

doi: 10.3969/j.issn.1672-3678.2016.02.014

搅拌式动物细胞反应器研究应用与发展

骆海燕¹ 窦冰然² 姜开维¹ 洪厚胜^{1,3}

1. 南京工业大学 生物与制药工程学院 江苏 南京 211800;
2. 南京工业大学 化学与分子工程学院 江苏 南京 211800;
3. 南京汇科生物工程设备有限公司 江苏 南京 210009)

摘要: 随着动物细胞表达的治疗型重组蛋白的应用越来越广,动物细胞大规模培养技术备受关注,其中机械搅拌式动物细胞生物反应器得到了广泛应用。本文对搅拌式动物细胞培养罐的结构功能进行了系统性的介绍,总结了其特性及国内外的研究现状与应用,最后指出其研发尚存在的问题及对未来的展望。

关键词: 大规模动物细胞培养; 搅拌式生物反应器; 结构; 应用

中图分类号: Q813.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-3678(2016)02-0075-06

Progress in stirred tank bioreactor for animal cell culture

LUO Haiyan¹, DOU Bingran², JIANG Kaiwei¹, HONG Housheng^{1,3}

1. College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211800, China;
2. College of Chemistry and Molecular Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211800, China;
3. Nanjing Highke Bioengineering Equipment Co. Ltd., Nanjing 210009, China)

Abstract: Animal cell culture in large-scale reactors becomes critical with the rapid development of animal cell culture technology and the growth of therapeutic protein demand. Stirred tank bioreactor becomes most widely applied. This paper reviews the structure and function of stirred tank bioreactor, introduces the application of hydromechanics in the animal cell culture. We summarize recent literatures about the development of stirred tank bioreactor. Finally we pointed out the difficulties existing in the research and application prospect of stirred tank bioreactor.

Keywords: large-scale animal cell culture; stirred tank bioreactor; structure; function

近年来,动物细胞培养技术的发展极大地推进了现代生物医药产业的发展^[1-4]。该技术被广泛应用于单克隆抗体的制备、重组蛋白药物的研发、人造器官移植等行业,成为生物制药领域的关键技术之一。随着全球对生物制品需求的快速增长^[5],动物细胞大规模培养技术也越来越受到人们的青睐,而作为动物细胞大规模培养中不可代替的主要设备——生物反应器,在生物制品的生产中也起到了

越来越重要的作用。它能够有效增加细胞单位体积的培养密度,从而为动物细胞的大规模生产奠定坚实的基础。

动物细胞培养反应器种类多样,常规应用较多的有机械搅拌式^[6]、激流式^[7]、气升式^[8]、一次性袋式^[9]、笼式通气搅拌^[10]和固定床式^[11]等,其中,搅拌式动物细胞反应器研究较为成熟,其操作与微生物发酵罐相似,工艺操作简单易行,成为生物制品

收稿日期: 2015-10-18

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)(2012AA021201)

作者简介: 骆海燕(1991—),女,江苏盐城人,研究方向:动物细胞培养;洪厚胜(联系人),研究员,E-mail: hhs@njtech.edu.cn

生产的主流趋势。

1 搅拌式动物细胞反应器定义及特点

搅拌式动物细胞反应器的主要容器为类似发酵罐的罐体,罐内安装搅拌装置,密闭状态下由电动机带动桨叶混合培养液,批次培养、流加培养或灌注培养动物细胞使之增殖扩大,因此可定义为机械搅拌式动物细胞培养罐。它是最早被采用且工艺技术较为成熟的一种生物反应器。在诸多生物反应器类型中,该反应器最能体现动物细胞培养专用生物反应器的设计理念。搅拌式动物细胞反应器通常由罐体、搅拌器、管路、阀门、泵及电动机组成,由电动机带动搅拌桨叶混合培养液,通过搅拌器的作用使细胞和养分在培养液中均匀分布,并且在罐体安装的不同传感器,用以在线持续检测培养液的pH、温度、溶氧(DO)等重要参数,以维持细胞生存环境的稳定性。小罐通常采用硅硼酸盐玻璃制作,用于实验室研究使用;大罐采用不锈钢材质,用于大规模生产。

