综述

生物制品中宿主细胞残留蛋白的检测研究进展

梁超超，咸瑞卿，石　峰，王维剑，巩丽萍 *
（山东省食品药品检验研究院，山东省人用疫苗研发重点实验室，产业技术基础公共服务平台，山东济南 250101）

摘要：宿主细胞蛋白（HCPs）是生物制品生产过程中难以完全去除的关键杂质，其残留可能损害产品的安全性、有效性及稳定性，并诱发免疫反应。此外，由于 HCPs 丰度低，对检测方法的灵敏度要求高。因此，HCPs 的精准检测与严格控制在生物制品质量控制中至关重要。该文综述了全球 HCPs 的监管现状，并对其现有质量控制技术（包括传统检测方法和新兴技术）的原理、应用现状及优缺点进行了剖析，为 HCPs 的控制提供了较为全面的视角。此外，该文系统探讨了 HCPs 检测面临的主要挑战，以期为未来相关质控技术的研究发展及药品监管奠定理论基础。

关键词：生物制品；宿主细胞蛋白；关键质量属性；检测技术；质量控制
中图分类号：R917；TQ464　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2025)11-1371-08
引用：梁超超，咸瑞卿，石　峰，等．生物制品中宿主细胞残留蛋白的检测研究进展［J］．中国医药工业杂志，2025, **56**(11)：1371-1378．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.11.001

Advances in the Detection of Host Cell Proteins in Biological Products

LIANG Chaochao, XIAN Ruiqing, SHI Feng, WANG Weijian, GONG Liping*
(*Industrial Technology Infrastructure Public Service Platform, Key Lab. of Human Vaccine Research in Shandong Province, Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101*)

ABSTRACT: Host cell proteins (HCPs) are critical impurities that are difficult to remove completely during biopharmaceutical production. Their residual presence may compromise product safety, efficacy, and stability, while potentially inducing immune responses. Characterized by low abundance, HCPs demand exceptionally high detection sensitivity. Therefore, the precise quantification and rigorous control of HCPs are of paramount importance in biopharmaceutical quality assurance. This paper systematically reviews the current global regulatory status of HCPs, and analyzes the principles, application status, advantages and disadvantages of existing quality control technologies (including traditional detection methods and emerging technologies), providing a more comprehensive framework for HCPs control. Furthermore, it systematically addresses the major challenges encountered in HCPs detection, aiming to establish a theoretical foundation for future research and development of related technologies, as well as for drug regulation.

Key Words: biological product; host cell protein; critical quality attribute; detection technology; quality control

随着生物制药产业的迅速发展，单克隆抗体、疫苗、重组蛋白和细胞治疗产品等生物制品在疾病治疗中的作用日益重要。然而，这些生物制品的生产依赖于宿主细胞表达系统［如大肠埃希菌、酵母、中国仓鼠卵巢细胞（Chinese hamster ovary cell，CHO）等］，在生产和纯化过程中不可避免地会引

收稿日期：2025-03-14
基金项目：山东省自然科学基金（ZR2024QH545）、济南市“新高校 20 条”资助项目（202333058）
作者简介：梁超超，博士，主管药师，从事生物制品质量控制及标准研究。
通信作者：巩丽萍，硕士，主任药师，从事化学药物、生物药物的关键质量控制技术研究。

入宿主来源的杂质，其中的主要杂质之一是宿主细胞蛋白（host cell proteins，HCPs）[1]。HCPs 残留量一直被认为是生物制药原料生产中的关键质量属性，需要在原液和成品的放行检测以及中间品的工艺控制中重点关注 [2]。

HCPs 成分复杂，包括细胞裂解过程中释放的内源性蛋白、分泌性蛋白以及工艺引入的外源性蛋白。尽管现代生物制品的生产过程经过多步纯化操作，已显著降低了 HCPs 含量，但仍有微量 HCPs 难以去除 [3]。然而，即使是痕量的 HCPs 也可能对生物制品的安全性和有效性产生严重影响。已有超过 100 种不同的 HCPs 因难以清除或在较低含量下仍能产生显著影响而被确定为高风险蛋白 [2]。HCPs 的存在可能会引起人体多种反应：某些异源性 HCPs 具有免疫原性，极易引起机体免疫反应 [4]；部分 HCPs 能促进单抗聚集，形成可溶 / 不可溶性聚合物，从而引发机体免疫反应 [5]；蛋白酶类 HCPs 通过参与单抗的水解或蛋白折叠，进而影响药效的稳定性 [6—8]。HCPs 中的脂肪酶类还能通过降解单抗制剂处方中的聚山梨酯 80 和聚山梨酯 20，破坏单抗的稳定性，导致产品质量不合格 [9]。因此，实现 HCPs 的高效检测与严格控制已成为生物制品质量控制的核心环节之一。

