

附件：

## 治疗用卡介苗

Zhiliaoyong Kajiemiao

BCG for Therapeutic Use

本品系采用与预防结核病用卡介苗相同的菌种、生产工艺，将高浓度卡介苗经冷冻干燥制成的免疫治疗制剂。主要用于膀胱癌手术后的治疗及预防复发。

### 1. 基本要求

生产、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。

卡介苗生产车间必须与其他生物制品生产车间及实验室分开。所需设备及器具均须单独设置并专用。卡介苗制造、包装及保存过程均须避光。

从事卡介苗制造的工作人员及经常进入卡介苗制造室的人员，必须身体健康，经X射线检查无结核病，且每年经X射线检查1~2次，可疑者应暂离卡介苗的制造。

### 2. 制造

#### 2.1 菌种

生产用菌种应符合“生物制品生产检定用菌毒种管理规程”规定。

##### 2.1.1 名称及来源

采用卡介苗 D:PB302 菌株。严禁使用通过动物传代的菌种制造卡介苗。

##### 2.1.2 种子批的建立

应符合“生物制品生产检定用菌毒种管理规程”规定。

##### 2.1.3 种子批的传代

工作种子批启开至菌体收集传代应不超过12代。

##### 2.1.4 种子批的检定

###### 2.1.4.1 鉴别试验

###### (1) 培养特性

卡介苗在苏通培养基上生长良好，培养温度在37~39℃之间。抗酸染色应为阳性。在苏通马铃薯培养基上培养的卡介苗应是干皱成团略呈浅黄色。在牛胆汁马铃薯培养基上为浅

灰色黏膏状菌苔。在鸡蛋培养基上有突起的皱型和扩散型两类菌落，且带浅黄色。在苏通培养基上卡介菌应浮于表面，为多皱、微带黄色的菌膜。

## (2) 多重 PCR 法

采用多重 PCR 法检测卡介菌基因组特异性的缺失区 RD1, 应无 RD1 序列存在, 供试品 PCR 扩增产物大小应与参考品一致。

多重 PCR 鉴别试验: 采用 ET1 (5'-AAGCGTTGCCGCCGACCGACC-3')、ET2 (5'-CTGGCTATATTCCTGGGCCCGG-3')、ET3 (5'-GAGGCGATCTGGCGGTTTGGGG-3') 三条引物, 分别以灭菌超纯水稀释至终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ 。DNA 分子量标记物为 50bp DNA ladder。

取适宜浓度的供试品 1ml 移入 1.5ml EP 管中, 12 000r/min, 离心 5 分钟, 弃上清, 留 40~50  $\mu\text{l}$  液体重悬供试品沉淀物, 沸水浴 10 分钟, 8000r/min 离心 5 分钟, 取上清作为多重 PCR 检测模板。

取供试品 PCR 检测模板 5  $\mu\text{l}$ , 加至 45  $\mu\text{l}$  反应试剂中[10 倍 PCR 缓冲液(pH8.3 100mmol/L Tris-HCl, 500mmol/L KCl, 15mmol/L MgCl) 5  $\mu\text{l}$ 、dNTP Mixture 2  $\mu\text{l}$ 、5 U/ $\mu\text{l}$  Taq DNA 聚合酶 0.3  $\mu\text{l}$ 、引物 ET1 2  $\mu\text{l}$ 、引物 ET2 4  $\mu\text{l}$ 、引物 ET3 2  $\mu\text{l}$ 、灭菌超纯水 29.7  $\mu\text{l}$ ], 共 50  $\mu\text{l}$  反应体系。检测参考品同法操作。每个供试品平行做 2 管。