目前FDA批准的主流生产工艺是以机械搅拌式生物反应器为前提下的流加培养工艺,这也是当前动物细胞大规模培养的主流工艺。机械搅拌式生物反应器优点在于工艺简单、操作灵活,并且对于不同的贴壁细胞系或悬浮细胞系都能有良好的适用性;其培养工艺容易放大,可以为细胞生长和增殖提供均质的环境;产品质量稳定,非常适合于工厂化生产生物制品;管路布置较为简单,提供较好的无菌条件,细胞生长过程中不易污染。虽然搅拌所产生的剪切力对细胞有害,但是通过选择合适的搅拌桨型并调整其结构尺寸,或者是在动物细胞培养工艺中加入非离子表面活性剂Pluronic F68、部分血清和牛血清白蛋白和硫酸葡聚糖等^[12],可减弱搅拌和通气过程中流体剪切力对细胞造成的损害程度。

2 搅拌式动物细胞反应器系统结构与功能

搅拌式动物细胞反应器整套系统由罐体、支架管路和控制器三大部分组成。通常选用触摸屏软件控制,并且具备计算机终端远程控制功能,可以实现培养罐中搅拌转速、温度、pH、溶氧等自动控制,另外具备数据记录和历史记录查找功能。

2.1 罐体

不同规模罐体设计材质不一样,实验室规模性

的小型罐体(10 L以内)可选择硼硅酸盐玻璃;10 L以上则由耐腐蚀的316不锈钢或者一次性无菌袋制成,用于大规模生产,罐体内壁面光滑,按压力容器要求设计。罐体外壁或法兰盘安装温度、pH、DO、液位和消泡等传感器,在线连续监测和调整细胞生长过程,对于不锈钢型细胞罐,还配置灯镜、视镜、取样阀和放料阀等。罐体内部主要由挡板、搅拌桨、气体分布器和挡板组成,这3个部件与培养罐内物料混合传质密切相关。挡板加强罐内流体湍动效果,避免形成大旋涡,一般4块挡板就能达到全挡板条件;搅拌桨是核心结构,搅拌桨叶应具备低剪切和良好的混合特性,让细胞正常生长;气体分布器用于曝气,达到细胞的溶氧需求。图1是搅拌式动物细胞反应器罐体的基本模型及其结构。

