

人促红素注射液

Ren Cuhongsu Zhushey

Human Erythropoietin Injection

APPRLICDSR VLERYLLEAK EAENITTGCA EHCSLNENIT
VPDTKVNFYA WKRM EVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL
LVNSSQPWEP LQLHVDKA VS GLRSLTLLR ALGAQKEAIS
PPDAASAAPL RTITADTFRK LFRVYSNFLR GKLKLYTGEA
CRTGD

$C_{809}H_{1301}O_{240}N_{229}S_5$

Mr 18235.70 (无糖基化)

糖基化位点: Asn24、Asn38、Asn83、Ser126

本品系由高效表达人红细胞生成素(简称人促红素)基因的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,经细胞培养和纯化后获得的人促红素制成的无菌溶液。含适宜稳定剂,不含抑菌剂和抗生素。

1 基本要求

生产和检定用设施、原材料及辅料、水、器具、动物等应符合"凡例"的有关要求。

2 制造

2.1 工程细胞

2.1.1 名称及来源

人促红素工程细胞系由带有人促红素基因的重组质粒转染的 CHO-dhfr⁻（二氢叶酸还原酶基因缺陷型细胞）细胞系。

2.1.2 细胞库建立、传代及保存

由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；从主细胞库的细胞传代，扩增后冻存于液氮中，作为工作细胞库。各级细胞库细胞传代应不超过批准的代次。细胞冻存于液氮中，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“生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制”规定。

2.1.3.1 外源因子检查

细菌和真菌、支原体、病毒检查均应为阴性。

2.1.3.2 细胞鉴别试验

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

2.1.3.3 人促红素表达量

应不低于原始细胞库细胞的表达量。

2.1.3.4 目的基因核苷酸序列检查（工作种子批可免做）

目的基因核苷酸序列应与批准的序列相符。

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，于含灭能新生牛血清培养液中进行传代、扩增，供转瓶或细胞培养罐接种用。新生牛血清的质量应符合规定（通则 3604）。

2.2.2 生产用细胞培养液

生产用细胞培养液应不含牛血清和任何抗生素。

2.2.3 细胞培养

细胞培养全过程应严格按照无菌操作。细胞培养时间可根据细胞生长情况而定。

2.2.4 分离纯化

收集的培养液按经批准的纯化工艺进行，采用经批准的超滤法或其他适宜方法进行浓缩，多步色谱纯化后制得高纯度的人促红素，除菌过滤后即为人促红素原液。如需存放，应规定时间和温度。

2.2.5 原液检定

按 3.1 项进行。

2.3 半成品

2.3.1 配制与除菌

原液加入适宜稳定剂，并用缓冲液稀释。除菌过滤后即为半成品。

2.3.2 半成品检定

按 3.2 项进行。

2.4 成品

2.4.1 分批

应符合“生物制品分包装及贮运管理”规定。

2.4.2 分装

应符合"生物制品分包装及贮运管理"与通则 0102 有关规定。

2.4.3 规格

- (1) 1ml:1000IU
- (2) 1ml:1500IU
- (3) 0.4ml:2000IU
- (4) 1ml:2000IU
- (5) 0.5ml:2500IU
- (6) 1ml:2500IU
- (7) 0.5ml:3000IU
- (8) 0.6ml:3000IU
- (9) 1ml:3000IU
- (10) 0.5ml:4000IU
- (11) 1ml:4000IU
- (12) 0.5ml:5000IU
- (13) 1ml:5000IU
- (14) 0.5ml:6000IU
- (15) 0.6ml:6000IU
- (16) 1ml:6000IU
- (17) 0.5ml:9000IU
- (18) 0.5ml:10000IU
- (19) 1ml:10000IU
- (20) 0.5ml:12000IU
- (21) 1ml:36000IU

