基于 ELISA 法测定重组人肝细胞生长因子裸质粒注射液原液中的宿主细胞蛋白残留量

张　波[#]，王艺诺[#]，马杉姗，李尚儒，侯慧丽[*]
（北京诺思兰德生物技术股份有限公司，北京 100085）

摘要：重组人肝细胞生长因子裸质粒注射液通过大肠埃希菌（*Escherichia coli*）表达系统生产，该过程中会残留 *E. coli* 菌体蛋白。该研究建立了检测原液中宿主细胞蛋白（HCP）的双抗夹心 ELISA 法，并进行了方法学验证试验。结果表明，原液样品对大肠埃希菌菌体蛋白质的检测无干扰作用，检测时无需稀释，方法专属性良好。*E. coli* HCP 标准品的质量浓度为 3 ～ 200 ng/mL 时，与 OD_{450} 值的四参数拟合曲线呈良好相关性（R^2>0.999）；定量下限为 3 ng/mL。该法回收率为 93.0％～ 100.2％，RSD 为 3.3％～ 6.3％；重复性试验 RSD 为 12.1％；中间精密度试验 RSD 为 11.6％。检测 3 批原液样品，结果 HCP 残留量均低于 1 μg/mg 质粒的质量标准限度。该法可为同类型产品及其他基于 *E. coli* 发酵工艺的重组生物制品中 HCP 残留量的测定提供参考。

关键词：肝细胞生长因子；重组裸质粒；注射液；宿主细胞蛋白残留；双抗夹心 ELISA 法；质量控制
中图分类号：R917；TQ464.6　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-8255(2026)05-0602-05
引用：张　波, 王艺诺, 马杉姗, 等．基于ELISA法测定重组人肝细胞生长因子裸质粒注射液原液中的宿主细胞蛋白残留量[J]．中国医药工业杂志, 2026, **57**(5): 602-606．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2026.05.014

Establishment and Validation of an ELISA Method for Host Cell Protein Residues in Drug Substance of Recombinant Human Hepatocyte Growth Factor Naked Plasmid Injection

ZHANG Bo[#], WANG Yinuo[#], MA Shanshan, LI Shangru, HOU Huili[*]
(*Beijing Northland Biotechnology Co., Ltd., Beijing 100085*)

ABSTRACT: Recombinant human hepatocyte growth factor naked plasmid injection is produced using an *Escherichia coli* expression system, which may lead to residual *E. coli* host cell protein (HCP) during manufacturing. A double-antibody sandwich ELISA method was established for determination of HCP residues in the drug substance of recombinant human hepatocyte growth factor naked plasmid injection. The results showed that the drug substance required no dilution for testing and no interference was observed in the detection of *E. coli* HCP indicating good specificity. The *E. coli* HCP standard showed a good linear relationship with the four-parameter logistic curve of OD_{450} values in the mass concentration range of 3 – 200 ng/mL (R^2>0.999), with a LOQ of 3 ng/mL. The recoveries ranged from 93.0% to 100.2% , with RSD between 3.3% and 6.3% . The repeatability RSD was 12.1% , and the intermediate precision RSD was 11.6% . The HCP residues in three batches of drug substance were all below the specification of 1 μg/mg plasmid. This method may serve as a reference for the determination of HCP residues in similar products and other recombinant biologics produced by *E. coli* fermentation processes.

Key Words: hepatocyte growth factor; recombinant naked plasmid; injection; residual host cell protein; double-antibody sandwich ELISA; quality control

重组人肝细胞生长因子裸质粒注射液（以下简称“质粒注射液”）是一款创新型基因治疗药物，以大肠埃希菌（*Escherichia coli*）为受体菌，将带有编码肝细胞生长因子的质粒转化进入菌体，通过发酵、前处理和纯化等步骤制得重组质粒，该注射液适应证为严重下肢缺血性疾病，包括溃疡及静息痛[1]。该药品通过 *E. coli* 表达系统生产，此过程中会残留 *E. coli* 菌体蛋白。残留的宿主细胞蛋白（host cell protein，HCP）是基因治疗药物质量控制的关键指标之一[2-3]。HCP 可能引发机体过敏反应，其潜在的“佐剂效应”还可能导致机体对药物产生抗体，影响药物疗效[4-5]。ChP 2025 年版规定，在使用 *E. coli* 表达系统生产的重组生物制品中，HCP 不得超过蛋白质总量的 0.10%；USP<1047>“基因治疗产品”规定，重组质粒 DNA 药物中 HCP 的限度为不高于 3 μg/mg DNA。综上所述，将本品原液的 HCP 限度规定为不高于 1 μg/mg 质粒。