目前，USP、EP 等各国药典和 ICH Q6B《质量标准：生物技术产品及生物制品的检验方法和可接受标准》等指南均对 HCPs 的检测和控制提出了明确要求。ChP 2020 年版三部也明确指出在人用疫苗、人用重组蛋白制品、人用重组单克隆抗体制品中，HCPs 残留是与生物制品关键质量属性相关的关键工艺杂质，需采取检测方法准确反映每一成品剂量中的残留水平。

1　HCPs 的监管现状

HCPs 的残留量和类型取决于用于产品表达的宿主细胞和克隆体，以及下游生产工艺。全球的卫生当局与相关行业基于质量源于设计（quality by design，QbD）理念开发了质量管理框架，旨在设计和管理保障患者安全和产品质量的过程，并基于坚实的科学原理和质量风险管理，包括 ICH Q6B（1999）、S6（R1）《生物技术药物的临床前安全性评价》（2011）、Q8（R2）《药品研发》（2009）、Q9（R1）《质量风险管理》（2023）、Q10《药品质量管理体系》（2008）和 Q11《起始物料一般原则》（2017）[9]。ICH 同时规定，需要根据 Q6B 等原则，采用敏感且经过验证的有效方法来监控残留的 HCPs，其残留量通常要求小于 100×10^{-6}[10]。ChP 2020 年版三部对不同来源的 HCPs 均作出了明确要求：CHO 中的 HCPs 残留要求 <0.05%，大肠埃希菌的 HCPs 残留要求 <0.01%。此外，对于重组乙型肝炎疫苗（CHO 细胞）和注射用人促红素（CHO 细胞），要求 HCPs 的残留量应不超过总蛋白含量的 0.05%。《体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则（试行）》[11] 中也指出应对包含 HCPs 在内的生产工艺杂质清除性能和杂质残留水平进行研究，并评估其风险，必要时需将高风险杂质纳入产品质量标准进行控制。

USP<1132> 章节中规定，应采用高灵敏方法来检测药品中的 HCPs，其含量应低于检测限（通常小于 100×10^{-6}）。同时，FDA 要求生产商应当开展纯化工艺的清除验证研究，在提交上市申请前，至少对 3 批注册批（如工艺验证批）样品进行定量检测，以证明纯化工艺的清除效果。EP 2.6.34 章节中也明确规定在生物制品中，HCPs 的含量应当小于 0.1%。

2　HCPs 的检测方法

生物制品的生产周期长，生产工艺复杂，生产过程中会引入或残留多种杂质，因此需要进行严格的质量控制，以确保生产工艺稳定，产品安全、有效。HCPs 残留作为一项关键的安全性质控指标，必须采取有效检测手段对其进行监控。如果检测方法的 HCPs 覆盖率不足或须重点关注的微量 HCPs 检测方法灵敏度不足，则难以达到日益严格的注册申报要求。因此，企业在工艺开发初期就应建立合适的 HCPs 检测方法。此外，由于 HCPs 的动态范围很宽，药物主成分与低丰度 HCPs 的含量相差往往超过 6 个数量级，因此对 HCPs 定性检测和定量分析方法的准确度和灵敏度要求也越来越高 [12]。目前，检测 HCPs 的方法主要有 ELISA 法、二维凝胶电泳法、蛋白质印记（Western blot，WB）法、色谱 - 串联质

谱（LC-MS/MS）法、基于适配体的流式细胞术与邻位连接技术（proximity ligation assay，PLA）等。

2.1 ELISA 法

ELISA 法通过制备 HCPs 的多克隆抗体进行总蛋白检测，是目前应用较广泛的 HCPs 残留检测方法；因具有高通量、高灵敏度和高选择性的特性[13]，被称为 HCPs 总水平检测的“金标准”[14]。HCPs 的 ELISA 检测法可分为三类：通用型、平台型和工艺特异性型[15]。基于抗体的化学检测方法包括直接 ELISA、夹心 ELISA、比色检测和荧光检测。

