高密度接种强化 CHO 细胞培养工艺的研究

赵丽丽[1,2]，朱玉强[1,2]，徐 凯[1,2]，朱中松[1,2]，张贵民[3]，刘 忠[3*]

（1. 鲁南新时代生物技术有限公司，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：为确定不同高密度接种对双特异性抗体表达量及质量的影响、强化双特异性抗体细胞培养工艺，分别以低、中、高密度［每 1 mL 分别含 (10±1)×10^6、(15±1)×10^6 和 (20±1)×10^6 个细胞］将双特异性抗体细胞接种于 3 L 生物反应器，补料分批次培养，并评估不同接种密度对抗体表达量及质量的影响。结果表明，与较低的高密度接种相比，中等及较高的高密度接种强化工艺所得的抗体表达量提高至 1.43 g/L，且抗体质量无显著差异。相同培养周期 (16 d) 内，在抗体质量不受影响和节约成本的前提下，接种密度应采用中等高密度，抗体表达量可提高到 1.43 g/L，与常规工艺 (0.79 g/L) 相比提高了 81%。随后将中等高密度接种强化工艺成功放大至 30 L 生物反应器，为后续抗体工艺开发提供了宝贵的经验。

关键词：双特异性抗体；培养工艺；补料批次培养；放大培养

中图分类号：TQ464.7 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2024)11-1511-08

引用：赵丽丽，朱玉强，徐 凯，等. 高密度接种强化 CHO 细胞培养工艺的研究［J］. 中国医药工业杂志，2024, 55(11)：1511-1518. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.11.008

Study on Strengthen CHO Cell Culture Technology by High Density Inoculation

ZHAO Lili[1,2], ZHU Yuqiang[1,2], XU Kai[1,2], ZHU Zhongsong[1,2], ZHANG Guimin[3], LIU Zhong[3*]

(*1. Lunan New Time Bio-tech 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: To determine the influence of different high inoculation densities on the expression level and quality of bispecific antibodies and strengthen the cell culture process, bispecific antibody cells were inoculated into a 3 L bioreactor at low, medium and high grades of high inoculation density［containing (10±1)×10^6, (15±1)×10^6 and (20±1)×10^6 cells per 1 mL, respectively］for fed-batch culture. The influences of different inoculation densities on antibody expression level and quality were evaluated. The results showed that compared with low grade of high inoculation density, the antibody expression levels of the intensified medium or high grade of high inoculation density process increased to 1.43 g/L, and there was no significant difference in antibody quality. Within the same culture period (16 d), on the premise of no influence on antibody quality and reduction of costs, medium grade of high inoculation density should be adopted for inoculation density, and the antibody expression level could be increased to 1.43 g/L, which was an 81% increase compared with the conventional process (0.79 g/L). Subsequently, the intensified medium grade of high inoculation density process was successfully scaled up to a 30 L bioreactor, providing valuable experience for subsequent antibody process development.

Key Words: bispecific antibody; culture process; feeding batch culture; scale up culture

中国仓鼠卵巢细胞（Chinese hamster ovary cell，CHO 细胞）是用于蛋白药物生产的主要细胞类型[1]。提高 CHO 细胞蛋白表达量是降低药品成本的重要途径[2—3]；而高产细胞系构建和细胞培养参数优化是提高 CHO 细胞蛋白表达量的重要途径[4—7]。随着生物技术的进步，CHO 细胞生物培养已经从简单的分

收稿日期：2024-06-05

基金项目：泰山产业领军人才工程项目（tscy20200329、tscx202306088）

作者简介：赵丽丽 (1977—)，女，博士，高级研究员，从事蛋白药物研究与开发。

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

E-mail：clevertree@163.com

批培养生产发展到 fed-batch 培养生产[8—10]，促进了细胞密度高增长和培养时间延长[11—12]，从而提高了蛋白的表达量。

灌流生物反应器具有连续化生产蛋白的能力，可在保证质量统一的前提下，提高蛋白表达量，有利于实现蛋白药物的商业化[13]，是细胞培养研究的主要方向。目前，已开发了多种基于灌流生物反应器的细胞分离技术。基于微滤的切向流过滤（tangential flow filtration，TFF）和交替式切向流（alternating tangential flow，ATF）过滤[14—15]是灌流生物反应器中重要的 2 种细胞分离技术，均已被证明在灌流细胞培养方面具有良好的可控性[16]。其中，基于 ATF 过滤的细胞分离装置可通过每个循环的反向流与正向流过滤最大限度地截留细胞，其工作参数的设定大多基于经验推导，形成的通用模型已广泛应用于高密度细胞培养以及高密度接种试验[17—19]。

本研究在 3 L 生物反应器中，以补料批次培养（fed-batch）培养方式培养双特异性抗体的 CHO 细胞，采用 ATF 灌流设备控制细胞接种密度，照 1 ∶ 5 进行接种细胞培养，在培养周期（16 d）下，检测产物的表达量和质量等参数，并对抗体药物的生产工艺放大培养进行初步研究。

