综述

哺乳动物细胞培养过程中单克隆抗体的糖基化修饰调控技术进展

赵丽丽[1,2]，朱玉强[1,2]，王宏涛[1,2]，张贵民[3]，刘　忠[3*]

（1. 山东新时代药业有限公司，山东临沂 273400；2. 哺乳动物细胞高效表达国家工程实验室，山东临沂 273400；
3. 鲁南制药集团股份有限公司，山东临沂 276000）

摘要：生物制品，尤其是单克隆抗体药物，主要由哺乳动物细胞培养系统生产。糖基化是单克隆抗体药物的一个关键质量属性，对单克隆抗体的生物学活性、药代动力学、半衰期和免疫原性等有显著影响。因此，为了更好地控制糖基化修饰质量，必须在整个哺乳动物细胞的培养过程中对单克隆抗体的糖基化过程进行调控与监测。该文围绕哺乳动物细胞的工程改造、细胞培养工艺及培养基的优化、糖基化调节剂、数学模型和组学技术等方面内容，介绍哺乳细胞培养过程中单克隆抗体的糖基化修饰调控取得的技术进展。

关键词：哺乳动物细胞；单克隆抗体；糖基化修饰；细胞培养；蛋白质工程；数学模型；组学技术；研究进展

中图分类号：R392-33；Q816　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2025)05-0567-09

引用：赵丽丽，朱玉强，王宏涛，等. 哺乳动物细胞培养过程中单克隆抗体的糖基化修饰调控技术进展[J]. 中国医药工业杂志，2025, 56(5): 567-575. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.05.001

Technological Progress of Regulation of Glycosylation Modification of Monoclonal Antibodies during Mammalian Cell Culture

ZHAO Lili[1,2], ZHU Yuqiang[1,2], WANG Hongtao[1,2], ZHANG Guimin[3], LIU Zhong[3*]

(*1. Shandong New Time Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi 273400; 2. State Engineering Lab. of High Expression of Mammalian Cells, Linyi 273400; 3. Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276000*)

ABSTRACT: Biopharmaceuticals, especially therapeutic monoclonal antibodies (mAbs), are mainly produced in mammalian cell culture systems. Glycosylation is a critical quality attribute of mAbs, which has a significant impact on their biological activity, pharmacokinetics, half-life, and immunogenicity. Therefore, in order to better control the quality of glycosylation modification, the glycosylation process of mAbs must be regulated and monitored throughout the culture process of mammalian cells. This review focuses on the engineering of mammalian cells, optimization of cell culture processes and culture media, glycosylation regulators, mathematical models and omics technologies. And it introduces the technological progress achieved in the regulation of glycosylation modification of monoclonal antibodies during mammalian cell culture.

Key Words: mammalian cell; monoclonal antibody; glycosylation modification; cell culture; protein engineering; mathematical model; omics technology; research progress

自首个治疗性单克隆抗体（monoclonal antibodies，mAbs），莫罗单抗-CD3(muromonab-CD3)，被FDA批准上市以来[1]，mAbs药物在生物制品中一直占主导地位，种类占比超过50%，销售额占比超80%[2]。mAbs糖基化后性质可发生显著改变，如增强mAbs产品的稳定性和溶解性，降低其聚集倾向，影响其

收稿日期：2024-08-06

基金项目：山东省重点研发计划（泰山产业领军人才工程）项目（tscy202306088、tscy20200329）

作者简介：赵丽丽（1977—），女，博士，高级研究员，从事蛋白药物的研究。

通信作者：刘　忠（1975—），男，博士，高级研究员，从事蛋白药物的研究与开发。

E-mail：clevertree@163.com

生物学活性、药代动力学、半衰期和免疫原性等[3]。在 mAbs 生物类似药的开发过程中，必须对生物类似药和原研药的糖型进行表征和匹配。EMA 还指出，应特别注意 mAbs 产品中唾液酸（sialic acid，Sia）、半乳糖（galactose，Gal）、甘露糖（mannose，Man）和岩藻糖（fucose，Fuc）的水平[4]。

大多数 mAbs 产品属于免疫球蛋白 G（immunoglobulin G，IgG）类（特别是 IgG1 亚类），且较常用的表达系统是中国仓鼠卵巢细胞（Chinese hamster ovary cells，CHO 细胞）和小鼠骨髓瘤细胞（NS0 细胞和 Sp2/0 细胞）[5]。同时 mAbs 上的聚糖结构会受到宿主细胞中糖基化酶的表达机制、在高尔基体中的转运时间、核苷酸糖的供应、细胞代谢状态、培养条件和培养基成分等的影响，导致不同的 mAbs 产品拥有不同的 N- 糖基化特征。哺乳动物细胞培养过程中的糖基化修饰影响因素及其复杂的相互作用，导致同一制造商在使用相同的设施和工艺时都几乎不可能得到糖型、含量完全相同的 mAbs 产品[6]。本综述重点聚焦 mAbs 产品的上游工艺（如宿主细胞系及其工程化改造、培养基优化、糖型调节剂和培养工艺）对糖基化的影响，并描述了建模及组学方法在 mAbs 糖基化调控中的应用。表 1 汇总了已上市的代表性 mAbs 的 N- 糖基化特征和基本信息[7—8]。

1　mAbs 的聚糖异质性

IgG1 Fc 区 Asn297 上附着的常见 N- 聚糖结构如图 1[9]（图片使用已取得授权）所示。成熟的双触角 N- 聚糖结构复杂，具有由 3 个 Man 和 2 个 GlcNAc 残基组成的核心结构［$(Man)_3(GlcNAc)_2$］。根据其 α(1,3) 和 α(1,6) 触角的组成，N- 聚糖可分为 3 种类型，即高甘露糖型、复合型和杂合型[9]。

