

贝伐珠单抗注射液

Beifazhu Dankang Zhusheye

Bevacizumab Injection

重链

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW 50
INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP 100
HYYGSSHWYF DVWGQGT LVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC 150
LVKD YFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTPSSSLG 200
TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP 250
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE 300
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR 350
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT 400
PPVLDS DGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS 450
PGK 453

轻链

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVL IYF 50
TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ 100
GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLN NFY PREAKVQWKV 150
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSS TLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200
LSSPVTKSFN R GEC 214

二硫键:

重链链内 23-96 149-206 267-327 373-431

23"-96" 149"-206" 267"-327" 373"-431"

轻链链内 23'-88' 134'-194'

23"-88" 134"-194"

重轻链间 226-214' 226"-214"

重链链间 232-232" 235-235"

N-糖基化位点 303, 303"

分子式 $C_{6538}H_{9994}N_{1716}O_{2029}S_{44}$ (不含糖基部分)

分子量 146564.49 (不含糖基部分)

本品系由含有可高效表达贝伐珠单抗基因的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,经细胞培养、分离和高度纯化及病毒去除/灭活后获得的贝伐珠单抗的无菌溶液。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

贝伐珠单抗工程细胞株系由含抗血管表皮生长因子人源化单克隆基因的质粒转染中国仓鼠卵巢(CHO)细胞构建而成。

2.1.2 细胞库建立、传代及保存

原始细胞传代,扩增后保存于液氮或-130℃以下,作为主细胞库。从主细胞库经细胞传代、扩增后保存于液氮或-130℃以下,作为工作细胞库。各级细胞库细胞传代不得超过批准的代次,细胞库检定合格后方可用于生产。

2.1.3 主细胞库及工作细胞库的检定

应符合生物制品生产用动物细胞基质制备及检定(通则 0234)规定。

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,进行传代、扩增,供生物反应器接种用。

2.2.2 生产用细胞培养液

生产用细胞培养液不得含任何血清和抗生素。

2.2.3 细胞培养

采用经批准工艺进行细胞培养，收集含目的产物的培养液，即收获液。细胞培养全过程应严格按照无菌操作。

2.2.4 分离纯化

收获液采用经批准的工艺进行纯化、病毒灭活并调整至目标浓度，过滤，即为贝伐珠单抗原液。如需存放，应规定保存温度和时间。

2.2.5 原液检定

按 3.1 项进行。

2.3 成品

2.3.1 分批

应符合生物制品分包装及贮运管理（通则 0239）项下有关规定。

2.3.2 分装

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

2.3.3 规格

4ml :100mg

2.3.4 包装

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

2.3.5 成品检定

按 3.2 项进行。

3 检定

各项目中如涉及到贝伐珠单抗的质量，均以贝伐珠单抗蛋白质部分计。

3.1 原液检定

3.1.1 鉴别

3.1.1.1 肽图 照肽图检查法（通则 3405）测定。

试液（1）变性溶液 取盐酸胍 7.64 g，加水适量使溶解并稀释至 10 ml，摇匀。取二硫苏糖醇 1.50 g，加水使溶解并稀释至 10ml，摇匀。取盐酸胍溶液 1ml、二硫苏糖醇溶液 10μl 和三羟甲基氨基甲烷缓冲液（pH8.0）50μl，

混匀。

(2) 碘乙酰胺溶液 取碘乙酰胺 1.80g，加水使溶解并稀释至 10ml。

(3) 赖氨酸内切酶溶液 (Lys-C 酶溶液) 取 Lys-C 酶 1 支 (约相当于 200 单位)，自上而下缓慢加 50mmol/L 醋酸溶液 40 μ l 至包装瓶底，混匀，制成每 1ml 含 Lys-C 酶 0.5mg 的溶液；或按 Lys-C 酶说明书操作。

