

## • 新药论坛 •

## 重组蛋白药物生产用哺乳动物细胞系构建中筛选标记的应用现状及审评思考

崔颖, 白玉, 程速远\*

(国家药品监督管理局药品审评中心, 北京 100022)

**摘要:** 对于重组蛋白药物开发, 短时间内构建筛选高表达稳定的单克隆细胞株是工业界最主要的挑战。筛选标记是质粒载体中的关键元件, 在生产细胞系的构建和筛选中发挥重要作用, 通过设计筛选标记提高筛选严谨性, 以获得稳定高产细胞株, 是一种改进细胞株开发工艺的有效手段。本文以中华仓鼠卵巢 (Chinese hamster ovary, CHO) 细胞为例, 介绍筛选标记在重组蛋白药物生产用哺乳动物细胞系构建中的应用, 设计筛选标记以提高筛选严谨性的方法, 以及细胞基质稳定性及筛选标记安全性的审评思考, 以期能为药物研发机构高效开发重组蛋白药物提供参考。

**关键词:** 重组蛋白药物; 中华仓鼠卵巢细胞; 筛选标记; 筛选严谨性; 细胞基质稳定性; 筛选标记安全性

中图分类号: R915 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)12-2989-05

**Considerations and application status of selection marker for generation of recombinant biologics producing mammalian cell lines**

CUI Ying, BAI Yu, CHENG Su-yuan\*

*(Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100022, China)*

**Abstract:** The major challenge in the development of recombinant biologics lies in generating and isolating rare high-producing stable single clone in a short period of time. The selection marker is an essential component of the plasmid vector, it plays an important part in the generation and screening of producing cell lines. Engineering the selection marker to enhance the stringency of selection for high producing cells is one of the most effective approaches to improve the cell line development process. Here, using Chinese hamster ovary (CHO) cells as an example, we introduce the application of selection marker for generation of recombinant biologics producing mammalian cell lines, methods of engineering the selection markers to enhance the selection stringency, and propose considerations on cell substrate stability and selection marker safety, in order to provide references for high-efficiency development of recombinant biologics.

**Key words:** recombinant biologics; CHO cell; selection marker; selection stringency; cell substrate stability; selection marker safety

近年来, 治疗性重组蛋白药物快速发展, 大多数由哺乳动物细胞表达生产, 其中中华仓鼠卵巢 (Chinese hamster ovary, CHO) 细胞因其广泛被证实的安全性、易于获得高产率细胞株以及和人类蛋白相似的糖基化

修饰等优点, 已经成为工业化生产治疗性重组蛋白药物最主要的细胞系。

生产细胞系的构建通常将目的基因克隆到带有筛选标记的载体上, 转染宿主细胞后筛选得到目的基因整合到宿主基因组上的克隆, 以满足高产率、质量符合预期且保持长期稳定生产等要求。由于外源基因整合位点的随机性, 以及多个整合位点表达活性的差异等, 需要

收稿日期: 2020-03-31; 修回日期: 2020-06-02.

\*通讯作者 Tel: 86-10-68583020, E-mail: chengsy@cde.org.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0454

开展大规模的克隆筛选。目前短时间内快速获得高表达稳定的单克隆细胞株仍然是工业界最主要的挑战。

细胞工程技术、表达载体优化以及高通量克隆筛选等新技术的应用有助于加快药物研发。本文以CHO细胞为例,介绍筛选标记在重组蛋白药物生产用哺乳动物细胞系构建中的应用,设计筛选标记以提高筛选严谨性,以及细胞基质稳定性和筛选标记安全性的审评思考,为药物研发提供参考,同时也为高效建立重组蛋白药物生产用哺乳动物细胞系<sup>[1,2]</sup>,如小鼠骨髓淋巴瘤细胞(NSO和Sp2/0)、人胚肾细胞(human embryonic kidney cell, HEK293)、人成纤维肉瘤细胞系HT-1080和人胚胎视网膜PER.C6细胞等提供借鉴。