2.4.4 包装

应符合"生物制品分包装及贮运管理"与通则 0102 有关规定。

3 检定

3.1 原液检定

3.1.1 鉴别

3.1.1.1 紫外光谱

照紫外-可见分光光度法（通则 0401）测定。

供试品溶液 取供试品适量，用水或 0.9%氯化钠溶液稀释并制
成每 1ml 含人促红素蛋白质 0.5~2mg 的溶液。

测定法 取供试品溶液，在 230~360nm 绘制光谱图。

结果判定 应在 279nm 处有最大吸收，在 250nm 处有最小吸收，
在 320~360nm 处无吸收峰。

3.1.1.2 肽图

照肽图检查法（通则 3405）试验。

供试品溶液 取供试品适量，经透析、冻干后，用1% 碳酸氢铵溶液溶解并稀释制成每1 ml中含人促红素蛋白质约1.5mg的溶液，取100 μ l，加胰蛋白酶2 μ l，混匀，置37℃保温6小时。

对照品溶液 取人促红素对照品适量，照供试品溶液同法制备。

色谱条件 用辛烷基硅烷键合硅胶为填充剂(25cm×4.6mm, 5 μ m, 300 \AA)，柱温为45℃；以0.1%三氟乙酸水溶液为流动相A，0.1%三氟乙酸-80%乙腈水溶液为流动相B，按下表进行梯度洗脱，流速为每分钟0.75ml；检测波长为214nm；进样体积20 μ l。

编号	时间(分钟)	流速(ml)	A(%)	B(%)
1	0.00	0.75	100.0	0.0
2	30.00	0.75	85.0	15.0
3	75.00	0.75	65.0	35.0
4	115.00	0.75	15.0	85.0
5	120.00	0.75	0.0	100.0
6	125.00	0.75	100.0	0.0
7	145.00	0.75	100.0	0.0

测定法 分别取对照品溶液和供试品溶液，注入液相色谱仪，记录色谱图。

结果判定 供试品溶液色谱图应与对照品溶液色谱图基本一致。

3.1.1.3 N 端氨基酸测序

至少每年测定一次。用氨基酸序列分析仪测定，N 端序列应为：

Ala-Pro-Pro-Arg-Leu-Ile-Cys-Asp-Ser-Arg-Val-Leu-Glu-Arg-Tyr。

3.1.2 检查

3.1.2.1 电泳纯度

依法测定（通则 0541 第五法）。用非还原型 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法，考马斯亮蓝染色，分离胶的胶浓度为 12.5%，加样量应不低于 10 μ g，经凝胶扫描仪扫描，按面积归一化法计算人促红素的含量。

限度 应不低于 98.0%。

3.1.2.2 色谱纯度

照高效液相色谱法（通则 0512）试验。

供试品溶液 取供试品适量，用流动相稀释制成每 1ml 约含人促红素蛋白质 0.2mg 的溶液。

色谱条件 以亲水改性硅胶为固定相的体积排阻色谱柱（7.5mm \times 30cm，10 μ m，排阻极限 300kD，孔径 24nm，粒径），柱温为 30℃；流动相为磷酸盐缓冲液（取十二水磷酸氢二钠 2.30g、磷酸二氢钾 0.40g、氯化钠 46.80g，加水 1600ml 使溶解，调节 pH 至 7.3，用水稀释至 2L，摇匀），流速为 0.5ml/min；检测波长为 280nm；进样体积 100 μ l。

系统适用性要求 理论板数按人促红素峰计算应不低于 1500。

测定法 取供试品溶液，注入液相色谱仪，记录色谱图至人促红素峰保留时间的 2 倍。按面积归一化法计算人促红素的含量，保留时间大于人促红素峰保留时间的峰忽略不计。

限度 应不低于 98.0%。

3.1.2.3 分子量

依法测定（通则 0541 第五法）。用还原型 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法，考马斯亮蓝 R250 染色，分离胶的胶浓度为 12.5%，加样量应不低于 1 μ g。分子量应为 36000~45000。