供试品溶液 取本品适量 (约相当于贝伐珠单抗 0.8 mg)，置离心管中，37℃减压离心浓缩至内容物为透明状，加变性溶液 40 μ l，涡旋使蛋白质溶解。37℃水浴 1 小时后短暂离心，放冷，加碘乙酰胺溶液 1 μ l，混匀后再次短暂离心，避光放置 30 分钟，加三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (pH8.0) 760 μ l，混匀。取上述溶液 100 μ l，加赖氨酸内切酶溶液 5 μ l，混匀，37℃水浴 4 小时。加甲酸 3 μ l 终止反应，16200g 离心 5 分钟，取上清液。

对照品溶液 取贝伐珠单抗对照品适量 (约相当于贝伐珠单抗 0.8 mg)，自“37℃减压离心浓缩……”起，照供试品溶液同法制备。

色谱条件 以耐酸的十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂 (2.1mm $\times$ 150mm，1.7 μ m)，柱温为 60℃；以含 0.1%甲酸的 0.02%三氟乙酸水溶液为流动相 A，含 0.08%甲酸的 0.02%三氟乙酸乙腈溶液为流动相 B，按下表进行梯度洗脱，流速为每分钟 0.3ml；检测波长为 214nm；样品盘温度为 6℃；进样体积 10 μ l。

时间 (分钟)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	98	2
5	98	2
120	65	35
120.1	0	100
128	0	100
128.1	98	2
135	98	2

测定法 取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 供试品溶液的肽图谱应与对照品溶液的肽图谱一致。

3.1.1.2 全柱成像毛细管等电聚焦电泳法

照单抗电荷变异体测定法 (通则 3129 第一法) 测定。

系统适用性溶液、空白溶液、系统适用性要求见通则 3129 第一法项下。

结果判定 供试品溶液图谱应与对照品溶液一致，供试品溶液主峰和对照品溶液主峰的等电点差值不得大于 0.2。

3.1.2 检查

3.1.2.1 颜色

取本品，按照批准的方法测定，应符合批准的要求。

3.1.2.2 澄清度

取本品，依法检查（通则 0902），与 3 号浊度标准液比较，不得更浓。

3.1.2.3 pH 值

取本品，依法检查（通则 0631），应符合批准的要求。

3.1.2.4 渗透压摩尔浓度

取本品，依法检查（通则 0632），应符合批准的要求。

3.1.2.5 纯度与杂质

（1）分子排阻色谱法

照高效液相色谱法（通则 0512）测定。

供试品溶液 1 取供试品，30℃ 孵育 24 小时。当供试品浓度高于 25mg/ml，用供试品缓冲液稀释制成每 1ml 约含贝伐珠单抗 25 mg 的溶液。

供试品溶液 2 取供试品，用流动相将供试品稀释至每 1ml 约含贝伐珠单抗 0.5 mg 的溶液，30℃ 孵育 24 小时。

对照品溶液 取贝伐珠单抗对照品，分别按供试品溶液 1 和供试品溶液 2 项下同法操作。

空白溶液 取供试品缓冲液，分别按供试品溶液 1 和供试品溶液 2 项下同法操作。

色谱条件 以适合分离分子质量为 10~500kD 蛋白质的亲水改性硅胶为填充剂的色谱柱（7.8mm×300mm，粒径 5μm），柱温为 23℃；流动相为含 0.25 mol/L 氯化钾的 0.20 mol/L 磷酸钾缓冲液（pH 6.2）；流速为每分钟 0.5ml；检测波长为 280nm；样品盘温度为 30℃；。

系统适用性要求 空白溶液图谱应无目标峰干扰。对照品溶液色谱图中，贝伐珠单抗峰的保留时间约为 17.5 分钟，主峰相邻的相对保留时间约为 0.75 的峰

视为聚体峰，两峰之间的分离度不得低于 1.5。前 5 针和末次对照品主峰保留时间的 RSD 不得高于 3.0%，主峰面积百分比的 RSD 不得高于 3.0%。

测定法 分别取供试品溶液 1 10 μ l 和供试品溶液 2 100 μ l，注入液相色谱仪，记录色谱图至贝伐珠单抗峰保留时间的 2 倍。按面积归一化计算贝伐珠单抗和聚体的含量。