1　仪器与试药

CLABD 型 ATF 灌流设备［瑞普利金（上海）生物科技有限公司］；Multitron Pro 型二氧化碳摇床（上海知楚仪器有限公司）；IC1000 型 Countstar 智能细胞计数仪（上海睿钰生物科技有限公司）；My-Control 型和 BIOSTAT^{R} B 型 3 L 生物反应器（荷兰 Applikon 公司和德国 Sartorius 公司）；Cedex Bio HT 型生化分析仪（瑞士罗氏公司）；LC AT-20 型 HPLC 液相系统、PA800 PLUS 型 CE 毛细血管电泳仪（美国 Agilent 公司）；Nano Photometer PEAR 型分光光度计（上海奥析科学仪器有限公司）等。

基础培养基 A（批号 31466994）、补料培养基 FeedA 和 FeedB（批号 31466995）均购自美国 Hyclone 公司；消泡剂 -C、碘乙酰胺、β- 巯基乙醇均购自美国 Sigma 公司；葡萄糖（潍坊盛泰药业有限公司）；氢氧化钠、盐酸均购自西陇科学股份有限公司；硫酸葡聚糖（日本 WAKO 会社）；碳酸氢钠（河北华晨药业集团有限公司）；磷酸氢二钠（湖南九典宏阳制药有限公司）；甲酸和乙酸（四川金山制药有限公司）；氯化钠（江苏省勤奋药业有限公司）；DMSO（德国默克公司）。

CHO 细胞株由本实验室构建及保藏。

2　方法与结果

2.1　常规工艺与中等高密度强化工艺对比

2.1.1　常规工艺与中等高密度强化工艺

N-2 级种子液培养：冻存细胞复苏后，在 37 ℃、5% CO_2 条件下，于基础培养基 A 50 mL 中摇瓶培养至每 1 mL 含 0.3×10^6 ～ 0.6×10^6 个细胞，且细胞活率≥ 90%。于 37 ℃、5% CO_2、摇床（130 r/min）条件下摇瓶扩增培养至 600 mL，继续培养 3 d，当细胞密度为每 1 mL 含 4×10^6 ～ 6×10^6 个细胞且细胞活率≥ 90%，即得 N-2 级种子液。

常规工艺培养 N-1 级种子液：取 N-2 级种子液 300 mL 接种于培养基 1.2 L 中，置 3 L 生物反应器中，设置起始温度为 37 ℃，起始 pH 值为 7.00±0.20，起始搅拌转速为 200 r/min（后续需根据氧气通气量进行调节），溶氧量为 35%，空气通气量为 60 mL/min，氧气通量与溶氧级联控制。培养 3 d，当细胞密度为每 1 mL 含 3×10^6 ～ 5×10^6 个细胞且细胞活率≥ 95%，即得 N-1 级种子液。

中等高密度强化工艺 N-1 级种子液培养：取 N-2 级种子液 300 mL 接种于培养基 1.2 L 中，置 3 L 生物反应器中，设置起始温度为 37 ℃，起始 pH 值为 7.00±0.20，起始搅拌转速为 200 r/min（后续需根据氧气通气量进行调节），溶氧量为 35%，空气通气量为 60 mL/min，氧气通量与溶氧级联控制。当细胞密度为每 1 mL 含≥ 3×10^6 个细胞（糖浓度<5 g/L）时，开始灌流培养，灌流培养 6 d，当活细胞密度达每 1 mL 含 74×10^6 ～ 76×10^6 个细胞且细胞活率≥ 95%，即得 N-1 级种子液。

发酵培养：取 N-1 级种子液 300 mL 接种于 1.2 L 培养基中，置 3 L 生物反应器中，设置起始温度为 37 ℃，降温策略及补料策略如表 1 所示，起始 pH 值为 7.00±0.20，降温后控制 pH 值为 7.00±0.10，起始搅拌转速为 200 r/min（后续需根据氧气通气量进行调节），溶氧量为 35%，空气通气量 60 mL/min，氧气通量与溶氧级联控制，培养周期为 16 d。

表 1 常规工艺与中等高密度强化工艺的工艺参数

Tab.1 Process Parameters of Conventional Process and Intensified Medium Grade of High Inoculation Density Process

培养工艺	降温密度	降温策略	补料策略
常规工艺	每 1 mL 含 (21±1)×10^6 个细胞	D5 降温至 31 ℃	D3 2%；D4 ～ D15 3%
中等高密度强化工艺	每 1 mL 含 (38±2)×10^6 个细胞	D2 降温至 31 ℃	D0 ～ D2 3%；D3 ～ D15 4%