### 1 筛选标记应用的科学基础和技术要求现状

目前可采用多种表达载体、宿主细胞、基因导入方法和筛选标记等进行工程细胞的构建和筛选。将携带有目的基因和筛选标记基因的质粒载体转染CHO细胞,筛选标记基因通过其编码的蛋白赋予阳性转化子对特定营养缺失条件或抗生素抗性的生长优势,经药物加压筛选出整合在染色体上的稳定细胞群。

国际人用药品注册技术协调会(International Council for Harmonization, ICH) Q5D《用于生物技术产品及生物制品生产的细胞基质的来源和鉴定》中要求“对于重组产品,细胞系是指克隆自一个祖细胞且含有所需序列的转染细胞”<sup>[3]</sup>。《中国药典》2015年版《生物制品生产检定用动物细胞基质制备及检定规程》中明确要求,在细胞克隆过程中,应选择单个细胞用于扩增,筛选具有分泌目的蛋白最佳特性的候选克隆,用于建立细胞种子。

由于外源基因整合位点的随机性和拷贝数差异等,细胞群在产物表达水平、稳定性和质量等方面均具有不同克隆之间的异质性<sup>[4]</sup>。为满足生产和法规要求,需开展大规模克隆筛选,以获得高产率的、稳定的和质量符合预期的细胞株。已在多方面开展细胞株开发工艺改进研究,如使用强启动子/增强子和染色质调节元件以优化质粒载体,使用荧光活化的细胞分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS)和自动克隆挑选设备Clone Pix以实现高通量克隆筛选,以及通过在活性位点定点整合质粒载体以摆脱基因表达的位置效应等<sup>[5]</sup>。可通过荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)对细胞库进行鉴定,通过对细胞核型和目的基因整合位点的检测判断细胞库的单克隆性。筛选标记是质粒载体中的关键元件,在生产细胞系的构建和筛选中发挥重要作用,通过设计筛选标记提高筛选严谨性,以获得稳定高产细胞株,也是一种改进细胞株开发工艺的有效手段。

## 2 常见筛选标记的应用及研究现状

**2.1 营养缺失条件筛选标记** 常用于生产治疗性重组蛋白药物的筛选标记包括二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)和谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS),这2种酶都是营养缺失条件下细胞代谢和生长生产的关键酶。DHFR利用烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)将二氢叶酸还原为四氢叶酸,后者是核酸代谢的关键原料。采用次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷缺失的培养基和DHFR活性抑制剂甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)进行筛选,只有DHFR基因拷贝数扩增的细胞才能得以存活。目标基因与筛选标记基因位于同一质粒载体上,二者同步扩增,多轮逐步提高MTX浓度可实现目标基因拷贝数增加。GS催化谷氨酸和游离分子氨合成谷氨酰胺,通过谷氨酰胺缺失培养基和氨基亚砷蛋氨酸(methionine sulphoximine, MSX)进行筛选,其筛选过程和扩增原理与DHFR类似<sup>[3]</sup>。

由于DHFR和GS的合成基因都是内源性CHO基因,在基因敲除的、改造后的CHO细胞中筛选效率更高,如GS敲除的CHO K1细胞<sup>[6]</sup>和DHFR缺陷的CHO DG44细胞<sup>[7]</sup>。更高的基因拷贝数可以提高转录水平进而实现更高产率,但其缺点包括:细胞株开发周期长<sup>[8]</sup>,基因沉默可引起细胞株长时间培养后不稳定表达<sup>[9]</sup>,以及基因扩增导致突变几率增加致产物中出现氨基酸序列变异体<sup>[10]</sup>。因此,缩短开发周期、提高目的蛋白产率并降低突变几率成为改进细胞株开发工艺的关键。NSO和Sp2/0细胞系的内源性GS表达水平不足以支持细胞生长,因此在培养基中去除谷氨酰胺便可以进行筛选<sup>[11]</sup>。