限度 供试品溶液 2 贝伐珠单抗含量不得低于 95%，供试品溶液 1 聚体含量不得高于 10%。

(2) 离子交换色谱法

照高效液相色谱法（通则 0512）测定。

供试品溶液 取供试品，用流动相 A 稀释制成每 1ml 约含贝伐珠单抗 1mg 的溶液，取 1ml，加 1mg/ml 羧肽酶 B 溶液 10 μ l，混匀，37℃水浴 20 分钟。

对照品溶液 取贝伐珠单抗对照品，照供试品溶液项下同法操作。

空白溶液 按照制剂配方配制但不含贝伐珠单抗的溶液，照供试品溶液项下同法操作。

色谱条件 色谱柱为带羧基官能团弱阳离子交换柱（4mm $\times$ 250mm, 粒径 10 μ m），柱温为 40℃；以 20 mmol/L N-氨基甲酰甲基乙磺酸（ACES）溶液（pH 6.50 $\pm$ 0.05）为流动相 A，含 0.200 mol/L 氯化钠的 20 mmol/L ACES 溶液（pH 6.50 $\pm$ 0.05）为流动相 B，按下表梯度洗脱，流速为每分钟 0.5ml；检测波长为 280nm；样品盘温度为 5℃；进样体积 50 μ l。

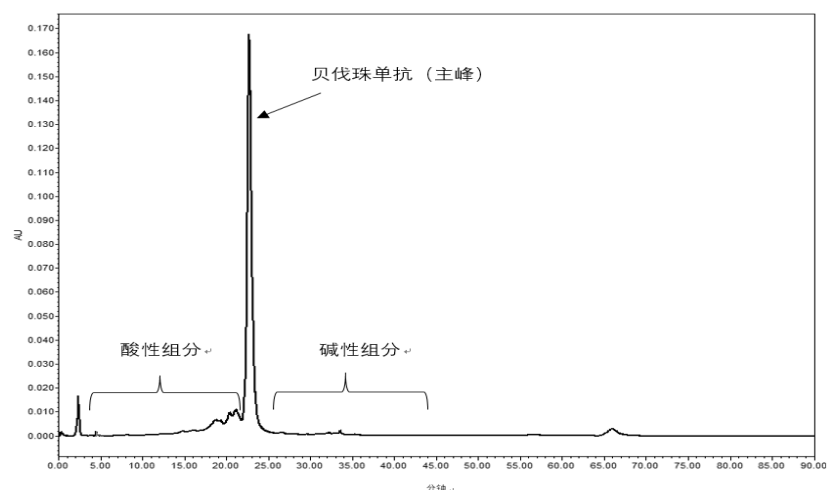
时间（分钟）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0	70	30
25	57	43
53	0	100
60	0	100
62	70	30
90	70	30

系统适用性要求 空白溶液图谱应无目标峰。对照品溶液色谱图应与参考图谱相似。前 5 针和末次对照品主峰保留时间的 RSD 不得高于 3.0%，主峰面积百分比的 RSD 不得高于 3.0%。