双抗夹心 ELISA 法于 2000 年被收录于 ChP 并沿用至今，具有高灵敏度和特异性，是目前检测 HCP 的主流方法[6-8]。常见的生产用细胞株可采用商品化 HCP 残留检测试剂盒，经验证后使用[9-10]。然而，目前尚未见市售 ELISA 试剂盒检测质粒注射液中 HCP 的适用性验证报道。为保障生产过程中质量控制的有效性，本研究选用 *E. coli* 菌体蛋白质残留量 ELISA 检测试剂盒，建立并验证了适用于检测该注射液中 HCP 的 ELISA 法。

1 仪器与试药

SpectraMax iD3 型酶标仪（美国 Molecular Devices 公司）；MicBio-IV 型酶标板恒温振荡器（合肥艾本森科学仪器有限公司）。

质粒注射液原液（质粒含量为 2.02、2.03、1.94 mg/mL，批号 01JC202311003、01JC202311004 和 01JC202312005）和原液空白溶剂均由北京诺思兰德生物技术股份有限公司提供；*E. coli* HCP ELISA Kit 检测试剂盒［美国 Cygnus 公司，批号 120124A-1，其中包括辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记的抗 *E. coli* 抗体（羊多抗，批号 1223B-1223）、抗 *E. coli* coated microtiter strips（96 孔板，批号 111223）、*E. coli* HCP 标准品溶液（0、3、6、12、25、50、100、200 ng/mL，批号 281123-1）、终止液（批号 LSTPZ03C）、3,3',5,5'- 四甲基联苯胺（3,3',5,5'-tetramethylbenzidine，TMB）底物（批号 TMBWZ04）和 20 倍浓缩洗涤液（批号 WSHWZ04C）］。

2 方法与结果

2.1 检测方法

试剂盒于室温放置，确保所有组分均达到室温后进行检测。取出试验所需板条，标记顺序，每个待测样本 2 个复孔，向各反应孔中加入 HRP 标记的抗 *E. coli* 抗体 100 μL；分别取质量浓度为 200、100、50、25、12、6、3、0 ng/mL 的 HCP 标准品溶液和待测样品溶液各 50 μL，加至对应的反应孔中，密封，置酶标板恒温振荡器中，在室温、400～600 r/min 的条件下振荡孵育 90 min。翻转酶标板，使其垂直向下，甩出所有孔中的液体，倒扣在滤纸上轻轻拍打，去除孔中大部分残余液体，每孔加入洗涤液（1×）350 μL，随后再次倾倒并拍打，重复洗涤 4 次后，立即加入 TMB 显色液，每孔 100 μL，室温避光静置 30 min，每孔加入终止液 100 μL，显色均匀后置酶标仪中进行读数（需在 30 min 内完成操作）。检测波长设置为 450 nm，测定各反应孔的光密度（OD_{450}）值。以不含 HCP 标准品时测得的 OD_{450} 值为本底，以不同质量浓度（200、100、50、25、12、6、3 ng/mL）为横坐标、对应的 OD_{450} 值为纵坐标，作四参数曲线。

2.2 样品稀释倍数研究

取质粒注射液原液，用原液空白溶剂稀释 2 倍作为供试溶液。取 3 个批次的原液及相应的供试溶液，照“**2.1**”项下方法检测，对比 HCP 含量。结果（表 1）显示，3 批原液及供试溶液中的 HCP 含量均低于标准品的最低质量浓度（3 ng/mL），表明原液检测时不需要稀释。

2.3 方法学验证试验

2.3.1 专属性试验

取质粒注射液原液，与等体积标准品溶液（不含 HCP）混合，作为供试品溶液；另取原液，分别

对文章贡献相同。
收稿日期：2025-10-06
基金项目：国家科技重大专项项目（2018ZX09301-010-003）
作者简介：张　波，硕士，从事生物药质量控制研究。
王艺诺，硕士，从事生物药质量控制研究。
通信作者：侯慧丽，硕士，副高级工程师，从事生物药质量控制研究。

