(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101397339 B
(45)授权公告日 2012.07.25

(21)申请号 200810200343.7
(22)申请日 2008.09.24
(73)专利权人 上海天伟生物制药有限公司
地址 201108 上海市金都路 4258 号
(72)发明人 季晓铭 高霄梁 季斌 严惠敏 洪云海
(74)专利代理机构 北京三聚阳光知识产权代理有限公司 11250
代理人 李红团
(51)Int.Cl.
C07K 14/59(2006.01)
C07K 14/575(2006.01)
C07K 1/34(2006.01)
C07K 1/18(2006.01)
A61K 38/24(2006.01)
A61K 38/22(2006.01)
A61P 15/08(2006.01)

(56)对比文件
CN 1308673 A,2001.08.15, 全文.
CN 1199642 A,1998.11.25, 全文.
CN 1302818 A,2001.07.11, 权利要求 2,7.

审查员 周茂新

权利要求书 1 页 说明书 11 页

(54)发明名称

糖蛋白中去除/灭活病毒的方法

(57)摘要

本发明公开了一种去除和/或灭活糖蛋白中的病毒的方法,所述的方法选自下述步骤的一种或多种,并且所述步骤的顺序可以任意交换:(a)将糖蛋白进行有机溶液处理;所述的有机溶液处理选自形成沉淀和/或悬浮液搅拌处理;(b)将糖蛋白进行微孔膜过滤;(c)将糖蛋白进行离子交换层析。

CN 101397339 B

1. 一种去除和 / 或灭活糖蛋白激素中的病毒的方法，包含以下步骤：

(a) 将糖蛋白进行有机溶液处理，所述的有机溶液处理是将糖蛋白和有机溶液混合使形成沉淀或混合搅拌成悬浮液，使病毒灭活，混合温度为零下 20℃至 20℃，混合或混合搅拌的时间为 1 分钟至 4 小时；所述有机溶液是 70-100v/v％的有机溶媒 / 水溶液，所述有机溶媒选自乙醇、甲醇、丙酮或乙醚；所述糖蛋白和有机溶液混合时的重量体积比为 0.7-1.5 克： 20-40 毫升；

(b) 将糖蛋白进行微孔膜过滤，所述微孔膜为孔径为 10-80nm 的除病毒膜，所述微孔膜过滤是将糖蛋白浓度为 20-40 毫克 / 毫升的溶液通过所述微孔膜，去除和 / 或灭活病毒；

(c) 将糖蛋白进行离子交换层析，所述离子交换层析是将糖蛋白浓度为 20-40 毫克 / 毫升的溶液通过离子交换树脂，所述离子交换层析采用的离子交换树脂为 DEAE Sephadex；

所述的糖蛋白激素选自绒毛膜促性腺激素、卵泡刺激素、绝经期促性腺素；

所述方法得到的糖蛋白中 HIV 的含量用 PCR 法在 1mg/mL 的浓度下检测呈阴性，HBV 的含量用 PCR 法在 1mg/mL 的浓度下检测呈阴性，HCV 的含量用 PCR 法在 1mg/mL 的浓度下检测呈阴性。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，步骤 (a) 中的有机溶媒选自乙醇或丙酮。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于，步骤 (c) 中所述离子交换层析在 pH5-10 的条件下进行。

4. 如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，步骤 (c) 中所述离子交换层析在 pH6-8 的条件下进行。

糖蛋白中去除／灭活病毒的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域，尤其涉及治疗不孕症的糖基化蛋白质的病毒去除／灭活的方法。

背景技术

[0002] 治疗不孕症的糖蛋白是一类结构接近的物质，包括绒毛膜促性腺激素（HCG）、绝经期促性腺素（HMG）、卵泡刺激素（FSH）、黄体生成素（LH），其中绝经期促性腺素是含有卵泡刺激素和黄体生成素且两者成一定比例（1：0.1—1）的混合物。

[0003] HCG、FSH、LH 都是由 α 链和 β 链两个亚基通过非共价键的形式结合，其中它们的 α 亚基完全相同，具有 92 个氨基酸，分子量约为 14500D，第 52 和 78 位置上的天冬酰胺是发生 N- 糖基化的氨基酸。HCG 的 β 亚基有 145-147 个氨基酸，分子量 22200-39000D，其中第 13、30 位置上的天冬酰胺以及第 121、127、132、145 位置是发生糖基化的地方。FSH 的 β 亚基由 111 个氨基酸组成，分子量约为 18000D，其中第 7 和 24 位置上的天冬酰胺是发生 N- 糖基化的氨基酸。而 LH 的 β 亚基由 121 个氨基酸组成，分子量约为 14800D。

[0004] 临床上 HCG、HMG、FSH、LH 主要用于治疗不育症以及体外辅助生殖。它们可以从特定妇女（孕期或绝经期）的尿液中提取出来，也可通过 DNA 重组技术而制备。