测定法 取供试品溶液，分别注入液相色谱仪，记录色谱图。按面积归一化

法分别计算贝伐珠单抗、酸性组分和碱性组分的含量。

限度 贝伐珠单抗不得小于 53.0%，酸性组分含量不得过 37.0%，碱性组分含量不得过 15.0%。



贝伐珠单抗离子交换色谱参考谱图

(3) 毛细管凝胶电泳法

取供试品，照单抗分子大小变异体测定法（通则 3127 第一法）测定。

还原电泳限度 贝伐珠单抗重链、非糖基化重链和轻链的修正峰面积不得小于总修正峰面积的 95.0%。

非还原电泳限度 贝伐珠单抗主峰修正峰面积不得小于总修正峰面积的 92.0%，片段修正峰面积不得高于总修正峰面积的 8.0%。

3.1.2.6 聚糖分布

取本品，照 N 糖谱测定法（通则 3130 第一法）测定贝伐珠单抗高甘露糖型含量。

限度 不得大于 5.0%。

3.1.2.7 宿主细胞蛋白残留量

取本品，依法检查（通则 3429）。用经验证的酶联免疫吸附法测定，残留量不得大于 10ng/mg。

3.1.2.8 蛋白 A 残留量

取本品，依法检查（通则 3429）。用经验证的酶联免疫吸附法测定，残留量不得大于 10ng/mg。

3.1.2.9 宿主细胞 DNA 残留量

取本品，依法检查（通则 3407 第三法）。每 1mg 贝伐珠单抗中宿主细胞 DNA 残留量不得过 10 pg。

3.1.2.10 细菌内毒素

取本品，依法检查（通则 1143）。每 1ml 中含内毒素的量不得大于 2 EU。

3.1.2.11 微生物限度

取本品，照非无菌产品微生物限度检查：微生物计数法（通则 1105）检查。每 10ml 供试品中需氧菌总数不得过 1cfu，霉菌和酵母菌总数不得过 1cfu。

3.1.3 生物学活性

取本品，依法测定（通则 3541，任选一种方法进行）。供试品生物学活性应为标准品的 70%~130%。

3.1.4 含量测定

照紫外-可见分光光度法（通则 0401）测定。

供试品缓冲液 按照制剂配方配制但不含贝伐珠单抗的溶液。

供试品溶液 取供试品，精密量取适量，用供试品缓冲液稀释制成每 1ml 约含贝伐珠单抗 0.5 mg 的溶液。

测定法 取供试品溶液，以供试品缓冲液作为空白，在 240nm~500nm 绘制紫外光谱，确定最大吸收波长，测定供试品溶液在最大吸收波长和 320 nm 波长处的吸光度，按下式计算供试品中贝伐珠单抗的含量。

$$\text{蛋白质含量 (mg/ml)} = (A_{\text{max}} - A_{320}) \times n / (E \times L)$$

式中 A_{max} 为最大吸收波长处的吸光度； A_{320} 为供试品溶液在 320nm 波长处的吸光度； n 为稀释倍数； E 为贝伐珠单抗的吸收系数，1.7 ml/(mg·cm)； L 为光程，cm。