TAIT 等[16]报道空白 CHO 细胞系（未进行重组蛋白表达）与生物制品生产用的重组细胞系具有高度相似的 HCPs 组成特征。这种相似性表明，基于空白细胞系材料开发的抗体可能能够准确反映重组细胞系中的 HCPs 库。但此法明显的局限性体现在 HCPs 的抗体库覆盖率有限，无法覆盖所有 HCPs，也无法检测低免疫原性或无免疫原性的 HCPs。另外，ELISA 法无法确定具体的 HCP 种类，因而无法提供特定 HCP 的含量信息。

2.2 二维凝胶电泳法

二维凝胶电泳法可高效、详细地分析蛋白质谱，在生物制品生产中作为重要的分析工具发挥作用。该法首先根据 HCPs 的相对分子质量差异进行第一维凝胶分离，再通过等电点（pI）值的差异对 HCPs 进行第二维分离，最后经染色和可视化处理，通过凝胶图像分析识别蛋白质组的变化；还可从凝胶中切取感兴趣的蛋白质斑点，通过质谱测序结合数据库比对来进行鉴定[17—18]。JIN 等[19]利用二维差异凝胶电泳技术分析 CHO 细胞培养收获液中的 HCPs 成分，考察不同的上游工艺参数（如细胞培养基、生物反应器控制策略、补料策略、细胞培养时间和细胞存活率）对 HCPs 特征谱的影响。结果显示，在这些参数中，细胞存活率对 HCPs 特征谱的影响最显著。二维凝胶电泳法可直接比较不同条件下 HCPs 成分的变化，作为常用 HCPs 免疫分析法的补充，能揭示具体 HCP 的 pI 值和相对分子质量等特性，但其灵敏度低，仅能检测高丰度的蛋白，且方法操作复杂，对 HCPs 只能进行半定量分析[20]。

2.3 WB 法

WB 法通过识别所制备的特定 HCP 抗体，进行特定 HCP 的靶向性鉴定。将二维凝胶电泳与 WB 技术相结合，通过对 HCPs 进行全面的免疫化学分析，可有效评估检测体系中多克隆血清的抗原识别能力，从而为 ELISA 法的开发和质量控制提供技术支持。POSCH 等[17]建立的标准化二维凝胶电泳 -WB 法，通过整合样品制备、蛋白电泳分离、高效转膜、免疫显色及数字化成像等多种新型技术，显著提升了 HCPs 的检测效率。但受制于转膜效率不稳定（如转膜过度或不足）等技术缺陷，该法仍存在 HCPs 检测覆盖率波动的问题[21]。

2.4 LC-MS/MS 法

随着基于质谱技术的蛋白质组学的迅猛发展，质谱技术被越来越多地运用到单抗类药物的工艺开发中。例如，表面增强激光解吸电离飞行时间质谱、液相色谱 - 质谱联用等已成为 HCPs 快速检测与定量分析的重要技术手段。LC-MS/MS 法可通过液相色谱对不同类型的 HCPs 进行有效分离，然后借助质谱图与数据库的对比分析，精确识别和表征每种 HCP[14,22—23]。由于 LC-MS/MS 具有无偏向性的特点，能有效检测无免疫原性或低免疫原性的 HCPs，从而弥补 ELISA 法的局限性，提高 HCPs 鉴定结果的准确性和可靠性。

HCPs 的 LC-MS/MS 分析通常基于“自下而上”的蛋白质组学工作流程，包括样品前处理、样品分离、数据采集和分析 3 个阶段。在通过多步柱色谱纯化制备的单克隆抗体药物中，目标单克隆抗体与 HCPs 的浓度差异可达 10^6 倍[12]。这种显著的丰度差异（HCPs 含量通常为 10^{-6} 级）导致高浓度抗体产生的基质效应会遮蔽低丰度 HCPs 的信号，从而严重干扰低丰度 HCPs 的检测灵敏度。为了提升 HCPs 检测的准确性和灵敏度，优化样品前处理步骤、色谱条件以及质谱参数，从而减少主成分的背景干扰信号，成为质谱法检测的关键步骤。样品前处理方法的优化策略主要包括：富集 HCPs，改变酶解条件，选择变性剂。若通过相对分子质量截留过滤[24]、配体结合筛选[25]等方法富集 HCPs，检测覆盖率往

