

• 综 述 •

# 重组蛋白产业化中内毒素的去除、检测及限值

刘书岩<sup>1</sup>, 田文华<sup>1</sup>, 李玲<sup>1</sup>, 张蕻<sup>1</sup>, 王建<sup>1</sup>, 于玉凤<sup>2\*</sup>

1 山西锦波生物医药股份有限公司 功能蛋白山西省重点实验室, 山西 太原 030032

2 山西医科大学 基础医学院, 山西 太原 030001

刘书岩, 田文华, 李玲, 张蕻, 王建, 于玉凤. 重组蛋白产业化中内毒素的去除、检测及限值[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4006-4018.

LIU Shuyan, TIAN Wenhua, LI Ling, ZHANG Hong, WANG Jian, YU Yufeng. Removal, detection, and limits of endotoxin in the industry of recombinant proteins[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4006-4018.

**摘 要:** 随着合成生物技术的发展, 重组蛋白将在医疗领域发挥重要作用。重组蛋白规模化生产是其在各领域普及、发展的基础。规模化生产过程中需要对内毒素进行去除与检测, 将其在终产品中的含量降到安全水平。针对不同重组蛋白产品制定严格的内毒素限值要求是安全性评价的重要一环。本文综述了内毒素的致病性, 讨论了重组蛋白生产过程中内毒素的去除及测定方法, 介绍了生物制品、医疗器械、人用重组 DNA 制品等行业对内毒素检测限值的要求, 重点介绍了重组蛋白注射产品的内毒素限值要求, 明确无论重组蛋白表达宿主是否为细菌, 均需对注射用重组蛋白的终产品进行内毒素检测, 并需符合相关行业标准要求。本文将为重组蛋白规模化生产过程中内毒素的相关研究提供参考。

**关键词:** 重组蛋白; 内毒素致病性; 内毒素去除; 内毒素检测; 内毒素限值

## Removal, detection, and limits of endotoxin in the industry of recombinant proteins

LIU Shuyan<sup>1</sup>, TIAN Wenhua<sup>1</sup>, LI Ling<sup>1</sup>, ZHANG Hong<sup>1</sup>, WANG Jian<sup>1</sup>, YU Yufeng<sup>2\*</sup>

1 Shanxi Key Laboratory of Functional Proteins, Shanxi Jinbo Biopharmaceutical Co., Ltd., Taiyuan 030032, Shanxi, China

2 School of Basic Medical Sciences, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China

**Abstract:** With the advancement of synthetic biology, recombinant proteins are poised to play a significant role in medical applications. The scaled manufacturing is a pillar for the extensive

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFC2411205)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFC2411205).

\*Corresponding author. E-mail: yuyf021@sxmu.edu.cn

Received: 2024-01-17; Accepted: 2024-05-14

application and development of recombinant proteins across various fields. In the large-scale production process of recombinant proteins, the removal and detection of endotoxins are essential to reduce their levels to safe thresholds in the final products. Currently, establishing stringent endotoxin limits for different recombinant protein products is a crucial aspect of safety assessment. This review begins by shedding light on the pathogenicity of endotoxins and discusses the methods for the removal and determination of endotoxins during the production processes of recombinant proteins. Subsequently, this review summarizes the endotoxin limits in industries such as biologics, medical devices, and human recombinant DNA products, particularly those in recombinant protein injection products. It is highlighted that regardless of whether the hosts for recombinant protein expression are bacteria or not, endotoxin testing is required for the final products of injectable recombinant proteins, and compliance with relevant industry standards is necessary. This review aims to provide a reference for the research on endotoxins in the large-scale production process of recombinant proteins.

**Keywords:** recombinant protein; endotoxin pathogenicity; endotoxin removal; endotoxin detection; endotoxin limits

重组蛋白可用于疾病的预防和治疗。重组蛋白的制备是利用 DNA 重组技术将目标基因通过载体导入宿主细胞,表达并翻译成蛋白质实现的。为了得到具有生物活性的蛋白质产品,需要进行一系列的处理,包括蛋白的提取和纯化。规模化生产过程中,无论宿主细胞是否为细菌,都有引入细菌污染的可能。伴随革兰氏阴性菌的死亡或分解,细胞外膜中的内毒素(也称为脂多糖, lipopolysaccharide, LPS)被释放到裂解物中。内毒素具有较强的致病性,其物理化学性质非常稳定且种类多样。因此,在以注射为主要用途的重组蛋白产品生产过程中,细菌内毒素的综合评价成了非常重要的一环。内毒素控制的目标是在降低产品损耗的同时,利用合理的内毒素去除技术以及内毒素检测技术将产品的内毒素水平降低至内毒素限值以下,以提高产品安全性。

## 1 内毒素毒性

### 1.1 内毒素结构

内毒素是革兰氏阴性细菌细胞壁的主要成

分,在细胞壁结构和功能完整性方面发挥着至关重要的作用。1935 年,Boivin 和 Messrobianu 首次从革兰氏阴性菌中分离出内毒素,将其描述为脂质和多糖的外膜复合物,并命名为“脂多糖”<sup>[1]</sup>。内毒素具有细菌毒性,在细胞分裂、外膜小泡脱落或细菌细胞死亡等过程中,内毒素可被释放到周围介质中。单个单体形式的内毒素分子的分子量为 10–30 kDa,其具有稳定的物理化学性质,独立的内毒素分子可凭借两性性自发形成分子量超过 1 000 kDa、直径达 0.1  $\mu\text{m}$  的超分子内毒素聚集体<sup>[2]</sup>。所有革兰氏阴性菌菌株的内毒素结构均由基本的 3 个单元组成,即 O-抗原、核心多糖和脂质 A,并且这些结构高度有序<sup>[3]</sup>。核心多糖是内毒素的核心成分,位于 O-抗原和脂质 A 之间,由一系列保守的低聚糖组成。核心多糖区域可分为 2 个亚基,即内核和外核。脂质 A 由疏水性脂肪酸组成,与核心多糖共价连接并嵌入革兰氏阴性菌外壁,主要决定内毒素毒性。O-抗原与亲水性核心多糖共价连接,位于细胞外侧。O-抗原产生抵抗力物质,使细菌能够逃逸宿主免疫系统,且在不同菌株之间