[0005] 目前的血制品药物的工艺过程中都有针对性的病毒去除／灭活的多个步骤的组合，比如热处理、低 pH 处理、表面活性剂处理等，但这些步骤对上述糖基化蛋白质药物不完全适合，因为此类糖基化蛋白质药物对热和低 pH 的耐受性很差，容易失去活性。

[0006] 按照 ICH Q5A 生物制品病毒安全性评估的规程，要求工艺过程中应有 2 步或 2 步以上的步骤的组合，并且至少有一步的病毒去除／灭活率大于 10^4，才能被认为是安全有效的病毒去除／灭活方法。

[0007] 因此，本领域迫切需要开发出适合治疗不孕症的糖基化蛋白质的去除／灭活病毒的工艺，以获得安全有效的药物。

发明内容

[0008] 本发明旨在提供一种去除和／或灭活糖蛋白中的病毒的方法。

[0009] 在本发明的第一方面，提供了一种不含病毒的糖蛋白。

[0010] 在另一优选例中，所述的糖蛋白中 HIV 的含量用 PCR 法在 1mg/mL 的浓度下检测呈阴性。

[0011] 在另一优选例中，所述的糖蛋白中 HBV 的含量用 PCR 法在 1mg/mL 的浓度下检测呈阴性。

[0012] 在另一优选例中，所述的糖蛋白中 HCV 的含量用 PCR 法在 1mg/mL 的浓度下检测呈阴性。

[0013] 所述的荧光定量 PCR 方法是通过裂解液和抽提液将样品中的核酸（DNA 或 RNA）抽提出来，然后利用核酸聚合酶链反应将特异性病毒核酸序列扩增，通过荧光显色，测定出病

毒的滴度。可以使用本领域常规的仪器和试剂进行 PCR 检测，例如但不限于，杭州大和热磁电子有限公司的荧光定量 PCR 检测系统，深圳匹基生物工程有限公司的 HBV、HCV、HIV 核酸扩增荧光定量检测试剂盒。

[0014] 在另一优选例中，所述的糖蛋白选自绒毛膜促性腺激素、卵泡刺激素、黄体生成素、绝经期促性腺素、或其混合。

[0015] 在另一优选例中，所述绒毛膜促性腺激素是人绒毛膜促性腺激素或其变体，选自人尿来源的和 / 或重组的人绒毛膜促性腺激素或其变体；所述绝经期促性腺素是人绝经期促性腺素或其变体，选自人尿来源的和 / 或重组的人绝经期促性腺素或其变体；所述卵泡刺激素是人卵泡刺激素或其变体，选自人尿来源的和 / 或重组的人卵泡刺激素或其变体；所述黄体生成素是人黄体生成素或其变体，选自人尿来源的和 / 或重组的人黄体生成素或其变体。

[0016] 在本发明的第二方面，提供了一种去除和 / 或灭活糖蛋白激素中的病毒的方法，所述的方法选自下述步骤的一种或多种，并且所述步骤的顺序可以任意交换：

[0017] (a) 将糖蛋白进行有机溶液处理；所述的有机溶液处理选自形成沉淀和 / 或悬浮液搅拌处理；

[0018] (b) 将糖蛋白进行微孔膜过滤；

[0019] (c) 将糖蛋白进行离子交换层析。

[0020] 在另一优选例中，所述的糖蛋白激素选自绒毛膜促性腺激素、卵泡刺激素、黄体生成素、绝经期促性腺素、或其混合。

[0021] 在另一优选例中，所述绒毛膜促性腺激素是人绒毛膜促性腺激素或其变体，选自人尿来源的和 / 或重组的人绒毛膜促性腺激素或其变体；所述绝经期促性腺素是人绝经期促性腺素或其变体，选自人尿来源的和 / 或重组的人绝经期促性腺素或其变体；所述卵泡刺激素是人卵泡刺激素或其变体，选自人尿来源的和 / 或重组的人卵泡刺激素或其变体；所述黄体生成素是人黄体生成素或其变体，选自人尿来源的和 / 或重组的人黄体生成素或其变体。

[0022] 在另一优选例中，步骤 (a) 中所述的有机溶液是 30—100v/v％的有机溶媒 / 水溶液。

[0023] 在另一优选例中，所述的有机溶液是 70—100v/v％的有机溶媒 / 水溶液。

[0024] 在另一优选例中，所述的有机溶媒选自乙醇、甲醇、丙酮、或乙醚。

[0025] 在另一优选例中，所述的有机溶媒选自乙醇或丙酮。

[0026] 在另一优选例中，步骤 (a) 中所述糖蛋白和有机溶液的重量体积比为 0.5—2 克 :15—60 毫升。

[0027] 在另一优选例中，所述糖蛋白和有机溶液的重量体积比为 0.7—1.5 克 :20—40 毫升。

[0028] 在另一优选例中，步骤 (a) 中将糖蛋白在零下 30℃至 30℃用有机溶液处理 0.5 分钟至 6 小时。

[0029] 在另一优选例中，步骤 (a) 中将糖蛋白在零下 20℃至 20℃用有机溶液处理 1 分钟至 4 小时。

[0030] 在另一优选例中，步骤 (b) 中所述微孔膜选自孔径在 1000 道尔顿以上的超滤膜、

孔径为 1—100nm 的除病毒膜、或孔径为 0.1—1μm 的细菌过滤膜。

[0031] 在另一优选例中，步骤 (b) 中所述微孔膜选自孔径在 100000 道尔顿以上的超滤膜、孔径为 10—80nm 的除病毒膜、或孔径为 0.2—0.8μm 的细菌过滤膜。

