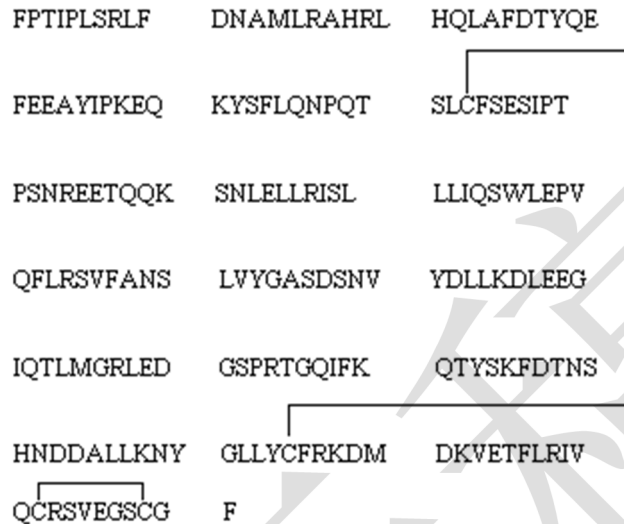


人生长激素注射液

Ren Shengzhangjisu Zhusheye

Human Somatropin Injection



分子式：C₉₉₀H₁₅₂₈N₂₆₂O₃₀₀S₇ 分子量：22,125

本品系由含有可高效表达人生长激素基因的工程化细胞，经过发酵、分离和高度纯化后获得的人生长激素（hGH），加入适宜稳定剂和保护剂制成的无菌液体制剂，可含抑菌剂，不含抗生素。每 1mg 无水人生长激素相当于 3.0 国际单位。

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

人生长激素工程化细胞名称、来源及种子批检定应符合批准的要求。

2.2 原液

2.2.1 种子液制备

将检定合格的工作种子批细胞接种于适宜的培养基（可含适量抗生素）中培养。

2.2.2 发酵用培养基

采用适宜的不含抗生素的培养基。

2.2.3 种子液接种及发酵培养

2.2.3.1 在灭菌培养基中接种适量种子液。

2.2.3.2 在适宜的温度下进行发酵，应根据经批准的发酵工艺进行，并确定相应的发酵条件，如温度、pH 值、溶解氧、补料、发酵时间等。发酵液应定期进行质粒丢失率检查（通则 3406）。

2.2.4 发酵液处理

用适宜的方法收集、处理菌体。

2.2.5 初步纯化

采用经批准的纯化工艺进行初步纯化，使其纯度达到规定的要求。

2.2.6 高度纯化

经初步纯化后，采用经批准的纯化工艺进行高度纯化，过滤后使其达到 3.1 项要求，即为人生长激素原液。如需存放，应规定时间和温度。

2.2.7 原液检定

按 3.1 项进行。

2.3 半成品

2.3.1 配制与除菌

按经批准的配方配制稀释液。配制后应立即用于稀释。将原液用稀释液稀释至所需浓度，过滤后即为半成品，保存于适宜的温度。

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（通则 0239）规定。

2.4.2 分装

应符合生物制品分包装及贮运管理（通则 0239）及注射剂（通则 0102）有关规定。

2.4.3 规格

2IU/0.66mg/0.4ml , 4IU/1.33mg/1ml , 4.5IU/1.5mg/0.9ml , 8IU/2.66mg/0.8ml , 10IU/3.33mg/1ml , 15IU/5mg/3ml , 30IU/10mg/3ml , 6IU/2mg/0.6ml , 3IU/1mg/0.75ml、5IU/1.66mg/0.5ml, 1.5ml: 5mg, 1.5ml: 10mg 和 1.5ml: 15mg。

2.4.4 包装

应符合生物制品分包装及贮运管理（通则 0239）及注射剂（通则 0102）有关规定。

3 检定

3.1 原液检定

3.1.1 外观

应为无色澄明或微浊液体。

3.1.2 鉴别

3.1.2.1 反相色谱法

照高效液相色谱法（通则 0512）试验。

试剂 三羟甲基氨基甲烷缓冲液 取三羟甲基氨基甲烷 6.05g，加水溶解并稀释至 900ml，用 1mol/L 盐酸溶液调节 pH 至 7.5，并用水稀释至 1000ml。

