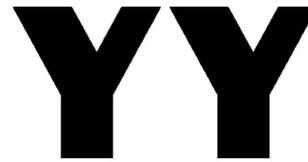


ICS 11.040.30  
CCS C 30



# 中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1849—2022

## 重组胶原蛋白

Recombinant collagen protein

2022-01-13 发布

2022-08-01 实施

国家药品监督管理局 发布

## 目 次

前言 .....	I
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 质量控制 .....	2
4.1 通则 .....	2
4.2 制备工艺的质量控制 .....	2
4.3 重组胶原蛋白的质量控制 .....	2
5 检测项目、要求和检测方法 .....	2
5.1 通则 .....	2
5.2 理化项目 .....	3
5.3 鉴别 .....	4
5.4 纯度 .....	4
5.5 杂质、污染物和添加剂 .....	5
5.6 含量 .....	6
5.7 结构表征 .....	6
5.8 生物学功能 .....	7
5.9 安全性试验 .....	8
6 稳定性 .....	9
7 生物学评价 .....	9
8 包装、运输和贮存 .....	9
附录 A (资料性) 重组胶原蛋白特性分析 .....	10
附录 B (规范性) 细胞黏附性测定——离心法 .....	12
附录 C (规范性) 细胞移行试验——细胞划痕法 .....	14
参考文献 .....	15

## 前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由中国食品药品检定研究院归口。

本文件起草单位：中国食品药品检定研究院、四川省药品检验研究院（四川省医疗器械检测中心）、山东省医疗器械和药品包装检验研究院、北京大学口腔医学院口腔医疗器械检验中心、陕西巨子生物技术有限公司、山西锦波生物医药股份有限公司、江苏创健医疗科技有限公司、江苏江山聚源生物技术有限公司。

本文件主要起草人：陈亮、刘兴兰、侯丽、韩建民、徐丽明、段志广、李海航、王建、赵健烽、赵代国、王鸾鸾、王觉晓、范行良、吴洋、蒋若丹、兰婉玲、盖潇潇、严建亚、孙丹丹、田旭栋、黄建民。



# 重组胶原蛋白

## 1 范围

本文件规定了重组胶原蛋白的质量控制要求、检测指标及其检测方法等。

本文件适用于作为医疗器械原材料的重组胶原蛋白的质量控制。

注：鉴于目前的技术研发现状，本文件中的重组胶原蛋白主要指基于人的胶原蛋白基因重组的产物。基于非人胶原蛋白基因的重组胶原蛋白或类胶原蛋白产物可参考本文件，但需要根据具体的产品特性和生产工艺进行质量控制。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 16886.1 医疗器械生物学评价 第1部分：风险管理过程中的评价与试验

GB/T 16886.20 医疗器械生物学评价 第20部分：医疗器械免疫毒理学试验原则和方法

GB 18278.1 医疗保健产品灭菌 湿热 第1部分：医疗器械灭菌过程的开发、确认和常规控制要求

GB 18279.1 医疗保健产品灭菌 环氧乙烷 第1部分：医疗器械灭菌过程的开发、确认和常规控制的要求

GB 18280.1 医疗保健产品灭菌 辐射 第1部分：医疗器械灭菌过程的开发、确认和常规控制要求

YY/T 1453 组织工程医疗器械产品 I型胶原蛋白表征方法

YY/T 1465(所有部分) 医疗器械免疫原性评价方法

YY/T 1805.2 组织工程医疗器械产品 胶原蛋白 第2部分：I型胶原蛋白分子量检测 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳法

YY/T 1805.3 组织工程医疗器械产品 胶原蛋白 第3部分：基于特征多肽测定的胶原蛋白含量检测 液相色谱-质谱法

中华人民共和国药典

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**胶原蛋白 collagen**

**胶原**

一类含有至少20种在遗传学上不同类型的分泌蛋白质家族，主要担任机体的结构支撑功能，具有独特的由三条多肽链（被称为 $\alpha$ 链）组成的三螺旋构型，并具有一定的生物学功能。

## 3.2

### 重组胶原蛋白 recombinant collagen protein

采用重组 DNA 技术,对编码所需人胶原蛋白的基因进行遗传操作和(或)修饰,利用质粒或病毒载体将目的基因带入适当的宿主细胞(细菌、酵母或其他真核细胞等)中,表达并翻译成胶原蛋白(3.1)或类似胶原蛋白(3.1)的多肽,经过提取和纯化等步骤制备而成。

## 4 质量控制

### 4.1 通则

由于重组基因片段的型别与序列的不同,表达体系的差异,致使获得的产物不尽相同,与天然胶原蛋白相比,氨基酸组成、分子量大小和(或)结构可能差异很大,甚至是个全新的蛋白质。因此,宜对其进行全面的特性分析(见附录 A),进行严格的质量控制。

重组胶原蛋白的质量控制与分子量大小、结构特性、质量属性复杂程度以及生产工艺相关。质量控制体系主要包括原辅料质量控制、生产工艺和过程控制及最终成品的检测等。应通过成品检测、过程控制和工艺验证相结合的方法,确保各类杂质已去除或降低至可接受水平。

### 4.2 制备工艺的质量控制

重组胶原蛋白属于一种重组蛋白,应参照《中华人民共和国药典》“人用重组 DNA 蛋白质总论”中“制造”的所有要求,包括:基本要求、工程细胞(细菌、酵母或其他真核细胞等)的控制(表达载体和宿主细胞、细胞库系统、细胞库的质量控制、细胞基质的遗传稳定性)、生产过程的控制(细胞培养、提取和纯化、原液、半成品和成品)和生产工艺变更要求,建立质量控制体系。不适用条款或事项需给出合理的说明。