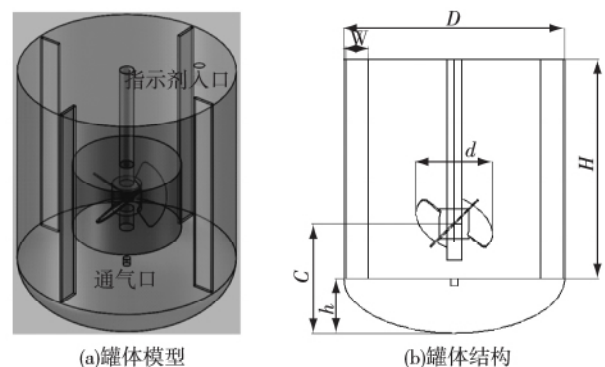


图1 搅拌式动物细胞反应器结构

Fig. 1 Structure of stirred tank bioreactor

2.1.1 搅拌器的类型与特征

不同细胞培养罐的搅拌器有不同的选择,如篮式、笼式、双层推进式、旋转滤器结合推进式及象耳式(Elephant Ear)等。图2是不同搅拌桨叶的实物图。其中篮式和笼式属于细胞提升式桨,前者应用于贴壁类细胞固定化培养,其中细胞贴附在聚酯纤维纸片^[13]上,纸片直径6 mm时在罐内流动缓慢,适合溶氧需求低、对剪切敏感的贴壁细胞,如HEK-293细胞;后者配通气搅拌桨适用于贴壁细胞微载体培养,如培养Vero细胞,微载体直径在60~200 μm^[13]间,常用的商品化微载体有Cytodex1、Cytodex2、Cytodex3、Cytopore和Cytoline^[14-18]。笼式桨轴外包有75 μm不锈钢丝网作为通气腔,即气体曝气后产生气泡经丝网破碎,分成气、液两部分,多余的气泡上升到顶部消泡腔,进一步破碎最终从尾气排走,微载体直径比丝网孔大,进不去通气腔,这样在保证传氧需求时大大减弱气体破裂过程中的剪切力,

搅拌转速一般在 30 ~ 60 r/min 范围内,所以通气量可根据细胞需求适当提高。

双层推进式和旋转过滤器结合推进式都装配推进式轴流桨。前者罐内容易形成大的流体轴向循环流动,推进式剪切力低,适用于大部分中悬浮细胞培养;后者装配旋转过滤器和推进式桨叶,用于悬浮细胞灌注高密度培养,旋转过滤器作用是细胞截留功能,旋转壁上分布各个筛孔,一般筛孔大小为 20 ~ 50 μm ,具体筛孔大小需要针对所培养细胞大小对应设计。然而长时间的高密度培养容易造成细胞的结团,从而导致旋转过滤器的堵塞,因而选择好合适孔径的同时,筛网材料选择也很重要,不锈钢加特氟龙表面就有很好的防粘效果^[19]。

另外,Deo 等^[20]发现高的转速可使旋转过滤器免于堵塞,无堵塞下的最大灌注速率与筛网表面的切向速度的平方相关。

除此之外,象耳桨也广泛应用于动物细胞悬浮培养。赵晓伟^[21]结合 CFD 数值模拟方法分析象耳式 (Elephant Ear) 桨与其他 3 种常用搅拌桨叶在流场传质性能及剪切大小进行仿真对比,得出该桨叶综合了轴流桨和径流桨的优点:流场分布均匀,产生的剪切较小,能适用于大规模动物细胞反应器。Zhu 等^[22]应用 PIV 实验研究了 Elephant Ear 桨在不通气与不同通气量情况下所产生的流场,高速相机拍下的液体运动轨迹图像证明了该桨具有良好的混合性能,另外流场中的湍动能比较小,即对细胞造成的损伤小。



图2 搅拌桨叶的类型

Fig. 2 Different impellers of stirred tank bioreactor

2.1.2 气体分布器的类型及特征

传统的气体分布器包括 3 种类型: 钻孔 L 型结构简单,加工便利,适用于小型细胞罐内,属于细胞罐前期产品开发中设计的结构,但目前大多公司较少采用;金属烧结微泡型最先由美国 Mott 公司开发设计,气体分布器采用重力烧结和冷等静压过程制成,曝气后气体在烧结层内部多次打碎气泡,然后进入罐内,气泡尺度较小,溶氧效果可观,但容易“堵孔”,目前在德国赛多利斯商品化细胞罐中使用;钻孔环型分布器在中小规模发酵罐中常常使用,在动物细胞罐中同样适用,在适量通气速度下,开孔大小在 1 mm^[23] 曝气溶氧效果可观,目前国内外多家公司都选择使用钻孔环型气体分布器。

2.2 支架管路

支架管路系统复杂,集成蒸汽灭菌管路、控温管路、通气管路、取样管路、补料管路和放料管路,对于实验室台式玻璃罐,管路选配医药卫生级硅胶软管,设计无菌管路接口方便实验操作;对于不