LUO 等[5]总结了向 FDA 递交电子通用技术文档的 119 种 mAbs 中相对丰度前 10 名的 N- 聚糖结构及其相应的末端表位，建立了基准聚糖谱，可作为 mAbs 开发、质量控制和法规遵从性的重要参考。这 119 种 mAbs 由 3 种细胞系表达产生，使用最多的表达系统是 CHO 细胞［共表达产生 95 种 mAbs，其中包括 57 种典型的 IgG1 mAbs,、10 种其他类型 IgG1（包括抗体偶联药物、双特异性抗体和 Fc 片段）mAbs、24 种非 IgG1（包括 IgG2、IgG4、IgG1/2 和 IgG2/4）mAbs 和 4 种 IgG1-Fc 融合蛋白 mAbs］，另 2 种是 NS0 细胞（16 种 mAbs）和 Sp2/0 细胞（8 种 mAbs）。尽管 mAbs 中的 N- 聚糖表位十分多样，但有 9 种表位较为常见，分别为末端 GlcNAc、核心 Fuc、末端 Gal、高甘露糖、α-Gal、末端 α(2,3)- 连接的 *N*- 乙酰神经氨酸（*N*-acetylneuraminic acid，NANA）、末端 α(2,6)- 连接的 NGNA、三触角结构和二等分 GlcNAc。

2　宿主细胞系对 mAbs 糖基化的影响

截至 2023 年 5 月，在 FDA 批准的 120 种 IgG1 产品中，使用哺乳动物细胞作为宿主的超过了 90%。常用宿主包括 CHO 细胞、NS0 细胞、Sp2/0 细胞和大鼠骨髓瘤细胞（YB2/0 细胞），其占比分别是 78%、8%、8%和 1%[5]。

表 1　代表性治疗性 mAbs 的 N- 糖基化特征及基本信息

Tab.1　N-Glycosylation Characteristics and Basic Information of Representative Therapeutic mAbs

序号	通用名称	商品名称	N- 糖基化特征	蛋白质类型	表达细胞系
1	曲妥珠单抗（trastuzumab）	Herceptin	去岩藻糖基化，α-Gal	IgG1 mAbs	CHO
2	西妥昔单抗（cetuximab）	Erbitux	NGNA[1)]，α-Gal	IgG1 mAbs	Sp2/0
3	贝那利珠单抗（benralizumab）	Fasenra	去岩藻糖基化，末端 GlcNAc[2)]	IgG1 mAbs	CHO
4	雷莫芦单抗（ramucirumab）	Cyramza	NGNA，α-Gal	IgG1 mAbs	NS0
5	奥妥珠单抗（obinutuzumab）	Gazyva	二等分 GlcNAc，含有低丰度的核心 Fuc	IgG1 mAbs	CHO
6	英夫利昔单抗（infliximab）	Remicade	末端 GlcNAc，核心 Fuc，二等分 GlcNAc	IgG1 mAbs	Sp2/0
7	阿达木单抗（adamumab）	Humira	末端 GlcNAc	IgG1 mAbs	CHO
8	贝伐珠单抗（bevacizumab）	Avastin	末端 GlcNAc	IgG1 mAbs	CHO
9	帕尼单抗（panitumumab）	Vectibix	高甘露糖	IgG2 mAbs	CHO
10	帕博利珠单抗（pembrolizumab）	Keytruda	末端 GlcNAc，核心 Fuc，低丰度的高甘露糖	IgG4 mAbs	CHO

注：[1)]NGNA 为 *N*- 羟乙酰神经氨酸（*N*-glycolylneuraminic acid）；[2)]GlcNAc 为 *N*- 乙酰葡萄糖胺（*N*-acetylglucosamine）。