[0032] 在另一优选例中，步骤 (c) 中所述离子交换层析在 pH5—10 的条件下进行。

[0033] 在另一优选例中，步骤 (c) 中所述离子交换层析在 pH6—8 的条件下进行。

[0034] 在本发明的第三方面，提供了一种药物组合物，所述的组合物包括本发明提供的不含病毒的糖蛋白以及药学上可接受的载体。

[0035] 据此，本发明提供了适合治疗不孕症的糖基化蛋白质的去除 / 灭活病毒的工艺，并获得了安全有效的药物。

具体实施方式

[0036] 虽然现有技术中已存在一些去除和 / 或灭活蛋白质中病毒的方法，但是同样的方法对于不同的蛋白质，会产生无法预料的结果，有时甚至会适得其反；有的方法对于某种蛋白质虽然可行，但在其具体的运用条件上，与其它蛋白质之间仍然有很大的差异。鉴于此，发明人经过广泛而深入的研究，惊奇地发现可通过有机溶液处理、微孔膜过滤以及离子交换层析的方法中的 1 步或全部步骤的任意组合，来达到去除 / 灭活糖基化蛋白质中的病毒的目的，从而在温和条件下去除 / 灭活了病毒，并且保留了目标物—糖基化蛋白质的活性。在此基础上，发明人完成了本发明。

[0037] 在探索过程中，发明人注意到，乙醇或丙酮等有机溶媒的处理可以对病毒产生灭活作用，并且对 HCG、HMG、FSH、LH 的活性没有任何影响。本发明人还发现，采用合适的微孔膜过滤技术不但可以截留病毒颗粒，而且可以让目标物从膜上滤过，可以达到将目标物和病毒分离的目的。另外，发明人在试验过程中意外发现，只要控制好适当的条件，可以通过离子层析将病毒吸附在离子树脂上，而目标物却不被吸附，从而达到将目标物中的病毒去除的目的。

[0038] 通过上述 3 个步骤中的一个或多个的任意组合，可以有效地去除 / 灭活病毒，从而获得安全可靠的产品。

[0039] 定义

[0040] 如本文所用，“糖蛋白”和“糖基化蛋白质”可以互换使用，都是选自下述的一种或多种混合：绒毛膜促性腺激素 (chorionic gonadotropin，CG)、卵泡刺激素 (follicule-stimulating hormone，FSH)、黄体生成素 (luteotropic hormone，LH)、绝经期促性腺素 (human menopausal gonadotropin，HMG)。

[0041] 术语“卵泡刺激素”和“FSH”可互换使用，都是指一类用于促进精子或卵泡产生、促进卵巢发育的激素或其变体。在天然情况下由垂体前叶分泌，也可从绝经期妇女的尿液中提取或可通过重组技术获得的。本发明中的 FSH 可采用本领域常用的任何方式获得，例如天然产生、通过重组技术获得或合成，其中的杂质包括 LH 或 CG。在本发明的一个实施方式中，所述卵泡刺激素是人卵泡刺激素或其变体，优选人尿来源的卵泡刺激素或是重组的人卵泡刺激素。

[0042] 可用于本发明中的含有 FSH 且包含作为杂质的 LH 和 / 或 CG 的原料可为：未经任何预纯化步骤的原料、经预纯化步骤去除了部分杂质的原料、或经预纯化步骤而基本上只

含 FSH 和杂质 LH 和 / 或 CG 的原料。

[0043] 优选在采用本发明的方法纯化 FSH 前，采用本领域常规方法对原料 FSH 进行初步纯化，以分离除 LH 或 CG 以外的其它杂质。

[0044] 如本文所用，术语“黄体生成激素”和“LH”可互换使用，指在含有 FSH 的原料制备或获取过程中掺杂于其中的与天然 LH 具有相同或相似结构和功能的激素。

[0045] 类似地，术语“绒毛膜促性腺激素”和“CG”可互换使用，指在含有 FSH 的原料制备或获取过程中掺杂于其中的与天然 CG 具有相同或相似结构和功能的激素。

[0046] 本发明提供的去除和 / 或灭活蛋白质中的病毒的方法除了用于糖蛋白，也可用于糖蛋白组合物，所述的糖蛋白组合物包括糖蛋白和药学上 / 食品学上可接受的载体。

[0047] 如本文所用，术语“药学上可接受的”或“食品学上可接受的”的成分是适用于人和 / 或动物而无过度不良副反应（如毒性、刺激和变态反应）的，即有合理的效益 / 风险比的物质。