差异较大<sup>[4-6]</sup>。

## 1.2 内毒素的致病性

研究表明,内毒素具有诱导促炎反应和引发严重生理反应的能力<sup>[7]</sup>。内毒素与宿主细胞(如巨噬细胞)的相互作用诱导产生有效的生物活性介质<sup>[8-10]</sup>。当大量生物活性介质在体内循环时,会导致身体内部稳态失衡,通常表现为高烧、低血压和感染性休克<sup>[11]</sup>。毒素血症和脓毒症是医学上两种常见的综合征,通常由革兰氏阴性菌引起。

### 1.2.1 内毒素的致热性

内毒素致热性涉及先天免疫系统的激活,引起急性时相反应中的发热反应。内毒素作用于机体后,可以刺激机体多形核白细胞产生“内源性热原”。在该过程中,肿瘤坏死因子- $\alpha$ 是在循环中出现的第1种细胞因子,其次是微量白细胞介素-1 $\beta$ 、大量白细胞介素-6、白细胞介素-8以及其他细胞因子,如机体在感染或损伤时释放的巨噬细胞炎症蛋白-1<sup>[12-17]</sup>。内源性致热原作为基本信息分子通过体液途径、迷走神经途径中的一种或两种将发热信号传入体温调节中枢<sup>[18]</sup>,对下丘脑的体温调定点起作用,导致温度阈值上移。在这种情况下,体温调节中枢释放的神经冲动能够重新调整体温,使机体产热大于散热,进而出现体温上升现象<sup>[19]</sup>。

### 1.2.2 内毒素血症与内毒素休克

脓毒症是一种危险的感染反应,通常会引起患者机体紊乱,严重时可导致死亡<sup>[20]</sup>。脓毒症主要由内毒素等细菌毒性产物引起。内毒素血症是脓毒症的重要症状之一,通常由大量内毒素进入血液循环引起<sup>[21]</sup>,随后内毒素主要作用于巨噬细胞、血小板、内皮细胞、中性粒细胞等,引发机体产生肿瘤坏死因子、5-羟色胺、前列腺素、组胺、激肽等活性物质。在内毒素血症的临床进展过程中,可观察到几种严重的病理功能障碍,包括血压改变、温度控制能力

丧失和凝血障碍等,这些障碍通常会导致弥散性血管内凝血<sup>[22-23]</sup>。环境中内毒素促进血小板和中性粒细胞的活化以及血小板和中性粒细胞的聚集,这种聚集是弥散性血管内凝血的关键触发因素<sup>[24-25]</sup>。白细胞及血小板的黏附引发血液高凝,形成大量微血栓,血小板和凝血因子的减少又进一步促进了血液消耗性低凝;活化和受损的内皮细胞成为促凝剂,向血液循环释放更多的抗凝血剂和促纤维蛋白溶解分子,进而导致消耗性低凝和高纤溶;之后肿瘤坏死因子会诱导溶酶体激活<sup>[26]</sup>。弥散性血管内凝血还可促发小血管内广泛纤维蛋白沉着,此现象与脓毒症患者的不良预后和血管血栓形成直接相关,也与器官衰竭甚至器官衰竭引起个体死亡有关<sup>[27-29]</sup>。

内毒素性休克的出现往往伴随内毒素血症的发生。在炎症细胞、血小板和血管内皮与内毒素相互作用后,释放的细胞因子以及脂质介质协同作用于全身,进而引发多种次级介质释放以响应初级介质。内毒素性休克的发生是机体于内毒素反应后多种因素互相作用、互为因果的综合表现<sup>[30]</sup>。同时,凝血途径和纤溶途径的激活可消耗大量的凝血因子,微循环障碍促进了内毒素休克的发生。在这个过程中出现了细胞组织损伤引起的血流动力学改变和微循环障碍,进而导致病人的休克甚至死亡。深入探究内毒素休克的形成机制可以为处理感染性休克提供全新的研究思路和技术。

## 2 内毒素的去除

内毒素是一种物理化学结构稳定的分子,破坏内毒素分子结构需要通过加热或酸碱处理,如分别用180–250 °C和超过0.1 mol/L的酸或碱处理以破坏玻璃器皿和其他实验室设备上的内毒素<sup>[31-32]</sup>。内毒素分子形成胶束聚集体表明

可能有多种蛋白质与内毒素分子相互作用<sup>[33-34]</sup>。由于蛋白质-内毒素相互作用,从蛋白质溶液中去除内毒素需要能够与内毒素产生强相互作用的技术,例如亲和色谱法。同时,加强蛋白质-内毒素复合物的特异性解离也可以提高内毒素分子的去除效率。鉴于生物制品种类繁多,开发出一种从所有产品中去除内毒素的通用方法非常困难。目前内毒素去除工艺主要用于减少蛋白质制剂的内毒素污染,基于原理的不同可分为离子交换色谱法、亲和层析法、凝胶过滤色谱、超滤和 Triton X-114 液相分离法等(表 1)。这些技术从蛋白质中分离内毒素的成功与否很大程度上取决于目标蛋白的特性,如分子大小、静电和疏水特性等。

## 2.1 阴离子交换色谱法

去除内毒素可以利用内毒素分子带有负电荷、等电点约为 2 的特征进行工艺设计<sup>[35]</sup>。阴离子交换基质,可以阻止带有净正电荷的碱性

蛋白质的吸附,因此可以使用阴离子交换色谱法处理带有内毒素的液体。在这种情况下,柱中的阴离子交换树脂有效地结合内毒素而不结合蛋白质,最终使内毒素结合在阴离子交换树脂上而蛋白质流过柱。该方法的优点是成本较低且样品处理量较大,但在使用该方法时,需要考虑样品与树脂之间或内毒素与蛋白质之间是否存在显著的离子相互作用,如溶液中有其他带负电荷成分或内毒素与蛋白质紧密结合情况下会导致蛋白质回收率较低或内毒素去除效率降低问题<sup>[36-37]</sup>。

目前常用的阴离子交换色谱法中,可供选择的材料包括 Q-XL 树脂和 Q-HP 树脂等,对去除蛋白质溶液中的内毒素具有良好的效果。但该方法需要根据目的蛋白质特性对溶解蛋白质工作液的 pH、电导率、与柱材接触时间及柱材体积进行调整,以获得更好的内毒素去除效果和更高的蛋白质收率。

表 1 重组蛋白产业化内毒素去除方法原理及优缺点比较

Table 1 Comparison of principles, advantages and disadvantages of endotoxin removal methods for recombinant protein industrialization