锈钢罐的管路,物料管路必须选择 316 L 不锈钢,设计最好能满足全自动在位灭菌 (SIP) 和在位清洗 (CIP) 功能。

2.3 控制器

动物细胞培养罐的控制器,采集系统运行时的各种状态参数,如转速、pH、温度和溶氧,如果设备自动化程度高,只需要手动操作控制器就可位在位灭菌和在位清洗。目前以西门子公司的 PLC 模块控制为技术最优,搭配触摸屏和与罐体相连的各种传感器,保证设备正常操作运转。

3 搅拌式动物细胞反应器研究现状

3.1 国外研究现状

国内外众多企业都致力于动物细胞反应器的研究^[24],其中国外多家公司投入大量资金和人力研究开发动物培养罐,并早已进入商品化、产业化时期。虽然多种规模类型培养罐都已开发齐全,但是机械搅拌动物细胞培养罐仍是主流产品。如 Lonza 公司应用

20 000 L 机械搅拌动物细胞罐悬浮培养细胞生产抗体; Genentech 公司应用机械搅拌动物细胞罐培养 CHO 细胞生产 t-PA 重组蛋白, 放大规模到 12 000 L。

美国的生物工程巨头企业全球居多, 其中美国 New Brunswick Scientific(NBS) 公司是世界著名的生物反应器制造公司, 在动物细胞培养罐销售制造方面也是领头羊角色。该公司开发的 CelliGen BLU 小型玻璃培养罐是种多功能型通用式罐, 根据桨叶或通气量的不同, 既能培养动物细胞, 又能培养微生物, 该罐体没有夹套, 采用玻璃罐壁电加热, 罐体容量在 5 L 以内; CelliGen 310 是典型的机械搅拌动物细胞培养罐, 对不同贴壁细胞或悬浮细胞, 细胞批次培养、流加培养或灌注培养配制不同结构搅拌系统, 精确的自控软件设计系统使之操作简易, 保证细胞正常生长; BioFlo Pro 是不锈钢型搅拌式细胞培养罐, 用于中试生产, 采用 SIP 消毒系统保证无菌要求, 符合 GMP 标准, 循环水控温和通气系统设计稳定可靠。

德国的默克密理博公司研发的一次性无菌塑料袋有 50 和 200 L 2 种规模, 主要用于工业生产, 采用一次性袋式细胞培养罐时, 免去了复杂的灭菌和清洗步骤, 袋子通过无菌空气可最终鼓成圆柱型, 并有多个无菌接口连接搅拌轴、传感器及气体分布器管路, 外部的不锈钢夹套不仅能固定袋子随着流体运动, 同时起到了控温效果。德国贝朗公司研发的 BIOSTAT. B 是实验室台式玻璃细胞罐, 产品设计精巧灵活, 专为研发、工艺开发而设计, 全触摸屏彩色图像化操控界面, 具有参数曲线趋势图显示功能, 有效工作体积可选择 1、2、5 和 10 L。BIOSTAT. D-DCU 是目前德国最新设计的中试、生产用不锈钢动物培养罐系列, 罐体规模从 10 ~ 200 L 可选择, 采用全自动 SIP/CIP、顶盖自动提升、空气过滤器在位完整性测试和双排气过滤器等, 接种取样接口设计合理, 目前在世界各国推广销售; 而 BIOSTAT. STR 为可放大一次性使用动物细胞培养罐, 设计功能和默克密理博相似, 规模可放大到 2 000 L, 适用于工业生产。

荷兰 Applikon 公司是全球生物反应器最顶尖的品牌生产商之一。其研发的 3 种培养罐分别是 BioBundle、BioBench 和 Pilot Plant。BioBundle 是实验室玻璃台式型, 供 4 路气入罐体, 采用 MFC 保证通气溶氧自动控制精度, 设计大方精巧, 可选择夹套控温或加热毯控温, 同时用于灌注培养时可选配

Biosep 声频灌流装置; BioBench 是原位灭菌型培养罐, 灭菌过程手动控制, 适合细胞培养和微生物发酵, 并且采用磁力耦合搅拌保证密封效果, 无菌程度高; Pilot Plant 是工业生产应用型细胞培养罐, 管路复杂自动化程度高, 全自动 CIP/SIP, 顶部磁力耦合搅拌保证细胞培养过程无菌要求。