对照品溶液 取人生长激素对照品适量，加三羟甲基氨基甲烷缓冲液并制成每 1ml 中含人生长激素 2mg 的溶液。

供试品溶液 取人生长激素原液适量，照对照品溶液方法制备。

测定法 按 3.1.3.1 相关蛋白项下的色谱条件试验。

结果判定 供试品溶液主峰的保留时间应与对照品溶液主峰的保留时间一致。

3.1.2.2 肽图

照高效液相色谱法（通则 0512）试验。

试剂 胰蛋白酶溶液 取经苯磺酰苯丙氨酰氯甲酮(TPCK)处理的胰蛋白酶适量，加

3.1.2.1 反相色谱法项下的三羟甲基氨基甲烷缓冲液溶解并制成每 1ml 含 2mg 的溶液。

对照品溶液 取人生长激素对照品，加三羟甲基氨基甲烷缓冲液溶解并制成每 1ml

中约含2mg的溶液。取此液300μl、胰蛋白酶溶液20μl与三羟甲基氨基甲烷缓冲液300μl，混匀，置37℃水浴4小时，立即置-20℃终止反应。

供试品溶液 取人生长激素原液适量，必要时用三羟甲基氨基甲烷缓冲液稀释至每1ml中约含2mg的溶液，其他同对照品溶液方法制备。

空白溶液 取人生长激素原液适量，不加胰蛋白酶溶液，其他同供试品溶液方法制备。

色谱条件 用辛基硅烷键合硅胶为填充剂（5~10μm），柱温为35℃；以0.1%三氟乙酸溶液为流动相A，以含0.1%三氟乙酸的90%乙腈溶液为流动相B，流速为每分钟1.0ml；按下表进行梯度洗脱，进样体积100μl；检测波长为214nm。

时间（分钟）	A相（%）	B相（%）
0	100	0
20	80	20
45	75	25
70	50	50
75	20	80

测定法 取空白溶液、对照品溶液和供试品溶液，分别注入液相色谱仪，记录色谱图。

结果判定 排除空白溶液色谱峰后，供试品溶液肽图应与对照品溶液肽图一致。

3.1.2.3 凝胶色谱法

在3.1.4项下记录的色谱图中，供试品溶液主峰的保留时间应与对照品溶液主峰的保留时间一致。

3.1.2.4 毛细管电泳法

对照品溶液 取人生长激素对照品适量，用水稀释成每1ml约含人生长激素1mg的溶液。

供试品溶液 取人生长激素原液适量，用水稀释成每1ml约含人生长激素1mg的溶

液，该溶液与对照品溶液等体积混合，摇匀。

测定法 按 3.3.2.2 毛细管电泳法项下试验。

结果判定 在供试品溶液记录的电泳图中，人生长激素主峰应为单一无分裂电泳峰。

3.1.2.5 N 末端氨基酸序列（至少每年测定 1 次）

采用氨基酸序列分析仪或其他适宜的方法测定，N 端序列应为：
F-P-T-I-P-L-S-R-L-F-D-N-A-M-L

3.1.3 检查

3.1.3.1 相关蛋白质

照高效液相色谱法（通则 0512）试验。

供试品溶液 取人生长激素原液适量，用 3.1.2.1 反相色谱法项下的三羟甲基氨基甲烷缓冲液稀释并制成每 1ml 中约含 2mg 的溶液。

系统适用性溶液 取人生长激素对照品适量，用三羟甲基氨基甲烷缓冲液溶解并制成每 1ml 中约含 2mg 的溶液，过滤除菌，室温放置 24 小时。

色谱条件 用丁基硅烷键合硅胶为填充剂（5~10 μ m），柱温为 45℃；以三羟甲基氨基甲烷缓冲液-正丙醇（71:29）为流动相，调节流动相中正丙醇比例使人生长激素主峰保留时间为 30~36 分钟，流速为每分钟 0.5ml；检测波长为 220nm；进样体积 20 μ l。