往较低，检测成本也较高。HUANG 等[26]采用非变性酶切，降低了 HCPs 肽段浓度与主成分浓度的差异，从而避免高浓度主成分的背景干扰，为样品前处理提供了新思路。此外，酶解时添加表面活性剂，可节省除盐时间，减少样品蛋白损失[27]。传统的 HCPs 富集与纯化操作会干扰样品中 HCPs 的初始浓度，XUE 等[28]开发的基于串联质谱标签标记的质谱信号增强技术，特异性提高了样品中相应 HCPs 的 MS1 信号强度以及 MS/MS 碎片离子信号强度，有效提高了检测的灵敏度。

目前常用的分离方式主要包括液相色谱（liquid chromatography，LC）法和毛细管电泳（capillary electrophoresis，CE）法。其中，LC 法具有优良的稳定性与耐用性，较为常见。针对 HCPs 分布动态范围宽的技术挑战，研究人员通过引入正交分离维度实现检测能力的突破，例如引入二维液相色谱或离子淌度[29]。在质谱检测技术体系中，数据采集模式主要分为数据依赖性采集（data dependent acquisition，DDA）与数据非依赖性采集（data independent acquisition，DIA）两大类。质谱采集技术的发展也推动着 HCPs 检测方法不断创新。STRASSER 等[30]建立的集成化 LC-MS 平台，通过耦合自动化磁珠前处理系统与高覆盖 DIA 扫描模式，显著提高了 HCPs 检测的动态范围。CARVALHO 等[31]开发的 SWATH-MS（sequential window acquisition of all theoretical fragment-ion spectra-MS）方法，成功实现了 CHO 细胞来源 HCPs 的绝对 / 半绝对定量分析，为单抗纯化工艺的优化提供了重要的技术支撑。为提高检测灵敏度，当前的技术发展呈现出多维技术联用趋势，例如 TOMIOKA 等[32]构建的集成化检测体系，通过非变性亲和柱前处理富集、液相 - 离子淌度 - 串联质谱分离平台与平行反应监测 - 脉冲式离子淌度采集（parallel reaction monitoring-parallel-accumulation serial fragmentation，prm-PASEF®）技术的协同应用，将 CHO 细胞来源 HCPs 的检测数量从 154 个增加到了 226 个。

2.5　基于适配体的流式细胞术与邻位连接技术

基于适配体的流式细胞术[33]与邻位连接技术[34]为 HCPs 检测提供了创新解决方案，但受限于技术成熟度，目前尚未在抗体药物实际生产中得到规模化应用。核酸适配体凭借高亲和力、可编程性和非免疫原性的优势，在识别复杂生物样本中的低丰度 HCPs 方面展现出独特潜力。但研究[33]表明，现有筛选获得的 DNA 适配体库存在显著的交叉反应，筛选到的 32 种 DNA 适配体能广泛识别多种抗体，缺乏靶标特异性，导致难以构建标准化检测平台。此外，在指数富集配体系统进化（systematic evolution of ligands by exponential enrichment，SELEX）的筛选过程中，若固相载体包被不充分，易引发非特异性吸附，导致低质量适配体的假阳性富集[33]，制约检测方法的可靠性。

邻位连接技术基于双抗体介导的 DNA 探针空间邻近效应与级联核酸扩增，将单个蛋白质分子的识别事件转化为指数级增长的 DNA 荧光信号，从而显著提升了检测灵敏度[35]。LIU 等[34]采用链霉亲和素偶联磁珠捕获技术开发了自动化固相邻位连接系统，应用于 CHO 细胞中 HCPs 残留量的检测时，检测限达到 0.25 ng/mL，动态检测范围跨越 4 个数量级，较传统 ELISA 法的灵敏度提升 100 倍，为生物制品中痕量 HCPs 的监测提供了新策略。