Methods	Principles	Advantages	Disadvantages
Anion exchange chromatography	Negatively charged endotoxins are removed by binding to anion exchange media	Lower cost, higher capacity	It is required that there are no other negatively charged components in the solution. Tight binding of endotoxin to proteins can result in lower protein recovery or less efficient endotoxin removal.
Affinity chromatography	Use of specific ligands solidified on a substrate to make an affinity medium that specifically binds endotoxin	Higher efficiency and selectivity	Higher cost
Ultrafiltration	Removal of macromolecular endotoxins by membrane surface mechanical sieving, membrane pore blocking and membrane surface and pore adsorption	Simple operation, large processing capacity, fast separation speed, low energy consumption	Low yield, not suitable for large molecules
Triton X-114 liquid phase separation	Binding of detergent to the lipid fraction of endotoxin and removal of endotoxin by liquid-phase separation	Easy to operate, low cost	Residue of detergent in the product

## 2.2 亲和层析法

内毒素的 O-抗原和核心多糖具有多样性, 因此在设计具有生物识别能力的配体时应针对内毒素结构中最保守的部分, 即脂质 A。另外, 配体的结构应具有柔性, 柔性结构可保证配体和内毒素分子形成具有高度稳定性的阴离子-阳离子复合物<sup>[38]</sup>。从而使内毒素分子被结合在体系中的亲和吸附剂上。针对不同的相互作用, 亲和层析法还可选择免疫亲和配体、具有阳离子官能团的聚合物基质、多阳离子配体、脱氧胆酸等作为亲和吸附剂, 因此该方法效能及选择性较高。工业生产过程中的有时可通过设计合理的生产工艺在收获产物的同时有效去除内毒素。重组蛋白常由微生物或细胞发酵产生, 针对注射用重组蛋白产品则有着更加严格的生产工艺及环境要求, 同时成本也相对较高。在纯化工艺中, 通过选择合理的柱材及工作液, 可有效将产品中的内毒素水平降到合理的范围内。如针对带有组氨酸标签的注射用重组蛋白的纯化, 使用  $\text{Ni}^{2+}$  亲和柱可在获得高纯度重组蛋白的同时有效去除溶液中的内毒素。

## 2.3 超滤法

超滤法分离细菌内毒素常以筛滤为主, 其主要功能包括膜表面机械筛分、膜孔阻滞和膜表面及膜孔吸附。超滤膜上的筛孔可截留体积大于微孔的微粒, 而体积小于微孔的微粒通过超滤膜。利用内毒素分子常常聚集形成聚集体这一特点, 可通过使用微孔体积大于目的蛋白且小于内毒素分子聚集体的超滤膜进行内毒素的去除。当内毒素聚集体与目的蛋白质大小相似时, 则可在工作液中添加一些金属离子促进内毒素分子的聚合, 从而提高内毒素的去除效率。例如, 在超滤去除血红蛋白溶液中的内毒素时, 通过在工作液中加入  $\text{Ca}^{2+}$  可促进内毒素分子聚集, 从而将内毒素终含量控制在  $6 \text{ pg/mL}$ <sup>[39]</sup>。

超滤法去除蛋白质溶液中内毒素具有操作简单、处理量大、分离速度快、能耗低等优点。超滤系统的占用面积也较小, 超滤膜可重复使用。但该方法操作过程中会使用较高的压力, 因此不适合相对分子质量较大的样品, 且通常产品收率较低。

## 2.4 Triton X-114 液相分离法

Triton X-114 是一种不含离子的化合物, 可用作表面活性剂, 在适当的溶液条件下自发分离成两种不混溶的液相, 其中一个液相具有比另一个液相更高的胶束浓度, 即富胶束相和贫胶束相。富胶束相和贫胶束相中物理化学环境之间的差异构成了有效分离的基础。在液相分离系统中, 富胶束相与其中的生物分子之间具有更强的排外体积, 根据相互作用大小优先驱动生物分子进入贫胶束相。因此, 内毒素保留在富胶束相中, 目的蛋白进入贫胶束相, 之后还可通过离心或进一步提高两相分离体系温度加速内毒素去除速度<sup>[40-41]</sup>。通过不断重复此过程至剩余内毒素浓度低于限值。该方法的优点是操作简单且成本较低, 但不能将体系中的表面活性剂去除干净, 需要通过额外的吸附或凝胶过滤工艺去除, 因此可能导致产品损失。

# 3 内毒素检测方式

内毒素分子具有多种致热原效力, 因此检测产品中内毒素水平极其重要。内毒素的检测方法根据检测时是否使用鲎相关试剂, 分为鲎试剂检测法与非鲎试剂检测法; 非鲎试剂检测法又可分为直接检测法与间接检测法, 直接检测法是直接检测内毒素的活性或浓度, 而间接检测通常检测在内毒素影响下的不同免疫细胞和细胞系产生促炎细胞因子的生物活性以判断内毒素水平。随着精确度要求的不断提高与鲎资源短缺问题的加重, 更多种类的内毒素检测

方法被不断开发出来,并已在某些领域投入使用。但这些新的试验方法在被广泛接受之前,需要进行测试以确保其等效性、安全性,并对其操作规程进行管理和控制。

### 3.1 鲎试剂(limulus amebocyte lysate, LAL)测定

1964年,Levin和Bang发现大西洋鲎(*Limulus polyphemus*)的裂解物在接触细菌内毒素时会凝结<sup>[42-43]</sup>,他们的研究成果拉开了鲎试剂测定的序幕。

#### 3.1.1 传统鲎试剂(LAL)测定

目前的试验方法可以通过将待测液体样品与鲎试剂混合,观察混合物的外观、浑浊度、颜色等指标或使用其他经过验证的检验方法进行细菌内毒素的测定,并得出相应结果。目前常采用基于鲎试剂的内毒素测定方法为国家行业标准规定的凝胶法、显色法和浊度法。

鲎试剂测定中使用的蛋白酶级联反应是由内毒素和酶原因子C的组合启动的。活化的因子C刺激因子B,后者将凝固酶原转化为凝固酶。之后,凝固蛋白中的2个肽键被催化裂解,基质形成凝固蛋白凝胶<sup>[44-45]</sup>。值得注意的是,在检测内毒素的各种物理化学、免疫学和生物学技术中,鲎试剂测定法是最灵敏、特异性高、可定量的方法。凝胶法通过将等量的提取物和样品混合,进行一段时间孵育,如果混合物在试管底部保持完整即凝胶已经形成,则测试结果显示为样品至少有足够的内毒素引发阳性反应,该方法的检测限为0.03–0.06 EU/mL。而对于光度测试的显色法和浊度法,通常需要光学读取器辅助分析。