2.1.2 活细胞密度和细胞活率

培养过程中，采用台盼蓝染色法计数，每天检测活细胞密度和细胞活率。结果（图 1）显示，常规工艺培养的细胞在 D7 进入稳定期，最高活细胞密度达到每 1 mL 含 26.4×10^6 个细胞，细胞活率为 99.02%；而中等高密度强化工艺培养在 D3 进入稳定期，最高活细胞密度达到每 1 mL 含 44.4×10^6 个细胞，细胞活率为 97.93%。常规工艺 D6 降温比中等高密度强化工艺延迟 3 d，因此蛋白稳定表达期相较于中等高密度强化工艺少 3 d；而常规工艺活细胞密度自 D11 开始下降，而中等高密度强化工艺的活细胞密度虽然自 D7 开始下降，但仍明显高于常规工艺；D16 收获细胞时，常规工艺细胞活率（87.68%）低于中等高密度强化工艺（89.22%）。

2.1.3 细胞代谢情况

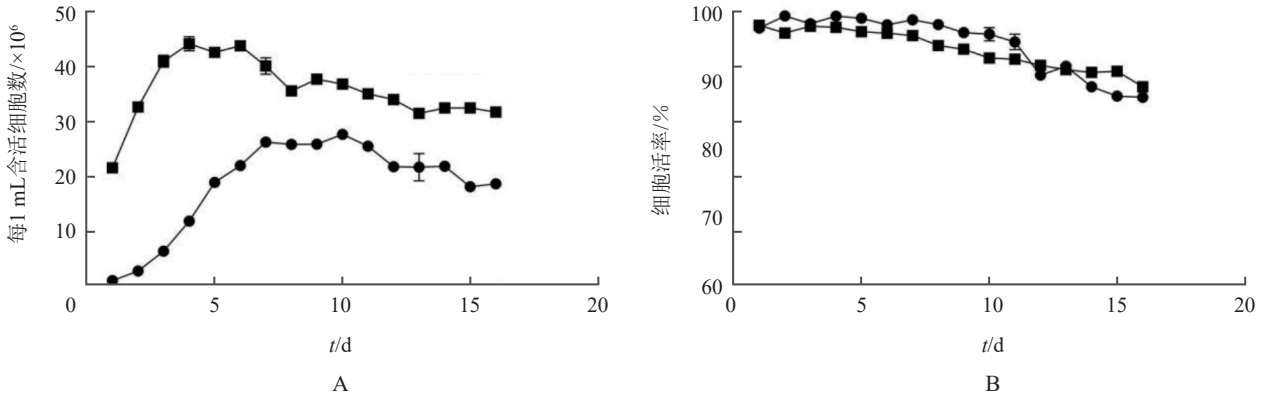
用生化分析仪测定葡萄糖浓度、铵离子浓度、乳酸浓度。结果（图 2）显示，因中等高密度强化工艺的活细胞密度明显高于常规工艺，所以消耗的葡萄糖偏多，但培养至 D7 时 2 种工艺的葡萄糖消耗基本趋于一致。中等高密度强化工艺培养至 D2 时，乳酸浓度到达峰值，而常规工艺培养至 D3 时达到峰值。由于中等高密度强化工艺的活细胞密度偏高，乳酸从 D2 开始消耗，比常规工艺提前 3 d；培养至 D11 时，2 种工艺的乳酸消耗量基本趋于一致。前期由于中等高密度强化工艺的活细胞密度高，培养至 D2 ～ D4 时铵离子有短期下降趋势，随着培养时间延长，后期会迅速积累，但细胞收获时 2 种工艺的铵离子浓度基本趋于一致。

2.1.4 蛋白表达量与纯度

分别收获 2 种工艺培养至 D14、D15、D16 的培养液，离心 (2 665×*g*) 15 min，取上清液，经 0.22 μm 滤膜过滤后，以亲和色谱法纯化，采用高通量微流控全波长分光光度仪检测蛋白表达量。

色谱条件：色谱柱 MabSelect SuRe LX 柱 (5 mL)；色谱柱平衡流动相 A（含 0.15 mol/L 氯化钠的 20 mmol/L 磷酸氢二钠溶液，pH 7.4），流速 5 mL/min；样品体积 5 mL；样品流速 5 mL/min；洗脱流动相 B（50 mmol/L 乙酸，pH 3.0），流速 5 mL/min；收峰范围 10 mAu- 峰尖 -10 mAu。

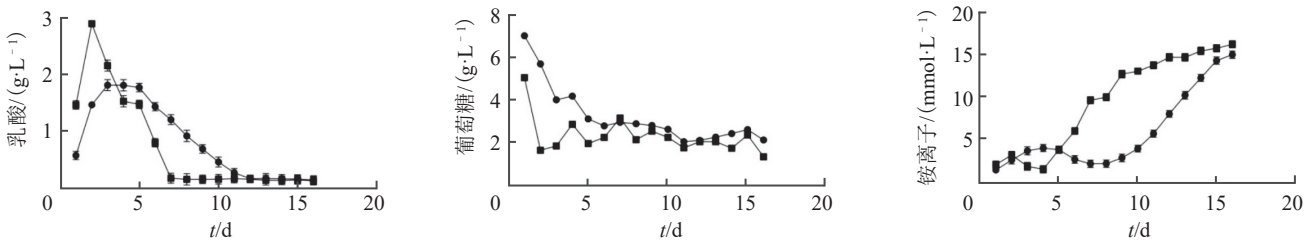
蛋白含量测定：收集洗脱液，用分光光度计在



●—常规工艺；■—中等高密度强化工艺。

图 1 常规工艺与中等高密度强化工艺的活细胞密度（A）与细胞活率（B）（*n*=3）

Fig.1 Cell Density (A) and Cell Viability (B) of Conventional Process and Intensified Medium Grade of High Inoculation Density Process (*n*=3)