### 4.3 重组胶原蛋白的质量控制

重组胶原蛋白成品的质量控制包括采用参比品和经验证的方法评估已知和(或)潜在的成品相关物质和工艺相关物质,以及采用适宜的方法对成品鉴别、生物学功能、纯度和杂质等进行检测和分析。

选择已证明足够稳定且适合临床试验的一个(多个)批次,或用一个代表批次作为参比品,用于鉴别、理化和生物学功能等各种分析。根据重组 DNA 蛋白质特性,应对参比品做全面深入的表征/特性分析。参比品的建立和制备应参照《中华人民共和国药典》“生物制品国家标准物质制备和标定”的相关要求。

用于理化测定等方面的参比品,如用于肽图或等电点测定的参比品,可用原液直接分装制备,一般-70℃以下或经验证的贮存条件下保存。根据重组 DNA 蛋白质特性,参比品应进行必要的分析鉴定,包括:蛋白质含量、等电点、纯度、N 端氨基酸序列、分子量、肽图、指纹肽图谱库、二硫键分析及糖基分析(酵母或其他真核细胞表达)等。

## 5 检测项目、要求和检测方法

### 5.1 通则

收获液经提取、纯化分装于中间贮存容器中即为原液。原液的检验项目取决于工艺的验证、一致性的确认和预期成品相关杂质与工艺相关杂质的水平。应采取适当方法对原液质量进行检测,必要时应与参比品进行比较。经工艺验证后,可由一批或多批原液合并生产半成品,制成成品前,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,包括检测项目和可接受标准。

根据具体重组胶原蛋白成品的特性确定需要进行的特性分析检测项目。建立或验证重组胶原蛋白生产过程的有效性或可接受性的特性分析检测项目可不纳入常规质量控制中,但应对某一特定质量属性是否放入常规放行标准予以说明。常规质量控制的检测项目包括如下几个方面。

## 5.2 理化项目

### 5.2.1 外观(如性状、颜色)

肉眼直接观测,供试品应为白色/淡黄色/无色透明液体或凝胶,或白色/类白色冻干粉或海绵状固体。

### 5.2.2 可见异物

适用时,按照《中华人民共和国药典》“可见异物检查法”的“灯检法”进行检测,供试品应无明显异物。

### 5.2.3 溶解性

应根据供试品的溶解特性,对供试品在水、稀酸或中性盐溶液中的溶解程度进行表征和阐述。

### 5.2.4 水分

取供试品约 1 g~2 g,按照《中华人民共和国药典》“水分测定法”第二法(烘干法)测定,或取供试品约 10 mg 按照《中华人民共和国药典》“热分析法”热重法(TG)测定,升温程序:从室温以 10 °C/min 速率升温至 105 °C,保持 60 min。减失重量应符合所标示范围。规定仲裁方法为水分测定法。

### 5.2.5 炽灼残渣

按照《中华人民共和国药典》“炽灼残渣检查法”测定,供试品应符合所标示范围。

### 5.2.6 pH 值

用 0.9%氯化钠溶液将供试品制成 1 mg/mL 的溶液,若使用其他溶剂溶解应明确说明使用溶剂及浓度,按照《中华人民共和国药典》“pH 值测定法”测定,应符合所标示范围。

### 5.2.7 渗透压摩尔浓度

如适用,用 0.9%氯化钠溶液将供试品制成 1 mg/mL 的溶液或根据临床预期使用,将供试品配制成相应溶液,按照《中华人民共和国药典》“渗透压摩尔浓度测定法”测定,应符合所标示范围。

### 5.2.8 动力黏度

取供试品按照《中华人民共和国药典》“黏度测定法”的“旋转黏度计测定法”测定,需要详细描述试验条件,动力黏度值应符合所标示范围。

注:对于重组胶原蛋白凝胶,宜测定动力黏度。

### 5.2.9 热稳定性

5.2.9.1 采用差示扫描量热法(DSC)进行解聚温度分析。按照《中华人民共和国药典》“热分析法”进行。初始温度 20 °C,以 2 °C/min 速度升温至 200 °C,记录热分析曲线。根据供试品的通常贮存性状(如冻干粉等)和预期使用性状进行相同或相似样品条件下的差示扫描量热分析。

注:水不溶性重组胶原蛋白的热稳定性测定宜采用差示扫描量热法(DSC)进行。

5.2.9.2 将供试品原液,或重组胶原蛋白冻干粉或海绵加水制成 10 mg/mL 的溶液,置(57±0.5)°C 水

浴中保温 4 h 后,用可见异物检查装置,肉眼观察应无凝胶化或絮状物。

#### 5.2.10 装量及其差异

按照《中华人民共和国药典》“最低装量检查法”,根据供试品性状(溶液、凝胶、冻干海绵或冻干粉末等)和装量的不同确定装量的允差要求。

### 5.3 鉴别

#### 5.3.1 肽图

5.3.1.1 按照《中华人民共和国药典》“肽图检查法”的第一法“胰蛋白酶裂解-反相高效液相色谱法”进行测定,应与参比品肽图一致,主要特征肽段相对比例(响应强度)应与参比品基本一致。