鲎试剂中含有许多其他蛋白质(其中至少10种参与抗菌反应),这些蛋白质可能会导致检测结果出现假阴性与假阳性,例如通过检测葡聚糖和纤维素残基激活鲎试剂级联反应的因子

G蛋白使试验结果受到干扰<sup>[46-47]</sup>。(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖为细胞膜热原的主要成分,其通过触发的蛋白酶因子G途径可形成与鲎试剂反应中相同的凝血蛋白终产物,从而引起假阳性反应。此外,鲎试剂测定所依赖的蛋白质级联可被样品中与内毒素活性位点相结合的游离金属离子、蛋白质、肽和聚合物破坏而失去生物活性,使内毒素水平测量结果偏低。

随着鲎试剂测定法在全球的广泛应用,鲎资源短缺成为不可忽视的问题,同时在动物伦理学和动物资源保护等方面的要求下,鲎试剂面临停产的情况,因此亟需寻求鲎试剂测定法的替代方案。

#### 3.1.2 基于鲎试剂的测定

因子C是鲎试剂级联反应中的第一个内毒素结合因子。因此,由因子C编码基因表达的重组因子C(recombinant factor C, rFC),被认为是一种对内毒素敏感的合成蛋白质,可以用作体外鲎试剂测定的替代品。在该测定方法中,rFC分子被内毒素激活,该分子可切割荧光素底物,从而产生荧光化合物。根据底物的荧光差异与样品中的内毒素浓度成比例的特性,可测量出样品中的内毒素浓度。该方法对内毒素的敏感范围为0.05–500 EU/mL<sup>[48]</sup>。因rFC测定法不包含因子G蛋白,所以避免了葡聚糖污染和其他鲎试剂反应物质导致的假阳性或结果增强问题。rFC是一种高纯度、低批次间变异性的蛋白质,因此内毒素检测批次间的可重复性较高<sup>[49]</sup>。尽管在实验室条件下检测限值较低,rFC测定是鲎试剂测定的有力替代,也可以用于检测各种药品中的细菌内毒素<sup>[50-51]</sup>。但目前缺乏使用rFC测定未知成分和污染物样本中内毒素的长期研究。

其他技术(改良的鲎试剂)包括内毒素散射光度法及使用突变荧光素酶的生物发光测定法

等。内毒素散射光度法是基于与浊度测定相同原理的方法,该方法可以检测流体反应中极小的颗粒<sup>[52]</sup>,使用新开发的生物发光技术将萤火虫萤光素酶与显色萤试剂测定法相结合,提高了内毒素检测范围<sup>[53]</sup>。

### 3.2 非萤试剂测定

#### 3.2.1 直接测定法

气相色谱质谱联用仪(gas chromatography mass spectrometry, GC-MS)测定法旨在通过靶向脂质 A 及其 3-羟基脂肪酸分子测定内毒素水平<sup>[54]</sup>。酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)是一种简单且特异性强的方法,该方法的发展方向是通过使用不同的抗体或探针不断提高其检测灵敏度和通用性,如使用大肠杆菌 0111:B4 J5 突变体的抗体识别内毒素的脂质 A、使用多黏菌素探针捕获内毒素等,该方法有成为标准诊断方法的潜力<sup>[55]</sup>。

#### 3.2.2 间接测定法

家兔热原试验是最古老、最简单的内毒素检测技术。这种方法的原理是基于兔子和人类在内毒素的影响下有相似的发热机制。《美国药典》与《欧洲药典》家兔热原试验要求对检测产品进行稀释,使用 mg/kg 的计量单位给药,以此匹配适用于人体的最大剂量<sup>[56]</sup>。家兔注射热源物质后可在 180 min 内出现体温升高 0.5 °C 的发热现象,研究人员可以直观检测到家兔发热症状。该技术操作方法简单,检测限为 0.5 EU/mL,测试结果灵敏<sup>[57]</sup>。目前,兔热原试验被认为是行业中最好的方法,被广泛应用。但随着时代的进步,实验动物伦理的不断健全,科学界正在尽可能地避免使用活体,因此亟需研发可替代兔热原试验的试验方法。

通过使用不同的免疫细胞和细胞系,如人中性粒细胞、单核细胞和人胚胎肾 293 细胞,开发基于细胞的内毒素测定法。单核细胞活化

试验是家兔热原试验的体外替代品,可以检测所有热原,包括内毒素和非内毒素热原<sup>[57]</sup>。表达 TLR4-MD2-CD14 通路的人胚胎肾 293 细胞株用于检测内毒素触发核转录因子  $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B)以测定内毒素水平<sup>[58]</sup>。

### 3.3 内毒素的掩蔽效应

低内毒素回收率,也称为掩蔽效应,其定义为在内毒素测定结果中内毒素值低于预期 50% 的现象。内毒素的超分子结构可在表面活性剂和螯合剂存在下解离,导致待测溶液中内毒素含量降低<sup>[59]</sup>。在应用较为成熟的萤试剂测定法时,除了活性物质本身之外,制剂成分也可能影响萤试剂对内毒素的检测。同时,温度、时间、pH、内毒素菌株、盐浓度、蛋白质、两亲性分子和血液成分都在一定程度上影响着内毒素的检测结果<sup>[60-62]</sup>。

由多学科技术融合开发新方法将会是内毒素检测现代化发展的重要方向,这些新方法将会逐步代替以萤试剂为基础的现有检测方法。电化学与光学检测具有比生物指示剂更高的灵敏度,其检测结果也可通过计算机处理后通过数据直观地表现出来。目前,已经有诸如电化学阻抗谱、表面等离子体共振、基于电化学的纳米通道生物传感器等检测技术用于内毒素检测,但因其成本较高,同时还需要操作者有较深厚的专业知识储备,因此并不能直接代替目前操作简便且成本低廉的萤试剂检测方法。相信通过将人工智能与上述新方法结合,能出现智能化、一体化、简单化程度更高的内毒素检测方法及设备。