A—乳酸代谢；B—葡萄糖代谢；C—铵离子代谢。

●—常规工艺；■—中等高密度强化工艺。

图 2　常规工艺与中等高密度强化工艺的细胞代谢参数（*n*=3）

Fig.2　Cell Metabolic Parameters of Conventional and Intensified Medium Grade of High Inoculation Density Process (*n*=3)

波长 280 nm 下检测吸光值，计算蛋白浓度。

取培养至 D16 的样品，采用体积排阻色谱（size exclusion chromatography，SEC）-HPLC 法测定蛋白纯度。

样品处理：取用流动相 A（含 50 mmol/L 甲酸水溶液）稀释至 1.0 mg/mL 的纯化样品 80 μL，加入氯化钠溶液（200 mmol/L pH 7.0）20 μL，混匀。

SEC-HPLC 试验：色谱柱 TSKgel G3000SW$_{XL}$ 柱；色谱柱平衡 流动相 A；样品上样 自动进样；样品体积 100 μL；样品流速 0.5 mL/min；检测波长 280 nm；检测时间 40 min；柱温（8±2）℃。按峰面积归一化法计算得出蛋白的纯度。

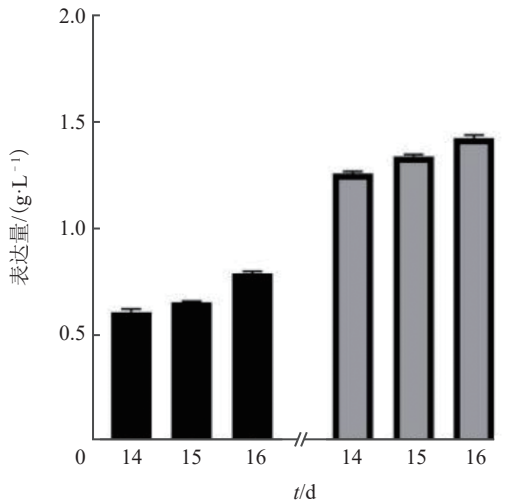
取培养至D16的样品，采用毛细管电泳（capillary electrophoresis，CE）-SDS 法测定蛋白纯度。

非还原样品处理：取用碘乙酰胺稀释至 1 mg/mL 的纯化样品 95 μL，加入 0.8 mmol/L 碘乙酰胺溶液 5 μL，于 70 ℃加热 10 min。

还原样品处理：取用上述碘乙酰胺溶液稀释至 1 mg/mL 的纯化样品 95 μL，加入 β- 巯基乙醇 10 μL，于 70 ℃加热 10 min。

CE-SDS 试验：用 0.1 mmol/L 氢氧化钠溶液在 413.68 kPa（60 psi）下冲洗 3 min，再用 0.1 mmol/L 盐酸在 413.68 kPa（60 psi）下冲洗 2 min，然后用纯化水在 482.63 kPa（70 psi）下冲洗 1 min，用 SDS 胶在 344.73 kPa（50 psi）下冲洗毛细管 15 min；用纯化水沾洗毛细管反相极性 10 kV 进样 40 s，纯化水沾洗毛细管反相极性 SDS 胶 15 kV 加电分离 40 min，结果按峰面积归一化法计算得出蛋白的纯度。

结果显示，中等高密度强化工艺抗体表达量明显高于常规工艺，D16 收获的蛋白表达量（1.43 g/L）相比常规工艺（0.79 g/L）提高约 81%（图 3）；与常规工艺相比，中等高密度强化工艺产品的 SEC 主峰明显升高 14.7%，SEC 聚体明显降低 18.9%，而抗体的 CE-SDS 还原和非还原主峰并无差异（表 2）。



■一常规工艺；■一中等高密度强化工艺。

图 3　常规工艺与中等高密度强化工艺的蛋白表达量（*n*=3）

Fig.3　Protein Expression of Conventional Process and Intensified Medium Grade of High Inoculation Density Process (*n*=3)

表 2 常规工艺与中等高密度强化工艺抗体质量参数（n=3）

Tab.2 Quality Parameters of Conventional Process and Intensified Medium Grade of High Inoculation Density Process (n=3)

培养工艺	SEC/%		CE-SDS/%	
	聚体	主峰	非还原主峰	还原主峰
常规工艺	25.9±0.2	57.3±0.3	96.0±0.1	96.5±0.4
中等高密度强化工艺	7.0±0.2	72.0±0.3	96.2±0.1	99.2±0.1