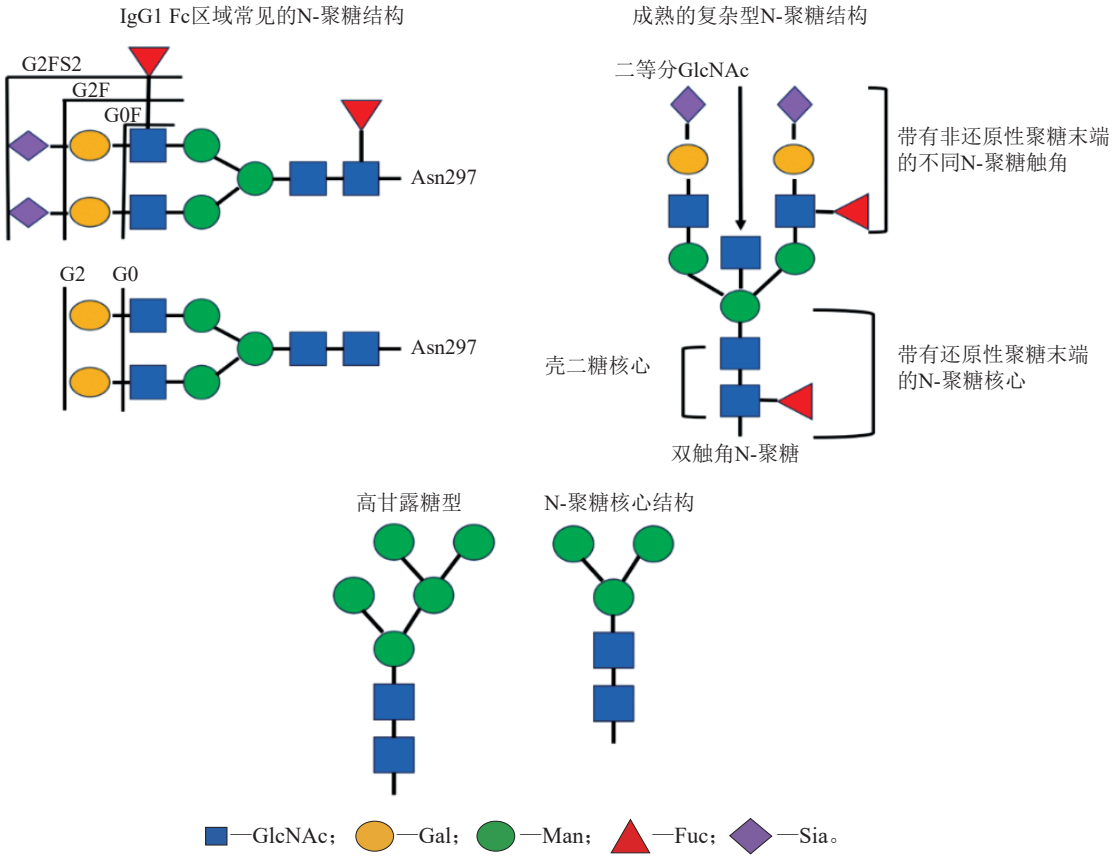


图 1 N- 聚糖结构图、N- 聚糖命名法和常见的 N- 聚糖结构 [9]

Fig.1 N-Glycan Structure, N-Glycan Nomenclature and Common N-Glycan Structures[9]

CHO 细胞由于缺乏 *N*- 乙酰葡萄糖胺转移酶（*N*-acetylglucosaminyl transferase，GnT）- Ⅲ的表达基因，因此不产生二等分 GlcNAc。此外，由于 CHO 细胞中缺乏 α(2,6)- 唾液酰基转移酶（sialyltransferase，SiaT），仅产生 α(2,3)-Sia[10]，而人类细胞同时产生 α(2,3)-Sia 和 α(2,6)-Sia。YB2/0 细胞由于其天然较低的岩藻糖基转移酶 8（fucosyltransferase 8，FUT8）表达水平，被用来生产 2 种 mAbs：oledumab 和 ublituximab[11]。与 CHO 细胞相比，NS0 细胞和 Sp2/0 细胞还能够整合 α(1,3)-Gal 表位，而该表位在人类中具有高度免疫原性[12]。CHO 细胞作为成熟的生产 mAbs 的主力军，其合规的监管路径已被完善，因此业界缺少动力将糖基化 mAbs 的制造平台由 CHO 细胞转向为其他细胞系。

人胚胎肾细胞（human embryonic kidney，HEK293）虽然不具有生成免疫原性聚糖的风险，但却可能会引起聚糖结构的高度异质性。据报道[13]，HEK293 细胞生产的 IgE 会产生 30 种不同的糖型，其中许多可能会带来不良影响。此外，HEK293 细胞还有其他局限性，如存在人类病原体污染和传播的风险。

3 用于 mAbs 糖基化调控的工程改造

mAbs 糖基化调控的常用细胞工程策略包括基于小干扰 RNA 技术的基因沉默，以及使用 CRISPR/cas-9、锌指核酸酶（zinc finger nuclease，ZFN）和转录激活因子样效应物核酸酶（transcription activator-like effector nucleases，TALENs）等的基因编辑[14]。此外，还可使用过表达特定的核苷酸糖转运蛋白、基因失活和增加一种或多种糖基转移酶（glycosyltransferase，GT）活性等方法直接导致单个单糖向聚糖结构的转移，甚至改变特定 GT 的定位模式[15]。

3.1 降低 mAbs 核心 Fuc 的改造

减少 IgG Fc 区 Asn297 处 N- 聚糖的核心 Fuc，

可以显著增加 IgG mAbs 的依赖抗体的细胞毒性（antibody-dependent cellular cytotoxicity，ADCC）活性[16]。去除核心 Fuc 可以通过使用由日本 Kyowa Hakko Bio Co., Ltd. 于 2004 年开发的 Potelligent™ 技术而实现[17]。该技术开发了一种 CHO 细胞系，其中负责将 Fuc 添加到核心 GlcNAc 的 *Fut8* 基因被敲除。使用该技术的一个实例是莫格利珠单抗（mogamulizumab），商品名为 Poteligeo®[9]。

还有一种方法是用 CHO 细胞异源表达来自细菌的鸟苷二磷酸（guanine diphosphate，GDP）-6- 脱氧 -D- 来苏糖 -4- 己酮糖还原酶来降低核心 Fuc 水平[18]，间接影响 GDP-Fuc 的合成途径。使用这种方法产生的 IgG 中 Fuc 去除率达到 98%[19]。该平台由德国 ProBioGen 公司开发（商品名为 GlymaxX®），于 2019 年授权给德国拜耳公司[9]。使用此方法已生产出奥妥珠单抗，商品名为 Gazyva®[20]。

3.2 提高 mAbs 末端 Gal 或末端 Sia 含量的改造

α(2,3)-SiaT 和 β(1,4)- 半乳糖基转移酶［β(1,4)-galactosyltransferase，GalT］的共过表达被证实可提高 IgG 的末端 Sia 和末端 Gal 水平[21]。胞苷单磷酸（cytidine monophosphate，CMP）-Sia 合酶和 α(2,3)-SiaT 的共转染能显著提高 CHO 细胞系中重组蛋白的 Sia 含量[15]。CHUNG 等[22]利用双敲除技术使哺乳动物细胞系中编码 α(2,3)-SiaT 基因的 Fc 区发生多处突变，有利于生产出高 Gal 水平的 IgG。