反应体系于 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 分钟, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 1 分钟、64 $^{\circ}\text{C}$  退火 1 分钟、72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 秒, 循环 30 次后, 72 $^{\circ}\text{C}$  再延伸 7 分钟。取 PCR 产物 10  $\mu\text{l}$  加 6 倍 loading buffer [配方为: ①吸取 2ml EDTA (500mmol/L pH 8.0) 加入约 40ml 双蒸水; ②称量 250mg 溴酚蓝; ③量取加入 50ml 丙三醇; ④定容至 100ml, 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。] 2  $\mu\text{l}$  混匀后上样于 3% 的琼脂糖凝胶泳道, 50bp DNA ladder 直接上样 6  $\mu\text{l}$ 。于 100mA 电泳 50 分钟。以 50bp DNA ladder 为分子量标记, 观察供试品与参考品 PCR 扩增片段分子量大小。

### 2.1.4.2 纯菌检查

按通则 1101 的方法进行, 生长物做涂片镜检, 不得有杂菌。

### 2.1.4.3 毒力试验

用结核菌素纯蛋白衍生物皮肤试验 (皮内注射 0.2ml, 含 10IU) 阴性、体重 300~400g 的同性豚鼠 4 只, 各腹腔注射 1ml 菌液 (5mg/ml), 每周称体重, 观察 5 周动物体重不应减轻; 同时解剖检查, 大网膜上可出现脓疱, 肠系膜淋巴结及脾可能肿大, 肝及其他脏器应无肉眼可见的病变。

### 2.1.4.4 无有毒分枝杆菌试验

用结核菌素纯蛋白衍生物皮肤试验 (皮内注射 0.2ml, 含 10IU) 阴性、体重 300~400g

---

的同性豚鼠 6 只，于股内侧皮下各注射 1ml 菌液（10mg/ml），注射前称体重，注射后每周观察 1 次注射部位及局部淋巴结的变化，每 2 周称体重 1 次，豚鼠体重不应降低。6 周时解剖 3 只豚鼠，满 3 个月时解剖另 3 只，检查各脏器应无肉眼可见的结核病变。若有可疑病灶时，应做涂片和组织切片检查，并将部分病灶磨碎，加少量生理氯化钠溶液混匀后，由皮下注射 2 只豚鼠，若证实系结核病变，该菌种即应废弃。当试验未满 3 个月时，豚鼠死亡则应解剖检查，若有可疑病灶，即按上述方法进行，若证实系结核病变，该菌种即应废弃。若证实属非特异性死亡，且豚鼠死亡 1 只以上时应复试。

#### 2.1.5 种子批的保存

种子批应冻干保存于 8℃ 以下。

#### 2.2. 原液

##### 2.2.1 生产用种子

启开工作种子批菌种，在 L-J 培养基、苏通马铃薯培养基、液体苏通培养基上每传 1 次为 1 代。在马铃薯培养基培养的菌种置冰箱 2~8℃ 保存，不得超过 2 个月。

##### 2.2.2 生产用培养基

工作种子批首次复苏可用 L-J 培养基，生产用培养基为苏通马铃薯培养基、液体苏通培养基或批准的其他培养基。

##### 2.2.3 接种与培养

挑取生长良好的菌膜，移种于改良苏通综合培养基或经批准的其他培养基的表面，置 37~39℃ 静止培养。

##### 2.2.4 收获和合并

培养结束后，应逐瓶检查，若有污染、湿膜、浑浊等情况应废弃。收集菌膜压干，移入盛有不锈钢珠瓶内，钢珠与菌体的比例应根据研磨机转速控制在一适宜的范围，并尽可能在低温下研磨。加入适量无致敏原稳定剂稀释，制成原液。

##### 2.2.5 原液检定

按 3.1 项进行。

#### 2.3 半成品

##### 2.3.1 配制

用稳定剂将原液浓度调整至适宜浓度，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“生物制品分批规程”规定。