表 1　样品稀释对 HCP 含量检测结果的影响

Tab.1　Effect of Sample Dilution on Detection Results of HCP Content

样品批号	处理方式	检测值 /(ng·mL^{-1})
01JC202311003	不稀释	2.39
	2 倍稀释	0.80
01JC202311004	不稀释	2.52
	2 倍稀释	0.90
01JC202312005	不稀释	2.17
	2 倍稀释	0.70

与等体积标准品溶液（含 HCP100、50、25 ng/mL）混合，作为加标供试品溶液，加标量分别为 50.0、25.0、12.5 ng/mL。照“**2.1**”项下方法进行检测，计算回收率［（加标量实测值 － 供试品量）/ 加标量实测值 ×100％］。可接受标准为：回收率在 80％～120％。结果（表 2）显示，加标量为 50.0、25.0、12.5 ng/mL 的供试品溶液的回收率分别为 102.9％、96.4％、90.8％，均在可接受范围内，表明 *E. coli* 的 HCP 标准品不会对该检测方法产生干扰作用，方法专属性良好。

表 2　专属性验证结果

Tab.2　Specificity Verification Results

样品	实测值 /(ng·mL^{-1})	回收率 /%
加标量 50 ng/mL	52.23	102.9
加标量 25 ng/mL	24.90	96.4
加标量 12.5 ng/mL	12.15	90.8
供试品量	0.80	—

注：“—”表示不适用。

2.3.2　线性试验

取质量浓度为 200、100、50、25、12、6、3 ng/mL 的 HCP 标准品溶液，照“**2.1**”项下方法检测。以标准品质量浓度为横坐标、吸光度值为纵坐标，进行四参数曲线拟合，所得标准曲线的相关系数（R^2）应不低于 0.99。结果显示，HCP 标准品质量浓度（c）在 3 ～ 200 ng/mL 时，与 OD_{450} 值的四参数曲线呈良好线性关系，拟合方程为：$OD_{450}=16.17+(-0.009-16.17)/[1+(c/1\,956)^{0.901}]$，$R^2>0.999$。

2.3.3　定量下限试验

试剂盒说明书中注明的定量下限为 3 ng/mL。取质量浓度为 3 ng/mL 的 HCP 标准品溶液，作为定量下限样品溶液，设置 6 个复孔，照“**2.1**”项下方法检测，计算 6 份样品检测值的 RSD 和回收率（检测值 / 理论值 ×100％）。可接受标准为：RSD ≤ 15％，回收率在 80％～ 120％。结果显示，3 ng/mL 标准品溶液的检测值（n=6）为（2.74±0.19）ng/mL，RSD 为 7.0％，回收率为 91.3％，表明本方法的定量下限为 3 ng/mL。

2.3.4　准确度试验

取高、中、低质量浓度（100、25、6 ng/mL）的 HCP 标准品溶液，每个水平设置 3 个复孔，照“**2.1**”项下方法检测，照“**2.3.3**”项下方法计算回收率。可接受标准为：回收率在 80％～ 120％。结果（表 3）显示，高、中、低质量浓度标准品溶液的回收率分别为 97.1％、100.2％、93.0％，均在可接受范围内，表明方法准确度良好。

表 3　准确度试验验证结果（n=3）

Tab.3　Verification Results of Accuracy Test（n=3）

质量浓度 /(ng·mL^{-1})	检测值 /(ng·mL^{-1})	回收率 /%	RSD/%
100	97.14±3.17	97.1	3.3
25	25.05±1.04	100.2	4.2
6	5.58±0.35	93.0	6.3

2.3.5　重复性试验

取质粒注射液原液，设置 6 个复孔，照“**2.1**”项下方法检测，计算 6 份样品检测值的 RSD。可接受标准为：RSD ≤ 15％。结果显示，6 份样品中的 HCP 含量检测结果为（2.70±0.33）ng/mL，RSD 为 12.1％，表明方法重复性良好。