4 用于 mAbs 糖基化调控的上游工艺

4.1 培养基及添加剂对 mAbs 糖基化的影响

细胞培养过程中的培养基和补料成分是聚糖异质性的主要来源。如表 2 所示，同一种成分对糖型的调控作用存在差异，还可以同时影响多种糖型[23—39]。

4.1.1 调节核心岩藻糖基化

由于葡萄糖是 GDP-Fuc 的前体，因此 mAbs 的无岩藻糖基化水平在补充葡萄糖后降低，在葡萄糖耗尽时会升高[23]。另外，向葡萄糖培养基中补充 Fuc 并不会升高岩藻糖基化水平[40]。与其他替代糖策略不同，HOSSLER 等[41]向培养物中添加阿拉伯糖，竞争性取代 Fuc 对核心聚糖结构的附着，以增强 ADCC 活性。结果显示，当在培养基中补加 10 mmol/L 阿拉伯糖时，所得 mAbs 的 98%核心 Fuc 被阿拉伯糖取代，且显示出与无岩藻糖基化 mAbs 相似的 ADCC 活性增加。

虽然谷氨酰胺不直接供应 GDP-Fuc，但培养基中缺乏谷氨酰胺会导致糖酵解通量减少，从而引起无岩藻糖基化水平升高[24]。此外，谷氨酰胺分解产生的氨对细胞的生长和代谢均有抑制作用，但在培养物中补充氨会提高无岩藻糖基化水平[42]。采用添加 Mn^{2+} 的方法来提高 mAbs 的无岩藻糖基化水平时，调控效果与使用的剂量和细胞系相关。研究[38]表明，在补充 Mn^{2+} 后，FUT8 的表达也会上调。

添加岩藻糖基化抑制剂也是调节核心岩藻糖基化水平的重要策略。常见的岩藻糖基化抑制剂是从细胞外介质摄取的 Fuc 类似物，如 GDP-Fuc 类似物，可作为 FUT8 的抑制剂[26,32]。

4.1.2 调节末端 Gal 和末端 Sia 含量

在培养基中添加 Gal 会增加 GnT-Ⅰ和 GalT 的表达，并提高 UDP-Gal 的水平，进而提高 N- 聚糖的半乳糖基化水平[38]。增加葡萄糖用量可提高 CHO 细胞中 mAbs 的半乳糖基化和唾液酸化程

表 2 用于调节 mAbs 糖基化的培养基成分及添加剂

Tab.2 Effects of Culture Medium Components and Additives on mAbs Glycosylation

N- 聚糖表位	调控方向	培养基成分及添加剂	参考文献
核心 Fuc	升高	葡萄糖、谷氨酰胺	[23—24]
	降低	阿拉伯糖、Mn^{2+}、几夫碱、Fuc 类似物、脱氧甘露野尻霉素（deoxymannojirimycin，DMJ）	[25—26]
末端 Gal	升高	葡萄糖、Mn^{2+}、Gal、尿苷、谷氨酸	[27—28]
	降低	丁酸钠、GlcNAc、Zn^{2+}、尿苷二磷酸（uridine diphosphate，UDP）-Gal 类似物	[27,29—30]
末端 Sia	升高	葡萄糖、*N*- 乙酰甘露糖胺、Mn^{2+}、Gal、尿苷、Cu^{2+}、胞苷、地塞米松、UDP-GlcNAc	[31—33]
	降低	丁酸钠、全乙酰化代谢前体 SiaFAc	[29,34]
高甘露糖	升高	Man、GlcNAc、果糖、半乳糖胺、Cu^{2+}、Mg^{2+}、鸟氨酸、精氨酸酶、精胺、栗精胺、几夫碱、马杜霉素、DMJ	[23,35—37]
	降低	Cu^{2+}、Gal、Mn^{2+}、甜菜碱、胆碱	[38—39]

度[43]。另外，在细胞培养物中添加尿苷和 Mn^{2+} 可以增加末端 Gal 水平[28]，而添加 UDP-GlcNAc 和使用无血清培养基则会增加 IgG1 抗体的唾液酸化水平[44]。基于 GalT 的 UDP-Gal 类似物可作为调节 mAbs 半乳糖基化的抑制剂[16]。CMP-Sia 是哺乳动物 SiaT 的底物，其氟化供体类似物 CMP-3Fax-NANA 可作为有效的 SiaT 抑制剂。基于此，有研究[34]开发了一种全乙酰化代谢前体 SiaFAc，能够被动跨膜并降低人原髓细胞白血病细胞（HL-60 细胞）中的唾液酸化程度。

丁酸钠可通过停滞细胞周期来提高特定 mAbs 的生产力，但将其添加到培养基中会降低半乳糖基化和唾液酸化水平[29]。LOEBRICH 等[27]研究表明，向培养基中加入 12.5 mmol/L 的 GlcNAc 会降低 CHO-K1 细胞的 IgG1 半乳糖基化水平。此外，有研究[30]表明，向培养基中添加超过 100 μmol/L 的 Zn^{2+} 也会降低 CHO 细胞中 mAbs 的半乳糖基化水平。

4.1.3 调节高甘露糖含量

升高培养基的渗透压或延长细胞培养时间会提高高甘露糖型聚糖 Man5 水平，而补充 Mn^{2+} 或甜菜碱可以减少渗透压升高引起的高甘露糖增加；胆碱、精胺、鸟氨酸和精氨酸酶等其他成分也会影响 mAbs 中的高甘露糖含量[39]。GRAHAM 等[37]研究表明，向基础培养基中补充 1 μmol/L 的 Mn^{2+} 会降低高甘露糖水平，而用 Mg^{2+} 替代 Mn^{2+} 时则降低了 GnT-Ⅰ 60%的催化活性，使得高甘露糖水平升高。值得注意的是，当存在大量 Mn^{2+}，并用 Gal 等替代葡萄糖后，高甘露糖含量可从 5%提高到 32%[23]。MASTRANGELI 等[45]研究显示，缺铜会导致高甘露糖型聚糖 Man9-Man6 的积累和 Man5 的减少。此外，不同的商品化培养基也可以直接影响高甘露糖水平[46]。