**2.2 抗生素抗性筛选标记** 使用抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)不需要对宿主细胞进行改造<sup>[3]</sup>,在含适当浓度抗生素培养基的维持培养过程中,未发生外源基因整合的细胞将被逐渐清除。常用的抗生素抗性基因包括新霉素磷酸转移酶基因(neomycin phosphotransferase gene, NEO)、潮霉素抗性基因(hygromycin resistance hyg gene, HYG)、博来霉素抗性基因(zeocin resistant Shble gene, ZEO)、杀稻瘟菌素抗性基因(blebbistatin resistant bsd gene, BLA)和嘌呤霉素-N-乙酰基转移酶(puromycin N-acetyl-transferase, PURO)基因等,通过抑制蛋白合成或切割DNA发挥作用<sup>[12]</sup>。不同的抗生素抗性基因用于筛选高表达株的效率不同:和其他抗生素相比,杀稻瘟菌素和嘌呤霉素作用更快,可在低浓度下快速杀死无抗性基因的细胞;在一项比较NEO、HYG、PURO和ZEO等抗性基因的研究中,ZEO在分离高表达株表现更好,其细胞株的稳

定性也优于其他抗性基因<sup>[13]</sup>。

使用抗生素抗性基因可以快速鉴别阳性转化子, 无需基因扩增而缩短细胞株开发周期。然而, 由于转化细胞仅需要低水平的抗生素抗性蛋白即可存活, 这意味着建立的稳转细胞群中主要是低表达株。由于无法通过基因扩增提高表达水平, 提高筛选严谨性优化抗生素抗性基因表达就成为获得高表达株的关键因素。

**2.3 筛选严谨性研究** 提高筛选严谨性可通过减弱筛选标记蛋白的表达水平或表达效率, 只允许那些质粒载体整合在基因组活性位点和/或高基因拷贝数的克隆存活。目标基因和筛选基因的共表达可采用多个启动子, 由各自的启动子在独立的转录单元中驱动表达。可使用弱启动子减少转录、加入序列使 mRNA 或蛋白去稳定、不进行密码子优化以及非传统 AUG 起始密码子<sup>[14]</sup>以降低翻译效率、突变氨基酸降低酶活性等手段减少筛选标记的表达。

研究表明使用含有弱化的 SV40E 启动子的表达载体和 GS 敲除的 CHO K1 SV 细胞可显著提高筛选严谨性并降低 GS 表达水平, 获得高产率细胞株<sup>[15]</sup>。通过添加富含 AU 元件以及鼠鸟氨酸脱羧酶 PEST 区 (protein regions of enriched amino acids proline, glutamic acid or aspartic acid, serine and threonine) 分别促进 mRNA 和蛋白降解, 使 DHFR 筛选标记不稳定以提高筛选严谨性, 从而提高了 CHO-DG44 细胞中重组人干扰素  $\gamma$  (interferon-gamma, IFN $\gamma$ ) 的产率<sup>[16]</sup>。通过 PEST 与 DHFR 串联促进 DHFR 降解, 突变核糖体进入位点 (internal ribosome entry site, IRES) 以阻碍翻译起始以及对 DHFR 筛选标记基因不进行密码子优化, 降低了 DHFR 蛋白表达以提高筛选严谨性, 并在 3 个月内完成两步 MTX (50 nmol·L<sup>-1</sup>) 筛选, 目的蛋白产率与 300 nmol·L<sup>-1</sup> 浓度的 MTX 筛选结果相当<sup>[17]</sup>。

另有研究表明, 使用降低活性的 GS 突变体作为筛选标记, 可显著提高稳转细胞群的抗体产率, 而且和野生 GS 系统相比, 这些稳转细胞群能够更长时间保持高表达水平, 可减少或无需维持 MSX 的使用<sup>[18]</sup>。使用降低活性的 NEO 突变体作为筛选标记, 有助于提高基因拷贝数进而获得高表达细胞株, 并且与野生型 NEO 相比, 降低酶活性的筛选体系获得高产率细胞株的几率更高<sup>[19]</sup>。