注:如胰蛋白酶不能水解,选择适宜的其他蛋白酶。

5.3.1.2 按照《中华人民共和国药典》“质谱法”进行测定,采用适宜的质谱技术对各色谱峰对应的肽段进行定性,序列覆盖率应符合所标示范围。

注:如胰蛋白酶不能水解,选择适宜的其他蛋白酶。

#### 5.3.2 末端氨基酸序列

用氨基酸序列分析仪或质谱法测定 N 端和/或 C 端氨基酸序列,其结果应符合理论预测(每年应至少做一次)。

#### 5.3.3 分子量

5.3.3.1 按照 YY/T 1805.2 规定的方法条件进行试验,分子量应符合标示要求。

5.3.3.2 按照《中华人民共和国药典》“高效液相色谱法”进行分子量分析时,出峰保留时间应与定性参比品(经过飞行时间质谱鉴定过的重组胶原蛋白)保持一致。

5.3.3.3 按照《中华人民共和国药典》“质谱法”进行测定,其分子量应与理论分子量一致。

#### 5.3.4 等电点

按照《中华人民共和国药典》“电泳法”的“等电聚焦电泳法”或“毛细管电泳法”测定,其等电点应在标示范围内。

### 5.4 纯度

#### 5.4.1 电泳法

按照《中华人民共和国药典》“电泳法”的非还原型“SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法”测定,分离胶的胶浓度为 15%,供试品加水制成浓度为 1 mg/mL~2 mg/mL 的溶液,点样量 10  $\mu$ L,考马斯亮蓝 R250 染色,经扫描仪扫描,纯度应符合标示要求。

#### 5.4.2 高效液相色谱法

按照《中华人民共和国药典》“色谱法”的“分子排阻色谱法”测定,按面积归一化法计算纯度,其结果应符合标示要求。

注 1: 适用时,可采用反相高效液相色谱法。

注 2: 适用时,可采用样品图谱与参比品一致,或主峰保留时间与参比品主峰保留时间一致进行判断。

## 5.5 杂质、污染物和添加剂

### 5.5.1 总则

按照《中华人民共和国药典》“人用重组 DNA 蛋白制品总论”对“纯度和杂质”的要求,工艺相关杂质的质量控制(如蛋白质 A、宿主细胞蛋白质、DNA、其他潜在的培养或纯化残留物等)通常在原液阶段进行。如经充分验证证明生产工艺对工艺相关杂质的去除已达到高水平时,工艺相关杂质的质量控制可在恰当工艺步骤的中间产物进行,可不列入放行检测中。杂质检测项目可能涉及,但不限于如下项目。

### 5.5.2 外源性 DNA 残留量

按照《中华人民共和国药典》“外源性 DNA 残留量测定法”的“荧光染色法”或“定量 PCR 法”进行测定,“荧光染色法”的样品加标回收率应满足 70%~130%;“定量 PCR 法”的样品加标回收率应满足 50%~150%,应规定残留限量。如果样品中外源性 DNA 残留量低于“荧光染色法”的检测限,则应采用“定量 PCR 法”进行测定。

注 1: 宜根据预期临床用途(作为植入物体内使用,还是作为敷料等体表、黏膜使用)、使用量等,确定含重组胶原蛋白的产品临床最大使用量的外源性 DNA 残留量限值。如果含重组胶原蛋白的产品预期为体内植入剂,推荐参考生物制品外源性 DNA 残留限量要求,结合残留 DNA 宿主类型及其风险程度设定每人每次最大使用量限值。

注 2: 生物制品中大肠杆菌或酵母菌表达的基因工程重组产品外源性 DNA 残留量,如:注射用人生长激素 $\leq 1.5$  ng/mg,或注射用人干扰素 $\leq 10$  ng/剂;CHO 细胞表达的基因工程重组产品(如人促红素)外源性 DNA 残留量 $\leq 100$  pg/剂(10 000 IU);重组乙型肝炎疫苗(CHO 细胞) $\leq 10$  pg/剂。

### 5.5.3 大肠杆菌蛋白质残留量

按照《中华人民共和国药典》“大肠埃希菌菌体蛋白质残留量测定法”或采用经验证的酶联免疫试剂盒进行测定,其结果应在总蛋白的 0.05%以下(体内植入),或 0.1%以下(外用)。

### 5.5.4 酵母蛋白质残留量

按照《中华人民共和国药典》“酵母工程菌菌体蛋白质残留量测定法”或采用经验证的酶联免疫试剂盒进行测定,其结果应在总蛋白的 0.05%以下(体内植入),或 0.1%以下(外用)。

### 5.5.5 CHO 细胞蛋白质残留量

采用经验证的酶联免疫试剂盒进行测定,CHO 细胞蛋白质残留量应在总蛋白的 0.05%以下(体内植入),或 0.1%以下(外用)。

### 5.5.6 残余抗生素含量/活性

应根据工艺中采用的表达体系和使用的抗生素类型,采用经验证的方法测定残余抗生素含量/活性,并根据风险分析规定可接受的限量要求。不应有残余抗生素活性。

残余抗生素活性按照《中华人民共和国药典》“抗生素残留量检查法(培养法)”进行试验。

残余抗生素含量可按照《中华人民共和国药典》“免疫化学法”的“酶联免疫吸附法”进行试验。其中,氨苄西林残留量也可采用高效液相色谱-质谱法。推荐液相色谱条件可采用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,流动相 A 为水(甲酸 0.1%),流动相 B 为乙腈(甲酸 0.1%)梯度洗脱;质谱采用电喷雾电离离子源(ESI)为离子源。