2.3.6　中间精密度试验

取质粒注射液原液，由不同实验人员于不同日期照“**2.1**”项下方法设置 6 个平行样品进行检测，计算不同实验人员、不同日期检测同一样品的 RSD。可接受标准为：RSD ≤ 15 ％。不同实验人员、不同日期检测同一样品所得的 HCP 含量如表 4 所示，平均值为（2.66±0.31）ng/mL，RSD 为 11.6 ％（n=12），表明方法中间精密度良好。

2.4　方法的初步应用

用建立的方法检测 3 批质粒注射液原液的 HCP 残留量（HCP 残留量 =HCP 含量 / 质粒含量）。检测

表 4 中间精密度验证结果

Tab.4 Verification Results of Intermediate Precision Test

人员	平行样品	检测值 /(ng·mL^{-1})
A	1	2.27
	2	2.83
	3	2.85
	4	2.33
	5	2.87
	6	3.08
B	1	3.05
	2	2.38
	3	2.43
	4	2.86
	5	2.26
	6	2.78

结果分别为 1.35×10^{-3}、1.30×10^{-3} 和 1.07×10^{-3} μg/mg 质粒，如表 5 所示。该结果远低于宿主菌蛋白质残留量不高于 1 μg/mg 质粒的质量标准，表明目前的生产工艺能有效去除原液中的 HCP。

表 5 原液中 HCP 残留量的检测结果

Tab.5 Residual HCP Detection Results in the Original Solution

批号	HCP 含量 /(ng·mL^{-1})	质粒含量 /(mg·mL^{-1})	HCP 残留量 /(μg·mg^{-1})
01JC202311003	2.72	2.02	1.35×10^{-3}
01JC202311004	2.64	2.03	1.30×10^{-3}
01JC202312005	2.08	1.94	1.07×10^{-3}

3 讨论

HCP 的组成成分复杂、多样，受宿主表达系统、培养条件和生产工艺等多个因素的影响[11-12]。双抗夹心 ELISA 法虽是目前 HCP 残留量检测的主要方法，但该法高度依赖试剂盒中抗体对 HCP 的覆盖率。若检测时使用的抗体覆盖率不足，可能会导致终产品中残留 HCP 的漏检，从而引起患者免疫反应或造成其他的药物安全性问题。因此，各国药典均要求对 HCP 抗体的覆盖率进行评估，若覆盖率不足，需开发特异性的自制试剂盒[13-15]。然而，基于特异性抗体的检测方法只能对 HCP 总浓度或特定的单一蛋白成分进行定量分析，无法全面监测 HCP 的全部种类及其含量分布，存在一定局限性[16]。

在 HCP 抗体覆盖率的检测技术中，近年来开发的免疫亲和富集 - 质谱联用方法，可在天然状态下模拟 ELISA 反应，直接鉴定 HCP 种类，从而更真实、全面地评估抗体的覆盖谱系[17-18]。传统的双向电泳联合免疫印迹法虽因蛋白变性，可能导致部分表位识别受限，且难以提供 HCP 的身份信息，但仍具有以下优势：该法是监管机构普遍认可的分析技术，结果具有明确的法规可接受性；通过凝胶图谱与免疫印迹图谱的直观比对，可清晰呈现抗体所识别出来的 HCP 的相对分子质量与等电点分布，便于快速定位未覆盖区域[19]；此外，该法所用设备普及度高、操作方法成熟、成本可控，适用于工艺开发早期的常规筛选。本公司通过双向电泳和免疫印迹法分析了抗 *E. coli* HCP 抗体对空载 *E. coli* 蛋白的覆盖率，结果显示，空载 *E. coli* 菌体破碎后的上清液免疫印迹图谱，与相关的快速银染图谱约有 54%的蛋白质点重合，表明该抗体能与约 54%的 HCP 结合。

本研究开展了原液稀释倍数的考察，并通过加标回收率试验评估其适用性。监管机构同样非常关注原液生产过程中的各纯化步骤对 HCP 的去除效果。因此，将 HCP 检测纳入关键中间产品的质控范围，可较全面地监测整个工艺去除 HCP 的能力。后续将进一步明确中间产品缓冲液是否干扰本法的检测结果，同时确定各阶段产物检测中所需的稀释比例。

本试验表明，双抗夹心 ELISA 法专属性良好、灵敏度高、重复性与准确度良好，可用于质粒注射液原液中 HCP 残留量的检测，同时可为同类型产品及其他基于 *E. coli* 发酵工艺的重组生物制品中 HCP 残留量的测定提供参考。

参考文献：

[1] WANG P, RONG Z, LI F, *et al*. Optimal injection sites for therapeutic angiogenesis: HGF-mediated regulation of HIF-1α via MAPK/PI3K pathways in hypoxic endothelial cells [J]. *Tissue Cell*, 2025, **95**: 102871.