在一项研究中, 为了增加高表达株的筛选严谨性, 使用野生型和突变型内部 IRES 探索 CHO K1 细胞中 5 种不同抗生素抗性基因和 CHO DG44 细胞中 DHFR 的最佳表达水平, 结果表明, 突变弱化的 IRES 可减少筛选标记表达有助于提高稳转细胞株的产量, 但是过度弱化会导致细胞无法存活或降低目标产物表达量<sup>[20]</sup>。因此, 应该将筛选标记表达优化保持在既能够实现高表达细

胞株的筛选严谨性, 又能够保证细胞存活的水平。每一种筛选标记在不同的宿主细胞中有其各自最佳的筛选严谨性水平, 深入研究有助于改进细胞株开发工艺。

基于多启动子的载体设计的主要缺点是目的基因和筛选基因未紧密偶联, 因此载体片段化可能导致那些只表达筛选标记基因而不表达目的基因的细胞能够在药物筛选过程中存活下来<sup>[21]</sup>。而使用 IRES 和 2A 肽在一个转录子中表达目的基因和筛选标记基因可解决此问题<sup>[3]</sup>, 还可通过应用弱化的 IRES 以减少筛选标记表达来提高此类载体的选择严谨性。有研究开发了 1 个三顺反子载体, 其中包括了 2 个 IRES, 包含 1 个核心 CpG 岛元件和半抗原修饰的人巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, hCMV) 启动子以增强表达稳定性。有 3 个基因轻链 (light chain, LC)、重链 (heavy chain, HC) 和 DHFR 按顺序分布在整个转录子上并被第 1 个野生型的 IRES 和第 2 个突变的 IRES 分隔开。由于 IRES 启动的翻译效率较低, 轻链和重链被野生型 IRES 分隔开, 实现了 LC 多肽的超表达, 促进单抗表达并减少聚体产生; 突变的 IRES 降低了 DHFR 的表达水平, 增强了选择严谨性<sup>[22]</sup>。

### 3 对筛选标记应用的一般考虑

在所有哺乳动物细胞表达系统中, CHO 细胞应用最广泛, 占据了 70% 的重组蛋白生产, 小鼠骨髓淋巴瘤细胞 (NS0 和 Sp2/0) 已获批用于西妥昔单抗 (cetuximab) 和帕利珠单抗 (palivizumab) 等抗体的商业化生产, 人胚肾细胞 HEK293 已获批用于凝血因子 Fc 融合蛋白商业化生产<sup>[23]</sup>, HT-1080 多用于生产治疗罕见病的重组酶类, 如艾度硫酸酯酶  $\beta$  注射液已在美国、欧盟等获批上市。在其他哺乳动物细胞系的筛选中, 也可考虑通过设计筛选标记以提高选择严谨性的策略。在改进细胞株开发工艺的同时, 还应关注细胞基质稳定性、筛选试剂和筛选标记的去除效果及其安全性风险评估。

在重组蛋白药物开发过程中, 细胞基质稳定性与蛋白产量同等重要。经加压和单克隆筛选获得的候选单克隆细胞株, 在长期传代过程中会呈现不同的稳定性, 若选择的单克隆稳定性欠佳, 当生产工艺或规模发生变更时, 会对产品质量和产量造成影响。因此, 在克隆筛选过程中应对候选克隆的稳定性进行研究, 选择高产、稳定且质量符合预期的单克隆进行后续开发。根据既往审评经验, 部分产品在申请临床阶段细胞库稳定性研究未模拟实际生产工艺开展。例如, 在实际生产中种子扩增加压而生产培养不加压, 如果仅考察加压条件下的稳定性, 则无法证明细胞在实际生产中的稳定性。应模拟实际生产条件, 在加压和/或撤压条件下连续传代, 通过细胞生长状态、产物表达水平、蛋