[0048] 如本文所用，术语“药学上可接受的载体”指用于治疗剂给药的载体，包括各种赋形剂和稀释剂。该术语指这样一些药剂载体：它们本身并不是必要的活性成分，且施用后没有过分的毒性。合适的载体是本领域普通技术人员所熟知的。在《雷明顿药物科学》(Remington’s Pharmaceutical Sciences,Mack Pub.Co.,N.J.1991) 中可找到关于药学上可接受的赋形剂的充分讨论。

[0049] 所述的“药学上可接受的载体”可含有液体，如水、盐水、甘油和乙醇。另外，这些载体中还可能存在辅助性的物质，如填充剂、崩解剂、润滑剂、助流剂、泡腾剂、润湿剂或乳化剂、矫味剂、pH 缓冲物质等。通常，可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中，其中 pH 通常约为 5-8，较佳地，pH 约为 6-8。

[0050] 方法

[0051] 本发明提供的去除和 / 或灭活糖蛋白中的病毒的方法包括一个或多个步骤，多个步骤的顺序可任意组合。

[0052] 所述的步骤是有机溶液处理、微孔膜处理、和离子交换层析处理。

[0053] 所述的有机溶液处理是将糖蛋白和有机溶液混合使形成沉淀或混合搅拌成悬浮液，使病毒灭活。混合温度为零下 30℃至 30℃，较佳地为零下 20℃至 20℃；混合或混合搅拌的时间为 0.5 分钟至 6 小时，较佳地为 1 分钟至 4 小时；糖蛋白和有机溶液混合时的重量体积比为 0.5—2 克：15—60 毫升，较佳地为 0.7—1.5 克：20—40 毫升；所述的有机溶液是 30—100v/v％的有机溶媒 / 水溶液，较佳地为 70—100v/v％的有机溶媒 / 水溶液；所述的有机溶媒选自乙醇、甲醇、丙酮、或乙醚，较佳地选自乙醇或丙酮。

[0054] 所述的微孔膜处理是将糖蛋白浓度为 15—60 毫克 / 毫升（较佳地为 20—40 毫克 / 毫升）的溶液通过微孔膜，去除和 / 或灭活病毒。所述微孔膜选自孔径在 1000 道尔顿以上的超滤膜、孔径为 1—100nm 的除病毒膜、或孔径为 0.1—1μm 的细菌过滤膜；较佳地所述微孔膜选自孔径在 100000 道尔顿以上的超滤膜、孔径为 10—80nm 的除病毒膜、或孔径为 0.3—0.8μm 的细菌过滤膜。所述溶液 pH6-10，较佳地为 pH7-9，如磷酸盐、醋酸盐或 Tris 缓冲液。

[0055] 所述的离子交换层析处理是将糖蛋白浓度为 15—60 毫克 / 毫升（较佳地为 20—40 毫克 / 毫升）的溶液通过离子交换树脂，一般病毒被吸附在树脂上，而糖蛋白随着洗脱

液流出，从而去除和 / 或灭活病毒。所述溶液 pH5-10，较佳地为 pH6-8，如磷酸盐、醋酸盐或 Tris 缓冲液。可以使用本领域常规的离子交换树脂，例如但不限于，弱阴离子交换树脂，较佳地为 DEAE Sephadex。

[0056] 用本发明的方法去除和 / 或灭活的病毒是本领域所熟知的，例如但不限于，HIV、HAV、HBV、HCV、猪细小病毒。

[0057] 本发明提到的上述特征，或实施例提到的特征可以任意组合。本案说明书所揭示的所有特征可与任何组合物形式并用，说明书中所揭示的各个特征，可以任何可提供相同、均等或相似目的的替代性特征取代。因此除有特别说明，所揭示的特征仅为均等或相似特征的一般性例子。

[0058] 本发明的主要优点在于：

[0059] 1、本发明提供的方法安全、高效。

[0060] 2、本发明提供的方法条件温和，适合于工业化生产。

[0061] 下面将结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册 (NewYork：Cold Spring Harbor Laboratory Press，1989) 中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则所有的百分比和份数按重量计。

[0062] 除非另行定义，文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外，任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

[0063] 本发明实施例中所用的检测用病毒、检测用细胞系、病毒的制备及细胞毒性检测的方法如下：

[0064] 检测用病毒

[0065] 验证实验中所选用的指示病毒具有不同的理化特性，可用于分析制品的污染情况。

[0066] HIV-1 是一种反转录病毒（球型），属于反转录病毒科（直径 80-100nm）。这种慢病毒对热和极端 PH 敏感，在脂性溶剂和去污剂作用下破裂。可作为 HIV-2 的模型病毒。通过其在易感细胞中具有扩增和诱使合胞体形成的特性进行检测。

[0067] 伪狂犬病毒是一种脂包膜 DNA 病毒（球型），属于疱疹病毒科。这种病毒在低蛋白浓度下对热敏感，对极端 PH 和脂性溶剂敏感。可通过其在易感细胞中有扩增和致使细胞病变的特性进行检测。