2.2 不同细胞密度的高密度强化工艺对比

按“**2.1**”项下方法灌流培养中等高密度强化工艺 N-1 级种子液，至细胞密度分别为每 1 mL 含 $(50\pm5)\times10^6$（较低的高密度）、$(75\pm5)\times10^6$（中等高密度）、$(100\pm5)\times10^6$（较高的高密度）个细胞时，分别取 300 mL 接种于培养基装量为 1.2 L 的 3 L 生物反应器中，按“**2.1**”项下方法发酵培养。因接种密度不同，较低的高密度强化工艺补料策略及降温密度与常规工艺相同，而较高和中等的高密度强化工艺相同；其他工艺保持一致。每天检测活细胞密度、细胞活率、葡萄糖浓度、铵离子浓度和乳酸浓度，培养至 D16 时测定蛋白表达量及质量。

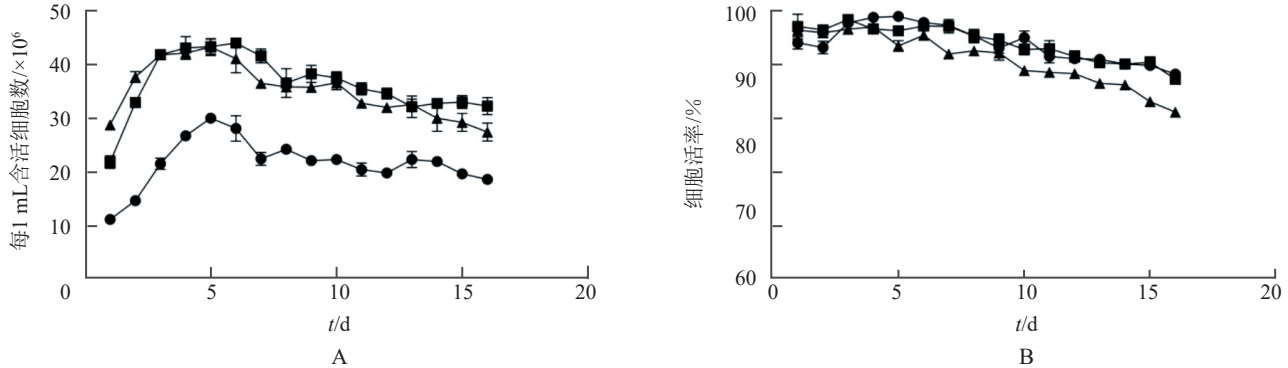
细胞生长情况如图 4 所示，与较低的高密度强化工艺相比，中等与较高的高密度强化工艺的活细胞密度明显较高；在较高的高密度强化工艺中，细胞于 D3 进入稳定期，细胞密度与中等高密度强化工艺基本一致。随着培养时间延长，较高的高密度强化工艺的活细胞密度逐渐下降，但总体细胞密度积分明显高于较低的高密度强化工艺。较低的高密度强化工艺中的细胞于 D6 进入稳定期，活细胞密度与常规工艺基本一致。至 D16 蛋白收获时，较高的高密度强化工艺中的细胞活率显著低于较低和中等的高密度强化工艺，后二者基本一致。

细胞代谢情况如图 5 所示，中等和较高的高密度强化工艺的葡萄糖大量消耗，而较低的高密度强化工艺中 D2 开始消耗葡萄糖。在较高的高密度强化工艺中，接种后乳酸迅速消耗，于 D7 趋于稳定；而较低和中等的高密度强化工艺于 D2 开始消耗乳酸，D7 时趋于稳定，三者的乳酸代谢基本一致。3 种工艺的铵离子代谢趋势基本一致，D16 收获蛋白时，铵离子代谢无明显差异。

较低、中等和较高的高密度强化工艺所得的蛋白表达量分别为 0.93、1.41、1.45 g/L，后 2 种工艺的蛋白表达量基本一致，比前者提高约 54%（图 6）；三者 SEC 和 CE-SDS 之间并无差异（表 3）。

2.3 30 L 生物反应器放大培养

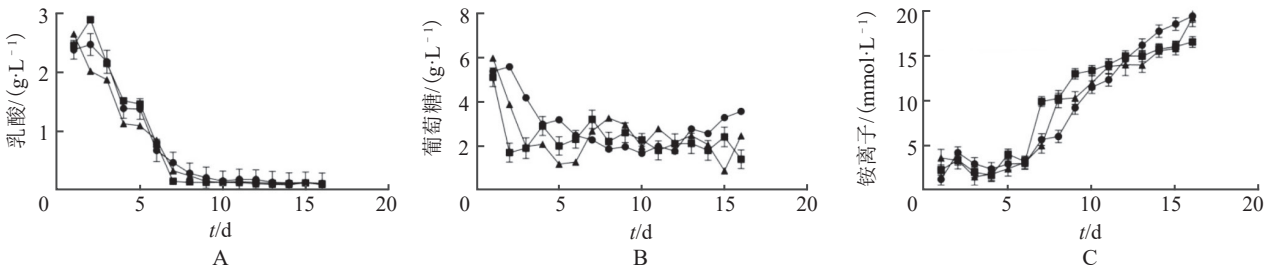
以每 1 mL 含 $(15\pm1)\times10^6$ 个细胞的接种密度进行 30 L 生物反应器等 P/V 放大研究。工艺及培养过程，检测代谢产物和测定表达量及质量参数均参照