系统适用性要求 人生长激素主峰与脱氨人生长激素峰之间的分离度应不小于 1.0，人生长激素峰的拖尾因子应为 0.9~1.8。

测定法 取供试品溶液，注入液相色谱仪，记录色谱图，按面积归一化法进行计算。

限度 不得大于 6.0%。

3.1.3.2 高分子蛋白质

供试品溶液、色谱条件与系统适用性要求 见 3.1.4。

测定法 按 3.1.4 项下测定，忽略保留时间大于主峰的色谱峰，所有保留时间小于主

峰的色谱峰视为高分子蛋白质峰，按面积归一化法计算，

限度 不得大于 4.0%。

3.1.3.3 宿主菌 DNA 残留量

依法测定（通则 3407）或采用经验证并批准的其他适宜方法，每 1mg 人生长激素中宿主菌 DNA 残留量不得过 1.5ng。

3.1.3.4 宿主菌蛋白质残留量

依法检查（通则 3412、3414）或采用经验证并批准的其他适宜方法，每 1mg 人生长激素中宿主菌蛋白质残留量应不得过 10ng。

3.1.3.5 残余抗生素活性

如在生产（例如种子液制备）中使用抗生素，应依法检查（通则 3408），或按照经验证并批准的方法检查，不应有残余氨苄西林或其他抗生素活性。

3.1.3.6 细菌内毒素

依法检查（通则 1143），每 1mg 人生长激素中含细菌内毒素的量应小于 5.0EU。

3.1.3.7 生物学活性

依法测定(通则 3537),按下式计算结果,每 1mg 人生长激素的活性不得少于 2.5 IU。

供试品生物学活性 (IU/ml) = 标准品效价(IU/ml) × 供试品相对生物学效价 (%) ×

$\frac{D_s}{D_r}$

式中：Ds 为供试品预稀释倍数；Dr 为标准品预稀释倍数；

供试品比活性 (IU/mg) = 供试品生物学活性 (IU/ml) / 供试品蛋白质含量 (mg/ml)。

3.1.4 含量

照分子排阻色谱法（通则 0514）测定。

试剂 （1）0.063mol/L 磷酸盐缓冲液 取无水磷酸氢二钠 5.18g、磷酸二氢钠 3.65g，加水 950ml，用磷酸或氢氧化钠试液调节 pH 值至 7.0，用水制成 1000ml。

（2）0.025 mol/L 磷酸盐缓冲液 取 0.063mol/L 磷酸盐缓冲液 100ml，用水稀释至

250ml, 必要时用磷酸或氢氧化钠试液调节 pH 值至 7.0。

对照品溶液 取人生长激素对照品适量, 加 0.025mol/L 磷酸盐缓冲液溶解并制成每 1ml 中约含 1.0mg 的溶液。

供试品溶液 取人生长激素原液适量, 加 0.025mol/L 磷酸盐缓冲液稀释并制成每 1ml 中约含人生长激素 1.0mg 的溶液。

系统适用性溶液 取人生长激素单体-二聚体混合物对照品适量, 加 0.025mol/L 磷酸盐缓冲液溶解并制成每 1ml 中约含 1.0mg 的溶液。

色谱条件 以适合分离分子量为 5000-60000Da 球状蛋白的亲水改性硅胶为填充剂; 以异丙醇-0.063mol/L 磷酸盐缓冲液 (3:97) 为流动相; 流速为每分钟 0.6ml; 检测波长为 214nm; 进样体积 20 μ l。

系统适用性要求 系统适用性色谱图中, 人生长激素单体峰与二聚体峰之间的分离度应符合要求。

测定法 精密量取供试品溶液和对照品溶液, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。按外标法以峰面积计算。