2.6　其他技术

随着技术的不断创新，越来越多的新兴技术被应用到 HCPs 的检测以及工艺控制中。PILELY 等[22]基于 ELISA 免疫富集技术与质谱技术开发的 ELISA-MS 法，显著提高了 HCPs 的检测覆盖率，尤其适用于能够与抗体共纯化的 HCPs 检测。HCPs 的残留可能引发抗体降解风险。因此，在单抗生产的不同阶段（上游和下游），越来越多的创新技术被应用到 HCPs 的清除过程[36]。例如，在生物药物制剂中，聚山梨酯的降解及游离脂肪酸聚集体 / 颗粒的形成，常与部分难以去除的脂肪酶类 HCPs 直接相关。针对该问题，开发低脂肪酶表达水平的工程细胞株已成为控制聚山梨酯降解的有效策略。CHIU 等[37]针对聚山梨酯降解问题的研究表明，单一脂肪酶基因敲除仅能部分抑制降解反应，揭示该过程存在多种脂肪酶协同作用的机制。为有效控制聚山梨

酯的降解，需同步调控多种脂肪酶的表达水平。然而，CRISPR 技术构建多基因编辑细胞系的效率普遍较低。WEIB 等[38]开发了 miRNA 多靶点调控策略，通过识别脂蛋白脂肪酶（lipoprotein lipase，LPL）、磷脂酶 A1 成员 A（phospholipase A1 member A，PLA1A）和磷脂酶 B 样蛋白 2（phospholipase B-like 2，PLBL2）mRNA 序列中的保守结构域，实现了人工微小 RNA（artificial microRNAs，amiRNA）的同时结合，能同时敲除多个目的基因，成功抑制了聚山梨酯的降解。

随着转录组学技术的不断发展，转录组学或许能作为一种有效手段，用于宿主细胞中 HCPs 的分析。作为一种数据密集型技术，转录组学能从单个样本中定量分析并鉴定出 20 000 个以上的不同基因表达谱[39]。目前，转录组学多被用于指导 HCPs 的工艺控制。KÖNITZER 等[40]通过高通量 RNA 测序，高效分析了不同宿主细胞系在抗体生产过程中的基因表达模式，为监测 HCPs 的动态变化提供了基础数据。LEWIS 等[41]解析了 CHO 细胞基因组特征，并阐述转录组学在理解蛋白质表达方面的潜力，进而深化了人们对 HCPs 表达异质性的分子机制认知。SAHOO 等[42]借助转录组学技术，深入探究了 CHO 细胞培养过程中多种高风险 HCPs 的累积状况，为工艺控制策略的制定提供理论支撑。尽管 mRNA 表达水平与实际的蛋白质水平并不总是直接相关，但转录组学仍可作为观察细胞培养中蛋白质累积情况的有效替代工具。将转录组学与蛋白组学等多种组学技术进行融合，可更全面地解析 HCPs 的表达模式。这种多组学整合方法不仅阐明了 HCPs 在跨工艺培养条件下的动态变化规律，也为高风险 HCPs 的靶向性筛查提供了有效手段。

表 1 汇总了目前各种 HCPs 检测方法的优缺点。

3 结语与展望

近年来，疫苗、抗体、细胞与基因治疗产品等生物制品蓬勃发展，人们对此类药物安全性和有效性的关注度也越来越高，国内外监管部门对生物制品的质量安全也提出了更严格的要求。HCPs 作为一项至关重要的质量控制指标，也必将持续受到严密监控与管理。在生物制药工艺的开发中，HCPs 的残留水平呈现显著的工艺依赖性特征。在从初始细胞系筛选到终产品回收的全流程中，宿主相关因素（如细胞株遗传背景、表达产物特性）、工艺参数（培养周期、收获时细胞活力、剪切应力响应）及下游技术路线（产物回收效率）共同构成了 HCPs 残留的复合调控网络。鉴于这些复杂因素，单一技术难以实现对所有关键 HCPs 的有效控制、监测与清除。TOMIOKA 等[32]建立的整合式 HCPs 监控方案，融合了多项技术手段，为后续 HCPs 检测的方法研究提供了很好的思路。

