

国家药品监督管理局

国家药品标准修订件

受理号：

批件号：SGB2020-001

药品名称	通用名称：注射用红色诺卡氏菌细胞壁骨架 汉语拼音：Zhusheyong Hongse Nuokashijun Xibaobi Gujia 英文/拉丁名：Nocardia Rubra Cell Wall Skeleton for Injection		
剂型	注射剂	规格	200 μg/瓶
标准依据	2010年版《中国药典》第三增补本		
修订内容与结论	根据《药品管理法》及其有关规定，经审查，修订注射用红色诺卡氏菌细胞壁骨架标准。		
实施规定	本标准自颁布之日起6个月内，生产企业按原标准生产的药品仍按原标准检验，按本标准生产的药品应按本标准检验。自本标准实施之日起，生产企业必须按照本标准生产该药品，并按照本标准检验，原标准同时停止使用。		
标准编号	WS ₄ -(S-001)-2010-2020		
实施日期	2021年06月11日		
附件	注射用红色诺卡氏菌细胞壁骨架标准		
主送	福建省山河药业有限公司		
抄送	各省、自治区、直辖市（食品）药品检验院（所），中国人民解放军联勤保障部队药品仪器监督检验总站，中国食品药品检定研究院，国家药典委员会，国家药品监督管理局药品审评中心，国家药品监督管理局药品审核查验中心，国家药品监督管理局药品评价中心，国品药品监督管理局信息中心，国家药品监督管理局药品注册管理司，国家药品监督管理局药品监督管理司。		
备注	请各省、自治区、直辖市（食品）药品监督管理局及时通知辖区内有关药品生产企业，自实施之日起执行修订后的国家药品标准。		



国家药品监督管理局

国家药品标准

WS₄-(S-001)-2010-2020

注射用红色诺卡氏菌细胞壁骨架

Zhusheyong Hongse Nuokashijun Xibaobi Gujia

Nocardia Rubra Cell Wall Skeleton for Injection

本品系用红色诺卡氏菌经发酵、破碎、提取获得细胞壁骨架(N-CWS),加入适量乳化剂后冻干制成,主要含该细胞壁的组分霉菌酸、阿拉伯半乳聚糖和黏肽等。不含防腐剂和抗生素。

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 菌种

生产用菌种应符合“生物制品生产检定用菌毒种管理及质量控制”的有关规定。

2.1.1 名称及来源

采用红色诺卡氏菌 PO-8 株。

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及质量控制”的有关规定。

2.1.3 种子批的传代

主种子批启开后传代次数不得超过 5 代。工作种子批启开后至生产,传代不超过 5 代。

2.1.4 种子批检定

主种子批和工作种子批的菌种应进行以下各项检定。

2.1.4.1 生长特性

在营养琼脂培养基上生长良好,菌落为橙红色至红色。马铃薯块上生长良好,菌落小,隆起,不整齐,橙红色至红色。在营养肉汤培养基中培养 7 天,液面边缘有菌环,橙红色至红色,液体应澄清,有颗粒状菌落沉淀。