3.1.2.4 电荷变异体

以下三种方法可任选其一。

第一法 等电聚焦电泳法

照电泳法（通则 0541 第六法）试验。

供试品溶液 取供试品适量，用水置换供试品的缓冲体系并制成每 1ml 中约含人促红素蛋白质 0.5~2.0mg 的溶液。

对照品溶液 取人促红素工作对照品，照供试品溶液同法制备。

系统适用性溶液 取人促红素理化测定系统适用性对照品，照供试品溶液同法制备。

系统适用性要求 系统适用性溶液图谱中，各主要电荷变异体等电点的相对标准偏差 ($n \geq 3$) 均应不大于 2.0%，各主要电荷变异体含量的相对标准偏差 ($n \geq 3$) 均应不大于 5.0%；供试品溶液各电荷变异体等电点应与对照品溶液各电荷变异体等电点一致。

测定法 取尿素 9g、30%丙烯酰胺单体溶液 6.0ml、40% pH 3~5 的两性电解质溶液 1.05ml、40% pH 3~10 的两性电解质溶液 0.45ml、水 13.5ml，充分混匀后，加入 N, N, N', N' -四甲基乙二胺 15 μ l 和 10%过硫酸铵溶液 0.3ml，脱气后制成凝胶。分别取系统适用性溶液、对照品溶液和供试品溶液适量（约相当于人促红素蛋白质

40~50 μg) 上样, 进行试验, 用凝胶扫描仪扫描凝胶, 记录电泳图谱。

按面积归一法分别计算各电荷变异体的含量, 记录测定结果。

第二法 毛细管等电聚焦电泳法

照毛细管电泳法(通则 0542)。

试剂 (1) 等电聚焦电泳用凝胶溶液 商品化试剂。

(2) 等电聚焦电泳用凝胶溶液 (2) 取尿素 0.36g, 加等电聚焦电泳用凝胶溶液 1ml 使溶解。

(3) 预混液 按下表比例配制。

试剂	体积 (μl)
两性电解质 (pH3~10)	6
等电点标记物 1	0.5
等电点标记物 2	0.5
等电点标记物 3	0.5
等电聚焦电泳用凝胶溶液 (2)	90
0.2mol/L 亚氨基二乙酸	15

供试品溶液 取供试品适量, 用水置换供试品的缓冲体系并制成每 1ml 约含 2.0mg 的溶液, 取 20 μl , 加预混液 112.5 μl , 混匀, 不低于 14000g 离心 3 分钟, 取上清液。

系统适用性溶液 取人促红素理化测定系统适用性对照品, 照供试品溶液同法制备。

对照品溶液 取人促红素工作对照品, 照供试品溶液同法制备。

电泳条件 采用涂层熔融石英毛细管(内径 50 μm)或等效毛细管, 选择合适的长度以满足系统适用性要求。样品盘温度设为 10°C; 毛细管温度设为 25°C; 用 25psi 压力进样 99 秒, 进样端设为负极。以

0.200mol/L 磷酸溶液为正极液，以 0.300mol/L 氢氧化钠溶液为负极液，用 25kv 电压分离 6 分钟；以 0.100mol/L 氨水溶液为正极液，以 0.300mol/L 氢氧化钠溶液为负极液，用 30kv 电压分离 30 分钟；检测波长为 280nm。

系统适用性要求 系统适用性溶液图谱应与系统适用性对照品说明书中图谱基本一致，其中各主要电荷变异性等电点的相对标准偏差 ($n \geq 3$) 均应不大于 2.0%，各主要电荷变异性含量的相对标准偏差 ($n \geq 3$) 均应不大于 5.0%；供试品溶液图谱中各电荷变异性等电点应与对照品溶液图谱各电荷变异性等电点一致。

测定法 分别取系统适用性溶液、对照品溶液和供试品溶液进样，记录电泳图谱。按面积归一法分别计算各电荷变异性含量，记录测定结果。

第三法 成像毛细管等电聚焦电泳法

照毛细管电泳法（通则 0542）。

试剂 预混液 按下表比例配制溶液，加尿素 0.24g，振摇使溶解。

试剂	体积 (μl)
两性电解质 (pH2.5~5)	30
两性电解质 (pH5~8)	10
等电点标记物 1	5
等电点标记物 2	5
1%甲基纤维素	350
水	240