当前，基于 LC-MS/MS 的检测技术在 HCPs 的鉴定与定量分析领域展现出显著的应用潜力。然而，如何进一步提升其准确性和灵敏度仍是亟待解决的问题。为优化 HCPs 的富集与纯化效率，亟须改进样品前处理技术，以有效提升样品中 HCPs 的含量，同时减少杂质干扰，为后续全面、准确的样品分析奠定坚实基础。在 LC-MS/MS 分析方法的基础上，应探索更加适配 HCPs 的检测模式，如 DIA 和平行

表 1 用于定性检测和定量分析宿主细胞蛋白的方法总结

Tab.1 Summary of the Various Methods Used for the Qualitative Detection and Quantitative Analysis of Host Cell Proteins

检测方法	优点	缺点	参考文献
ELISA 法	成熟且应用广泛；可量化 HCPs 总蛋白含量；易于自动化；适用于筛选和日常监测	受制于已知抗体或抗原，无法覆盖所有 HCPs；大规模分析耗时较长；量化动态范围有限	[13,15]
二维凝胶电泳法	实现 HCPs 的可视化表征；可根据 HCPs 的不同特性进行蛋白分离	仅能检测高丰度蛋白；方法操作复杂；只能进行 HCPs 的半定量分析	[15,17,19]
WB 法	实现 HCPs 的可视化表征	检测的准确性依赖于抗体的覆盖范围；转膜步骤影响 HCPs 检测的覆盖率	[17,22]
LC-MS/MS 法	具有高灵敏度和特异性；蛋白质组全覆盖；具有 HCPs 高通量筛选能力	无法检测低丰度 HCPs；需要精密设备和专业技术人员；数据分析较为复杂	[14,23]
基于适配体的流式细胞术	能够定量非免疫原性 HCPs	方法开发难度大，难以构建标准化检测平台	[33]
邻近连接技术	灵敏度高；动态范围广	—	[34]

反应监测（parallel reaction monitoring，PRM），以进一步提升分析的灵敏度、动态范围和通量，同时提供更丰富的蛋白质信息，从而深化对 HCPs 特性的理解。此外，持续扩展和完善针对 HCPs 的特定数据库及生物信息学工具十分重要，这将有助于更好地识别和表征 HCPs，包括对其翻译后修饰和蛋白质异构体等复杂特征的表征。针对高风险 HCPs，应开发靶向定量方法，利用多反应监测或 PRM 等模式，实现高灵敏、可重复且准确的量化，进而提高特定 HCPs 的质量控制标准。将 LC-MS/MS 技术与基因组学、转录组学和蛋白质组学等其他组学技术相融合，将更全面地解析 HCP 的表达模式、调控机制及其对病毒载体系统的影响。这种跨学科的整合不仅为药物研发提供了更为全面的视角，也为深入理解 HCPs 的生物学意义提供了新方法。

随着生物技术的持续创新突破，HCPs 的构成及其特性将不断被揭示，这有望为企业构建“源头控制 - 过程监控 - 深度清除”的全链条 HCPs 控制体系提供关键理论基础，并进一步推动高效去除 HCPs 技术的创新，同时也为政府监管提供新的技术支撑。此外，随着技术的进步，人们对 HCPs 残留的科学认知将不断加深，对 HCPs 的控制要求和监管将更加合理、科学。

参考文献：

[1] HOGWOOD C E M, BRACEWELL D G, SMALES C M. Host cell protein dynamics in recombinant CHO cells: impacts from harvest to purification and beyond [J]. *Bioengineered*, 2013, **4**(5): 288-291.

[2] JONES M, PALACKAL N, WANG F, *et al*. “High-risk” host cell proteins (HCPs): a multi-company collaborative view [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2021, **118**(8): 2870-2885.

[3] PILELY K, JOHANSEN M R, LUND R R, *et al*. Monitoring process-related impurities in biologics-host cell protein analysis [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2022, **414**(2): 747-758.

[4] JAWA V, JOUBERT K M, ZHANG Q C, *et al*. Evaluating immunogenicity risk due to host cell protein impurities in antibody-based biotherapeutics [J]. *AAPS J*, 2016, **18**(6): 1439-1452.

[5] EON-DUVAL A, VALAV P, SOLACROUP T, *et al*. Application of the quality by design approach to the drug substance manufacturing process of an Fc fusion protein: towards a global multi-step design space [J]. *J Pharm Sci*, 2012, **101**(10): 3604-3618.