[0068] 牛腹泻病毒是一种脂包膜 RNA 病毒（多球型），属于黄病毒科（直径 40-60nm）。这种感染性病毒相对不耐热，对有机溶剂敏感，在酸中不稳定而在碱中稳定。可作为 HCV 的模型病毒。通过其在易感细胞中有扩增和致使细胞病变的特性进行检测。

[0069] 猪细小病毒是一种非脂包膜 DNA 病毒（二十面体型），属于细小病毒科（直径 18-24nm）。这种细小病毒可耐受极端高热，在脂性溶剂中稳定，相对耐受酸性 PH。可作为细小病毒 B19 的模型病毒。通过其在易感细胞中有扩增和致使细胞病变的特性进行检测。

[0070] HAV 是一种非脂包膜病毒，属于细小核糖核酸病毒科（直径 27nm）。这种病毒具有相对热稳定性，可耐受有机溶剂和非离子性去污剂，在酸性 pH 条件下稳定。可通过其在易

感细胞中有扩增和致使细胞病变的特性进行检测。

[0071] 检测用细胞系

[0072] C8166(人，CO4+成人淋巴细胞)细胞在含青霉素(50iu/ml)，链霉素(50μg/ml)和10％胎牛血清，并补充有谷氨酸盐I(Glutamax I)的RPMI 1640培养基中培养。在病毒分析过程中，细胞同样维持在上述培养基中。

[0073] CRFK(猫，肾来源，Felis catus)细胞在含青霉素(50iu/ml)，链霉素(50μg/ml)，1％非必需氨基酸和10％胎牛血清，并补充有氨酸盐I(GlutamaxI)的EMEM培养基中培养。在病毒分析过程中，细胞同样维持在上述培养基中。

[0074] NBL-1(牛，肾脏来源，Bos taurus)细胞在含青霉素(50iu/ml)，链霉素(50μg/ml)和5％马血清，及补充有氨酸盐I(Glutamax I)的EMEM培养基中培养。在病毒分析过程中，细胞同样维持在上述培养基中。

[0075] ST(猪，睾丸来源)细胞在含青霉素(50iu/ml)，链霉素(50μg/ml)和10％胎牛血清，并补充有氨酸盐I(Glutamax I)的DMEM培养基中培养。在病毒分析过程中，细胞同样维持在上述培养基中，但胎牛血清浓度减至2％。

[0076] FRhK-4(恒河猴，肾脏来源，Macaca mulatta)细胞在含青霉素(50iu/ml)，链霉素(50μg/ml)和10％胎牛血清，并补充有谷氨酸盐I(Glutamax I)的DMEM培养基中培养。在病毒分析过程中，细胞维持在同样培养基中，但胎牛血清浓度减至2％。

[0077] 病毒的制备

[0078] HIV-1通过感染C8166细胞制备。细胞感染后，培养3—5天，收获上清液。

[0079] 伪狂犬病毒通过感染单层培养的CRFK细胞制备。细胞感染后，培养直至观察到明显的细胞病变现象。被感染的细胞在无菌条件下，冻融、裂解、离心，最后收获上清液。

[0080] 牛腹泻病毒通过感染单层培养的NBL-1细胞制备。细胞感染后，培养直至观察到明显的细胞病变现象。被感染的细胞在无菌条件下，冻融、裂解、离心，最后收获上清液。

[0081] 猪细小病毒通过感染单层培养的ST细胞制备。细胞感染后，培养直至观察到明显的细胞病变现象。被感染的细胞在无菌条件下，冻融、裂解、离心，最后收获上清液。

[0082] HAV通过感染单层培养的FRhK-4细胞制备。细胞感染后，培养直至观察到明显的细胞病变现象。被感染的细胞在无菌条件下，冻融裂解、离心，最后收获上清液。

[0083] HIV-1通过合胞体生成测定确定滴度。伪狂犬病毒、牛腹泻病毒、猪细小病毒均通过TCID50测定确定滴度。

[0084] 细胞毒性检测

[0085] 在病毒掺入前，先将样品处于维持培养基中，然后检测其对细胞系的毒性。检测用细胞系为C8166、CRFK、NBL-1、ST和FRhK-4细胞。

[0086] 用维持培养基将待测样品从1倍到243倍进行三倍比稀释。每一细胞系均有一阴性对照，对照只含维持培养基，而不含样品。对CRFK、NBL-1、ST和FRhK-4细胞系而言，在待测样品和阴性对照接种到检测细胞后，将在37℃，5％ CO2的湿润环境中培养大约90分钟；然后移走接种物，用磷酸缓冲液清洗细胞培养板，并在每个孔中加入维持培养基。对C8166细胞系而言，在待测样品和阴性对照接种到悬浮细胞中后，将在37℃，5％ CO2的湿润环境中培养。