3.2 半成品检定

如需对原液进行稀释或加入其他辅料制成半成品, 应确定半成品的质量控制要求, 应按如下检项或经批准的检项进行。

3.2.1 细菌内毒素

依法检查 (通则 1143), 每 1mg 人生长激素含细菌内毒素的量应小于 2.0EU。

3.2.2 无菌

依法检查 (通则 1101 薄膜过滤法), 应符合规定。

3.3 成品检定

3.3.1 外观

本品为无色澄明或微浊液体。

3.3.2 鉴别

3.3.2.1 反相色谱法

供试品溶液、对照品溶液与色谱条件 见 3.3.3.3 相关蛋白 1 项下。

测定法 取本品，按 3.3.3.3 项相关蛋白质 1 项下色谱条件试验。

结果判定 在供试品溶液记录的色谱图中，供试品溶液主峰的保留时间应与对照品溶液主峰的保留时间一致。

3.3.2.2 毛细管电泳法

对照品溶液 取人生长激素对照品适量，用水稀释成每 1ml 约含人生长激素 1mg 的溶液。

供试品溶液：取本品适量，用水稀释成每 1ml 约含人生长激素 1mg 的溶液，该溶液与对照品溶液等体积混合，摇匀。

测定法 按 3.3.3.4 相关蛋白 2 项下试验。

结果判定 在供试品溶液记录的电泳图中，人生长激素主峰应为无分裂单一峰。

3.3.3 检查

3.3.3.1 pH 值

取本品，依法测定（通则 0631），pH 值应为 5.5~6.5。

3.3.3.2 溶液的澄清度与颜色

取本品，用水制成每 1ml 中约含人生长激素 1.6mg 的溶液（规格低于该浓度的成品可不经稀释直接作为供试品溶液），依法检查（通则 0901 第一法和 0902 第一法），溶液应澄清无色；如显浑浊，与 2 号浊度标准液比较，不得更浓。

3.3.3.3 相关蛋白质 1（反相色谱法）

照高效液相色谱法（通则 0512）试验。

对照品溶液 取人生长激素对照品适量，加水制成每 1ml 中含人生长激素 1.6mg 的溶液。

供试品溶液 取本品，用 0.025mol/L 磷酸盐缓冲液稀释成每 1ml 中含人生长激素 1.6mg 的溶液；规格低于该浓度的成品可不经稀释直接作为供试品溶液。

系统适用性溶液 取 30%过氧化氢溶液 5μl，加水稀释至 100ml，作为溶剂。另取人生长激素对照品适量，用溶剂制成每 1ml 中含人生长激素 1.6mg 的溶液，放置 1~7 天，以得到适量的甲硫氨酸氧化形式。

空白溶液 照成品处方制备不含人生长激素的辅料溶液。

对照品溶液、供试品溶液、系统适用性溶液、空白溶液均于 2~8℃ 保存，24 小时内使用。

色谱条件 采用末端封尾的十八烷基硅烷键合硅胶填充的色谱柱（4.0mm×250mm、7μm、孔径 100nm），柱温为 45℃；取硫酸铵 82.6g 和磷酸二氢钠（NaH₂PO₄·H₂O）34.5g，加水 2950ml 溶解后再加入高氯酸 25.0ml 和乙腈 2000ml，混匀后加水稀释至 5000ml，作为流动相 A；乙腈-水（4:1）为流动相 B，按下表进行梯度洗脱；流速为每分钟 1.0ml；检测波长为 215nm；进样体积 20μl。

时间（分钟）	A 相（%）	B 相（%）
0	77	23
60	72	28
61	77	23

系统适用性要求 调节流动相比比例，使系统适用性色谱图中人生长激素主峰保留时间约为 40 分钟；在系统适用性色谱图中，[MetO¹⁴]人生长激素与人生长激素主峰的相对保留时间约为 0.9。[MetO¹⁴] 人生长激素色谱峰的峰高与该峰和人生长激素主峰之间的峰谷高之比应不低于 2.0。在空白溶液色谱图中应无干扰峰。

测定法 取供试品溶液，注入液相色谱仪，记录色谱图。在供试品溶液记录的色谱图中，扣除空白溶液相对应的峰，除主峰外的其他峰均视为相关蛋白峰，按峰面积归一

化法计算相关蛋白质含量。

限度 不得大于 10.0%。

3.3.3.4 相关蛋白质 2（毛细管电泳法）

照毛细管电泳法（通则 0542）测定。

对照品溶液 取人生长激素对照品适量，用水稀释成每 1ml 约含人生长激素 1mg 的溶液。

供试品溶液 取本品，用水稀释成每 1ml 约含人生长激素约 1mg 的溶液。

系统适用性溶液 取人生长激素系统适用性对照品适量，用水稀释成每 1ml 约含人生长激素 1mg 的溶液。

空白溶液 按成品处方制备不含人生长激素的辅料溶液。

磷酸盐缓冲液 称取磷酸氢二铵 13.2g，加水 1L 溶解混匀后，用磷酸调节 pH 至 6.0，过滤。

电泳条件 用未包被熔融石英毛细管（有效长度至少 70cm，内径 50 μ m）。柱温 30℃，检测波长为 200nm，场强 217V/cm，至少电泳至主峰保留时间两倍时长处，停止电泳。用磷酸盐缓冲液作为两个电解槽中的电解液。在压力或真空下进样至少 5 秒钟，然后进样磷酸盐缓冲液 1 秒钟。为满足系统适用性要求，进样时间和压力可适当调整。