[6] HALL T, SANDEFUR S L, FRYE C C, *et al*. Polysorbates 20 and 80 degradation by group XV lysosomal phospholipase A2 isomer X1 in monoclonal antibody formulations [J]. *J Pharm Sci*, 2016, **105**: 1633-1642.

[7] WEI W, ARUN A I, BROLY H, *et al*. Degradation of an Fc-fusion recombinant protein by host cell proteases: identification of a CHO cathepsin D protease [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2009, **104**: 1132-1141.

[8] KIM J Y, KIM Y G, BAIK J Y, *et al*. A proteomic approach for identifying cellular proteins interacting with erythropoietin in recombinant Chinese hamster ovary cells [J]. *Biotechnol Prog*, 2010, **26**(1): 246-251.

[9] ITO T, LUTZ H, TAN L, *et al*. Host cell proteins in monoclonal antibody processing: control, detection, and removal [J]. *Biotechnol Prog*, 2024, **1**: e3448.

[10] RUDGE S R, NIMS R W. ICH Q6B specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products [EB/OL]. [2025-01-01]. https://ispe.org/pharmaceutical-engineering/september-october-2021/ich-quality-guidelines-present-initiatives-ispe.

[11] 国家药监局药审中心. 体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则（试行）. [EB/OL]. [2025-01-01]. http://img1. 17img. cn/17img/files/202206/attachment/f8d9b6ae-c43a-442a-b20b-3abda5bf1ba9. pdf.

[12] TSUKIDATE T, STIVING A Q, RIVERA S, *et al*. diaPASEF enables high-throughput proteomic analysis of host cell proteins for biopharmaceutical process development [J]. *Anal Chem*, 2024, **96**(32): 12999-13006.

[13] ZHU-SHIMONI J, YU C, NISHIHARA J, *et al*. Host cell protein testing by ELISAs and the use of orthogonal methods [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2014, **111**(12): 2367-2379.

[14] GUO J, KUFER R, LI D, *et al*. Technical advancement and practical considerations of LC-MS/MS-based methods for host cell protein identification and quantitation to support process development [J]. *MAbs*, 2023, **15**(1): 2213365.

[15] WANG X, HUNTER A K, MOZIER N M. Host cell proteins in biologics development: identification, quantitation and risk assessment [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2009, **103**(3): 446-458.

[16] TAIT A S, HOGWOOD C E M, SMALES C M, *et al*. Host

cell protein dynamics in the supernatant of a mAb producing CHO cell line [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2012, **109**(4): 971-982.

[17] POSCH A, KOLLMANN F, BERKELMAN T, *et al*. Sample preparation of secreted mammalian host cell proteins and their characterization by two-dimensional electrophoresis and western blotting [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, **2261**: 507-524.

[18] SMITH R. Two-dimensional electrophoresis: an overview [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, **519**: 1-16.

[19] JIN M, SZAPIEL N, ZHANG J, *et al*. Profiling of host cell proteins by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE): implications for downstream process development [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, **105**(2): 306-316.

[20] KANWAL F, HENRY M, MELEADY P. Analytical Tools for HCP detection, identification, and quantitation [M]. New York: Springer US, 2024.

[21] PILELY K, NIELSEN SB, DRABORG A, *et al*. A novel approach to evaluate ELISA antibody coverage of host cell proteins-combining ELISA-based immunocapture and mass spectrometry [J]. *Biotechnol Prog*, 2020, **36**(4): e2983.

[22] BRACEWELL D G, FRANCIS R, SMALES C M. The future of host cell protein (HCP) identification during process development and manufacturing linked to a risk-based management for their control [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2015, **112**(9): 1727-1737.

[23] KREIMER S, GAO Y, RAY S, *et al*. Host cell protein profiling by targeted and untargeted analysis of data independent acquisition mass spectrometry data with parallel reaction monitoring verification [J]. *Anal Chem*, 2017, **89**(10): 5294-5302.

[24] CHEN I H, XIAO H, DALY T, *et al*. Improved host cell protein analysis in monoclonal antibody products through molecular weight cutoff enrichment [J]. *Anal Chem*, 2020, **92**(5): 3751-3757.

[25] MÖRTSTEDT H, MAKOWER Å, Edlund P O, *et al*. Improved identification of host cell proteins in a protein biopharmaceutical by LC-MS/MS using the ProteoMiner™ Enrichment Kit [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, **185**: 113256.

