

# 注射用重组人促卵泡激素制造及检定暂行规程

本品系由具有高效表达人促卵泡激素基因的中国仓鼠卵巢（CHO）细胞，通过细胞培养，分离和高度纯化后冻干制成。具有维持其稳定性作用的保护剂，不含防腐剂和抗生素。适应症为①不排卵（涉及多囊卵巢综合症[PCOD]）且对枸橼酸克罗米酚治疗无反应的妇女。②对于进行超排卵期或辅助生育技术，如体外受精—胚胎移植（IVF）、配子输卵管内移植（GIFT）和合子输卵管内移植（ZIFT）D 的患者，本品可刺激多卵泡发育。

## 1. 基本规定

### 1.1 设施与生产质量管理

按中国《药品生产质量管理规范》规定实行。

### 1.2 原料及辅料

应符合现行《中华人民共和国药典》2023 版二部或《中国生物制品重要原辅材料质控标准》的规定。未纳入上述标准的化学试剂，应不低于化学纯。

### 1.3 生产用水

生产用水源水应符合饮用水标准，纯化水及注射用水应符合现行《中华人民共和国药典》2023 版二部标准。

### 1.4 生产用器具

直接用于生产的金属或玻璃等器具，应通过严格清洗及去热原质解决或灭菌解决。

## 2. 制造

### 2.1 工程细胞

#### 2.1.1 名称及来源

重组人促卵泡激素工程细胞系由带有人促卵泡激素  $\alpha$  和  $\beta$  链基因的重组质粒共转染的 CHO-K1 细胞系。

#### 2.1.2 种子库建立、传代及保存

从原始细胞库的细胞传代，扩增后冻存于液氮中，作为主细胞库；从主细胞库传代，扩增后冻存于液氮中，建立工作细胞库。每次传代不超过批准的代次。细胞系冻存于液氮中，检定合格后方可用于生产。

### 2.1.3 主细胞库及工作细胞库细胞的检定

应符合“生物制品生产用动物细胞基质制备及检定规程”规定。

#### 2.1.3.1 外源因子检查

细菌和真菌（附录 XI IA）、支原体（附录 XI IB）、病毒检查（附录 XI IC）。

#### 2.1.3.2 细胞鉴别实验

应用同工酶分析、生物化学、免疫学、细胞学和遗传学标记物等任一方法进行鉴别，应为典型 CHO 细胞。

#### 2.1.3.3 重组人促卵泡激素表达量

应不低于原始细胞库细胞表达量。

## 2.2 原液

### 2.2.1 细胞的复苏与扩增

从工作细胞库来源的细胞复苏后，于无血清、无蛋白培养基中进行传代和扩增，供转瓶或细胞培养罐接种用。

### 2.2.2 细胞培养液

生产用培养液应不含血清、蛋白质。

### 2.2.3 细胞培养

细胞培养全过程应严格按照无菌操作，细胞培养时间根据细胞生长情况而定。

### 2.2.4 分离纯化

收集的培养液通过超滤法进行浓缩，经多步色谱纯化后得到高纯度的重组人促卵泡激素，即为重组人促卵泡激素原液。除菌过滤后保存于适宜温度，并规定其有效期。

### 2.2.5 原液检定

按照 3.1 项进行。

## 2.3 半成品

### 2.3.1 配置与除菌

原液加入适宜的稳定剂，并用缓冲液稀释。除菌过滤后即成半成品。

### 2.3.2 半成品检定

按照 3.2 项进行。

## 2.4 成品

### 2.4.1 分批

应符合“生物制品分批规程”规定。

### 2.4.2 分装及冻干

应符合“生物制品分装和冻干规程”规定。半成品应及时分装、冷冻，冻干的全过程中，制品的温度应不高于 30℃。

### 2.4.3 规格

75IU/瓶。

### 2.4.4 包装

应符合“生物制品包装规程”规定。

## 3 检定

### 3.1 原液检定

#### 3.1.1 性状

应为无色澄明液体

#### 3.1.2 鉴别

3.1.2.1 在氧化亚基项下记录的色谱图中，供试品主峰保存时间应与对照品一致。

3.1.2.2 在含量测定项下记录的色谱图中，供试品主峰的保存时间应与对照品一致。

### 3.1.2.3 肽图（至少每半年测定一次）

取本品，照附录 1 测定，肽图谱应与对照品一致。

3.1.2.4 N 末端氨基酸序列（至少每一年测定一次）：将本品烷基化解决，再经 HPLC 分离纯化得到 $\alpha$ 、 $\beta$ 链后，通过 Edman 降解法测序，两条链 N 末端 15 个氨基酸序列分别为： $\alpha$  链：A-P-D-V-Q-D-C-P-E-C-T-L-Q-E-N， $\beta$  链：N-S-C-E-L-T-X-I-T-I-A-I-E-K-E，其中 X 代表未测出氨基酸，也许有修饰？。