供试品溶液 取供试品适量，用水置换供试品的缓冲体系并制成每 1ml 约含人促红素蛋白 2.0mg 的溶液。取 20 μ l，加预混液 80 μ l，混匀，不低于 14000g 离心 3 分钟，取上清液。

系统适用性溶液 取人促红素理化测定系统适用性对照品，照供试品溶液同法制备。

对照品溶液 取人促红素工作对照品，照供试品溶液同法制备。

电泳条件 采用涂层熔融石英毛细管或等效毛细管；样品盘温度设为 10°C，毛细管温度设为 25°C；以含有 80 mmol/L 磷酸的 0.1% 甲基纤维素溶液为正极液，以含有 0.1 mol/L 氢氧化钠的 0.1% 甲基纤维素溶液为负极液；预聚焦电压 1.5kV，预聚焦时间 1 分钟；聚焦电压为 3kV，聚焦时间为 7 分钟；检测波长 280nm。

系统适用性要求 系统适用性溶液图谱应与系统适用性对照品说明书中图谱基本一致，其中各电荷变异体等电点的相对标准偏差应不大于 2.0%，各主要电荷变异体相对百分含量的相对标准偏差应不大于 5.0%；供试品溶液图谱中各电荷变异体等电点应与对照品溶液图谱中相应电荷变异体等电点一致。

测定法 分别取系统适用性溶液、对照品溶液和供试品溶液进样，记录电泳图谱。按面积归一法分别计算各电荷变异体的含量，记录测定结果。

注：第二法、第三法可根据产品特征调整样品预混液组分/比例、样品浓度、聚焦电压、聚焦时间、毛细管温度以及样品池温度等。

3.1.2.5 N 糖糖谱

以下二种方法可任选其一。

第一法 离子色谱法

照离子色谱法（通则 0513）。

试剂 磷酸盐缓冲液 取磷酸氢二钠 0.7513g，磷酸二氢钠 0.0557g，加水适量使溶解，调 pH 至 7.5，用水稀释至 100ml。

供试品溶液 取供试品适量，用磷酸盐缓冲液置换供试品的缓冲体系并制成每 1ml 约含人促红素蛋白 2.0mg 的溶液。取 100 μ l，加糖苷酶 F 溶液 4 μ l，混匀，置 37℃ 保温 16 小时。加入-20℃ 预冷的乙醇 0.3ml，混匀，置-20℃ 至少 30 分钟，于 4℃ 不低于 14000g 离心 15 分钟，取上清液，必要时采用适宜方式除盐后真空干燥，加水 0.20ml 复溶。

系统适用性溶液 取促红素理化测定系统适用性对照品，照供试品溶液同法制备。

对照品溶液 取人促红素工作对照品，照供试品溶液同法制备。
色谱条件 以键合季铵基官能团的苯乙烯二乙烯基苯共聚物为固定相（250mm×3mm，5.5 μ m 或等效色谱柱），柱温为 30℃；以 50mmol/L 氢氧化钠溶液为流动相 A，以 0.2mol/L 氢氧化钠溶液为流动相 B，以含有 50mmol/L 氢氧化钠溶液和 0.25mol/L 乙酸钠溶液为流动相 C，按下表进行梯度洗脱；流速为每分钟 0.5ml；脉冲安培检测器，适合的工作电极及参比电极；进样体积为 25 μ l。

时间（分钟）	流动相 A	流动相 B	流动相 C
0	95	0	5
10	95	0	5

25	80	0	20
80	0	0	100
85	0	0	100
85.1	0	100	0
90	0	100	0

系统适用性要求 系统适用性溶液图谱应与系统适用性对照品说明书中图谱基本一致，其中二唾液酸峰簇、三唾液酸峰簇和四唾液酸峰簇保留时间的相对标准偏差 ($n \geq 3$) 均应不大于 5.0%，上述各峰簇含量的相对标准偏差 ($n \geq 3$) 均应不大于 10.0%。供试品溶液图谱中各唾液酸峰簇保留时间与对照品溶液图谱中相应唾液酸峰簇保留时间的比值均应为 0.8~1.2。