[0087] 之后再将细胞在37℃，5％ CO2的湿润环境中培养适当时间。C8166细胞培养11

天；CRFK 细胞检测生产步骤 1 中样品时需培养 13 天，生产步骤 3 中样品需培养 8 天；NBL-1 细胞检测生产步骤 1 中样品时需培养 10 天，生产步骤 3 中样品需培养 8 天；ST 细胞需培养 8 天；FRhK-4 细胞检测生产步骤 2 中样品时需培养 18 天，生产步骤 3 中样品需培养 19 天。在此期间通过显微观察细胞病变现象。

[0088] 下述实施例中蛋白质生物效价或生物活性的测定方法按中国药典 2005 版尿激酶项下的酶活力检测方法以及附录 XII M、XII N、XII E 的方法检验。

[0089] 实施例 1

[0090] 在 1g HCG 粗制品（购自上海天伟生物制药有限公司）中加入 30ml、-20℃ ±2℃的无水乙醇，将其混匀制得一悬浊液（作为初始样品），并测量悬浊液的体积。将初始样品保持在 12℃ ±2℃，边搅拌边分别加入 HIV-1、伪狂犬病毒、牛腹泻病毒各 2ml，每种病毒均平行做 2 组 (A 和 B)。混匀之后，取 2ml 样品，感染细胞，测定初始加入病毒的量（此时作为时间零点）。将加入病毒后的溶液同样保持在 12℃ ±2℃，持续搅拌 3 小时。然后取样 2ml，感染细胞，测定病毒感染率。

[0091] 病毒灭活结果

[0092]

病毒	空白对照初始病毒加入量（sfu_{50}/ $TCID_{50}$ log_{10}）		病毒降低量（log_{10}）	
HIV-1	A：5.95	B：6.27	A：>5.17	B：>5.49
伪狂犬病毒	A：7.46	B：7.23	A：>6.88	B：>6.66
牛腹泻病毒	A：7.09	B：6.71	A：>6.89	B：>6.51

[0093] HCG 生物效价结果

[0094]

	HCG 总生物效价相对百分比
乙醇处理前	100%
乙醇处理后	97.1%

[0095] 结果表明，三种脂包膜病毒的降低量都在 10^5 以上，且 HCG 生物效价几乎没有损失，可以认为这一步骤对保证 HCG 生产安全、防止脂包膜病毒的污染起了十分重要的作用。

[0096] 实施例 2

[0097] 在 1g HMG 粗制品（上海天伟生物制药有限公司提供）中加入 30ml、-20℃ ±2℃的无水乙醇，将其混匀制得一悬浊液（作为初始样品），并测量悬浊液的体积。将初始样品保持在 12℃ ±2℃，边搅拌边分别加入 HIV-1、伪狂犬病毒、牛腹泻病毒各 2ml，每种病毒均平行做 2 组 (A 和 B)。混匀之后，取 2ml 样品，感染细胞，测定初始加入病毒的量（此时作为时间零点）。将加入病毒后的溶液同样保持在 12℃ ±2℃，持续搅拌 3 小时。然后取样 2ml，感染细胞，测定病毒感染率。

[0098] 病毒灭活结果

[0099]

病毒	空白对照初始病毒加入量（sfu_{50}/ $TCID_{50}$ log_{10}）		病毒降低量（log_{10}）	
HIV-1	A：6.04	B：6.26	A：>5.26	B：>5.48
伪狂犬病毒	A：7.28	B：7.21	A：>6.71	B：>6.64
牛腹泻病毒	A：6.91	B：7.26	A：>6.69	B：>7.05

[0100] HMG 生物效价结果

[0101]

	HMG 总生物效价相对百分比
乙醇处理前	100%
乙醇处理后	103.8%

[0102] 结果表明，三种脂包膜病毒的降低量都在 10^5 以上，且 HMG 生物效价几乎没有损失，可以认为这一步骤对保证 HMG 生产安全、防止脂包膜病毒的污染起了十分重要的作用。

[0103] 对照例

[0104] 在 1g 尿激酶粗制品（购自上海天伟生物制药有限公司）中加入 30ml、-20℃ ±2℃ 的无水乙醇，将其混匀制得一悬浊液，并测量悬浊液的体积。将样品保持在 12℃ ±2℃，，持续搅拌 3 小时。然后取样，测定尿激酶的活性变化情况。

[0105] 尿激酶活性测定结果

[0106]

	尿激酶总效价相对百分比
乙醇处理前	100%
乙醇处理后	17%

[0107] 结果表明，类似的乙醇处理方法对尿激酶等蛋白质有失活作用，不适用。

[0108] 实施例 3

[0109] 将 50ml pH7.8±0.1 的磷酸缓冲液冷却到 12 ℃ ±2 ℃，然后加入到 1g DEAESephadex A-50 中。将溶液在 12℃ ±2℃保持至少 15 小时以使树脂充分溶胀。将溶胀好的树脂悬浊液装在 XK16 柱中，使最终床层体积为 15ml。将蠕动泵的管中充满 pH7.0±0.1 的醋酸钠缓冲液，然后接在柱上。用上述缓冲液平衡至少 5 个柱体积 (75ml)，控制流速在 0.17-0.18ml/min。如果需要可在柱的流出口测定流速，调整泵速以控制流速。收集并测量流出液的 pH，直到确定其与进口缓冲液 pH 值相同。关闭蠕动泵和柱出口，直到上柱样品准备完毕。