### 3.1.3 检查

#### 3.1.3.1 等电点

取本品，照附录 2 测定，等电点主区带应在 3.5-5.5 之间，供试品主区带应与对照品一致？。

#### 3.1.3.2 解离亚基

取本品（1.0 mg/ml）50ul，加 2×非还原上样缓冲液 50ul，混匀即得供试品溶液；取上述供试品溶液 10ul，加入 190ul 1×非还原上样缓冲液，混匀后 100℃ 加热 5 分钟，放冷即得对照溶液（供试品溶液 5%）。依法（药典 2023 版三部，附录 IV C，考马斯亮蓝法），用非还原 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法检测，分离胶浓度为 12.5%，供试品溶液和对照溶液各取 20ul；考马斯亮蓝染色，凝胶成像仪扫描记录结果。供试品中解离亚基条带显色应不深于对照溶液中的解离亚基条带（5%）。

#### 3.1.3.3 氧化亚基

照高效液相色谱法（中国药典 2023 年版三部，附录 III B）测定。

色谱条件与系统合用性实验：用 Vydac Protein and Peptide C<sub>4</sub> 柱（25cm×4.6mm，5um，或同等产品），以 0.1mol/L TEAP 缓冲液（取 85%磷酸 6.75ml，加水 950ml，用三乙胺调 pH 值至 6.00±0.05，加水至 1000ml，0.45um 滤膜滤过，放置 24 小时后使用）为流动相 A，乙腈为流动相 B，0.1%三氟乙酸的 80%乙腈溶液为流动相 C（洗柱液）；流速为 1.0ml/min；柱温为 40℃

；检测波长为 214nm。梯度程序为：

时间 (min)	A%	B%	C%
0	86	14	0
56	72	28	0
57	0	0	100
72	0	0	100
73	86	14	0

取本品 (0.5mg/ml) 200 $\mu$ l, 加入 1% 双氧水溶液 4 $\mu$ l, 反应 30 分钟即为系统合用性实验用样品溶液, 取 20 $\mu$ l 注入液相色谱仪, 记录色谱图。相对  $\alpha$  亚基保存时间约为 0.86 的杂质峰即为氧化亚基峰。

测定法: 取本品 (0.5mg/ml) 20 $\mu$ l 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按峰面积归一化法计算, 氧化亚基含量不得高于总蛋白量的 10%。

#### 3.1.3.4 聚合物

取本品 原液浓度不定? (0.1mg/ml) 80 $\mu$ l, 加入 5 $\times$ 非还原样品缓冲液 20 $\mu$ l, 混匀作为供试品溶液; 取供试品溶液适量, 用 1 $\times$ 非还原样品缓冲液稀释为供试品溶液的 2%, 作为对照品溶液。取供试品溶液与对照溶液各 25 $\mu$ l, 依法检查 (药典 2023 版三部, 附录 IV C 银染法), 分离胶浓度为 12.5%。对照品条带应显色, 供试品中聚合物带的显色应不深于对照品的主带 (2%)。

#### 3.1.3.5 唾液酸含量

精密配制浓度分别为 0 $\mu$ g/ml、40 $\mu$ g/ml、80 $\mu$ g/ml、120 $\mu$ g/ml、160 $\mu$ g/ml、200 $\mu$ g/ml 的唾液酸对照品作标准曲线; 取本品, 依法测定 (药典 2023 版三部, 附录 VI E), 唾液酸含量应为 1.41-12.84% ? 范围太大?。

#### 3.1.3.6 紫外光谱扫描

取本品适量, 用原液空白溶剂 (10mM PB 0.1M NaCl) 稀释为 200 $\mu$ g/ml, 以空白溶剂为参比, 在波长 230~330nm 范围, 依法 (药典 2023 版三部, 附录 II A) 检查。最大吸取波长应在 276 $\pm$ 3nm 处。

#### 3.1.3.7 宿主 DNA 残留量

取本品，依法测定（药典 2023 版三部，附录 IX B），每剂量重组人促卵泡激素应不高于 100pg。

#### 3.1.3.8 CHO 细胞蛋白残留

取本品，照 CHO 宿主细胞蛋白 ELISA 检测试剂盒（Cygnus）方法测定，分别用样品稀释液稀释至 1mg/ml 作为供试品溶液；取 200ng/ml CHO 宿主蛋白标准品溶液 50ul，并加入 200ul 供试品溶液，作为回收率实验溶液。按照试剂盒说明书进行操作。每 1mg 重组人促卵泡激素中 CHO 宿主蛋白残留不得过 25ng。