3.2 国内研究现状

近年来, 国内研究者主要研究方向在大肠杆菌、枯草芽胞杆菌和毕赤酵母等微生物表达载体上, 但随着国外单克隆抗体等癌症生物药市场效益越来越高及国内生物制药产业的不断发展^[25], 国内的研究者才开始重视动物细胞表达载体。多数企业模仿学习国外引进的动物细胞培养罐技术, 也形成一些商品化的细胞罐供应公司, 但是设备的自动化控制等技术水平还需要大幅度提高。

成都英德生物医药装备技术有限公司的机械搅拌动物细胞培养罐有 350 和 650 L 2 种规格, 在国内属于较大规模设备, 设计支持 CIP/SIP、磁力耦合搅拌、静密封与零泄漏, 符合 cGMP 要求, 常应用于兽用疫苗的生产。

南京比瑞生物科技有限公司动物细胞培养罐产品在悬浮培养、贴壁培养及微载体培养等细胞培养罐中都有应用。上海日泰医药设备工程有限公司采用篮式搅拌桨的细胞固定化培养罐主要应用于贴壁类细胞培养, 细胞在固流床中培养时, 进入片状聚脂片内, 处于相对静止状态, 各种营养物质通过液体的流动传送给细胞, 消除了搅拌桨的剪切力对细胞的伤害, 有利于细胞的生长。同时在纤维载体内部生长的细胞具有良好的群体效应, 不易脱落。

杭州安普(AP) 生物工程有限公司致力于一次性袋式反应器开发研究, 杨凡等^[26]使用 AP20 和 AP200 一次性激流反应器灌注培养 BHK-21 细胞生产口蹄疫疫苗, 在 AP20 最终细胞收获量达到 30.0×10^9 cells(活性 95% 以上), 灌注 20 L, 细胞增殖 15 倍, 在 AP200 最终收获细胞 53.6×10^{10} cells(活性 90% 以上), 灌注 120 L, 细胞增殖 18 倍。吴全德等^[9]使用 AP5 一次性激流反应器悬浮培养 HEK293 细胞生产 Ad-HFN γ , 最后细胞密度到 2.0×10^6 个/mL, 产物达 1.49×10^{13} IFU。

4 搅拌式动物细胞反应器应用

4.1 在兽用疫苗生产中的应用

早在 1965 年, Telling 等便成功利用搅拌式动物

细胞培养罐悬浮培养 BHK21 细胞生产口蹄疫苗。现如今已普遍采用 3 000 ~ 8 000 L 的搅拌式反应器对 BHK21 细胞生产口蹄疫苗进行悬浮培养。周燕等^[27]在优化的培养条件下,利用 CelliGen 反应器大规模生产 Vero 细胞,表达猪流行性腹泻病毒,其密度最高可达到 1.74×10^6 个/mL,远远超出方瓶培养产率,并且每个细胞的猪流行性腹泻病毒含量与方瓶培养相当,制备的免疫原性好。

Novartis 公司和 Baxter 公司先后利用搅拌式动物细胞培养罐生产 Vero 细胞与 MDCK 细胞,高产量表达出禽流感疫苗,并成功上市。

4.2 在单克隆抗体生产中的应用

搅拌式动物细胞反应器用于单克隆抗体生产的例子也是不胜枚举的。Schenerman 等^[28]利用搅拌罐反应器生产 NS0 细胞,表达单抗(SynagisTM),在实验过程中发现,随着规模增加、细胞代数的增加均不影响抗体的产率,并且在无血清培养的条件下,规模由 20 L 成功放大到了 10 000 L。随后 Sauer 等^[29]开发了搅拌罐反应器的无血清培养技术,能够普遍应用与 Sp2/0 和 NS0 细胞系培养生产人或人源化的 IgG 抗体。Yang 等^[30]实现了搅拌罐悬浮培养的控制流加的灌注培养系统,成功应用于无血清培养 Sp2/0-Ag14 细胞生产 hLL2。

