approaches to Optimizing Animal Cell Culture Process: Substrate Metabolism Regulation and Protein Expression Improvement. In: Zhong, J.-J., *et al.*, Eds., *Biotechnology in China I*, Springer, 177-215. https://doi.org/10.1007/10_2008_19
- [47] Fan, Y., Jimenez Del Val, I., Müller, C., Wagtberg Sen, J., Rasmussen, S.K., Kontoravdi, C., *et al.* (2015) Amino Acid and Glucose Metabolism in Fed-Batch CHO Cell Culture Affects Antibody Production and Glycosylation. *Biotechnology and Bioengineering*, **112**, 521-535. <https://doi.org/10.1002/bit.25450>
- [48] Kuwae, S., Miyakawa, I. and Doi, T. (2018) Development of a Chemically Defined Platform Fed-Batch Culture Media for Monoclonal Antibody-Producing CHO Cell Lines with Optimized Choline Content. *Cytotechnology*, **70**, 939-948. <https://doi.org/10.1007/s10616-017-0185-1>
- [49] Pan, X., Streefland, M., Dalm, C., Wijffels, R.H. and Martens, D.E. (2017) Selection of Chemically Defined Media for CHO Cell Fed-Batch Culture Processes. *Cytotechnology*, **69**, 39-56. <https://doi.org/10.1007/s10616-016-0036-5>
- [50] Li, W., Fan, Z., Lin, Y. and Wang, T. (2021) Serum-Free Medium for Recombinant Protein Expression in Chinese Hamster Ovary Cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **9**, Article ID: 646363. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.646363>
- [51] Burky, J.E., Wesson, M.C., Young, A., Farnsworth, S., Dionne, B., Zhu, Y., *et al.* (2007) Protein-Free Fed-Batch Culture of Non-GS NS0 Cell Lines for Production of Recombinant Antibodies. *Biotechnology and Bioengineering*, **96**, 281-293. <https://doi.org/10.1002/bit.21060>
- [52] Xiao, Z., Sabourin, M., Piras, G. and Gorfien, S.F. (2014) Screening and Optimization of Chemically Defined Media and Feeds with Integrated and Statistical Approaches. In: Pörtner, R., Ed., *Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols*, Humana Press, 117-135. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-733-4_9
- [53] Zhu, Z., Chen, X., Li, W., Zhuang, Y., Zhao, Y. and Wang, G. (2023) Understanding the Effect of Temperature Downshift on CHO Cell Growth, Antibody Titer and Product Quality by Intracellular Metabolite Profiling and *in Vivo* Monitoring of Redox State. *Biotechnology Progress*, **39**, e3352. <https://doi.org/10.1002/btpr.3352>
- [54] Yang, W.C., Minkler, D.F., Kshirsagar, R., Ryll, T. and Huang, Y.-M. (2016) Concentrated Fed-Batch Cell Culture Increases Manufacturing Capacity without Additional Volumetric Capacity. *Journal of Biotechnology*, **217**, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.10.009>
- [55] Mason, M., Sweeney, B., Cain, K., Stephens, P. and Sharfstein, S. (2014) Reduced Culture Temperature Differentially Affects Expression and Biophysical Properties of Monoclonal Antibody Variants. *Antibodies*, **3**, 253-271. <https://doi.org/10.3390/antib3030253>
- [56] Mellahi, K., Brochu, D., Gilbert, M., Perrier, M., Ansoerge, S., Durocher, Y., *et al.* (2019) Assessment of Fed-Batch Cultivation Strategies for an Inducible CHO Cell Line. *Journal of Biotechnology*, **298**, 45-56. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.04.005>
- [57] Paul, K., Böttinger, K., Mitic, B.M., Scherfler, G., Posch, C., Behrens, D., *et al.* (2020) Development, Characterization, and Application of a 2-Compartment System to Investigate the Impact of pH Inhomogeneities in Large-Scale CHO-Based Processes. *Engineering in Life Sciences*, **20**, 368-378. <https://doi.org/10.1002/elsc.202000009>
- [58] Limberg, M.H., Joachim, M., Klein, B., Wiechert, W. and Oldiges, M. (2017) pH Fluctuations Imperil the Robustness of *C. glutamicum* to Short Term Oxygen Limitation. *Journal of Biotechnology*, **259**, 248-260. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.08.018>
- [59] Jiang, R., Chen, H. and Xu, S. (2018) pH Excursions Impact CHO Cell Culture Performance and Antibody N-Linked Glycosylation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **41**, 1731-1741. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-1996-y>
- [60] Reddy, J.V., Singh, S.K., Leibiger, T., Lee, K.H., Ierapetritou, M. and Papoutsakis, E.T. (2025) Flux Balance Analysis

- and Peptide Mapping Elucidate the Impact of Bioreactor pH on Chinese Hamster Ovary (CHO) Cell Metabolism and N-Linked Glycosylation in the Fab and Fc Regions of the Produced IgG. *Metabolic Engineering*, **87**, 37-48. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2024.11.005>
- [61] MacDonald, M.A., Nöbel, M., Roche Recinos, D., Martínez, V.S., Schulz, B.L., Howard, C.B., *et al.* (2022) Perfusion Culture of Chinese Hamster Ovary Cells for Bioprocessing Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, **42**, 1099-1115. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1998821>
- [62] Gomez, N., Barkhordarian, H., Lull, J., Huh, J., GhattyVenkataKrishna, P. and Zhang, X. (2019) Perfusion CHO Cell Culture Applied to Lower Aggregation and Increase Volumetric Productivity for a Bispecific Recombinant Protein. *Journal of Biotechnology*, **304**, 70-77. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.08.001>
- [63] Rish, A.J., Drennen, J.K. and Anderson, C.A. (2022) Metabolic Trends of Chinese Hamster Ovary Cells in Biopharmaceutical Production under Batch and Fed-Batch Conditions. *Biotechnology Progress*, **38**, e3220. <https://doi.org/10.1002/btpr.3220>
- [64] Nöbel, M., Barry, C., MacDonald, M.A., Baker, K., Shave, E., Mahler, S., *et al.* (2024) Harnessing Metabolic Plasticity in CHO Cells for Enhanced Perfusion Cultivation. *Biotechnology and Bioengineering*, **121**, 1370-1382. <https://doi.org/10.1002/bit.28613>