●—较低的高密度强化工艺；■—中等高密度强化工艺；▲—较高的高密度强化工艺。

图 4 不同密度的高密度培养强化工艺的活细胞密度曲线（A）与细胞活率曲线（B）（n=3）

Fig.4 Cell Density Curves (A) and Cell Viability Curves (B) of Intensified High Inoculation Density Process with Different Densities (n=3)

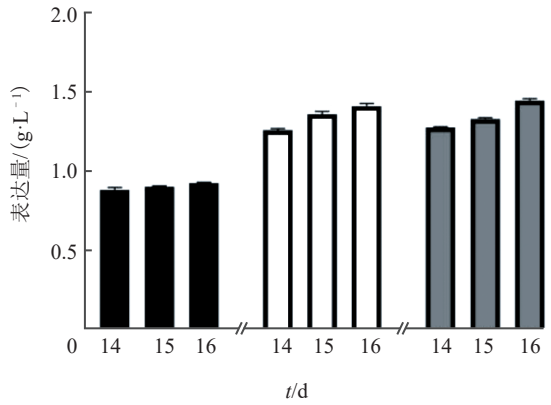


A—乳酸浓度；B—葡萄糖浓度；C—铵离子浓度。

●—较低的高密度强化工艺；■—中等高密度强化工艺；▲—较高的高密度强化工艺。

图 5　不同密度的高密度强化工艺中细胞的代谢参数（*n*=3）

Fig.5　Cell Metabolic Parameters of Intensified High Inoculation Density Process with Different Densities (*n*=3)



■—较低的的高密度强化工艺；□—中等高密度强化工艺；

■—较高的高密度强化工艺。

图 6　不同密度的高密度强化工艺的蛋白表达量（*n*=3）

Fig.6　Protein Expressions of Intensified High Inoculation Density Process with Different Densities (*n*=3)

表 3　不同密度的高密度强化工艺中抗体的质量参数（*n*=3）

Tab.3　Quality Parameters of Antibodies Produced by Intensified High Inoculation Density Process with Different Densities (*n*=3)

高密度强化工艺的密度级别	SEC/%		CE-SDS/%	
	聚体	主峰	非还原主峰	还原主峰
较低	6.3±0.2	75.8±0.2	96.1±0.1	99.0±0.1
中等	7.3±0.1	71.9±0.2	96.3±0.1	99.1±0.1
较高	6.2±0.2	74.8±0.3	95.7±0.2	96.3±0.4

“**2.1**”项。

细胞生长情况如图 6 所示，放大培养工艺与中等高密度强化工艺 D3 的活细胞密度一致，此后放大培养工艺的活细胞密度下降，但从 D8 开始，2 种工艺皆进入稳定期；细胞培养过程中，细胞活率基本保持一致。

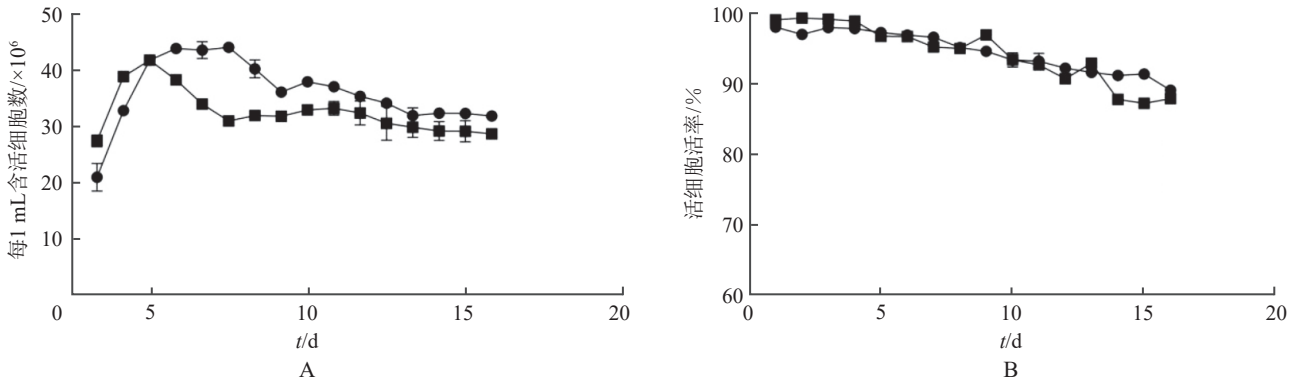
细胞代谢情况如图 7 所示，放大培养工艺与中等高密度强化工艺的细胞代谢趋势基本一致。前期，放大培养过程的细胞增长较快，导致乳酸快速积累和葡萄糖大量消耗，但与中等高密度强化工艺的细胞代谢趋势基本一致；放大培养工艺中的铵离子代谢至 D5 后，整体比中等高密度强化工艺偏高，但整体趋势基本一致。