4.3 在其他重组生物制品生产中的应用

为了使细胞无需消化、能够直接接种进行微载体培养,在搅拌式动物细胞反应器内部安装旋转过滤器是一个十分有效的手段。Kong 等^[31]应用该技术生产 CHO 细胞,高产量表达出单细胞克隆抑制因子。Hu 等^[32]在装有内部旋转过滤器的 3 L 搅拌罐反应器中灌注培养 CHO 细胞生产重组人丝钙素,同时在 60 L 规模中用 Sf9 细胞生产 hSTC,当时成为机械搅拌式动物细胞培养生物反应器研究进程中的里程碑成果。

5 结论与展望

近年来,我国癌症患者不断增加,采用化学药物治疗对患者副作用大,所以研究生物靶向药物治疗越来越热,以单克隆抗体为代表的生物药品对不同癌症的应用性高且对患者副作用小,这些生物制药都由哺乳动物细胞经大规模培养、表达而来。然而动物细胞大规模培养离不开生物反应器,以机械搅拌式动物细胞培养罐为代表的生物反应器,适用于动物细胞悬浮培养和微载体悬浮培养,操作方便

且放大可观,现如今已扩大到万升以上的级别,研究设计机械搅拌动物细胞培养罐具有重要意义。

然而,在搅拌动物细胞培养罐研发过程中仍旧存在着诸多有待解决提高的问题,诸如如何开发出剪切力更低、通气混合效率更好的搅拌式生物反应器,确保生产工艺放大的稳定性,建立更为精确的数学模型来模拟优化细胞的生长环境等。可以预期,相关的研发成果将为机械搅拌式生物反应器的进一步发展提供巨大的发展空间。

参考文献:

- [1] 胡显文,陈惠鹏,汤仲明,等.生物制药的现状和未来(二):发展趋势与希望[J].中国生物工程杂志,2005(01):86-93.
- [2] VERNARDIS S I, GOUDAR C T, KLAPA M I. Metabolic profiling reveals that time related physiological changes in mammalian cell perfusion cultures are bioreactor scale independent[J]. Metab Eng, 2013, 19: 1-9.
- [3] DE JESUS M, WURM F M. Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors[J]. Eur J Pharma Biopharma, 2011, 78(2S): 184-188.
- [4] EL WAJGALI A, ESTEBAN G, FOURNIER F, et al. Impact of microcarrier coverage on using permittivity for on-line monitoring high adherent Vero cell densities in perfusion bioreactors[J]. Biochem Eng J, 2013, 70: 173-179.
- [5] 王永红,夏建业,唐寅,等.生物反应器及其研究技术进展[J].生物加工过程,2013,11(2):14-23.
- [6] 吴茂柏.浅谈生物反应器在大规模动物细胞培养中的应用[J].科教文汇,2011(8):131-132.
- [7] 常保安.激流式生物反应器的流场仿真与结构优化[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2012.
- [8] 王洪跃,戴晓云.现代动物细胞培养反应器概述[J].中国医药生物技术,2010(2):156-157.
- [9] 吴全德,黄文林.一次性生物反应器悬浮培养 HEK293 细胞生产 Ad-HFN γ 的工艺[J].生物工程学报,2014(11):1786-1790.
- [10] 王秋兰.NBS 发酵罐检修分析与探讨[J].中国医学装备,2009(12):40-41.
- [11] 张立,范为民,严春,等.用国产生物反应器培养 Vero 细胞和狂犬病毒[J].高技术通讯,1999(3):55-58.
- [12] 张元兴,易小萍,张立,等.动物细胞培养工程[M].北京:化学工业出版社,2006.
- [13] 石凯,熊晓辉,许建生.固定化动物细胞大规模培养技术研究进展[J].化工进展,2002(8):556-559.
- [14] 过琴媛,王辉,沈心亮.微载体培养动物细胞技术的研究进展[J].微生物学免疫学进展,2007(1):73-75.
- [15] 田石华,孙明波,张新文,等.无血清微载体培养 Vero 细胞和 H1N1 流感病毒条件的优化[J].中国生物制品学杂志,2010(6):639-642.
- [16] 何春艳,陈列胜,吴书军,等.Vero 细胞和流感病毒在无血清