注: 根据风险分析规定可接受的限量要求。如疫苗抗生素残留规定 $\leq 50$  ng/剂。

### 5.5.7 促炎性污染物(肽聚糖等)

采用经验证的方法或经验证的市售细菌肽聚糖检测试剂盒(ELISA)检测残留肽聚糖,应根据其致热反应风险规定可接受的限量要求。

### 5.5.8 重金属及微量元素含量

5.5.8.1 对工艺中添加的重金属元素,应按照《中华人民共和国药典》“原子吸收分光光度法”,或“电感耦合等离子体质谱法”进行测定,其结果应符合标示的限量要求。

5.5.8.2 残留重金属总量按照《中华人民共和国药典》“重金属检查法”检测,重金属总量(以Pb计)应 $\leq 10 \mu\text{g/g}$ (质量分数)。

5.5.8.3 残留金属元素按照《中华人民共和国药典》“原子吸收分光光度法”“电感耦合等离子体质谱法”或相当的方法进行测定(应进行方法学确认和验证),其结果应符合限量要求:砷(As) $\leq 1 \mu\text{g/g}$ ,汞(Hg) $\leq 4 \mu\text{g/g}$ ,铅(Pb) $\leq 15 \mu\text{g/g}$ ,铬(Cr)、镉(Cd) $\leq 50 \mu\text{g/g}$ (质量分数)。预期植入用的重组胶原蛋白成品中铜(Cu)、钼(Mo)、铁(Fe)、镍(Ni)均 $\leq 50 \mu\text{g/g}$ (质量分数)。

### 5.5.9 添加剂

如果使用了防腐剂、冻干保护剂等添加剂,应给出其限量要求和检测方法。

## 5.6 含量

5.6.1 重组胶原蛋白含量用总蛋白含量和纯度计算。总蛋白含量的测定按照《中华人民共和国药典》“蛋白质含量测定法”的“凯氏定氮法”进行测定,纯度按5.4进行检测。含量结果应在标示量的90%~110%。

注:关于凯氏定氮法计算蛋白含量时的系数,需要根据理论氨基酸序列和异质性状态的测算和验证予以确定。

如果是液体或凝胶状样品,以重组胶原蛋白含量除以样品总体积,即可得到相对于单位体积样品中重组胶原蛋白的相对含量数据,标示为 $\text{mg/mL}$ ;如果为固体样品或冻干品,以重组胶原蛋白含量除以总质量,即可得到单位质量样品中重组胶原蛋白的相对含量数据,标示为 $\text{mg/mg}$ 。

5.6.2 特征多肽法:用高效液相色谱-质谱法进行特异性特征多肽的定量检测,得到重组胶原蛋白特征多肽含量。基于特异性特征多肽的高效液相色谱-质谱方法按照YY/T 1805.3的规定进行。

## 5.7 结构表征

### 5.7.1 异质性分析

如适用,应充分表征重组胶原蛋白的各种异质性(如脱酰胺化、氧化、异构化、碎片化、二硫键错配、N-连接和O-连接的寡糖、糖基化、聚集等)。可使用高分辨率色谱质谱技术(如:LCMS-QTOF)对样品适宜的蛋白质酶(如:胰蛋白酶)酶解产物进行肽图指纹图谱分析,通过将天冬酰胺脱酰胺化和甲硫氨酸氧化修饰设置为可变修饰,分析多见的脱酰胺化和氧化异质性。应通过适合的理化方法分析高级结构,并通过生物学功能进行确证,也可采用体外或体内证实其发挥功能或作用的分析方法,作为高级结构确证的补充。

### 5.7.2 一级结构的表征

应采用氨基酸序列分析仪或质谱法进行氨基酸序列分析。其结果应符合理论序列。

### 5.7.3 红外光谱

每种重组胶原蛋白都有其特征的红外光谱,供试品的红外光谱图应与参比品一致。光谱图应规定

非特征区(如:酰胺 A、B)和特征区(如:酰胺 I、酰胺 II、酰胺 III)的特征峰位置。

#### 5.7.4 圆二色(CD)光谱

胶原的 CD 谱图在 195 nm 附近的波长处有负峰,在 221 nm 附近的波长处有正峰。如果检测不到在 221 nm 附近处的正峰,则提示没有三螺旋结构。如果定性检测证实供试品中有三螺旋结构,则可利用不同比例的系列胶原蛋白对照品和其完全变性的胶原蛋白对照品混合物作为外标法对照品,与在 221 nm 附近波长处的正峰强度进行拟合,实现三螺旋含量的相对定量分析。推荐使用组织提取胶原蛋白国家医药标准物质作为对照品。

#### 5.7.5 微量差热分析(DSC)

胶原蛋白的三螺旋结构的特征表现出特定的吸收峰,如组织提取牛 I 型胶原蛋白在(43±1)℃有吸收峰,如果检测不到特征峰则提示供试品中没有三螺旋结构。如果定性检测已证实供试品含有三螺旋结构,则可利用不同比例的系列胶原蛋白对照品和其完全变性的胶原蛋白对照品混合物作为外标法对照品,对三螺旋含量进行相对定量分析。推荐使用组织提取胶原蛋白国家医药标准物质作为对照品。

#### 5.7.6 蛋白酶敏感性分析

如适用,可用胰蛋白酶、胃蛋白酶或其他蛋白酶敏感性试验,提示有无三螺旋结构,及检测没有螺旋结构的单链含量,间接获得三螺旋结构的含量比。通过加热变性处理和非加热变性处理样品的蛋白酶酶解产物中特征多肽含量的比较分析,如果二者特征多肽检测的响应强度(谱峰高度或面积)一致,则提示无三螺旋结构;如果加热变性处理后样品的响应强度明显高于非加热变性处理样品,则提示可能含有三螺旋结构。