[0110] 在 12℃ ±2℃ 20ml 平衡缓冲液（醋酸钠缓冲液，pH7.0±0.1）中，边搅拌边加入 600mg HCG 粗制品（上海天伟生物制药有限公司提供）。样品在 12℃ ±2℃持续搅拌适当时间，以确保 HCG 充分溶解。然后测量这一溶解样品的 PH 和电导，如果与平衡缓冲液不符，可用醋酸调节。测量初始样品的体积。将初始样品保持在 12℃ ±2℃，边搅拌边分别加入猪细小病毒、HAV 各 1ml，每种病毒均平行做 2 组。混匀后，取样 1ml，测定初始病毒加入量。

[0111] 将进口管没入样品液中，并使其充满液体，打开蠕动泵。加入病毒的样品以 0.17-0.18ml/min 的流速加在柱上。当前体积到 7ml 时，开始收集。当上样结束后，用平衡缓冲液洗柱，流速控制在 0.10-0.11ml/min。收集到 43ml 流出液时，作为收集液。取样 1ml，测定病毒感染率。

[0112] 病毒去除结果

[0113]

病毒	初始病毒加入量 ($TCID_{50}$ log_{10})		病毒降低量 (log_{10})	
猪细小病毒	A：6.91	B：7.50	A：>6.74	B：>7.33
HAV	A：6.69	B：6.31	A：3.28	B：2.90

[0114] 结果表明，对猪细小病毒而言，病毒降低量较好，大于 10^6。对 HAV 病毒而言，病毒降低量分别为 3.28 log10 和 2.90 log10。因此可以认为这一步骤对提高 HCG 生产安全、防止非脂包膜病毒的污染起了一定的作用。

[0115] 实施例 4

[0116] 除样品为 600mg HMG 粗制品（上海天伟生物制药有限公司提供）外，其它步骤与实施例 3 一致。

[0117] 病毒去除结果

[0118]

病毒	初始病毒加入量 ($TCID_{50}$ log_{10})		病毒降低量 (log_{10})	
猪细小病毒	A：7.40	B：7.24	A：4.84	B：>7.23
HAV	A：6.17	B：6.44	A：2.35	B：3.00

[0119] 结果表明，对猪细小病毒而言，病毒降低量较好，大于 10^4。对 HAV 病毒而言，病毒降低量分别为 2.35 log10 和 3.00 log10。因此可以认为这一步骤对提高 HMG 生产安全、防止非脂包膜病毒的污染起了一定的作用。

[0120] 对照例

[0121] 除平衡液为 pH4.5±0.1 的醋酸钠缓冲液之外，样品及步骤都与实施例 3 一致。

[0122] 病毒去除结果

[0123]

病毒	初始病毒加入量 ($TCID_{50}$ log_{10})		病毒降低量 (log_{10})	
猪细小病毒	A：6.25	B：7.02	A：0.21	B：1.37
HAV	A：6.98	B：6.19	A：0.55	B：0.91

[0124] 结果表明，对猪细小病毒和 HAV 而言，病毒降低量在 1 log10 左右或低于 1 log10，因此可以认为在 pH 为 4.5±0.1 的平衡液条件下，这一步骤对提高 HMG 生产安全、防止非脂包膜病毒的污染几乎没有贡献。

[0125] 实施例 5

[0126] 准备 Pall Ultipor VF DV20 滤器。用 20ml 无菌超纯水在最大压力 30psi 条件

下充分湿润滤器。在 20ml pH7.0±0.1 的醋酸铵溶液中，边搅拌边溶解 600mg HCG 粗制品（上海天伟生物制药有限公司提供），并测量样品的体积。在样品中边搅拌边分别加入每种病毒 1ml，每种病毒均平行做 2 组。混匀后，取样 1ml，测定初始病毒加入量。加入病毒后的样品经 0.2μm 的滤器过滤。取样 1ml，测定病毒感染率。剩余的样品在最高压力 30psi 条件下经已湿润的 PallVF DV20 滤器过滤。将滤过液收集在另一个容器中。在最高压力 30psi(2070mba) 条件下，用 5ml pH7.0±0.1 的醋酸铵缓冲液洗涤滤器。测量过滤液体积，并取样 1ml，测定病毒感染率。

[0127] 病毒去除结果

[0128]

病毒	加入滤器的病毒量（sfu_{50}/ $TCID_{50}$ log_{10}）		病毒降低量（log_{10}）	
HIV-1	A：4.91	B：4.76	A：>4.88	B：>4.73
伪狂犬病毒	A：5.78	B：5.64	A：>5.73	B：>5.61
牛腹泻病毒	A：5.74	B：5.67	A：>5.69	B：>5.63
猪细小病毒	A：7.03	B：6.66	A：6.04	B：5.55
HAV	A：5.77	B：6.29	A：>5.74	B：>6.26