使用 DMJ 替代靶向 α- 甘露糖苷酶，可降低岩藻糖基化水平并增加高甘露糖的比例[47]。几夫碱是顺式高尔基体中 α- 甘露糖苷酶的抑制剂，将其加入培养基可提高高甘露糖水平[36]。有研究[36]开发了一类低成本的几夫碱替代品——三羟甲基氨基甲烷［*tris*(hydroxymethyl)aminomethane，Tris］，其效益-成本比是几夫碱的 35 倍且更稳定。用于哺乳动物分批补料和稳态灌注过程的新型糖基化调节剂，马杜霉素（聚醚离子载体），也被证明是一种有效的高甘露糖调节剂[48]。

4.2 培养工艺对 mAbs 糖基化的影响

4.2.1 培养方式

补料分批培养是 mAbs 生产中常见的细胞培养模式，但当活细胞密度（viable cell density，VCD）降低而产量和比生产率仍在增加时，会导致高甘露糖、无半乳糖基化以及无岩藻糖基化产物增加[35]。与补料分批培养工艺相比，灌流工艺平台能减少 mAbs 在培养物中的停留时间，从而使产品质量更加一致。

研究[49]显示，在 CHO 细胞灌流过程中，高甘露糖水平与 VCD 相关。SEO 等[43]研究表明，与灌流工艺相比，补料分批培养工艺中的高甘露糖和 G0 型聚糖水平较高。LIANG 等[6]在灌流细胞培养过程中，采用通过改变细胞密度的方式来模拟不同的工艺强化水平，考察其对 mAbs 质量的影响。结果显示，在不同的细胞密度［每 1 mL 含 $(15\pm1)\times10^6$、$(20\pm1)\times10^6$、$(25\pm1)\times10^6$ 个细胞］下，CHO-K1 细胞产生的 IgG1 中 G0F、G1F、G0、G2FS1 和 G2FS2 型聚糖的含量存在显著差异。因此，在将工艺变更为灌流模式时，需要评估培养方式对 mAbs 质量的影响。

4.2.2 过程参数

一些过程参数，包括温度、溶解氧（dissolved oxygen，DO）[51]、pH 值[35,52—53]、渗透压（osmotic pressure，Osm）[35,51—52]、二氧化碳分压（partial pressure of carbon dioxide，pCO_2）[54—55] 和剪切力[54]等，对 mAbs 糖基化的影响如表 3 所示。

降低细胞培养温度是一种常用的生产方法，亚低温会导致细胞内的核苷酸糖供体 UDP-GlcNAc 和 UDP-Gal 减少，负责糖链延长的 GT 表达降低[35]。但 MARSCHALL 等[50]研究显示，将温度从 35.8 ℃升至 37 ℃，可实现最佳的糖基化曲线，半乳糖基化水平提高了 4.5%。该策略已被成功应用于 1 000 L 的生产规模。

表 3　哺乳动物细胞培养中的过程参数对 mAbs 糖基化影响

Tab.3　Effects of Process Parameters of Mammalian Cell Culture on mAbs Glycosylation

过程参数	对 mAbs 糖基化影响
温度	降温：提高无岩藻糖基化水平，降低半乳糖基化水平，降低唾液酸化水平；升温：提高半乳糖基化水平 [50]
DO	低 DO：降低半乳糖基化水平，提高唾液酸化水平；DO 周期性变化：提高唾液酸化水平 [51]
pH 值	pH 值升高：提高无岩藻糖基化水平，降低或提高半乳糖基化水平，提高唾液酸化水平；pH 值过高或过低：降低唾液酸化水平，降低半乳糖基化水平 [35,52—53]
Osm	Osm 升高：降低或提高无岩藻糖基化水平，降低 G0F 型聚糖水平；高 Osm 条件：升高 Man5 水平 [35,51—52]
pCO_2	pCO_2 升高：降低唾液酸化水平 [54—55]
剪切力	高剪切力：降低糖基化位点占有率 [54]

氧化应激可能影响 GT（包括 FUT8）的表达或活性。这可以解释在不同 DO 水平下观察到的糖基化水平变化。高尔基体、细胞质和内质网之间存在 pH 值差异，而包括乳酸和氨在内的几种代谢副产物的积累以及 pCO_2 都会改变 pH 值，从而影响糖基化途径和效率。因此，细胞培养过程中的 pH 值需要严格控制在一定范围内 [52—53]。相对于标准条件（320 ～ 330 mOsm/kg），低渗透压和高渗透压都会影响无岩藻糖基化水平。发酵液中的 pCO_2 升高则会降低唾液酸化水平 [56]。在工艺放大过程中需要注意体积依赖参数（如 DO 和 pCO_2）控制的一致性，避免因工艺放大引起聚糖的异质性。

4.2.3　过程控制

W EYSTER 等 [57] 将基于拉曼光谱的乳酸和葡萄糖水平的双重控制策略，用于 CHO 细胞补料分批培养过程生产 mAbs。该研究显示，控制葡萄糖为 4 g/L、乳酸为 2 g/L，能使铵水平降低 68%，同时将 mAbs 的半乳糖基化水平提高 50%。