限度 应符合批准的要求。

3.2 成品检定

3.2.1 鉴别

3.2.1.1 肽图

取本品，按 3.1.1.1 项测定。供试品溶液图谱应与对照品溶液图谱一致。

3.2.1.2 全柱成像毛细管等电聚焦电泳法

取本品，照 3.1.1.2 项测定。供试品溶液图谱应与对照品溶液一致，供试品

溶液主峰和对照品主峰溶液的等电点差值不得大于 0.2。

3.2.2 检查

3.2.2.1 颜色

取本品，按照批准的方法测定，应符合批准的要求。

3.2.2.2 澄清度

取本品，依法检查（通则 0902），与 3 号浊度标准液比较，不得更浓。

3.2.2.3 pH

取本品，依法检查（通则 0631），应符合批准的要求。

3.2.2.4 渗透压摩尔浓度

取本品，依法检查（通则 0632），应符合批准的要求。

3.2.2.5 装量

取本品，依法检查（通则 0102），不得低于标示量。

3.2.2.6 不溶性微粒

取本品，依法检查（通则 0903），应符合规定。

3.2.2.7 可见异物

取本品，依法检查（通则 0904），应符合规定。

3.2.2.8 纯度与杂质

（1）分子排阻色谱

取本品，照 3.1.2.5（1）项下方法检查。

限度 供试品溶液 2 中贝伐珠单抗含量不得低于 93%，供试品溶液 1 中聚体含量不得高于 12%。

（2）离子交换色谱法

取本品，照按 3.1.2.5（2）项下方法测定。

限度 贝伐珠单抗不得小于 45.0%，酸性组分含量不得过 42.0%，碱性组分含量不得过 18.0%。

（3）毛细管凝胶电泳法

照单抗分子大小变异体测定法（通则 3127 第一法）测定。

还原电泳限度 贝伐珠单抗重链、非糖基化重链和轻链的修正峰面积不得小于总修正峰面积的 94.0%。

非还原电泳限度 贝伐珠单抗主峰修正峰面积不得小于总修正峰面积的 90.0%，片段修正峰面积不得高于总修正峰面积的 10.0%。

3.2.2.9 聚山梨酯 80 含量

如处方中有聚山梨酯 80，依法检查（通则 3203 第二法），应符合批准的要求。

3.2.2.10 聚山梨酯 20 含量

如处方中有聚山梨酯 20，按下法检查。

试液 苯基萘胺溶液 取 N-苯基-1-萘胺 0.11 g，置 50 mL 量瓶中，加乙腈适量使溶解并定容至刻度，摇匀。

聚氧乙烯（35）十二烷基醚溶液 取 30%聚氧乙烯（35）十二烷基醚溶液 1.0ml，置 10mL 量瓶，用水稀释至刻度，摇匀。

三羟甲基氨基甲烷混合溶液 取氯化钠 8.75 g 和三羟甲基氨基甲烷 6.05g，加水 800 ml，搅拌使溶解，用盐酸调节 pH 至 8.0，加乙腈 50 ml，加水至 1000ml，摇匀，滤过，加苯基萘胺溶液和聚氧乙烯（35）十二烷基醚溶液各 0.5ml，摇匀。

供试品溶液 取供试品，必要时定量稀释至聚山梨酯 20 含量为 0.05mg/ml-0.50mg/ml 的浓度。

对照品溶液 临用新制。精密称取聚山梨酯 20 对照品约 0.25g，用水溶解并定容至 100ml，摇匀，作为对照品贮备液。精密量取对照品贮备液适量，用水定量稀释制成每 1ml 中分别约含聚山梨酯 20 0.05mg、0.10mg、0.20mg、0.40mg 和 0.50mg 的溶液，摇匀。

系统适用性溶液 每 1ml 约含聚山梨酯 20 0.20mg 的对照品溶液。

试验条件 采用反应线圈（如 Knitted Reaction Coil , 5 m×0.50 mm ID；或 REACTION COIL-750μl 或其他适宜反应线圈）；流动相为三羟甲基氨基甲烷混合溶液，流速 1.5ml/min；荧光检测器，激发波长 350nm、发射波长 420nm，增益值 5；采集时间 2.5min，压力上限 100 bar，柱温 35℃；样品盘温度 2℃～8℃；进样量 10μl。

系统适用性要求 系统适用性溶液图谱中，聚山梨酯 20 峰面积的相对标准偏差（ $n \geq 5$ ）应不大于 10.0%；线性回归方程的相关系数不小于 0.996；系统适用性溶液中聚山梨酯 20 的回收率（聚山梨酯 20 浓度的测定值与理论值的比值）应

在 90%~110%之间。

测定法 取系统适用性溶液、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。以对照品溶液浓度与相应峰面积计算线性回归方程，由回归方程计算供试品溶液中聚山梨酯 20 的浓度。

限度 应符合批准的要求。

3.2.2.11 细菌内毒素

取本品，依法检查（通则 1143），每 1ml 不得大于 2 EU。

3.2.2.12 无菌

取本品，依法检查（通则 1101 薄膜过滤法），应符合规定。

3.2.2.13 异常毒性

取本品，依法检查（通则 1141 小鼠试验法），应符合规定。

3.2.3 生物学活性

取本品，依法测定（通则 3541，选其中一种方法试验），供试品生物学活性应为标准品的 70%~130%。

3.2.4 含量测定

取本品，照 3.1.10 项下方法测定。本品含贝伐珠单抗应为标示量的 90%~110%。

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（通则 0239）规定和批准的内容。