如果重组胶原蛋白中存在三螺旋结构,应选择 2 种或 2 种以上方法进行充分的表征和确证。推荐使用组织提取胶原蛋白对照品进行对比分析。

#### 5.7.7 脯氨酸羟基化分析

如适用,应进行脯氨酸羟基化分析,按照 YY/T 1453 规定的方法,使用氨基酸分析仪定量检测羟脯氨酸含量,其结果应符合标示值。

#### 5.7.8 糖谱/糖基化修饰分析

如适用,应进行糖谱/糖基化修饰分析,参照《中华人民共和国药典》“单抗 N 糖谱测定法”进行测定,供试品测定结果应在规定的范围内。必要时应将供试品与参比品进行比较。

### 5.8 生物学功能

#### 5.8.1 通则

重组胶原蛋白的生物学功能是指以重组胶原蛋白生物学特性相关属性为基础的生物学作用,对声称的生物学功能宜进行定性/定量分析。

胶原是细胞外基质的主要成分。重组胶原蛋白的主要生物学功能是为细胞提供支架和良好的微环境,如促进细胞黏附、增殖生长、分化等。因此,可通过评价细胞-胶原蛋白相互作用来评价重组胶原蛋白的生物学功能。

注 1: 在生物学性能评价试验中,如果重组胶原蛋白是溶于酸性溶液中形成 pH 值呈酸性的黏稠状液体,需对其可溶性和 pH 值进行调节,在不影响重组胶原蛋白结构与功能特性的前提下,采用适宜的方式制备供试样品。

注 2: 如果产品以非无菌的方式提供,可将样品除菌后用于细胞试验,宜考虑除菌方式对重组胶原蛋白生物学功能的影响。

### 5.8.2 细胞增殖

用重组胶原蛋白包被细胞培养板或其他经验证的方法,采用合适的预期临床应用时可能接触的细胞(如皮肤成纤维细胞),接种密度在 50%左右,常规培养 2 天~3 天后检测细胞增殖情况,考察重组胶原蛋白包被梯度浓度的剂量-效应关系。具体检测方法可采用 MTT 法、CCK8 法等进行检测(按照试剂盒的操作说明进行),采用无重组胶原蛋白包被的细胞培养板作为对照,分析细胞增殖率。

如需要,可采用组织提取胶原蛋白国家标准品作为对照材料,对比分析重组胶原蛋白的促细胞增殖作用。

### 5.8.3 细胞分化

用重组胶原蛋白包被细胞培养板或其他经验证的方法,采用合适的预期临床应用时可能接触的细胞(如皮肤成纤维细胞),接种密度在 90%左右,常规培养 3 天~7 天后检测细胞分化情况。具体方法可采用 RT-PCR 方法测定细胞的分化标志物(如:α-SMA、Vimentin、Fibroblast surface antigen),采用无重组胶原蛋白包被的细胞培养板作为对照,分析细胞分化情况。

如需要,可采用组织提取胶原蛋白国家标准品作为对照材料,对比分析重组胶原蛋白的促细胞分化作用。

### 5.8.4 细胞黏附性

细胞贴壁情况可通过细胞贴壁率试验简单地评价细胞黏附性。但是,细胞黏附性还包括细胞黏附强度(相对细胞黏附百分比),按照附录 B 或其他经验证的方法进行。

如需要,可采用组织提取胶原蛋白国家标准品作为对照材料,对比分析重组胶原蛋白的细胞黏附作用。

### 5.8.5 细胞的迁移或移行

重组胶原蛋白用于组织修复与重建时,应有利于细胞的识别、移行,细胞移行试验按照附录 C 或其他经验证的方法进行。

如需要,可采用组织提取胶原蛋白国家标准品作为对照材料,对比分析重组胶原蛋白的细胞的识别、移行作用。

## 5.9 安全性试验

### 5.9.1 概述

应根据所采用的表达体系(细菌、酵母或其他真核细胞等)而定,检测指标包括,但不限于如下几项。

注:在生物学性能评价试验中,如果重组胶原蛋白是溶于酸性溶液中形成 pH 值呈酸性的黏稠状液体,需对其可溶性和 pH 值进行调节,在不影响重组胶原蛋白结构与功能特性的前提下,采用适宜的方式制备供试样品。

### 5.9.2 无菌

如果重组胶原蛋白成品以无菌的方式提供,则应按照 GB 18278.1、GB 18279.1、GB 18280.1 对灭菌过程进行确认和常规控制。按照《中华人民共和国药典》“无菌检查法”进行无菌检测,结果应无菌。

### 5.9.3 细菌内毒素

按照《中华人民共和国药典》“细菌内毒素检查法”规定的方法测定,应符合标示的规定限值。

注 1:医疗器械产品的细菌内毒素限量要求与其与人体的接触方式等因素有关,宜考虑这些因素来规定作为原材料的重组胶原蛋白的细菌内毒素限值。

注2:《中华人民共和国药典》规定,对注射剂,人每千克体重每小时最大可接受的内毒素剂量为5 EU。

#### 5.9.4 微生物限度

如果重组胶原蛋白成品以非无菌的方式提供,每1 g、1 mL或10 cm<sup>2</sup>供试品中需氧菌总数不得超过10<sup>2</sup> CFU,霉菌和酵母菌菌落数不得超过10 CFU,不得检出大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌。