#### 3.1.3.9 鼠 IgG 残留量测定

取本品，依法测定（药典 2023 版三部，附录 IX L），每剂量重组人促卵泡激素中鼠 IgG 残留应不高于 10ng。

#### 3.1.3.10 细菌内毒素

依法测定（药典 2023 版三部，附录 XII E 凝胶限量实验），每 1mg 重组人促卵泡激素应不高于 10EU。

#### 3.1.4 含量测定

取重组人促卵泡激素对照品适量，用水制成每 1ml 具有 0.1mg 的溶液作为对照品溶液。照高效液相色谱法（中国药典 2023 版三部，附录 III B）测定。用 TSK gel G-2023SWXL（30cm×7.8mm I.D.）或其它相应的色谱柱；以磷酸盐缓冲液（取 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 6.74ml，加水 800ml，再加 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 14.2g，用 50%NaOH 调 pH 至 6.70±0.05，用水定溶为 1000ml 后抽滤）为流动相；流速为 1.0ml/min；检测波长为 214nm。取对照品 20μl，注入液相色谱仪，记录色谱图，以人促卵泡激素峰计，理论塔板数应不小于 1000；另取供试品适量注入液相色谱仪，记录色谱图，按外标法计算，即得。

#### 3.1.5 生物活性测定

取本品依法检定（中国药典 2023 版二部，附录 XII M

卵泡刺激素生物测定法检定), 每 1mg 重组人促卵泡激素生物活性应不低于 9000IU。

### 3.2 半成品检定

#### 3.2.1 细菌内毒素检查

依法(药典 2023 版三部, 附录 XII E 凝胶限量实验)检查, 每 6μg? 重组人促卵泡激素不得过 2EU?。

#### 3.2.2 含量测定

按照成品含量测定项下方法进行, 根据结果对半成品分装体积进行微调, 保证成品蛋白含量。

### 3.3 成品检定

#### 3.3.1 性状

本品为白色疏松体。复溶后为无色澄明液体。

#### 3.3.2 鉴别实验

3.3.2.1 在含量测定项下记录的色谱图中, 供试品主峰的保存时间应与对照品峰的保存时间一致。

3.3.2.2 供试品、抗体如何配制? 依法检定(药典 2023 版三部, 附录 VIII B, 免疫斑点法), 应符合规定?。

#### 3.3.3 检查

##### 3.3.3.1 复溶时间

取本品, 每支加注射用水 0.5ml 溶解, 溶解时间不得过 2 分钟。

##### 3.3.3.2 不溶性微粒

取本品, 用注射用水溶解后, 依法(中国药典 2023 年版二部附录 IX C)检查, 每瓶中 10μm 以上的微粒不得过 6000 粒; 25μm 以上的微粒不得过 600 粒。

##### 3.3.3.3 水分

取本品, 依法(药典 2023 版三部, 附录 VII D 第一法 B 库仑滴定法)检

查，含水分不得过 3.0%。



#### 3.3.3.4 酸碱度

取本品，每支加附带注射用水 0.5ml 溶解，依法（药典 2023 版三部，附录 V A）检查，pH 应为 6.5—7.5。

#### 3.3.4 聚合物

取本品，每瓶加入 80 $\mu$ l 注射用水溶解，加入 5 $\times$ 非还原样品缓冲液 20 $\mu$ l，混匀作为供试品溶液；取供试品溶液 10 $\mu$ l，加 1 $\times$ 非还原样品缓冲液 490 $\mu$ l 作为对照溶液。取供试品溶液与对照溶液各 25 $\mu$ l，依法检查（药典 2023 版三部，附录 IV C 银染法）对照溶液条带应显色，供试品中聚合物带的显色应不深于对照溶液的主带颜色（2%）。

#### 3.3.5 氧化亚基

色谱条件与系统合用性实验 照高效液相色谱法（中国药典 2023 年版三部，附录 III B）测定。

色谱条件与系统合用性实验：用 Vydac Protein and Peptide C<sub>4</sub> 柱（25cm $\times$ 4.6mm，5 $\mu$ m，或同等产品），以 0.1mol/L TEAP 缓冲液（取 85%磷酸 6.75ml，加水 950ml，用三乙胺调 pH 值至 6.00 $\pm$ 0.05，加水至 1000ml，0.45 $\mu$ m 滤膜滤过，放置 24 小时后使用）为流动相 A，乙腈为流动相 B，0.1%三氟乙酸的 80%乙腈溶液为流动相 C（洗柱液）；流速为 1ml/min；柱温为 40 $^{\circ}$ C；检测波长为 214nm。梯度程序为：