系统适用性要求 在系统适用性溶液记录的电泳图中，应可见先于主峰出峰的两个峰（I1，I2），明显可见迟于主峰出峰的至少两个峰（I3，I4，I4 为可能以峰簇形式出现的脱氨峰）；I3 峰与主峰的分离度应不小于 1.5。脱氨人生长激素对人生长激素主峰的相对保留时间约为 1.02~1.11。在空白溶液记录的电泳图中，应无干扰峰。

测定法 毛细管使用前用 1mol/L 氢氧化钠溶液（配制后置玻璃瓶中存放 24 小时以上）冲洗 20 分钟，用水冲洗 10 分钟，再用磷酸盐缓冲液冲洗 20 分钟。样品运行间隔中用 0.1mol/L 氢氧化钠溶液（配制后置玻璃瓶中存放 24 小时以上）冲洗毛细管 2 分钟，

然后用水冲洗 3 分钟，再用磷酸盐缓冲液冲洗 6 分钟。可根据所用毛细管的长度和仪器种类，调整毛细管预处理程序和样品运行间隔清洗程序。取系统适用性溶液、对照品溶液及空白溶液，在压力或真空下进样至少 5 秒钟，然后进样磷酸盐缓冲液 1 秒钟，记录电泳图。取供试品溶液适量进样，记录电泳图。在供试品溶液电泳图中，扣除空白溶液峰，按校正峰面积（经毛细管有效长度与保留时间校正后得到）归一化法计算总相关蛋白质。

限度 不得过 25.0%。

3.3.3.5 高分子蛋白质

取本品，按 3.1.3.2 项下测定，忽略保留时间大于主峰的其他峰面积，按面积归一化法计算，保留时间小于主峰的所有峰面积之和不得大于 2.0%。

3.3.3.6 可见异物

依法检查（通则 0904 第一法），应不得检出金属屑、玻璃屑或最大粒径超过 2mm 纤毛和块状物等明显外来的可见异物。

3.3.3.7 异常毒性

取本品，用注射用水或氯化钠注射液制成 1ml 中约含人生长激素 1.6mg 的溶液（规格低于该浓度的成品可不经稀释直接作为供试品溶液），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 薄膜过滤法），应符合规定。

3.3.3.9 细菌内毒素

依法检查（通则 1143），每 1mg 人生长激素中含细菌内毒素的量应小于 2.0EU。

3.3.3.10 装量

依法检查（通则 0102），应不低于标示量。

3.3.3.11 不溶性微粒

依法检查(通则 0903),每份容器中含 $10\mu\text{m}$ 及 $10\mu\text{m}$ 以上的微粒数不得过 6000 粒;
含 $25\mu\text{m}$ 及 $25\mu\text{m}$ 以上的微粒数不得过 600 粒。

3.3.3.12 渗透压摩尔浓度

依法测定(通则 0632),应符合经验证并批准的标准。

3.3.3.13 抑菌剂

如在成品生产过程中使用防腐剂,应按照经验证并批准的方法检查,并符合规定。

3.3.3.14 生物学活性(每年至少测定一次)

依法测定(通则 3537),应为标准品的 70%~140%。

3.3.4 含量

供试品 取本品,加 0.025mol/L 磷酸盐缓冲液制成每 1ml 中约含人生长激素 1.0mg 的溶液。

对照品溶液、色谱条件、适用性要求与测定法 见 3.1.4 项。

限度 含人生长激素应为标示量的 90.0%~110.0%。

4 保存、运输及有效期

于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 避光、密闭保存和运输。

5 使用说明

应符合生物制品分包装及贮运管理(通则 0239)规定和批准的内容。