测定法 分别取系统适用溶液、对照品溶液和供试品溶液，注入液相色谱仪，记录色谱图。按面积归一化法分别计算二唾液酸峰簇、三唾液酸峰簇和四唾液酸峰簇的含量，记录测定结果。

第二法 超高压液相色谱法

照高效液相色谱法（通则 0512）。

试剂 （1）磷酸盐缓冲液 称取十二水合磷酸氢二钠 0.7513g，一水合磷酸二氢钠 0.0557g，溶于超纯水中，如需要可用稀盐酸和氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.5 ± 0.2 ，超纯水定容至 100ml。

（2）衍生用溶液 取二甲基亚砜 350 μ l 和冰乙酸 150 μ l，摇匀，依次加 2-氨基苯甲酰胺（2-AB）25mg 和氰基硼氢化钠 30mg，振摇使溶解。

供试品溶液 取供试品适量，用磷酸盐缓冲液置换供试品的缓冲体系并制成每 1ml 约含人促红素蛋白质 2.0mg 的溶液。取 100 μ l，加糖苷酶 F 溶液 4 μ l，混匀，置 37℃ 保温 16 小时，加入-20℃ 预冷的乙醇 0.3ml，混匀，置-20℃ 至少 30 分钟，4℃ 不低于 14000g 离心 15 分钟，取上清液，必要时采用适宜方式除盐后真空干燥。于干燥品中加入衍生用溶液 100 μ l，置 37℃ 避光反应 3~5 小时。采用凝胶过滤或固相提取（如 HILIC 柱，磁珠等）等方式，按照说明书进行操作，对衍生后的 N 糖进行纯化，必要时可真空干燥/浓缩，用 50 μ l 水复溶，70% 乙腈调整至 100 μ l。

系统适用性溶液 取促红素理化测定系统适用性对照品，照供试品溶液同法制备。

对照品溶液 取人促红素工作对照品，照供试品溶液同法制备。

色谱条件 以阴离子交换和亲水相互作用官能团键合全多孔硅胶为固定相（150mm \times 2.1mm，1.7 μ m 或等效色谱柱），柱温为 30℃；以 0.1mol/L 甲酸铵溶液（pH4.4）为流动相 A，以 70% 乙腈为流动相 B，按下表进行梯度洗脱，流速为每分钟 0.4ml；荧光检测器，激发波长为 330nm，发射波长为 420nm；进样体积 10 μ l。

时间(分钟)	流动相 A	流动相 B
0	2	98
2	2	98
18	6	94
23	6	94
30	8	92
35	8	92

52	15	85
55	80	20
62	80	20
65	2	98
70	2	98

系统适用性要求 系统适用性溶液图谱应与对照图谱基本一致，其中二唾液酸峰簇、三唾液酸峰簇和四唾液酸峰簇保留时间的相对标准偏差 ($n \geq 3$) 均应不大于 5.0%，上述各峰簇含量的相对标准偏差 ($n \geq 3$) 均应不大于 10.0%。供试品溶液图谱中各唾液酸峰簇保留时间与对照品溶液图谱中相应唾液酸峰簇保留时间的比值均应为 0.8~1.2。

测定法 分别取系统适用溶液、对照品溶液和供试品溶液，注入液相色谱仪，记录色谱图。按面积归一化法分别计算二唾液酸峰簇、三唾液酸峰簇和四唾液酸峰簇的含量，记录测定结果。

注：1.样品预处理可根据是否能够完全酶切，调节样品量，加入的酶体积和缓冲液体系与孵育时间。

2.样品预处理、糖链的纯化、衍生化步骤可以采用其它系统进行，以达到等效的缓冲液置换、去蛋白沉淀和 N 糖纯化等目的。如果经过验证，也可以采用市售的商品化试剂盒进行供试品溶液和对照品溶液的制备。