白质量和目的基因序列等几个方面评价细胞的传代稳定性。考察的体外传代限次至少应能覆盖拟申报临床的生产工艺规模,但原则上,传代稳定性研究不规范不应阻碍临床进程。

在药品上市注册时,应基于确定的商业化工艺,评估培养期间细胞基质的稳定性,明确体外传代限度。生产细胞的体外传代限度,应根据试生产规模或全规模生产时生产细胞扩增至建议的细胞体外传代期限或更长期的数据而定<sup>[24]</sup>。审评实践中,部分治疗性蛋白药物在注册生产时,其传代稳定性研究较为完善。通常考察达到体外细胞龄限度和/或超过体外细胞龄限度细胞库的外源因子安全性和遗传稳定性,通过 Southern 杂交分析基因的完整性及整合位点稳定性,通过 Northern 杂交和 cDNA 测序分析转录产物稳定性,通过实时定量荧光 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 分析整合基因的拷贝数,并与最少传代数的细胞库 (master cell bank, MCB 或 working cell bank, WCB) 比较,分析遗传稳定性。此外,研发机构还应关注细胞基质在贮藏条件下的稳定性,通过临床试验用样品生产积累的细胞活力及细胞生长情况等数据,可证明复苏细胞在储存过程中的性能。

筛选试剂在生产用细胞株的构建筛选、细胞库建立或生产过程中使用,作为小分子物质因用量少和常规纯化工艺可去除,残留风险较低,但是作为工艺相关杂质,应关注其去除效果并进行风险评估,以确保其残留不会影响产品的安全性。例如,可以根据添加量和最坏情况的每剂最大残留量(将整个生产过程无清除视为最坏情况),以及毒理学风险评估的可接受日暴露量<sup>[25]</sup>来计算杂质安全系数 (impurity safe factor, ISF),如果安全系数较低,可采用递进式风险评估原则,进一步根据中间品中筛选试剂残留量或挑战试验计算 ISF 并进行风险评估<sup>[26]</sup>。研发机构可根据积累的平台和产品知识,合理确定安全系数限值,依据风险评估结果确定需要进行清除或挑战试验的杂质。在平台和产品知识有限的情况下,上市申请时鼓励建立特异、灵敏的筛选试剂分析方法,开展规范全面的方法学验证,检测商业化工艺性能确认批中间品和原液的残留量,同时计算安全系数评估安全性风险。

鉴于抗生素使用对人类和环境的危害,《中国药典》2015年版“凡例”十六要求,除另有规定外,不得使用青霉素或其他 $\beta$ -内酰胺类抗生素。生产过程中,应尽可能避免使用抗生素,必须使用时,应选择安全性风险相对较低的抗生素,且产品的后续工艺应保证可有效去除制品中的抗生素。对于哺乳动物细胞表达系统,目前已基本不采用青霉素或 $\beta$ -内酰胺类抗生素作

为筛选试剂,通常采用风险较低的博来霉素、杀稻瘟菌素和嘌呤霉素等。在药物开发过程中,应关注抗生素种类的选择,以保证产品的安全性。

筛选标记基因及其表达产物的残留,可能会增加药品免疫原性风险,因此要严格控制残留 DNA 和宿主残留蛋白 (host cell protein, HCP)。世界卫生组织推荐的非口服生物制品 DNA 限度为每剂量 10 ng,获得生物技术行业广泛认可<sup>[27]</sup>。1997年美国食品药品监督管理局将生物制品可以允许的残余 DNA 限度定为不超过每剂量 100 pg;对于大剂量的制品(如单克隆抗体),DNA 残留量放宽到每剂量 10 ng<sup>[28]</sup>。《中国药典》(2015年版三部)对于 CHO 细胞表达的重组蛋白制品, DNA 残留量应不超过每剂量 100 pg。一般根据药物临床使用的最大剂量以及积累的多批次检测数据,拟定残留 DNA 的质量标准。