5　模型和组学方法在调控 mAbs 糖基化中的应用

目前已经生成并优化了许多蛋白质糖基化的计算模型，可为筛选最佳策略提供指导，从而获得具有所需特性的目标糖基化谱 [58]。ZHANG 等 [49] 使用靶向补料策略，并使用聚糖残基平衡分析（glycan residues balance analysis，GReBA）数学模型进行分析，结果表明 GReBA 模型可用于设计灌流工艺的补料方案以获得所需的糖型。目前已建立了能够量化糖基化前体（如 Gal 和尿苷）补充量对 mAbs 产量和糖型影响的模型，其模拟所得的糖型分布准确度在 ±5% 以内。有研究 [59] 采用该模型优化补料策略，结果与对照相比，基于优化补料策略获得的 mAbs 半乳糖基化水平提高 90% 以上，且不影响 VCD 和 mAbs 产量。LOEBRICH 等 [27] 则开发了一种经济且适应性强的培养基筛选系统，用以对 CHO 细胞中表达的 mAbs 聚糖进行综合调节，并展示了在深孔板、摇瓶、AMBR-15 细胞培养系统和 2 L 一次性生物反应器上的可扩展性。

在工艺表征的初始过程中添加组学数据有助于进一步理解糖基化模式和细胞代谢机制。BARLAN 等 [60] 在 CHO 细胞中进行了全基因组 CRISPR 敲除筛选，使用凝集素结合性测定方法，鉴定了 224 个可显著改变蛋白质岩藻糖基化的基因。这种功能基因组学框架可以扩展并应用于其他糖型调控的遗传途径。SUMIT 等 [61] 使用时程转录组学和代谢组学的综合方法来分析 CHO 细胞在补料分批培养过程中表达 mAbs 糖型的时间动态。结果显示 Gal 能够缓解时间瓶颈，且唾液酸化受到半乳糖基化前体和 CMP-Sia 生物合成的限制。LEE 等 [62] 通过转录组学、蛋白质组学、代谢组学和糖组学来研究 pH 值对培养性能、mAbs 产量和质量特征的影响。结果显示，pH 值可对细胞内囊泡运输、细胞周期和细胞凋亡进行差异性调节，从而导致比生产率、mAbs 产量和质量特征的差异。

6　结论和展望

使用哺乳动物细胞生产具有最佳糖型的生物类似药是一项具有挑战性的任务。近年来，研究者们在 mAbs 糖基化修饰的调控方面取得了显著进展，

但在实际生产过程中仍面临诸多挑战。首先，糖基化修饰是一个复杂的多步骤过程，涉及多个酶和底物的相互作用，对其进行精确调控非常困难。其次，不同批次之间以及不同生产设施之间的糖基化异质性仍然是生物制药行业面临的一个重要问题。由于糖型的分布较为敏感，与不同的细胞、参数范围和培养基等都密切相关，需针对自己的平台进行研究并得出相应结论，文献中的糖基化调控方法只能作为参考。随着生物技术的不断进步和对糖基化修饰机制的深入理解，以及将基于数学模型和组学的分析方法与系统方法相结合，相信未来能够在哺乳动物细胞培养过程中实现更加精确、可控的 mAbs 糖基化修饰，从而开发出更安全、有效的治疗性 mAbs 药物。

参考文献：

[1] MULLARD A. FDA approves 100th monoclonal antibody product [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, **20**(7): 491-495.

[2] WALSH G, WALSH E. Biopharmaceutical benchmarks 2022 [J]. *Nat biotechnol*, 2022, **40**(12): 1722-1760.

[3] SHRIVASTAVA A, JOSHI S, GUTTMAN A, *et al*. *N*-Glycosylation of monoclonal antibody therapeutics: a comprehensive review on significance and characterization [J]. *Anal Chim Acta*, 2022, **1209**: 339828.

[4] CARILLO S, PÉREZ-ROBLES R, JAKES C, *et al*. Comparing different domains of analysis for the characterisation of *N*-glycans on monoclonal antibodies [J]. *J Pharm Anal*, 2020, **10**(1): 23-34.

[5] LUO S, ZHANG B L. Benchmark glycan profile of therapeutic monoclonal antibodies produced by mammalian cell expression systems [J]. *Pharm Res*, 2024, **41**(1): 29-37.

[6] LIANG G, MADHAVARAO C N, MORRIS C, *et al*. Effects of process intensification on homogeneity of an IgG1:κ monoclonal antibody during perfusion culture [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2024, **108**(1): 274.

[7] LUO S, ZHANG B L. A tailored lectin microarray for rapid glycan profiling of therapeutic monoclonal antibodies [J]. *MAbs*, 2024, **16**(1): 2304268.

[8] 程速远 , 赵 靖 , 胡莹莹 , 等. 关于阿达木单抗生物类似药质量相似性评价要点的初步探讨 [J]. 中国生物制品学杂志 , 2021, **34**(5): 626-632.

[9] EDWARDS E, LIVANOS M, KRUEGER A, *et al*. Strategies to control therapeutic antibody glycosylation during bioprocessing: synthesis and separation [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2022, **119**(6): 1343-1358.

[10] DICKER M, STRASSER R. Using glyco-engineering to produce therapeutic proteins [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, **15**(10): 1501-1516.

[11] SHARMAN J P, FARBER C M, MAHADEVAN D, *et al*. Ublituximab (TG-1101), a novel glycoengineered anti-CD20 antibody, in combination with ibrutinib is safe and highly active in patients with relapsed and/or refractory chronic lymphocytic leukaemia: results of a phase 2 trial [J]. *Br J Haematol*, 2017, **176**(3): 412-420.

[12] CHUNG C H, MIRAKHUR B, CHAN E, *et al*. Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose [J]. *N Engl J Med*, 2008, **358**(11): 1109-1117.

[13] ILIEVA K M, FAZEKAS-SINGER J, BAX H J, *et al*. AllergoOncology: expression platform development and functional profiling of an anti-HER2 IgE antibody [J]. *Allergy*, 2019, **74**(10): 1985-1989.