检测方法:用0.9%无菌氯化钠溶液或pH 7.2 无菌磷酸盐缓冲液制备供试品溶液。按照《中华人民共和国药典》“非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法”“非无菌产品微生物限度检查:控制菌检查法”规定的方法进行检测。

## 6 稳定性

重组胶原蛋白稳定性受多种因素影响,包括纯化工艺、微生物负载、包装贮存条件等。重组胶原蛋白的稳定性变化,如降解,可能会直接影响预期用于医疗器械产品的安全性和有效性,因此,应对其稳定性进行动态评价和分析。

与稳定性相关的工艺验证宜采用连续三批次重组胶原蛋白进行。在相关工艺条件无变化时,每年宜进行至少一个批次产品的稳定性检验。在工艺条件有变化时,应考虑对重组胶原蛋白稳定性的影响,必要时进行再次验证。

## 7 生物学评价

作为制备医疗器械产品的原材料,应按照GB/T 16886.1的要求对重组胶原蛋白进行相应必要的生物学评价。

基于部分人胶原蛋白核酸序列进行编辑组合而重组的蛋白质产物,可能引起人体预测不到的免疫原性,特别是长期反复使用时。因此,如果不能排除免疫原性风险,则宜增加免疫学研究。试验方法应按照GB/T 16886.20及YY/T 1465系列标准的要求进行。

如果产品以非无菌的方式提供,可将样品灭菌后用于生物学评价试验,宜考虑灭菌方式及灭菌对重组胶原蛋白的影响。

注:在生物学性能评价试验中,如果重组胶原蛋白是溶于酸性溶液中形成pH值呈酸性的黏稠状液体,需对其可溶性和pH值进行调节,在不影响重组胶原蛋白结构与功能特性的前提下,采用适宜的方式制备供试样品。

## 8 包装、运输和贮存

8.1 若生产商作为本单位研发医疗器械产品的初始材料(原材料)时,应按照医疗器械生产中对原材料管理的质量体系进行包装、贮存、运输相关管理。

8.2 若生产商作为医疗器械研发的原材料销售时,应提供必要的信息,在品名和来源的信息中应至少包括:表达体系、DNA模板种属及其胶原蛋白类型、氨基酸长度和编辑情况,如:(aa X—aa Y)<sub>n</sub>(重复次数),并建议考虑相关医疗器械产品对原材料包装、贮存、运输的要求。

附 录 A  
(资料性)  
重组胶原蛋白特性分析

### A.1 概述

研发阶段对重组胶原蛋白的理化特性、生物学功能/作用、免疫学特性、纯度和杂质等进行严格的特性分析鉴定是建立并确定产品质量标准的基础。需采用广泛的分析技术来表征其理化性质(如:分子量、等电点、氨基酸组成、疏水性等),以及对糖基化等各种翻译后修饰进行充分鉴定,并纳入适当的检测,以确认终产物具有预期的构象、聚集和(或)降解状态及其高级结构。

### A.2 理化特性

#### A.2.1 一级结构

包括二硫键(氢键)连接方式的氨基酸序列。宜测定目标产品的氨基酸序列,并与其基因序列推断的理论氨基酸序列进行比较。

注:可能需要采用综合的方法来测定氨基酸序列。

氨基酸序列测定还宜考虑可能存在的 N 端甲硫氨酸(如大肠杆菌来源的制品),信号肽或前导序列和其他可能的 N 端、C 端修饰(如乙酰化、酰胺化或者由于外源酶导致的部分降解以及 C 端加工、N 端焦谷氨酸等),以及各种其他异质性(如脱酰胺化、氧化、异构化、碎片化、二硫键错配、N-连接和 O-连接的寡糖、糖基化、聚集等)。

#### A.2.2 糖基化修饰

如有(如酵母菌发酵工艺或其他真核细胞表达体系制备的产品),则宜对糖基化修饰进行全面的分析和确定,如糖基化修饰与产品半衰期和生物学作用相关,则宜确定糖的含量(如中性糖、氨基糖和唾液酸)。糖型结构可能与不良反应相关(如非人类的糖型结构或其残基),宜尽可能对糖链的结构、糖型以及多肽链的糖基化位点进行深入分析。必要时应进一步就电荷异质性进行检测分析。

#### A.2.3 高级结构

如有,则宜通过适合的理化方法分析高级结构,并且通过生物学功能或作用来确认。生物学功能或作用是对高级结构的确证,也可采用体外或体内证实其发挥功能或作用的分析方法,作为高级结构确证的补充。

### A.3 纯度、杂质和污染物

**A.3.1 概述:**重组胶原蛋白的杂质主要包括自身相关杂质、工艺相关杂质以及外源污染物。宜尽可能地对杂质进行分析鉴定,并采用适宜的方法评价其对生物学功能的影响。

**A.3.2 自身相关物质/杂质:**主要源于重组胶原蛋白的异质性和降解产物。需要对目标重组胶原蛋白的各种分子变体进行分离、鉴别和分析。如变异体的功能与目标产物一致时可不做杂质考虑。但宜考虑在生产和/或贮存期间产品降解产物是否显著增加及其与免疫原性的相关性。