## 4 内毒素限值

内毒素限值是指产品浸出溶液中内毒素的最大允许浓度,这与产品自身的内毒素限值相关<sup>[63]</sup>。内毒素测量的标准单位是内毒素单位

(endotoxin unit, EU)。在此基础上涉及到内毒素检测灵敏度  $\lambda$  (lambda) 的问题, 它代表了鲎试剂凝胶法的规定灵敏度, 或者是基于标准曲线的最低点(即内毒素浓度), 在显色法和浊度法中应用时, 通常用 EU/mL 表示<sup>[64-65]</sup>。

#### 4.1 生物制品行业标准及概况

生物制品是由微生物、寄生虫、动物毒素和生物组织等制备而成的生物活性制剂, 制备过程采用生物学工艺或分离纯化技术, 中间产物和成品质量受到生物技术和分析技术的控制。其中包括用于预防疾病的疫苗、治疗疾病的免疫球蛋白、调节免疫和细胞功能的细胞因子、调节生理功能的激素、催化生化反应的酶、发酵产生的各种产品以及利用 DNA 重组技术制备的产品等<sup>[66]</sup>。

无论生物制品的生产方式是否为细菌发酵, 都应该对制品的内毒素水平进行检测。为了满足生物制品的要求, 生产过程必须在设计合理、洁净程度高的专用厂房内进行, 如细胞培养、半成品配制及分装、纯化等操作需要在规定级别的洁净区进行; 规范操作人员更衣、洗手、消毒及无菌操作; 在生产过程中, 设备、容器、管道、滤膜、介质等应该按照规定的程序进行去热源处理; 在生产过程中, 所使用的水、化学物质、增加剂以及保护剂等必须符合内毒素水平的标准<sup>[67]</sup>。若以上任何一点没有达到要求, 都可能在制品中直接引入内毒素污染。

#### 4.2 生物制品内毒素行业标准

按照《中华人民共和国药典(2020 年版)》中的“细菌内毒素检查法应用指导原则”, 可得到一个用于确定药品和生物制品细菌内毒素限值的公式(1):

$$L = \frac{K}{M} \quad (1)$$

式中:

L—试验物品的细菌内毒素限值。常以 EU/mg、EU/mL 或 EU/U 为单位进行表示;

K—按照规定的给药途径, 针对人体, 每千克体重每小时可接受的最大细菌内毒素剂量以 EU/(kg·h) 的方式表示。一般情况下, 注射剂的限制值为 5 EU/(kg·h), 放射性注射剂的限制值为 2.5 EU/(kg·h), 而鞘内注射剂的限制值为 0.2 EU/(kg·h);

M—人体最大剂量, 通常以 mL/(kg·h)、mg/(kg·h) 或 U/(kg·h) 为单位进行表示。根据中国的标准人均体重为 60 kg 计算, 当注射时间不足 1 h 时, 以 1 h 为基准进行计算<sup>[68]</sup>。

上述细菌内毒素限值的确定公式与多个国家的药典中的指导原则基本相符。

#### 4.3 医疗器械行业内毒素限值鉴定

查询国家相关规定性文件后可确定内毒素限值, 依据《医疗器械细菌内毒素试验方法常规监控与跳批检验》(YY/T 0618—2017)与《重组人源化胶原蛋白》(YY/T 1888—2023)的要求, 在进行试验时可使用公式(2)进行计算:

$$\text{医疗器械试验内毒素限值(EU/mL)} = \frac{KN}{V} \quad (2)$$

式中:

K—每一器械内毒素可接受量(产品的内毒素限值);

N—供试器械数量;

V—样品组合中的提取溶液总量, 使用 mL 作为单位。

在进行内毒素限值的鉴定时, 不同的产品可能对细菌内毒素试验产生干扰, 表现为抑制或增强。为了减轻这种干扰, 通常使用内毒素检查用水或其他适当的稀释剂来稀释产品提取液<sup>[63]</sup>。由于稀释操作会对试验结果产生影响, 因此必须确立一个允许的稀释限度, 即最大有效稀释倍数。在进行试验时可使用公式(3)进行计算:

$$\text{最大有效稀释倍数} = \frac{\text{试验内毒素限值}}{\lambda} \quad (3)$$

式中:

$\lambda$ —经过认证的鲎试剂校验灵敏度(适用于凝胶法),或者提供绘制参照标准曲线(显色法和浊度法)的最低内毒素浓度。

根据上述公式可知,最大有效稀释倍数代表了基于试剂灵敏度的克服抑制或增强效应的稀释倍数。例如,当最大有效稀释倍数值为4时,按照不超过4倍的比例稀释样品浸出液,可以保证对产品内毒素限值的检测有效性。如果可行,建议在低于最大有效稀释倍数的情况下对产品进行确认<sup>[63]</sup>。

在进行最大有效稀释倍数为基础的试验后,内毒素试验是一种定性试验,如果结果为阳性,意味着产品的内毒素含量超出了规定的内毒素限制,阴性结果反之,试验得出的结论应为产品通过/不通过内毒素实验。

#### 4.4 人用重组DNA制品行业标准

重组蛋白产品在《中华人民共和国药典(2020年版)》中被归为生物制品中的人用重组DNA制品。主要利用基因重组技术,通过对所需蛋白质的基因进行遗传修饰。采用质粒或病毒载体将目标基因导入合适的宿主细胞中,并进行表达和转录翻译,从而产生所需的蛋白质<sup>[69]</sup>。一般情况下,宿主细胞的种类包括常见的大肠杆菌、酵母菌以及哺乳动物细胞,但无论宿主细胞是否为革兰氏阴性菌,都应对产品的半成品及成品进行内毒素检测,并控制在官方要求内毒素限值以下。其原因是通过培养基、血清、水和未彻底无菌处理的环境等都可能引入细菌污染,从而引起产品内残留有一定量的内毒素。规定内毒素限值极为重要,科学地确定内毒素限值才能够保证最终产品的质量。但除了考虑内毒素限值的安全性以外,还应根据其生产工

艺及相关药品管理法规综合考虑其合理性。内毒素限值要求高虽然对临床应用安全和产品质量有利,但却提高了产品生产工艺要求,可能会使在安全内毒素水平内却未达到内毒素限值的产品不能通过检查,从而引起质量控制难和产品浪费。