目前生物制品行业多以商业化的通用性宿主蛋白酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒来检测产品中的宿主蛋白残留。重组蛋白药物由于表达系统和生产工艺的差异,不同产品的残留宿主蛋白会存在差异,若商品化 ELISA 试剂盒中的多克隆抗体的特异性和适用性不够高,则会带来漏检 HCP 的风险,从而对重组蛋白药物质量带来安全性风险。鼓励在临床试验阶段开发表达系统和生产工艺特异的 HCP 检测方法,用于上市产品宿主残留蛋白的质量控制。可采用空细胞系(来自相同的细胞系,但不含表达目的产品的基因)大量培养,用相同的下游生产工艺富集 HCP<sup>[29]</sup>。这种定制的工艺特异性检测方法特异性高,针对性强,灵敏度高。可采用荧光差异双向电泳 (two-dimensional difference gel electrophoresis, 2D-DIGE) 技术高效分离 HCP,再将 2D 胶上的蛋白转移至膜上进行 Western blot 检测,通过 2D-DIGE 和 Western blot 结果比较,评价 HCP 检测用抗体的特异性和适用性。

#### 4 结语

筛选标记是质粒载体中的关键元件,在生产细胞系的构建和筛选中发挥重要作用,通过设计筛选标记提高筛选严谨性,以获得稳定高产细胞株,是一种改进细胞株开发工艺的有效手段。研发机构在提高生产用哺乳动物细胞系开发效率的同时,还应关注细胞基质稳定性、筛选试剂和筛选标记的去除效果及其安全性,以保证药品质量和患者安全。技术审评将依据现有法规和指导原则,基于目前科学认知,对细胞基质稳定性和安全性进行整体评估,评价产品质量的可控性、临床使用的有效性和安全性。