**A.3.3 工艺相关杂质:**包括来源于生产工艺本身,如细胞基质来源、细胞培养来源和下游工艺。宜对潜在的工艺相关杂质(如宿主细胞蛋白质、宿主细胞 DNA、细胞培养残留物、下游工艺的残留物等)进行鉴别、评估,并进行定性和/或定量分析。

**A.3.4 污染物:**指所有引入的,且并非生产过程所需的物质(如各种微生物、细菌内毒素)。此外,还宜考虑采用其他适宜检测方法对可能污染的包括肽聚糖等在内的非细菌内毒素促炎性污染物进行控制。

#### **A.4 生物学功能**

评价重组胶原蛋白实现预期的生物学功能的特定能力、潜力,如胶原蛋白-细胞相互作用。同时也宜关注可能引起的负效应。

基于部分人胶原蛋白核酸序列进行编辑组合而重组的蛋白质产物,作为一种完整的蛋白质物质属于非人体内存在的全新蛋白质,需要进行详尽的结构分析和生物学功能(正向、负向)分析。

#### **A.5 免疫化学特性**

天然胶原蛋白有一定的糖基化,酵母发酵技术制备的胶原蛋白产物可能有轻度的糖基化。糖基化可能影响产品的生物学功能和免疫原性,宜进行适当的特性研究。必要时宜对目标分子中与相应表位作用的部分进行分析确证,包括对这些结构的生物化学鉴别(如蛋白质、低聚糖、糖蛋白、糖脂)和相关适合的特征研究(如氨基酸序列和糖型)。

基于部分人胶原蛋白核酸序列进行编辑组合而重组的蛋白质产物,不仅可能影响产品的生物学功能,也可能引起预测不到的免疫原性,特别是长期反复使用时,因此,宜进行免疫化学特性分析和充分的免疫原性评价。

#### **A.6 含量**

胶原蛋白含量以质量/质量(质量分数)或质量/体积(质量浓度)表示。进行目标蛋白质含量检测时宜除外宿主蛋白质残留等杂蛋白。可通过高效液相色谱法(HPLC)或绝对定量的方法,如:利用合成的能够代表拟测定的重组胶原蛋白产物的特征多肽标准品外标法,采用高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)技术进行胶原蛋白含量测定,并可用于鉴别、溯源和验证。

#### **A.7 参比品**

宜选择已证明足够稳定或用一个代表性批次作为参比品,用于鉴别、理化和生物学活性等各种分析,并按特性分析要求进行全面分析鉴定。

用于理化测定等方面的对照品,如用于肽图或等电点测定的对照品,可用原液直接分装制备,一般-70℃以下或经验证的贮存条件下保存。根据重组DNA蛋白制品特性,对照品宜进行必要的分析鉴定,包括:蛋白质含量、比活性、等电点、纯度、N端氨基酸序列、质谱分子量、液质肽图、指纹肽图谱库、二硫键分析及糖基分析(酵母或其他真核细胞表达)等。

**附录 B**  
(规范性)  
**细胞黏附性测定——离心法**

**B.1 试验原理**

为研究材料与细胞的黏附作用大小,可通过离心法定量测定胶原蛋白与细胞形成黏附后分离所需的力。将细胞悬液在涂有胶原蛋白的培养皿中培养一定时间,用荧光标记细胞,在最佳相对离心力(RCF)洗脱未黏附的细胞,测定离心前后细胞分离百分比,评价待测重组胶原蛋白样品的相对促细胞黏附性。试验原理示例图见图 B.1。

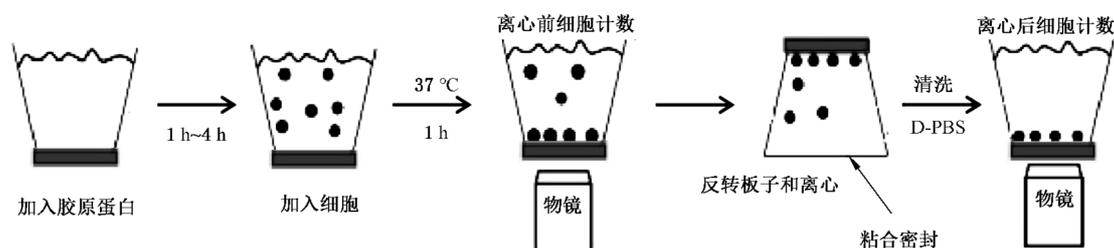


图 B.1 细胞黏附性测定——离心法试验原理示例图

**B.2 器具、试剂及耗材**

试验使用的器具、试剂和耗材如下:

- a) 试验细胞:如 NIH/3T3 细胞(ATCC CRL-1658 小鼠胚胎成纤维细胞);
- b) 阴性 D-PBS 溶液;
- c) 对照材料:胶原蛋白国家标准品;
- d) D-PBS 溶液、DMEM 细胞培养液、Hoechst 33342 荧光染色液、BSA-PBS 溶液;
- e) 细胞培养板(96 孔,平底)、封口膜(醋酸密封带或等效材料)、铝箔。

**B.3 试验步骤与方法****B.3.1 涂层制备**

向 96 孔板内分别加入 100  $\mu\text{L}$  标准品溶液、供试品、D-PBS 空白对照。每个样品包被制备 4 个孔,在 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 1 h~4 h。从孔中除去多余的包被溶液,加入 100  $\mu\text{L}$  1% BSA-PBS 溶液,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 1 h。移除孔内液体后,用 D-PBS 洗涤三次,弃除清洗液,用封口膜密封后置于 4  $^{\circ}\text{C}$  备用。