蛋白表达量和纯度如表 4 所示，收获放大培养工艺 D16 的蛋白并测定表达量，结果为 1.47 g/L，与中等高密度强化工艺所得的蛋白表达量基本一致。将 D16 时收获的培养液离心、取上清液、纯化后，测定蛋白纯度和还原及非还原情况，结果显示 2 种工艺产品的 SEC 和 CE-SDS 结果之间并无差异。

3　讨论

CHO 细胞是重组蛋白商业化生产中常用的宿主细胞之一。尽管 CHO 细胞能生产高质量的生物蛋白，但与基于细菌或酵母的表达系统相比，在生物制药生产中仍然受到许多因素的影响。例如，细胞生长受限、蛋白生产率低、细胞耐受性低以及蛋白纯度低等。除了优化培养基和载体外，灌流技术[20—21]的引入与使用，为CHO细胞工艺的开发铺平了道路、奠定了基础。

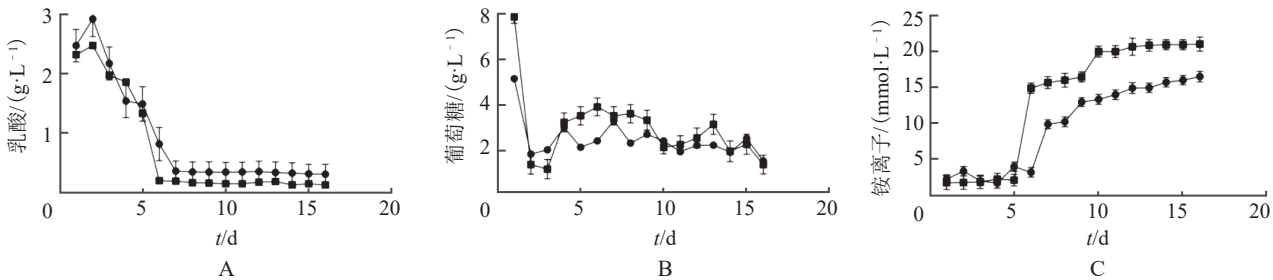
目前，开发市场可接受的双特异性抗体产品的一种切实可行方法是使用灌流设备，解决实际瓶颈



●—中等高密度强化工艺；■—放大培养工艺。

图 6 中等高密度强化工艺与放大培养工艺的活细胞密度曲线（A）与细胞活率曲线（B）（*n*=3）

Fig.6 Live Cell Density Curves (A) and Cell Viability Curves (B) of Intensified Medium Grade of High Inoculation Density Process and Scale up Culture Process (*n*=3)



●—中等高密度强化工艺；■—放大培养工艺。

A—乳酸浓度；B—葡萄糖浓度；C—铵离子浓度。

图 7 中等高密度强化工艺与放大培养工艺的细胞代谢参数（*n*=3）

Fig.7 Cell Metabolic Parameters of Intensified Medium Grade of High Inoculation Density Process and Scale up Culture Process (*n*=3)

表 4 中等高密度强化工艺与放大培养工艺所得抗体的质量参数与表达量（*n*=3）

Tab.4 Quality Parameters and Expression Levels of Intensified Medium Grade of High Inoculation Density Process and Scale up Culture Process (*n*=3)

培养工艺	SEC/%		CE-SDS/%		表达量/(g·L⁻¹)
	聚体	主峰	非还原主峰	还原主峰	
中等高密度强化工艺	7.1±0.1	72.6±1.1	96.4±0.3	99.1±0.1	1.44±0.01
放大培养工艺	7.0±0.1	75.1±0.2	96.4±0.4	98.9±0.3	1.47±0.01

问题。例如，N-1 级灌流，指通过 ATF 细胞截留设备将细胞密度提高到所需密度，以 N-1 级罐作为种子的强化工艺过程。本文证明了在不引入其他设备、降低污染风险、不影响产品质量的前提下，提高接种密度的灌流培养工艺可提高蛋白表达量。通过灌流培养，细胞密度从每 1 mL 含 (50±5)×10^6 个细胞提高到每 1 mL 含 (100±5)×10^6 个细胞。照 1 ∶ 5 接种 N 级种子罐培养后，初始细胞密度从每 1 mL 含 (10±1)×10^6 个细胞提高到每 1 mL 含 (20±1)×10^6 个细胞，使细胞跳出适应期迅速进入稳定期，进而大幅提高蛋白表达量，且各生化参数和质量指标均较为稳定。进一步对比了不同接种密度的高密度强化工艺，结果显示中等高密度接种优于较低和较高的高密度接种，蛋白的表达量提高且各生化参数和质量指标基本一致，并且成功进行了放大培养，为后续双抗工艺开发提供了宝贵的经验。

除关注灌流技术的复杂性和工艺放大等问题外，未来需进一步优化灌流培养基的成分及其组成，提

高灌流过程中细胞密度与所需培养基的投入产出比，从而降低罐流过程的生产成本。

参考文献：

[1] HARCUM S W, LEE K H. CHO cells can make more protein [J]. *Cell Syst*, 2016, **3**(5): 412-413.