### 2.4.2 分装与冻干

应符合“生物制品分装和冻干规程”规定。分装过程中应使半成品混合均匀，分装后应立即冻干，冻干后应立即封口。

### 2.4.3 规格

每瓶含卡介菌 60mg，每 1mg 卡介菌含活菌数应不低于  $1.0 \times 10^6$  CFU。

### 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 纯菌检查

按通则 1101 的方法进行，生长物做涂片镜检，不得有杂菌。

#### 3.1.2 浓度测定

用以分光光度法测定浓度，应为标示量的  $\pm 20\%$ 。

### 3.2 半成品检定

#### 3.2.1 纯菌检查

按通则 1101 的方法进行，生长物做涂片镜检，不得有杂菌。

#### 3.2.2 浓度测定

以分光光度法测定浓度，应为标示量的  $\pm 20\%$ 。

### 3.3 成品检定

除装量差异、水分测定、活菌数测定、热稳定性试验和抑瘤试验外，按每瓶加入 1ml 注射用水，复溶后进行其余各项检定。

#### 3.3.1 鉴别试验

##### 3.3.1.1 抗酸染色法

抗酸染色涂片检查，细菌形态与特性应符合卡介菌特征。

##### 3.3.1.2 多重 PCR 法

按 2.1.4.1 项进行，采用多重 PCR 法检测卡介菌基因组特异的缺失区 RD1，应无 RD1 序列存在，供试品扩增产物大小应与检测参考品一致。

### 3.3.2 物理检查

#### 3.3.2.1 外观

应为淡黄色或浅黄色疏松体或粉末状，按标示量加入注射用水，应在3分钟内复溶呈均匀悬液。

#### 3.3.2.2 装量差异

依法检查（通则1102），应符合规定。

#### 3.3.3 水分

应不高于3.0%（通则0832）。

#### 3.3.4 纯菌检查

按3.3.1项进行。

#### 3.3.5 活菌数测定

每亚批疫苗均应做活菌数测定。活菌数应不低于 $1.0 \times 10^6$ CFU/mg。本试验可与热稳定性试验同时进行。

#### 3.3.6 热稳定性试验

取每亚批疫苗于37℃放置28天测定活菌数，并与2~8℃保存的同批疫苗进行比较，计算活菌率；放置37℃的本品活菌数应不低于置2~8℃本品的25%，且不低于 $2.5 \times 10^5$ CFU/mg。

#### 3.3.7 毒性试验

用18~20g昆明小白鼠5只，每只腹腔注射0.5ml菌液（30mg），观察1周，到期称总体重，不得较试验前减轻或死亡。

#### 3.3.8 无有毒分枝杆菌试验

用结核菌素纯蛋白衍生物皮肤试验（皮内注射0.2ml，含10IU）阴性、体重300~400g的同性健康豚鼠6只，每只皮下注射1ml供试品（10mg/ml），注射前称体重，每2周称体重一次，观察6周，动物体重不应减轻；同时解剖检查每只动物，若肝、脾、肺等脏器无结核病变，即为合格。若动物死亡或有可疑病灶时，应按2.1.4.3项进行。

#### 3.3.9 抑瘤试验（H22实体瘤）

以H22肿瘤细胞悬液和供试品悬液同体积混合配制试验组用样品，皮下移植到雌性Balb/C小鼠（6周~8周）体内，对照组仅移植H22肿瘤细胞悬液。移植3周后测定实体肿瘤的重量，计算肿瘤生长抑制率（%）{（对照组实体肿瘤的重量-试验组实体肿瘤的重量）/对照组实体肿瘤的重量 × 100}。肿瘤生长抑制率应不低于75%，并且试验组与对照组的肿瘤重量差异有显著意义。

---

### 3.3.10 浓度测定

用分光光度法测定浓度，应为标示量的±20%。

### 4. 稀释剂

稀释剂为生理氯化钠溶液。应符合本版药典（二部）的相关规定

### 5. 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。

### 6. 使用说明

应符合“生物制品包装规程”规定和批准的内容。

---

起草单位：中国食品药品检定研究院  
复核单位：四川省食品药品检验检测院

联系电话：010-53851775