3.不同品牌检测器可能存在差异，可对检测器参数、进样体积进行适当调整，以获得合适的信号响应强度。

3.1.2.6 唾液酸含量

每 1mol 人促红素应不低于 10.0mol (通则 3102 第一法)。

3.1.2.7 外源性 DNA 残留量

每 10 000IU 人促红素应不高于 100pg (通则 3407)。

3.1.2.8 CHO 细胞蛋白质残留量

采用双抗体夹心酶联免疫法测定 CHO 细胞蛋白质含量，除以蛋白含量测定结果。应不高于 0.05%。

3.1.2.9 牛血清白蛋白残留量

依法测定 (通则 3411)，应不高于蛋白质总量的 0.01%。

3.1.2.10 细菌内毒素检查

依法检查 (通则 1143)，每 10 000IU 人促红素应小于 2EU。

3.1.3 含量与效价测定

3.1.3.1 蛋白质含量

供试品溶液 精密量取供试品适量，用 4g/L 碳酸氢铵溶液稀释至每 1ml 含人促红素蛋白 0.5~2mg。

测定法 以 4g/L 碳酸氢铵溶液作为空白，测定供试品溶液在 320nm、325nm、330nm、335nm、340nm、345nm 和 350nm 的吸光度。用读出的吸光度的对数与其对应波长的对数作直线回归，求得回归方程。照紫外-可见分光光度法 (通则 0401)，在波长 276~280nm 处，测定供试品溶液最大吸光度 A_{max} ，将 A_{max} 对应波长代入回归方程求得供试品溶液由于光散射产生的吸光度 $A_{\text{光散射}}$ 。按下式计算供试品蛋白质含量。

$$\text{蛋白质含量} = \frac{A_{\max} - A_{\text{光散射}}}{7.43} \times \text{供试品稀释倍数} \times 10$$

限度 应不低于 0.5mg/ml。

3.1.3.2 体内活性测定

依法测定（通则 3522 第一法），记录结果。

3.1.3.3 体内比活力（比活性）

计算体内活性测定结果与蛋白质含量测定结果的比值。

限度 每 1mg 蛋白质应不低于 1.0×10^5 IU。

3.1.3.4 体外活性测定

按酶联免疫吸附法试剂盒说明书测定，记录测定结果。

3.2 半成品检定

3.2.1 细菌内毒素

依法检查（通则 1143），每 1000IU 人促红素应小于 2EU。

3.2.2 无菌

依法检查（通则 1101），应符合规定。

3.3 成品检定

3.3.1 外观

应为无色的澄明液体。

3.3.2 鉴别

按免疫印迹法（通则 3401）或免疫斑点法（通则 3402）测定，应为阳性。

3.3.3 检查

3.3.3.1 pH

依法测定（通则 0631），应符合批准的要求。

3.3.3.2 渗透压摩尔浓度

依法测定（通则 0632），应符合批准的要求。

3.3.3.3 总蛋白质含量

若制品中加入人血白蛋白作稳定剂，则应符合经批准的要求（通则 0731 第二法）。

3.3.3.4 可见异物

依法检查（通则 0904），应符合规定。

3.3.3.5 装量

依法检查（通则 0102），应不低于标示量。

3.3.3.6 细菌内毒素

依法检查（通则 1143），规格小于 5000IU 的供试品，每 1000IU 人促红素中含内毒素的量应小于 2EU；规格不小于 5000IU 的供试品，每支含内毒素的量应小于 10EU。

3.3.3.7 异常毒性

依法检查（通则 1141 小鼠试验法），应符合规定。

3.3.3.8 无菌

依法检查（通则 1101），应符合规定。

3.3.4 生物学活性测定

3.3.4.1 体外法

按酶联免疫吸附法试剂盒说明书测定，应为标示量的 80%~120%。

3.3.4.2 体内法

依法测定（通则 3522 第一法），应为标示量的 80%~140%。

4 保存、运输及有效期

于 2~8℃避光保存和运输。自生产之日起，按批准的有效期执行。

5 使用说明

应符合"生物制品分包装及贮运管理"规定和批准的内容。