[26] HUANG L, WANG N, MITCHELL C E, *et al*. A novel sample preparation for shotgun proteomics characterization of HCPs in antibodies [J]. *Anal Chem*, 2017, **89**(10): 5436-5444.

[27] LI D, FARCHONE A, ZHU Q, *et al*. Fast, robust, and sensitive identification of residual host cell proteins in recombinant monoclonal antibodies using sodium deoxycholate assisted digestion [J]. *Anal Chem*, 2020, **92**(17): 11888-11894.

[28] XUE A, KONG L, LI J, *et al*. Comprehensive host cell proteins profiling in biopharmaceuticals by a sensitivity enhanced mass spectrometry strategy using TMT-labeling and signal boosting [J]. *Anal Chim Acta*, 2025, **1335**: 343445.

[29] HU M, MOLDEN R, HU Y, *et al*. Host cell protein identification in monoclonal antibody high molecular weight species [J]. *J Chromatogr B*, 2022, **1210**: 123448.

[30] STRASSER L, OLIVIERO G, JAKES C, *et al*. Detection and quantitation of host cell proteins in monoclonal antibody drug products using automated sample preparation and data-independent acquisition LC-MS/MS [J]. *J Pharm Anal*, 2021, **11**(6): 726-731.

[31] CARVALHO S B, PROFIT L, KRISHNAN S, *et al*. SWATH-MS as a strategy for CHO host cell protein identification and quantification supporting the characterization of mAb purification platforms [J]. *J Biotechnol*, 2024, **384**: 1-11.

[32] TOMIOKA R, OGATA K, ISHIHAMA Y. Quantitation of host cell proteins by capillary LC/IMS/MS/MS in combination with rapid digestion on immobilized trypsin column under native conditions [J]. *Mass Spectrom*, 2024, **13**(1): A0152-A0152.

[33] MCGIVNEY J B, CSORDAS A T, WALKER F M, *et al*. Strategy for generating sequence-defined aptamer reagent sets for detecting protein contaminants in biotherapeutics [J]. *Anal Chem*, 2018, **90**(5): 3262-3269.

[34] LIU N, BREVNOV M, FURTADO M, *et al*. Host cellular protein quantification using an automated solid-phase proximity ligation assay [J]. *BioProcess Int*, 2012, **10**(2): 44-50.

[35] ALAM M S. Proximity ligation assay (PLA) [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2018, **123**(1): e58.

[36] TUAMEH A, HARDING S E, DARTON N J. Methods for addressing host cell protein impurities in biopharmaceutical product development [J]. *Biotechnol J*, 2023, **18**(3): 2200115.

[37] CHIU J, VALENTE K N, LEVY N E, *et al*. Knockout of a difficult-to-remove CHO host cell protein, lipoprotein lipase, for improved polysorbate stability in monoclonal antibody

formulations［J］. *Biotechnol Bioeng*, 2017, **114**(5): 1006-1015.

［38］ WEIB L, SCHMIEDER-TODTENHAUPT V, HAEMMERLING F, *et al*. Multi-lipase gene knockdown in Chinese hamster ovary cells using artificial microRNAs to reduce host cell protein mediated polysorbate degradation［J］. *Biotechnol Bioeng*, 2024, **121**(1): 329-340.

［39］ TANG W, ZHOU M, DORSEY T H, *et al*. Integrated proteotranscriptomics of breast cancer reveals globally increased protein-mRNA concordance associated with subtypes and survival［J］. *Genome Med*, 2018, **10**: 1-14.

［40］ KÖNITZER J, BOCK H, BADER A. A global RNA-seq-driven analysis of CHO host and production cell lines reveals［J］. *Biotechnol J*, 2015, **10**(9): 1412-1423.

［41］ LEWIS N E, LIU X, LI Y, *et al*. Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the *Cricetulus griseus* draft genome［J］. *Nat Biotechnol*, 2013, **31**(8): 759-765.

［42］ SAHOO A, DEVENNEY K, NICOLAS M A, *et al*. Beyond viability: advancing CHO cell culture process strategies to modulate host cell protein levels［J］. *New Biotechnol*, 2024, **84**: 128-139.