[0129] 结果表明，5 种病毒的降低量都在 10^4 以上，可以认为这一步骤对保证 HCG 生产安全、防止脂包膜和非脂包膜病毒的污染起了十分重要的作用。

[0130] 实施例 6

[0131] 除样品为 400mg HMG 粗制品（上海天伟生物制药有限公司提供）外，其它步骤与实施例 5 一致。

[0132] 病毒去除结果

[0133]

病毒	加入滤器的病毒量（sfu_{50}/ $TCID_{50}$ log_{10}）		病毒降低量（log_{10}）	
HIV-1	A：5.18	B：4.99	A：>4.92	B：>4.73
伪狂犬病毒	A：6.02	B：5.47	A：>6.00	B：>5.46
牛腹泻病毒	A：5.70	B：5.47	A：>5.69	B：>5.46
猪细小病毒	A：6.61	B：6.85	A：4.38	B：4.61
HAV	A：6.51	B：6.39	A：>6.50	B：>6.36

[0134] 结果表明，5 种病毒的降低量都在 10^4 以上，可以认为这一步骤对保证 HCG 生产安全、防止脂包膜和非脂包膜病毒的污染起了十分重要的作用。

[0135] 实施例 7

[0136] HCG 冻干针剂的制备

[0137] 用于制造 10000 瓶 HCG 冻干针剂，且每瓶含 1000IU HCG 的生产的典型例子如下：

[0138] 经过如实施例 1、3、5 的三个步骤处理的 HCG 精品，但请注意此处的每个步骤都不加入额外的病毒，计算出的一定量（以生物效价为单位）然后溶解于 100mL 注射用无热原水中，如果需要的话，用 HCl 或 NaOH 调节 pH7.0±0.2，然后用 0.22μm 过滤器进行无菌过滤。

[0139] 将 300g 甘露醇和 10.9g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 溶解于 3L 注射用无热原水中，用 NaOH 调节 pH7.0±0.2，用 0.22μm 过滤器进行无菌过滤。然后加入到上述 HCG 溶液中，用注射用无热原水定容至 7.0L，混匀。

[0140] 将上述溶液分装入西林瓶中，每瓶 0.70mL，进行冷冻干燥。

[0141] 所得到的西林瓶中，每瓶含 1000IU HCG 和 30mg 甘露醇。

[0142] 实施例 8

[0143] HMG 冻干针剂的制备

[0144] 用于制造 10000 瓶 HMG 冻干针剂，且每瓶含 75IU FSH 和 75IU LH 的生产的典型例子如下：

[0145] 经过如实施例 2、6 的两个步骤处理的 HMG 精品，但请注意此处的每个步骤都不加入额外的病毒，计算出的一定量（以生物效价为单位）然后溶解于 100mL 注射用无热原水中，如果需要的话，用 HCl 或 NaOH 调节 pH6.5±0.2，然后用 0.22μm 过滤器进行无菌过滤。

[0146] 将 100g 乳糖溶解于 2L 注射用无热原水中，如果需要的话，用 HCl 或 NaOH 调节 pH6.5±0.2，用 0.22μm 过滤器进行无菌过滤。然后加入到上述 HMG 溶液中，用注射用无热原水定容至 7.5L，混匀。

[0147] 将上述溶液分装入西林瓶中，每瓶 0.75mL，进行冷冻干燥。

[0148] 所得到的西林瓶中，每瓶含 75IU FSH、75IU LH 和 10mg 乳糖。

[0149] 实施例 9

[0150] FSH 冻干针剂的制备

[0151] 用于制造 10000 瓶 FSH 冻干针剂，且每瓶含 75IU FSH 的生产的典型例子如下：

[0152] 经过如实施例 2、4、6 的两个步骤处理的 FSH 精品，但请注意此处的每个步骤都不加入额外的病毒，计算出的一定量（以生物效价为单位）的 FSH 精品溶解于 50mL 注射用无热原水中，如果需要的话，用 HCl 或 NaOH 调节 pH6.5±0.2，然后用 0.22μm 过滤器进行无菌过滤。

[0153] 将 100g 乳糖溶解于 2L 注射用无热原水中，如果需要的话，用 HCl 或 NaOH 调节 pH6.5±0.2，用 0.22μm 过滤器进行无菌过滤。然后加入到上述 FSH 溶液中，用注射用无热原水定容至 7.5L，混匀。

[0154] 将上述溶液分装入安瓿瓶中，每瓶 0.75mL，进行冷冻干燥。

[0155] 所得到的安瓿瓶中，每瓶含 75IU FSH 和 10mg 乳糖。

[0156] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并非用以限定本发明的实质技术内容范围，本发明的实质技术内容是广义地定义于申请的权利要求范围中，任何他人完成的技术实体或方法，若是与申请的权利要求范围所定义的完全相同，也或是一种等效的变更，均将被视为涵盖于该权利要求范围之中。