对于内毒素限值的安全性问题,参考美国对标准内毒素(Ec-5)临床试验,即以静脉注射后5 h内显示体温升高 $>1\text{ }^{\circ}\text{F}$  ( $0.55\text{ }^{\circ}\text{C}$ )为指标,以50%反应作为热原阈剂量,得到了热原阈剂量为 $(4.10\pm 0.55)\text{ EU/kg}$ 的结果,与我国药典中对注射剂的要求基本上是一致的,即人体最大可承受的内毒素剂量为 $5\text{ EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ 。根据我国药典对不同人用重组DNA制品的内毒素限值的要求,通常将内毒素限值单位设置为EU/支(瓶)、EU/mg、EU/mL和EU/IU等,如表2所示。这主要是因为制剂的最终形态及规格不同,如注射用重组人生长激素使用时以mg为单位计算用量,则内毒素限值应以EU/mg要求;注射用重组人白介素-2虽然以IU为活性单位,但因其最终产品为装有不同单位的西林瓶形式且整支使用,因此内毒素限值以EU/支要求。但无论内毒素限值单位如何,都在设定前考虑了产品适应症与用药人群的不同,因此通常以最大用药量为前提,计算内毒素限值。对于一些特殊药品,如心血管药、儿童老人用药、抗肿瘤药等,有时将内毒素计算值的1/3–1/2甚至更严格的标准作为内毒素限值。因此,在官方规定的安全阈值内,产品的应用安全性可以得到保障。

## 5 结语

作为生物制品的重要组成部分,重组蛋白产业在过去几年中经历了快速而持续的发展,未来更多的重组蛋白种类将被开发出来,重组

表 2 不同重组蛋白注射产品的来源及内毒素限值计算

Table 2 Source and endotoxin limit calculation of different recombinant protein injection products

Name	Source	Maximum dose	Calculated value	Prescribed limits
Arginine recombinant human insulin injection	<i>Escherichia coli</i> /Yeast	300.000 IU	1.000 EU/IU	0.800 EU/IU
Recombinant human growth hormone for injection	<i>Escherichia coli</i>	2.400 mg	2.080 EU/mg	0.500 EU/mg
Recombinant human interferon $\alpha 1b$ injection	<i>Escherichia coli</i> /Yeast	50.000 $\mu g$	6.000 EU/ $\mu g$	0.333 EU/ $\mu g$
Recombinant human granulocyte macrophage stimulating factor for injection	<i>Escherichia coli</i>	600.000 $\mu g$	50.000 EU/pc	10.000 EU/pc

The maximum dose in the table is calculated by taking the average weight of China people as 60 kg.

蛋白产品为疾病的诊断防治提供了新的方案。考虑到内毒素水平不达标的产品对人体具有危害性，中国药典的内毒素的限值标准提供了不同重组蛋白产品的内毒素限值建议，各生产单位还应竭尽全力地降低其产品的内毒素水平。内毒素的检测方法与去除方法的不断更新旨在快速精确地检测内毒素水平，并低成本高收率地去除产品中内毒素。通过学科交叉促进各领域技术的联合使用将为内毒素检测的不断发展注入新鲜血液，如表面等离子体共振和基于质量的测定技术等，技术融合将内毒素检测的速度和灵敏度提到新的高度。在检测技术革新的同时还应对内毒素的去除工艺进行更深入的研究，如研究更具有特异性的内毒素配体，使得亲和色谱法能够以更高的效率吸附样品中的内毒素。还可通过基因改造开发无细菌内毒素的大肠杆菌菌株，以此降低下游工艺成本。

## REFERENCES

- [1] GORMAN A, GOLOVANOV AP. Lipopolysaccharide structure and the phenomenon of low endotoxin recovery[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2022, 180: 289-307.
- [2] EL-MOGHAZY A. Factors affecting endotoxin removal from aqueous solutions by ultrafiltration process[J]. Journal of Scientific & Industrial Research, 2011, 70(1): 55-59.
- [3] RAETZ CRH, WHITFIELD C. Lipopolysaccharide endotoxins[J]. Annual Review of Biochemistry, 2001, 71(1):635-700.
- [4] BERTANI B, RUIZ N. Function and biogenesis of lipopolysaccharides[J]. EcoSal Plus, 2018, 8(1): 10.1128
- [5] HOLST O, MOLINARO A. Core region and lipid A components of lipopolysaccharides[M]//Microbial Glycobiology. Amsterdam: Elsevier, 2010: 29-55.
- [6] JERALA R. Structural biology of the LPS recognition[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2007, 297(5): 353-363.
- [7] MARTICH GD, BOUJOUKOS AJ, SUFFREDINI AF. Response of man to endotoxin[J]. Immunobiology, 1993, 187(3-5): 403-416.
- [8] GALANOS C, FREUDENBERG MA. Mechanisms of endotoxin shock and endotoxin hypersensitivity[J]. Immunobiology, 1993, 187(3-5): 346-356.
- [9] MICHIE HR, SPRIGGS DR, MANOGUE KR, SHERMAN ML, REVHAUG A, O'DWYER ST, ARTHUR K, DINARELLO CA, CERAMI A, WOLFF SM. Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings[J]. Surgery, 1988, 104(2): 280-286.
- [10] RIETSCHER ET, SEYDEL U, ZÄHRINGER U, SCHADE UF, BRADE L, LOPPNOW H, FEIST W, WANG MH, ULMER AJ, FLAD HD. Bacterial endotoxin: molecular relationships between structure and activity[J]. Infectious Disease Clinics of North America, 1991, 5(4): 753-779.
- [11] RIETSCHER ET, KIRIKAE T, SCHADE FU, MAMAT U, SCHMIDT G, LOPPNOW H, ULMER AJ, ZÄHRINGER U, SEYDEL U, Di PADOVA F.

- Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function[J]. *FASEB Journal*, 1994, 8(2): 217-225.
- [12] KLUGER MJ. Fever: role of pyrogens and cryogens[J]. *Physiological Reviews*, 1991, 71(1): 93-127.
- [13] JANSKÝ L, VYBÍRAL S, POSPÍŠILOVÁ D, ROTH J, DORNAND J, ZEISBERGER E, KAMÍNKOVÁ J. Production of systemic and hypothalamic cytokines during the early phase of endotoxin fever[J]. *Neuroendocrinology*, 1995, 62(1): 55-61.
- [14] ROTH J, CONN CA, KLUGER MJ, ZEISBERGER E. Kinetics of systemic and intrahypothalamic IL-6 and tumor necrosis factor during endotoxin fever in guinea pigs[J]. *The American Journal of Physiology*, 1993, 265(3 Pt 2): R653-R658.
- [15] KLIR JJ, ROTH J, SZELÉNYI Z, McCLELLAN JL, KLUGER MJ. Role of hypothalamic interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in LPS fever in rat[J]. *The American Journal of Physiology*, 1993, 265(3 Pt 2): R512-R517.
- [16] van ZEE KJ, DeFORGE LE, FISCHER E, MARANO MA, KENNEY JS, REMICK DG, LOWRY SF, MOLDAWER LL. IL-8 in septic shock, endotoxemia, and after IL-1 administration[J]. *Journal of Immunology*, 1991, 146(10): 3478-3482.
- [17] ZIEGLER SF, TOUGH TW, FRANKLIN TL, ARMITAGE RJ, ALDERSON MR. Induction of macrophage inflammatory protein-1  $\beta$  gene expression in human monocytes by lipopolysaccharide and IL-7[J]. *Journal of Immunology*, 1991, 147(7): 2234-2239.
- [18] SCHWARZ H, GORNICEC J, NEUPER T, PARIGIANI MA, WALLNER M, DUSCHL A, HOREJS-HOECK J. Biological activity of masked endotoxin[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 44750.
- [19] ROTH J, de SOUZA GE. Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation[J]. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2001, 34(3): 301-314.
- [20] RHODES A, EVANS LE, ALHAZZANI W, LEVY MM, ANTONELLI M, FERRER R, KUMAR A, SEVRANSKY JE, SPRUNG CL, NUNNALLY ME, ROCHWERG B, RUBENFELD GD, ANGUS DC, ANNANE D, BEALE RJ, BELLINGHAN GJ, BERNARD GR, CHICHE JD, COOPERSMITH C, de BACKER DP, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016[J]. *Intensive Care Medicine*, 2017, 43(3): 304-377.
- [21] CHRISTAKI E, GIAMARELLOS-BOURBOULIS EJ. The complex pathogenesis of bacteremia: from antimicrobial clearance mechanisms to the genetic background of the host[J]. *Virulence*, 2014, 5(1): 57-65.
- [22] KELL DB, PRETORIUS E. To what extent are the terminal stages of sepsis, septic shock, systemic inflammatory response syndrome, and multiple organ dysfunction syndrome actually driven by a prion/amyloid form of fibrin?[J]. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 2018, 44(3): 224-238.
- [23] WADA T, GANDO S, MIZUGAKI A, YANAGIDA Y, JESMIN S, YOKOTA H, IEKO M. Coagulofibrinolytic changes in patients with disseminated intravascular coagulation associated with post-cardiac arrest syndrome: fibrinolytic shutdown and insufficient activation of fibrinolysis lead to organ dysfunction[J]. *Thrombosis Research*, 2013, 132(1): e64-e69.
- [24] MARSHALL JC. Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome[J]. *Critical Care Medicine*, 2001, 29(7 Suppl): S99-S106.
- [25] ZHOU JY, XU EW, SHAO K, SHEN WY, GU Y, LI M, SHEN W. Circulating platelet-neutrophil aggregates as risk factor for deep venous thrombosis[J]. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2019, 57(5): 707-715.
- [26] STIEF TW. Coagulation activation by lipopolysaccharides[J]. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 2009, 15(2): 209-219.
- [27] De BACKER D, DONADELLO K, SAKR Y, OSPINA-TASCON G, SALGADO D, SCOLLETTA S, VINCENT JL. Microcirculatory alterations in patients with severe sepsis: impact of time of assessment and relationship with outcome[J]. *Critical Care Medicine*, 2013, 41(3): 791-799.
- [28] SAKR Y, DUBOIS MJ, De BACKER D, CRETEUR J, VINCENT JL. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock[J]. *Critical Care Medicine*, 2004, 32(9): 1825-1831.
- [29] BICK RL, ARUN BN, FRENKEL EP. Disseminated intravascular coagulation[J]. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 1999, 29(2/3): 111-134.
- [30] HARDIE EM, KRUSE-ELLIOTT K. Endotoxic shock part II: a review of treatment[J]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 1990, 4(6): 306-314.