作者贡献: 本文主要由崔颖撰写, 白玉和程速远修改。

利益冲突: 本文的作者和所涉及的内容不存在潜在的利益冲突。

## References

- [1] Wang D, Liu Y. Advancing in mammalian cell line for expressing recombinant protein [J]. *Pharm Biotechnol (药物生物技术)*, 2014, 21: 478-482.
- [2] Zhang MX, Zhu JW, Lu HL. Advances in antibody drug expression techniques [J]. *Chin J Biotechnol (生物工程学报)*, 2019, 35: 171-182.
- [3] International Council for Harmonisation. Q5D: derivation and characterisation of cell substrates used for production of biotechnological/biological products [EB/OL]. Switzerland: ICH, 1997 [2018-12-31]. <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>.
- [4] Davies SL, Lovelady CS, Grainger RK, et al. Functional heterogeneity and heritability in CHO cell populations [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110: 260-274.
- [5] Ho SC, Tong YW, Yang Y. Generation of monoclonal antibody-producing mammalian cell lines [J]. *Pharm Bioprocess*, 2013, 1: 71-87.
- [6] Fan L, Kadura I, Krebs LE, et al. Improving the efficiency of CHO cell line generation using glutamine synthetase gene knock-out cells [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109: 1007-1015.
- [7] Urlaub G, Käs E, Carothers AM, et al. Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells [J]. *Cell*, 1983, 33: 405-412.
- [8] Jun SC, Kim MS, Hong HJ, et al. Limitations to the development of humanized antibody producing Chinese hamster ovary cells using glutamine synthetase-mediated gene amplification [J]. *Biotechnol Prog*, 2006, 22: 770-780.
- [9] Dorai H, Corisdeo S, Ellis D, et al. Early prediction of instability of Chinese hamster ovary cell lines expressing recombinant antibodies and antibody-fusion proteins [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109: 1016-1030.
- [10] Guo D, Gao A, Michels DA, et al. Mechanisms of unintended amino acid sequence changes in recombinant monoclonal antibodies expressed in Chinese hamster ovary (CHO) cells [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 107: 163-171.
- [11] Lalonde ME, Durocher Y. Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells [J]. *J Biotechnol*, 2017, 251: 128-140.
- [12] Yeo JHM, Ho SCL, Mariati M, et al. Optimized selection marker and CHO host cell combinations for generating high monoclonal antibody producing cell lines [J]. *Biotechnol J*, 2017, 12: 1700175.
- [13] Lanza AM, Kim DS, Alper HS. Evaluating the influence of selection markers on obtaining selected pools and stable cell lines in human cells [J]. *Biotechnol J*, 2013, 8: 811-821.
- [14] Cairns VR, DeMaria CT, Poulin F, et al. Utilization of non-AUG initiation codons in a flow cytometric method for efficient selection of recombinant cell lines [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108: 2611-2622.
- [15] Fan L, Kadura I, Krebs LE, et al. Development of a highly-efficient CHO cell line generation system with engineered SV40E promoter [J]. *J Biotechnol*, 2013, 168: 652-658.
- [16] Ng SK, Wang DI, Yap MG. Application of destabilizing sequences on selection marker for improved recombinant protein productivity in CHO-DG44 [J]. *Metab Eng*, 2007, 9: 304-316.
- [17] Chin CL, Chin HK, Chin CS, et al. Engineering selection stringency on expression vector for the production of recombinant human alpha1-antitrypsin using Chinese hamster ovary cells [J]. *BMC Biotechnol*, 2015, 15: 44.
- [18] Lin PC, Chan KF, Kiess IA, et al. Attenuated glutamine synthetase as selection marker in CHO cells to efficiently isolate highly productive stable cells for production of antibodies and other biologics [J]. *MAbs*, 2019, 11: 965-976.
- [19] Sautter K, Enenkel B. Selection of high-producing CHO cells using NPT selection marker with reduced enzyme activity [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 89: 530-538.
- [20] Koh EY, Ho SC, Mariati, et al. An internal ribosome entry site (IRES) mutant library for tuning expression level of multiple genes in mammalian cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e82100.
- [21] Ng SK, Lin W, Sachdeva R, et al. Vector fragmentation: characterizing vector integrity in transfected clones by Southern blotting [J]. *Biotechnol Prog*, 2010, 26: 11-20.
- [22] Yeo JHM, Mariati, Yang Y. An IRES-mediated tricistronic vector for efficient generation of stable, high-level monoclonal antibody producing CHO DG44 cell lines [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1827: 335-349.
- [23] Hu J, Han J, Li H, et al. Human embryonic kidney 293 cells: a vehicle for biopharmaceutical manufacturing, structural biology, and electrophysiology [J]. *Cells Tissues Organs*, 2018, 205: 1-8.
- [24] International Council for Harmonisation. Q5B: analysis of the expression construct in cells used for production of r-DNA derived protein products [EB/OL]. Switzerland: ICH, 1995 [2018-12-31]. <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>.
- [25] International Council for Harmonisation. Q3C impurities: guideline for residual solvents [EB/OL]. Switzerland: ICH, 2018 [2020-05-22]. <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>.
- [26] CMC biotech working group. A-Mab: a case study in bioprocess development [M/OL]. North Bethesda: ISPE, 2009 [2009-10-30]. <https://ispe.org/publications/guidance-documents/a-mab-case-study-in-bioprocess-development>.
- [27] World Health Organization. Requirement for the Use of Animal Cells as *In Vitro* Substrates for the Production of Biologicals: WHO Technical Report Series [R]. Geneva: WHO, 1998: 878 (Annex 1).
- [28] Wang L, Wang JZ. Issues on quality control of residual DNA in biological products [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2011, 20: 678-683.
- [29] Du HQ, Yan JX. Risk analysis and detection strategy of residual host cell protein in biological products [J]. *Int J Biologicals (国际生物制品学杂志)*, 2012, 35: 82-86.