- 条件下的微载体培养[J]. 中国生物制品学杂志, 2007(2): 125-128.
- [17] 何锡忠,李春华,倪建平,等. 微载体培养 PK-15 细胞试验条件的优化[J]. 动物医学进展, 2010(8): 20-23.
- [18] 周燕,刘宝林,杨波,等. 微载体培养技术的研究与进展[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010(16): 2945-2948.
- [19] 陈利萍,王占兴,成洪峰,等. 轮胎模具特氟龙涂料喷涂工艺及效果[J]. 橡胶科技, 2013(4): 27-30.
- [20] DEO Y M, MAHADEVAN M D, FUCHS R. Practical considerations in operation and scale-up of spin-filter based bioreactors for monoclonal antibody production [J]. Biotechnol Prog, 1996, 12(1): 57-64.
- [21] 赵晓伟. 采用 ElephantEar 桨叶的生物反应器结构优化和细胞剪切特性研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2010.
- [22] ZHU H, NIENOW A W, BUJALSKI W, et al. Mixing studies in a model aerated bioreactor equipped with an up- or a down-pumping 'Elephant Ear' agitator: power hold-up and aerated flow field measurements [J]. Chem Eng Res Design, 2009, 87(3A): 307-317.
- [23] 朱立宽. 动物细胞生物反应器中鼓泡溶氧及远程监控的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2011.
- [24] 颜旭,顾承真,张志强,等. 动物细胞培养系统流程及其应用[J]. 动物医学进展, 2014, 35(4): 125-128.
- [25] 翁志兵,邵春花,胡辉,等. 无血清培养基干粉的生产工艺优化[J]. 生物加工过程, 2015, 13(5): 57-60.
- [26] 杨凡,李峦峰,宋玲玲,等. 应用一次性生物反应器大规模培养 BHK-21 细胞[J]. 机电信息, 2011(11): 30-33.
- [27] 周燕,王建超,华平,等. 猪传染性胃肠炎病毒在 ST 细胞中增殖规律的研究[J]. 中国兽医科技, 2005(06): 423-427.
- [28] SCHENERMAN M A, HOPE J N, KLETKE C, et al. Comparability testing of a humanized monoclonal antibody (Synagis (R)) to support cell line stability, process validation, and scale-up for manufacturing [J]. Biologicals, 1999, 27(3): 203-215.
- [29] SAUER P W, BURKY J E, WESSON M C, et al. A high-yielding, generic fed-batch cell culture process for production of recombinant antibodies [J]. Biotechnol Bioeng, 2000, 67(5): 585-597.
- [30] YANG J D, ANGELILO Y, CHAUDHRY M, et al. Achievement of high cell density and high antibody productivity by a controlled-fed perfusion bioreactor process [J]. Biotechnol Bioeng, 2000, 69(1): 74-82.
- [31] KONG D, GENTZ R, ZHANG J L. Long-term stable production of monocyte-colony inhibition factor (M-CIF) from CHO microcarrier perfusion cultures [J]. Cytotechnology, 1998, 26(2): 131-138.
- [32] HU X W, XIAO C Z, HUANG Z C, et al. Pilot production of u-PA with porous microcarrier cell culture [J]. Cytotechnology, 2000, 33(1-3): 13-19.

(责任编辑 荀志金)