- [31] MATSUMOTO K, SAKATA M, KUNITAKE M, MIYAZAKIA M, HIRAYAMA C. Rapid detection of a minute amount of lipopolysaccharide from *Salmonella* in large volumes by poly (ethyleneimine)-cloth enzyme immunoassay[J]. Biotechnology Letters, 2002, 24(21): 1791-1795.
- [32] MIYAMOTO T, OKANO S, KASAI N. Inactivation of *Escherichia coli* endotoxin by soft hydrothermal processing[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(15): 5058-5063.
- [33] BRANSTON SD, WRIGHT J, KESHAVARZ-MOORE E. A non-chromatographic method for the removal of endotoxins from bacteriophages[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2015, 112(8): 1714-1719.
- [34] DULLAH EC, ONGKUDON CM. Current trends in endotoxin detection and analysis of endotoxin-protein interactions[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2017, 37(2): 251-261.
- [35] MAGALHÃES PO, LOPES AM, MAZZOLA PG, RANGEL-YAGUI C, PENNA TCV, PESSOA A Jr. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review[J]. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, 2007, 10(3): 388-404.
- [36] PETSCH D, ANSPACH FB. Endotoxin removal from protein solutions[J]. Journal of Biotechnology, 2000, 76(2/3): 97-119.
- [37] HOU KC, ZANIEWSKI R. Endotoxin removal by anion-exchange polymeric matrix[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 1990, 12(3): 315-324.
- [38] ANSPACH FB. Endotoxin removal by affinity sorbents[J]. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2001, 49(1-3): 665-681.
- [39] LI LP, LUO RG. Use of  $\text{Ca}^{2+}$  to re-aggregate lipopolysaccharide (LPS) in hemoglobin solutions and the subsequent removal of endotoxin by ultrafiltration[J]. Biotechnology Techniques, 1998, 12(2): 119-122.
- [40] BORDIER C. Phase separation of integral membrane proteins in triton X-114 solution[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1981, 256(4): 1604-1607.
- [41] AIDA Y, PABST MJ. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using triton X-114[J]. Journal of Immunological Methods, 1990, 132(2): 191-195.
- [42] LEVIN J, BANG FB. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of limulus blood[J]. Bulletin of the Johns Hopkins Hospital, 1964, 115: 265-274.
- [43] LEVIN J, BANG FB. Clottable protein in *Limulus*; its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin[J]. Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica, 1968, 19(1): 186-197.
- [44] MUTA T, ODA T, IWANAGA S. Horseshoe crab coagulation factor B: a unique serine protease zymogen activated by cleavage of an Ile-Ile bond[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(28): 21384-21388.
- [45] IWANAGA S, KAWABATA SI, MUTA T. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions[J]. The Journal of Biochemistry, 1998, 123(1): 1-15.
- [46] KAWABATA S, KOSHIBA T, SHIBATA T. The lipopolysaccharide-activated innate immune response network of the horseshoe crab[J]. Invertebrate Survival Journal, 2009, 6(1): 59.
- [47] PERDOMO-MORALES R, PARDO-RUIZ Z, SPREITZER I, LAGARTO A, MONTAG T. Monocyte activation test (MAT) reliably detects pyrogens in parenteral formulations of human serum albumin[J]. ALTEX, 2011, 28(3): 227-235.
- [48] DING JL, HO B. Endotoxin detection: from *Limulus* amebocyte lysate to recombinant factor C[J]. Sub-Cellular Biochemistry, 2010, 53: 187-208.
- [49] TINDALL B, DEMIRCIOGLU D, UHLIG T. Recombinant bacterial endotoxin testing: a proven solution[J]. BioTechniques, 2021, 70(5): 290-300.
- [50] BOLDEN J, SMITH K. Application of recombinant factor C reagent for the detection of bacterial endotoxins in pharmaceutical products[J]. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 2017, 71(5): 405-412.
- [51] BOLDEN J, KNUTSEN C, LEVIN J, MILNE C, MORRIS T, MOZIER N, SPREITZER I, von WINTZINGERODE F. Currently available recombinant alternatives to horseshoe crab blood lysates: are they comparable for the detection of environmental bacterial endotoxins? a review[J]. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 2020, 74(5): 602-611.
- [52] SHIMIZU T, OBATA T, SONODA H, AKABORI H, MIYAKE T, YAMAMOTO H, TABATA T, EGUCHI Y, TANI T. Diagnostic potential of endotoxin scattering photometry for sepsis and septic shock[J]. Shock, 2013, 40(6): 504-511.
- [53] NODA K, GOTO H, MURAKAMI Y, AHMED ABF, KURODA A. Endotoxin assay by bioluminescence using mutant firefly luciferase[J]. Analytical

- Biochemistry, 2010, 397(2): 152-155.
- [54] MUNFORD RS. Endotoxemia-menace, marker, or mistake?[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2016, 100(4): 687-698.
- [55] MOHAMMED AH, McCALLUS DE, NORCROSS NL. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for endotoxin in milk[J]. Veterinary Microbiology, 1988, 18(1): 27-39.
- [56] THURMAN TL, LAHTI CJ, MATEFFY JM, FORNG RY, von WINTZINGERODE F, SILVA LM, DEUTSCHMANN SM, MOZIER N. Comparison of pyrogen assays by testing products exhibiting low endotoxin recovery[J]. ALTEX, 2023, 40(1): 117-124.
- [57] HOFFMANN S, PETERBAUER A, SCHINDLER S, FENNRICH S, POOLE S, MISTRY Y, MONTAG-LESSING T, SPREITZER I, LÖSCHNER B, van AALDEREN M, BOS R, GOMMER M, NIBBELING R, WERNER-FELMAYER G, LOITZL P, JUNG T, BRCIC M, BRÜGGER P, FREY E, BOWE G, et al. International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoïd cells[J]. Journal of Immunological Methods, 2005, 298(1/2): 161-173.
- [58] ZHANG G, GHOSH S. Molecular mechanisms of NF-kappa B activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors[J]. Journal of Endotoxin Research, 2000, 6(6): 453-457.
- [59] TAMURA H, REICH J, NAGAOKA I. Outstanding contributions of LAL technology to pharmaceutical and medical science: review of methods, progress, challenges, and future perspectives in early detection and management of bacterial infections and invasive fungal diseases[J]. Biomedicines, 2021, 9(5): 536.
- [60] PETSCH D, DECKWER WD, ANSPACH FB. Proteinase K digestion of proteins improves detection of bacterial endotoxins by the *Limulus* amebocyte lysate assay: application for endotoxin removal from cationic proteins[J]. Analytical Biochemistry, 1998, 259(1): 42-47.
- [61] REICH J, LANG P, GRALLERT H, MOTSCHMANN H. Masking of endotoxin in surfactant samples: effects on *Limulus*-based detection systems[J]. Biologicals, 2016, 44(5): 417-422.
- [62] HURLEY JC. Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates[J]. Clinical Microbiology Reviews, 1995, 8(2): 268-292.
- [63] 医疗器械细菌内毒素试验方法常规监控与跳批检验: SH/T 3405-2017[S].
- [64] SCHAUMBERGER S, LADINIG A, REISINGER N, RITZMANN M, SCHATZMAYR G. Evaluation of the endotoxin binding efficiency of clay minerals using the *Limulus* amebocyte lysate test: an *in vitro* study[J]. AMB Express, 2014, 4(1): 1.
- [65] SZERMER-OLEARNIK B, BORATYŃSKI J. Removal of endotoxins from bacteriophage preparations by extraction with organic solvents[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0122672.
- [66] 周逸. 我国中小生物医药企业危机管理研究[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2013.
- ZHOU Y. Research on crisis management of small and medium-sized biopharmaceutical enterprises in china[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2013 (in Chinese)
- [67] 姚伟. 生物制品生产中内毒素的控制及去除[C]. 第九次全国生物制品学术会议论文集. 2007: 30-32.
- [68] 唐元泰. 关于注射剂细菌内毒素检查限值的确定[J]. 中国药品标准, 2003, 4(4): 5-6.
- TANG YT. Establishment of limit to bacterial endotoxin in injections[J]. Drug Standards of China, 2003, 4(4): 5-6 (in Chinese).
- [69] 赵志晶, 么山山, 王斌, 曾明. 大肠埃希菌表达的重组生物制品种子批质量控制[J]. 中国生物制品学杂志, 2018, 31(7): 801-804.
- ZHAO ZJ, YAO SS, WANG B, ZENG M. Quality control of seed batch of recombinant biological products expressed by *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2018, 31(7): 801-804 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)