[2] 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.

[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] SOOK YEN E, YUNLI H, MOLDEN R, *et al*. Identification and quantification of a problematic host cell protein to support therapeutic protein development [J]. *J Pharm Sci*, 2023, **112**(3): 673-679.

[5] OH Y H, BECKER M L, MENDOLA K M, *et al*. Characterization and implications of host-cell protein aggregates in biopharmaceutical processing [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2023, **120**(4): 1068-1080.

[6] LAVOIE R A, CHU W, LAVOIE J H, *et al*. Removal of host cell proteins from cell culture fluids by weak partitioning chromatography using peptide-based adsorbents [J]. *Sep Purif Technol*, 2021, **257**: 117890.

[7] 程小玲, 罗　敏, 程　尧, 等. ELISA试剂盒检测Sabin株脊髓灰质炎灭活疫苗Vero细胞宿主蛋白残留量的验证[J]. 微生物学免疫学进展, 2023, **51**(5): 33-38.

[8] 路晶晶, 霍丽楠. 纳升超高效液相色谱-质谱联用技术及酶联免疫吸附试验分析贝伐珠单抗中宿主细胞蛋白残留[J]. 中国生物制品学杂志, 2025, **38**(5): 588-594.

[9] 于继伟, 尹红锐, 邵　泓. 质谱技术在单克隆抗体类药物宿主细胞残留蛋白检测中的应用进展[J]. 药物流行病学杂志, 2023, **32**(4): 458-465.

[10] 饶春明, 王军志, 高　凯, 等. 应用ELISA测定重组细胞因子中残余大肠杆菌菌体蛋白含量[J]. 中国生物制品学杂志, 2000, **13**(1): 42-45.

[11] 郭润姿, 伊君梅, 孙　澳, 等. NMM抗肿瘤DNA疫苗原液大肠杆菌菌体蛋白质残留量检测方法的建立与验证[J]. 中国医药科学, 2023, **13**(9): 85-89.

[12] HESSMANN S, CHERY C, SIKORA AS, *et al*. Host cell protein quantification workflow using optimized standards combined with data-independent acquisition mass spectrometry [J]. *J Pharm Anal*, 2023, **13**(5): 494-502.

[13] PANIKULAM S, HANKE A, KROENER F, *et al*. Host cell protein networks as a novel co-elution mechanism during protein A chromatography [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2024, **121**(5): 1716-1728.

[14] 田易晓, 黄庆生, 王新月, 等. 生物制剂工艺特异性残留宿主蛋白ELISA检测方法的建立及验证[J]. 中国生物制品学杂志, 2024, **37**(2): 221-226.

[15] OH Y H, MENDOLA K M, CHOE L H, *et al*. Identification and characterization of CHO host-cell proteins in monoclonal antibody bioprocessing [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2024, **121**(1): 291-305.

[16] 谢力琦, 王　静, 朱添怡, 等. 生物质谱在生物制品宿主细胞蛋白残留分析中的应用[J]. 质谱学报, 2024, **45**(2): 193-200.

[17] SEISENBERGER C, GRAF T, HAINDL M, *et al*. Toward optimal clearance: a universal affinity-based mass spectrometry approach for comprehensive ELISA reagent coverage evaluation and HCP hitchhiker analysis [J]. *Biotechnol Prog*, 2022, **38**(3): e3244.

[18] TAKAGI S, SHIBATA M, SUZUKI N, *et al*. Immunoreactivity profiling of Anti-Chinese hamster ovarian host cell protein antibodies by isobaric labeled affinity purification-mass spectrometry reveals low-recovery proteins [J]. J Chromatogr A, 2022, **1685**: 463645.

[19] BERKELMAN T, HARBERS A, BANDHAKAVI S. 2-D Western blotting for evaluation of antibodies developed for detection of host cell protein [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, **1295**: 393-414.