2.1.4.2 生化反应

淀粉水解试验呈阴性,明胶液化试验呈阴性。

2.1.5 菌种保存

主种子批菌种应冻干保存于 8℃ 以下或 20% 甘油中低温保存于 -20℃ 以下。

2.2 原粉

2.2.1 生产用种子

将检定合格的工作种子批菌种在葡萄糖-酵母浸粉培养基中于 26~30℃ 振荡培养不超过 48 小时。涂片镜检，无污染杂菌者方可用于接种。

2.2.2 生产用培养基

葡萄糖-酵母浸粉培养基。

2.2.3 培养

在灭菌培养基中接种适量种子液，振荡通气培养，培养物于对数生长期后期收获，在培养结束后涂片镜检，如发现污染杂菌，应废弃。

2.2.4 收获

收集培养液，离心收获湿菌体。

2.2.5 破壁及粗提

2.2.5.1 湿菌体加灭菌纯化水，采用超声波或其他经批准的适宜方法破碎菌体。

2.2.5.2 分别加胰蛋白酶-糜蛋白酶和链霉蛋白酶水解 16~24 小时，离心，获细胞壁粗提物。

2.2.6 提取

以乙醇、乙醚、三氯甲烷、甲醇单独或混合分步提取。

2.2.7 干燥研磨

溶媒提取后的细胞壁骨架于 60℃ 减压干燥，研磨，获得的 N-CWS 原粉置 -20℃ 以下 (-30℃ ~ -20℃) 干燥保存，有效期为 24 个月。

2.2.8 原粉检定

按 3.1 项进行。

2.3 半成品

2.3.1 配制

检定合格的 N-CWS 原粉，加入角鲨烯、甘露醇、聚山梨酯 80 和注射用水乳化成均匀的白色混悬液，经除菌过滤后供灌装。根据所测阿拉伯糖含量，使每瓶含 N-CWS 200 μg。

2.3.2 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 分装及冻干

应符合“生物制品分包装及贮运管理”及通则 0102 有关规定。

2.4.3 规格

每瓶含 N-CWS 200 μ g。

2.4.4 包装

应符合“生物制品分包装及贮运管理”及通则 0102 有关规定。

3. 检定

3.1 原粉检定

3.1.1 外观

应为类白色粉末，不溶于水与有机溶剂。

3.1.2 定性检定

取本品适量，按 3.3.1 项进行。

3.1.3 干燥失重

取本品 50mg，在 105°C 干燥至恒重，减失重量应不高于 5%（通则 0831）。

3.1.4 微生物限度

依法检查（通则 1105 与通则 1107），应符合规定。

3.2 半成品检定

无菌检查

依法检查（通则 1101），应符合规定。

3.3 成品检定

3.3.1 鉴别试验

3.3.1.1 细胞壁糖

取本品 1 瓶，加水 1.0ml，溶解后吸取 0.5ml 于试管中，滴加 0.05% 蒽酮硫酸溶液 1.0ml，摇匀即呈黄绿色至蓝绿色。

3.3.1.2 细胞壁内消旋二氨基庚二酸

取二氨基庚二酸、丙氨酸适量，分别加入 50%乙醇配制成 0.05mg/ml 二氨基庚二酸对照品溶液和 0.1mg/ml 丙氨酸对照品溶液。取本品 5 瓶，混合，加 6mol/L 的盐酸溶液 0.5ml，密封，在蒸汽灭菌器中 120°C 水解 3~6 小时，水解液蒸干，残渣加 50%乙醇 1ml 使溶解，作为供试品溶液。

照薄层色谱法（通则 0502）取丙氨酸对照品溶液和供试品溶液各 2 μ l，以正丁醇-冰醋酸-水（8:3:1）为展开剂，取二氨基庚二酸对照品溶液和供试品溶液各 5 μ l，以十二烷基硫酸钠-正丁醇-正己烷-水

(6: 25: 6: 20)为展开剂, 分别点样于硅胶 G 薄层板上, 展开, 取出, 晾干, 喷以茚三酮试液, 在 105℃ 加热至斑点显色清晰。供试品溶液所显主斑点的位置和颜色应与对照品溶液主斑点一致。