时间（min）	A%	B%	C%
0	86	14	0
56	72	28	0
57	0	0	100
72	0	0	100
73	86	14	0

取本品（0.5mg/ml）200 $\mu$ l，加入 1%双氧水溶液 4 $\mu$ l，反应 30 分钟即为系统合用性实验用样品溶液，取 20 $\mu$ l 注入液相色谱仪，记录色谱图。相对  $\alpha$

亚基保存时间约为 0.86 的杂质峰即为氧化亚基峰。需确认!

测定法 取本品适量，每瓶加水 100 $\mu$ l 溶解，合并，混匀作为供试品溶液，取供试品溶液 200 $\mu$ l 注入液相色谱仪，记录色谱图，按峰面积归一化法计算，氧化亚基不得过 10%。

### 3.3.6 含量测定

取重组人促卵泡激素对照品适量，用水制成每 1ml 具有 0.03mg 的溶液作为对照溶液。取本品，每瓶加水 250 $\mu$ l 溶解作为供试品溶液，照高效液相色谱法（中国药典 2023 版三部，附录 III B）测定。用 TSK gel G-2023SWXL（30cm $\times$ 7.8mm I.D.）或其它相应的色谱柱；以磷酸盐缓冲液（取 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 6.74ml，加水 800ml，再加 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 14.2g，用 50%NaOH 调 pH 至 6.70 $\pm$ 0.05，用水定溶为 1000ml 后抽滤）为流动相；流速为 1.0ml/min；检测波长为 214nm。分别取对照品和供试品 100 $\mu$ l，注入液相色谱仪，记录色谱图，以人促卵泡激素峰计，理论塔板数应不小于 1000；按外标法计算，即得。重组人促卵泡激素含量应为标示量的 90%~110%。

### 3.3.7 生物活性测定

取本品，供试品、标准品如何配制？依法（药典 2023 版二部，附录 XII M 卵泡刺激素生物测定法检定），重组人促卵泡激素的生物活性应为标示量的 80%~150%。

### 3.3.8 无菌检查

取本品，用注射用水溶解，依法（药典 2023 版三部，附录 XII A 膜过滤法）检查，应符合规定。

### 3.3.9 细菌内毒素

取本品，用注射用水溶解后，依法（药典 2023 版三部，附录 XII E 凝胶限量实验）检查，每支成品含细菌内毒素不得过 5EU。

### 3.3.10 异常毒性

取本品，用注射用水溶解，依法（药典 2023 版三部，附录 VII F 小鼠实验法）检查，应符合规定。

#### 4. 保存、运送及有效期

低于室温下保存及运送，有效期暂定 2 年。

#### 5. 使用说明

应符合“生物制品包装规程”规定。

#### 6. 附录

##### 6.1 肽图检测方法

###### 6.1.1 仪器及耗材

恒温水浴、磁力搅拌器、小型冻干机、氮气瓶、台式离心机、透析袋（3-10kd）、超滤离心管（5kd 孔径，4ml）、通风橱。

###### 6.1.2 试剂和溶液

###### 6.1.2.1 盐酸胍溶液（6mol/L）

称取盐酸胍 14.3g 至 25.0ml 容量瓶，加水溶解并定容，即得。

###### 6.1.2.2 TE 缓冲液（Tris, 0.2mol/L; EDTA, 1mmol/L, pH8.3）

称取 Tris 1.2g, EDTA 18.6mg 加 40ml 水溶解，用 2mol/L 盐酸调节 pH 至 8.3，移入 50ml 容量瓶，用水定容。

###### 6.1.2.3 还原及酰化试剂

盐酸胍缓冲液：取盐酸胍溶液 1.2ml，TE 缓冲液 0.4ml，混匀即得（用前配制）。

DTT 溶液（9.0mg/ml）：称取 DTT 约 9mg，加入 1.0ml 盐酸胍缓冲液，2~8℃ 保存。

碘乙酸溶液（130mg/ml）：称取碘乙酸 65mg，加入 0.5ml 盐酸胍缓冲液溶解，用铝箔避光保存，氮气充封后存于-20℃。

###### 6.1.2.4 0.1% TFA 溶液

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。

如要下载或阅读全文，请访问：

<https://d.book118.com/228043036120006061>