[14] CHAN K F, SHAHREEL W, WAN C, *et al*. Inactivation of GDP-fucose transporter gene (Slc35c1) in CHO cells by ZFNs, TALENs and CRISPR-Cas9 for production of fucose-free antibodies [J]. *Biotechnol J*, 2016, **11**(3): 399-414.

[15] LI W, ZHU Z Y, CHEN W Z, *et al*. Crystallizable fragment glycoengineering for therapeutic antibodies development [J]. *Front Immunol*, 2017, **8**: 1554.

[16] GARCÍA-ALIJA M, VAN MOER B, SASTRE D E, *et al*. Modulating antibody effector functions by Fc glycoengineering [J]. *Biotechnol Adv*, 2023, **67**: 108201.

[17] YAMANE-OHNUKI N, KINOSHITA S, INOUE-URAKUBO M, *et al*. Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2004, **87**(5): 614-622.

[18] MABASHI-ASAZUMA H, KUO C W, KHOO K H, *et al*. A novel baculovirus vector for the production of nonfucosylated recombinant glycoproteins in insect cells [J]. *Glycobiology*, 2014, **24**(3): 325-340.

[19] VON HORSTEN H H, OGOREK C, BLANCHARD V, *et al*. Production of non-fucosylated antibodies by co-expression of heterologous GDP-6-deoxy-D-lyxo-4-hexulose reductase [J]. *Glycobiology*, 2010, **20**(12): 1607-1618.

[20] GOEDE V, FISCHER K, ENGELKE A, *et al*. Obinutuzumab as frontline treatment of chronic lymphocytic leukemia: updated results of the CLL11 study [J]. *Leukemia*, 2015, **29**(7): 1602-1604.

[21] COSTA A R, RODRIGUES M E, HENRIQUES M, *et al*. Glycosylation: impact, control and improvement during therapeutic protein production [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2014, **34**(4): 281-299.

[22] CHUNG C Y, WANG Q, YANG S, *et al*. Combinatorial genome and protein engineering yields monoclonal antibodies with hypergalactosylation from CHO cells [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2017, **114**(12): 2848-2856.

[23] SURVE T, GADGIL M. Manganese increases high mannose glycoform on monoclonal antibody expressed in CHO when glucose is absent or limiting: implications for use of alternate sugars [J]. *Biotechnol Prog*, 2015, **31**(2): 460-467.

[24] BURLEIGH S C, VAN DE LAAR T, STROOP C J, *et al*. Synergizing metabolic flux analysis and nucleotide sugar metabolism to understand the control of glycosylation of recombinant protein in CHO cells [J]. *BMC Biotechnol*, 2011, **11**(1): 95.

[25] WELLS E, SONG L Q, GREER M, *et al*. Media supplementation for targeted manipulation of monoclonal antibody galactosylation and fucosylation [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2020, **117**(11): 3310-3321.

[26] NGUYEN DANG A, MUN M, ROSE C M, *et al*. Interaction of cell culture process parameters for modulating mAb afucosylation [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2019, **116**(4): 831-845.

[27] LOEBRICH S, CLARK E, LADD K, *et al*. Comprehensive manipulation of glycosylation profiles across development scales [J]. *MAbs*, 2019, **11**(2): 335-349.

[28] CHIANG A W, LI S Z, SPAHN P N, *et al*. Modulating carbohydrate-protein interactions through glycoengineering of monoclonal antibodies to impact cancer physiology [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2016, **40**: 104-111.

[29] NMAGU D, SINGH S K, LEE K H. Creation of monoclonal antibody expressing CHO cell lines grown with sodium butyrate and characterization of resulting antibody glycosylation [J]. *Methods Enzymol*, 2021, **660**: 267-295.

[30] PRABHU A, GADRE R, GADGIL M. Zinc supplementation decreases galactosylation of recombinant IgG in CHO cells [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, **102**(14): 5989-5999.

[31] VILLACRÉS C, TAYI V S, BUTLER M. Strategic feeding of NS0 and CHO cell cultures to control glycan profiles and immunogenic epitopes of monoclonal antibodies [J]. *J Biotechnol*, 2021, **333**: 49-62.

[32] 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.

[33] YIN B J, WANG Q, CHUNG C Y, *et al*. A novel sugar analog enhances sialic acid production and biotherapeutic sialylation in CHO cells [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2017, **114**(8): 1899-1902.

[34] RILLAHAN C D, ANTONOPOULOS A, LEFORT C T, *et al*. Global metabolic inhibitors of sialyl- and fucosyltransferases remodel the glycome [J]. *Nat Chem Biol*, 2012, **8**(7): 661-668.

[35] RAMEEZ S, GOWTHAM Y K, NAYAR G, *et al*. Modulation of high mannose levels in *N*-linked glycosylation through cell culture process conditions to increase antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity activity for an antibody biosimilar [J]. *Biotechnol Prog*, 2021, **37**(5): e3176.

[36] BRANTLEY T J, MITCHELSON F G, KHATTAK S F. A class of low-cost alternatives to kifunensine for increasing high mannose *N*-linked glycosylation for monoclonal antibody production in Chinese hamster ovary cells [J]. *Biotechnol Prog*, 2021, **37**(1): e3076.

[37] GRAHAM R J, BHATIA H, YOON S. Consequences of trace metal variability and supplementation on Chinese hamster ovary (CHO) cell culture performance: a review of key mechanisms and considerations [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2019, **116**(12): 3446-3456.

[38] ST AMAND M M, RADHAKRISHNAN D, ROBINSON A S, *et al*. Identification of manipulated variables for a glycosylation control strategy [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2014, **111**(10): 1957-1970.