[2] ZHAO L, WANG C, WANG J Q, *et al*. Low CO_2 partial pressure steers CHO cells into a defective metabolic state [J]. *Biotechnol Lett*, 2023, **45**(9): 1103-1115.

[3] TANG D M, WENDY S, LIU P, *et al*. Preventing pyruvate kinase muscle expression in Chinese hamster ovary cells curbs lactogenic behavior by altering glycolysis gating pyruvate generation and increasing pyruvate flux into the TCA cycle [J]. *Biotechnol Prog*, 2021, **37**(5): e3193.

[4] ZHU Z Y, CHEN X Q, LI W H, *et al*. 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 [J]. *Biotechnol Prog*, 2023, **39**(4): e3352.

[5] SAVIZI I S P, MAGHSOUDI N, MOTAMEDIAN E, *et al*. Valine feeding reduces ammonia production through rearrangement of metabolic fluxes in central carbon metabolism of CHO cells [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2022, **106**(3): 1113-1126.

[6] NAIK H M, KUMAR S, REDDY J V, *et al*. Chemical inhibitors of hexokinase-2 enzyme reduce lactate accumulation alter glycosylation processing and produce altered glycoforms in CHO cell cultures [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2023, **120**(9): 2559-2577.

[7] MONTÉGUT L, MARTÍNEZ-BASILIO P C, DA VEIGA MOREIRA J, *et al*. Combining lipoic acid to methylene blue reduces the Warburg effect in CHO cells: from TCA cycle activation to enhancing monoclonal antibody production [J]. *PLoS One*, 2020, **15**(4): e0231770.

[8] BIBILA T A, ROBINSON D K. In pursuit of the optimal fed-batch process for monoclonal antibody production [J]. *Biotechnol Prog*, 1995, **11**(1): 1-13.

[9] XU W J, LIN Y, MI C L, *et al*. Progress in fedbatch culture for recombinant protein production in CHO cells [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2023, **107**(4): 1063-1075.

[10] YANG W C, LU J Y, NGUYEN N B, *et al*. Addition of valproic acid to CHO cell fed-batch cultures improves monoclonal antibody titers [J]. *Mol Biotechnol*, 2014, **56**(5): 421-428.

[11] BEN YAHIA B, MALPHETTES L, HEINZLE E. Predictive macroscopic modeling of cell growth metabolism and monoclonal antibody production: case study of a CHO fed-batch production [J]. *Metab Eng*, 2021, **66**: 204-216.

[12] 牛宇辉 , 李洪珊 , 李殿玉 , 等. 重组人血清白蛋白在 CHO 细胞中的高效表达及其培养工艺优化 [J]. 中国生物制品学杂志 , 2023, **36**(9): 1054-1071.

[13] POLLOCK J, COFFMAN J, HO S V, *et al*. Integrated continuous bioprocessing: economic operation, and environmental feasibility for clinical and commercial antibody manufacture [J]. *Biotechnol Prog*, 2017, **33**(4): 854-866.

[14] CLINCKE M F, MÖLLERYD C, ZHANG Y, *et al*. Study of a recombinant CHO cell line producing amonoclonal antibody by ATF or TFF external filter perfusion in a WAVE Bioreactor™ [J]. *BMC Proc*, 2011, **5**(Suppl 8): P105.

[15] BERTRAND V, KARST DJ, BACHMANN A, *et al*. Transcriptome and proteome analysis of steady-state in a perfusion CHO cell culture process [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2019, **116**(8): 1959-1972.

[16] ZAMANI L, LUNDQVIST M, ZHANG Y, *et al*. High cell density perfusion culture has a maintained exoproteome and metabolomes [J]. *Biotechnol J*, 2018, **13**(10): e1800036.

[17] MACDONALD M A, NÖBEL M, ROCHE RECINOS D, *et al*. Perfusion culture of Chinese hamster ovary cells for bioprocessing applications [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2022, **42**(7): 1099-1115.

[18] MACDONALD M A, NÖBEL M, MARTÍNEZ V S, *et al*. Engineering death resistance in CHO cells for improved perfusion culture [J]. *MABS*, 2022, **14**(1): 2083465.

[19] 杨建军 , 隋礼丽. WAVE™ 生物反应器灌注培养生产种子细胞的开发和应用 [J]. 生物工程学报 , 2012, **28**(3): 358-367.

[20] LANG Z, YAN S F, XIANG Q Q, *et al*. WAVE-base intensified perfusion cell culture for fast process development [J]. *Biotechnol Lett*, 2023, **45**(9): 1117-1131.

[21] SU Y N, WEI Z H, MIAO Y N, *et al*. Optimized process operations reduce product retention and column clogging in ATF-based perfusion cell cultures [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2021, **105**(24): 9125-9136.