3.3.2 物理检查

3.3.2.1 外观

为白色疏松体。复溶后应成白色均匀的混悬液。

3.3.2.2 复溶时间

加入注射用水后, 复溶时间应不超过 1 分钟。

3.3.2.3 可见异物

依法检查 (通则 0904), 应符合规定。

3.3.2.4 装量差异

依法检查 (通则 0102), 应符合规定。

3.3.3 化学检定

3.3.3.1 pH 值

应为 5.0~7.0 (通则 0631)。

3.3.3.2 水分

应不高于 3.0% (通则 0832)。

3.3.3.3 甲醇及三氯甲烷残留量测定

精密称取甲醇 1g、三氯甲烷 0.1g, 同置于 5ml 容量瓶中, 用 N, N-二甲基甲酰胺稀释至刻度, 再加适量水制成每 1ml 中约含甲醇 20 μ g、三氯甲烷 2 μ g 的混合溶液, 精密量取混合液 3.0ml 置 10ml 顶空瓶中作为对照品溶液。取本品 10 瓶, 分别精密加入 3.0ml 水使溶解, 混合, 摇匀, 精密量取 3.0ml 置 10ml 顶空瓶中作为供试品溶液。照残留溶剂测定法 (通则 0861), 以 6%氰丙基苯基-94%二甲基聚硅氧烷为固定液 (或极性相近) 的毛细管柱为色谱柱, 起始温度为 40℃, 维持 11 分钟, 再以每分钟 25℃ 的速率升温至 180℃, 维持 6 分钟, 进样口温度 180℃, 检测器温度 220℃, 顶空瓶平衡温度为 70℃, 平衡时间为 30 分钟。取对照品和供试品溶液气液平衡后的液上气体 500 μ l, 分别注入气相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算, 甲醇残留量应不高于 0.2%, 三氯甲烷残留量应不高于 0.003%。

3.3.3.4 聚山梨酯 80 含量测定

取本品 10 瓶, 分别加入适量水, 溶解并稀释至 100ml, 精密量取 1.0ml, 按聚山梨酯 80 残留量测定法 (通则 3203) 进行测定, 每瓶含聚山梨酯 80 应小于 1mg。

3.3.4 无菌检查

依法检查 (通则 1101), 应符合规定。

3.3.5 异常毒性检查

依法检查（通则 1141），应符合规定。

3.3.6 细胞壁骨架（N-CWS）含量测定

细胞壁骨架（N-CWS）由霉菌酸、阿拉伯半乳糖和黏肽等成分组成，其中含 33%阿拉伯糖，本检测是通过测定阿拉伯糖含量推算 N-CWS 含量。

精密称取在 60℃减压干燥 1 小时的阿拉伯糖和半乳糖(用于排除干扰)适量，分别加水制成 20mg/ml 的溶液。精密量取阿拉伯糖溶液 2.5ml 和半乳糖溶液 1.2ml，置 10ml 容量瓶中，加水至刻度，摇匀，制成 5mg/ml 阿拉伯糖的对照品溶液。再精密吸取对照品溶液适量，加水稀释成 40μg/ml、60μg/ml、80μg/ml、100μg/ml 及 120μg/ml 的阿拉伯糖系列溶液。以水做空白，精密量取上述系列溶液和水各 2.0ml，置具塞试管中，在冰水浴中，分别缓慢滴加 2%蒽酮乙酸乙酯溶液 0.5ml，浓硫酸 4.0ml，小心摇匀，于 80℃水浴保温 30 分钟，立即用流水冲冷至室温，按紫外-可见分光光度法（通则 0401）于 625nm 波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标，以阿拉伯糖浓度为横坐标，绘制标准曲线。

取供试品 10 瓶，分别精密加入 1.0ml 水，混合，摇匀，作为供试品溶液。以水为空白，精密量取供试品溶液 2.0ml，同法于 625nm 波长处测定吸光度，代入标准曲线。计算供试品溶液中阿拉伯糖含量，阿拉伯糖含量应为 66~104μg/瓶，折算成 N-CWS 含量应不低于 200μg/瓶。

3.3.7 抑瘤试验

将 S₁₈₀ 腹水瘤细胞与本品混合均匀，皮下接种于实验小鼠，2 周后解剖动物，称瘤重，计算抑瘤率应不低于 50%。

取体重为 18~20gBALB/c 小鼠 20 只，试验组及对照组各 10 只，抽取 S₁₈₀ 腹水瘤，计数后稀释成 2×10⁷ 个细胞/ml，将 N-CWS 溶于生理氯化钠溶液，制成 2000 μg/ml。取 1.0ml 瘤细胞与 1.0ml N-CWS 液混合均匀，做为试验组样品。同时取 1.0ml 生理氯化钠溶液与 1.0ml 瘤细胞混合作为对照组注射用。分别对小鼠皮下注射，每只 0.2ml(200 μg N-CWS/只)，接种后 14 天解剖动物，取瘤并称重，按下式计算抑瘤率。

$$\text{治疗组抑瘤率 (\%)} = \frac{\text{对照组平均瘤重} - \text{试验组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100$$

4. 保存、运输及有效期

于阴凉处避光保存和运输。自生产之日起，有效期为 24 个月。

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。