[39] KANG S, ZHANG Z Q, RICHARDSON J, *et al*. Metabolic markers associated with high mannose glycan levels of therapeutic recombinant monoclonal antibodies [J]. *J Biotechnol*, 2015, **203**: 22-31.

[40] VILLIGER T K, STEINHOFF R F, IVARSSON M, *et al*. High-throughput profiling of nucleotides and nucleotide sugars to evaluate their impact on antibody *N*-glycosylation [J]. *J Biotechnol*, 2016, **229**: 3-12.

[41] HOSSLER P, CHUMSAE C, RACICOT C, *et al*. Arabinosylation of recombinant human immunoglobulin-based

protein therapeutics [J]. *MAbs*, 2017, **9**(4): 715-734.

[42] SYNOGROUND B F, MCGRAW C E, ELLIOTT K S, *et al*. Transient ammonia stress on Chinese hamster ovary (CHO) cells yield alterations to alanine metabolism and IgG glycosylation profiles [J]. *Biotechnol J*, 2021, **16**(7): e2100098.

[43] SEO J S, MIN B S, KIM Y J, *et al*. Effect of glucose feeding on the glycosylation quality of antibody produced by a human cell line, F2N78, in fed-batch culture [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, **98**(8): 3509-3515.

[44] PATEL T P, PAREKH R B, MOELLERING B J, *et al*. Different culture methods lead to differences in glycosylation of a murine IgG monoclonal antibody [J]. *Biochem J*, 1992, **285**(Pt 3): 839-845.

[45] MASTRANGELI R, AUDINO M C, PALINSKY W, *et al*. The formidable challenge of controlling high mannose-type *N*-glycans in therapeutic mAbs [J]. *Trends Biotechnol*, 2020, **38**(10): 1154-1168.

[46] POWERS D N, TRUNFIO N, VELUGULA-YELLELA S R, *et al*. Multivariate data analysis of growth medium trends affecting antibody glycosylation [J]. *Biotechnol Prog*, 2020, **36**(1): e2903.

[47] LEVANON S S, AHARONOVITZ O, MAOR-SHOSHANI A, *et al*. An efficient method to control high mannose and core fucose levels in glycosylated antibody production using deoxymannojirimycin [J]. *J Biotechnol*, 2018, **276-277**: 54-62.

[48] ROMANN P, VUILLEMIN T, PAVONE S, *et al*. Maduramycin, a novel glycosylation modulator for mammalian fed-batch and steady-state perfusion processes [J]. *J Biotechnol*, 2024, **383**: 73-85.

[49] ZHANG L, SCHWARZ H, WANG M L, *et al*. Control of IgG glycosylation in CHO cell perfusion cultures by GReBA mathematical model supported by a novel targeted feed, TAFE [J]. *Metab Eng*, 2021, **65**: 135-145.

[50] MARSCHALL L, GOTTIMUKKALA C B. Temperature upshifts in mammalian cell culture: a suitable strategy for biosimilar monoclonal antibodies? [J]. *Bioengineering* (Basel), 2023, **10**(10): 1149.

[51] BATRA J, RATHORE A S. Glycosylation of monoclonal antibody products: current status and future prospects [J]. *Biotechnol Prog*, 2016, **32**(5): 1091-1102.

[52] RISH A J, SIDDIQUEE K, HUANG Z R, *et al*. Strategies for controlling afucosylation in monoclonal antibodies during upstream manufacturing [J]. *Biotechnol J*, 2023, **18**(7): e2200604.

[53] 陈孝欢, 孙瑞强. pH 和 pCO_2 对抗体五聚甘露糖修饰水平的影响研究 [J]. 生物化工, 2023, **9**(5): 78-85.

[54] HOSSLER P, KHATTAK S F, LI Z J. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture [J]. *Glycobiology*, 2009, **19**(9): 936-949.

[55] GUPTA S K, SHUKLA P. Glycosylation control technologies for recombinant therapeutic proteins [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, **102**(24): 10457-10468.

[56] CHUNG S, TIAN J, TAN Z J, *et al*. Modulating cell culture oxidative stress reduces protein glycation and acidic charge variant formation [J]. *MAbs*, 2019, **11**(1): 205-216.

[57] W EYSTER T, TALWAR S, FERNANDEZ J, *et al*. Tuning monoclonal antibody galactosylation using Raman spectroscopy-controlled lactic acid feeding [J]. *Biotechnol Prog*, 2021, **37**(1): e3085.

[58] REDDY J V, RAUDENBUSH K, PAPOUTSAKIS E T, *et al*. Cell-culture process optimization via model-based predictions of metabolism and protein glycosylation [J]. *Biotechnol Adv*, 2023, **67**: 108179.

[59] KOTIDIS P, JEDRZEJEWSKI P, SOU S N, *et al*. Model-based optimization of antibody galactosylation in CHO cell culture [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2019, **116**(7): 1612-1626.

[60] BARLAN K, BHIDE G P, WHITE D R, *et al*. Genome-scale functional genomics screening highlights genes impacting protein fucosylation in Chinese hamster ovary cells [J]. *SLAS Discov*, 2024, **29**(1): 52-58.

[61] SUMIT M, DOLATSHAHI S, CHU A A, *et al*. Dissecting *N*-glycosylation dynamics in Chinese hamster ovary cells fed-batch cultures using time course omics analyses [J]. *iScience*, 2019, **12**: 102-120.

[62] LEE A P, KOK Y J, LAKSHMANAN M, *et al*. Multi-omics profiling of a CHO cell culture system unravels the effect of culture pH on cell growth, antibody titer, and product quality [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2021, **118**(11): 4305-4316.