注:宜根据重组胶原蛋白样品的特性,pH 等考察包被条件,确认最大包被效率。

**B.3.2 细胞制备**

将 NIH/3T3 细胞于 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养,每天在倒置显微镜下观察细胞密度及状态。当细胞生长至培养瓶的 80%~90%时,进行细胞传代或细胞接种。使用已经与 Hoechst 33342 荧光染色剂(10%)预混合的完全培养基,将细胞稀释至  $5 \times 10^4 / \text{mL}$ 。将 100  $\mu\text{L}$  细胞加入孔中,用铝箔覆盖,并在 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  下孵育 1 h。测量 3 个重复样品,第 4 个孔用来调整显微镜参数,不使用其测量值。

### B.3.3 检测

确定最佳相对离心力(RCF),使胶原蛋白国家标准品的相对细胞黏附性比值宜为 50%~60%。使用倒置显微镜捕获 3 个孔中每个孔的荧光平铺图像。每个孔用 D-PBS 填充以形成“反向弯月面”,吹扫气泡并用封口膜覆盖。以最佳相对离心力在 22 ℃下离心(倒置放置)5 min。离心后,弃去封口膜,从孔中取出上清液。用 D-PBS 清洗 1 次后,加入 100 μL D-PBS。对于 3 个孔中的每个孔进行拍摄。计算每个样品大约 2 400 个~3 600 个细胞[(800 细胞/孔~1 200 细胞/孔)×3 孔]。

注:推荐最佳相对离心力为 350 *g*,若采用其他相对离心力,对其进行论证。

### B.4 结果计算

使用自动细胞计数程序来计数荧光标记的细胞核数目,测定离心前后的细胞数。按式(B.1)计算黏附百分比:

$$V = \frac{N_t}{N_c} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (B.1)$$

式中:

$V$  ——黏附百分比;

$N_t$  ——离心后细胞数;

$N_c$  ——离心前细胞数。

相对细胞黏附性比值按式(B.2)计算:

$$P = \frac{V_1}{V_2} \quad \dots\dots\dots (B.2)$$

式中:

$P$  ——相对细胞黏附性比值;

$V_1$  ——胶原蛋白样品各复孔的黏附百分比平均值;

$V_2$  ——阴性对照各复孔的黏附百分比平均值。

## 附录 C

(规范性)

## 细胞移行试验——细胞划痕法

## C.1 试验原理

细胞划痕法是测定细胞迁移运动的简洁方法,在体外培养皿或平板培养的单层贴壁细胞上,用微量枪头或其他硬物在细胞生长的中央区域划线,去除中央部分的细胞,然后继续培养细胞至试验设定的时间(例如 24 h),观察周边细胞是否迁移至中央划痕区,以此判断细胞的生长迁移能力。试验通常需设定对照组和供试品组,对照组包括对照材料组和空白对照组。通过不同组之间的细胞向划痕区移行的比较,判断供试品组细胞的迁移能力。

## C.2 器具、试剂及耗材

试验使用的器具、试剂和耗材如下:

- a) 细胞培养孔板、记号(marker)笔、直尺、10  $\mu$ L 枪头;
- b) 无血清培养基、磷酸盐缓冲液(PBS)、如:NIH/3T3 细胞或 HaCaT 细胞(人正常皮肤永生角质形成细胞);
- c) 供试样品:包括名称、性状、浓度或质量、纯度、保质期等信息;
- d) 对照材料:可选择适当的组织提取胶原蛋白国家医药标准物质作为对照材料,如:牛 I 型胶原蛋白对照品;
- e) 所有使用的器具均需要灭菌,直尺和 marker 笔在使用前需要紫外灯照射 30 min(超净台内)。

## C.3 试验步骤和方法

## C.3.1 细胞培养

先用 marker 笔在 6 孔板背后每孔横向和纵向各三等份划线做记号。按每孔约  $(5\sim 15)\times 10^5$  个播种细胞。具体播种数量可根据细胞不同而调整,目标为培养 24 h 后能达到 95%~100%汇合状态。

每组 3 个重复孔。

## C.3.2 划痕试验

用 marker 笔比着直尺在孔板底部画 3 条横线,细胞培养 24 h 后用 10  $\mu$ L 枪头比着直尺垂直对准孔板(也可用划痕专用细胞培养皿),向下轻推纵向划线形成划痕,用 PBS 漂洗细胞 3 次,去除划掉的细胞,分别在样品组和参照材料组加入 2 mL 无血清培养基配制的供试品和对照材料,终浓度推荐为 0.5 mg/mL。空白对照组只加入无血清培养基。

在 37  $^{\circ}$ C, 5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养,于 0 h、24 h 后,以横向和纵向划线的交点为核心,在 40 倍显微镜下拍照,每孔获得 9 个部位的照片,每组合计 27 个数据。

注 1: 供试品终浓度可根据其预期使用浓度确定。

注 2: 检测时间点宜通过试验确定。

## C.3.3 数据处理

测量划痕区面积,并通过固定划痕区移行细胞的总面积除以固定划痕区初始面积,计算每组细胞迁移率。

参 考 文 献

- [1] 刘斌.巴氏毕赤酵母基因工程菌高密度发酵表达重组人源胶原蛋白[D].南京:南京理工大学,2012.
- [2] ASTM F3089—2014 Standard Guide for Characterization and Standardization of Polymerizable Collagen-Based Products and Associated Collagen-Cell Interaction
- [3] ASTM F 2212—2019 Standard Guide for Characterization of Type I Collagen as Starting Material for Surgical Implants and Substrates for Tissue Engineered Medical Products (TEMPs)
- [4] Petibois, C; Gouspillou, G; Wehbe, K; et al. Analysis of type I and IV collagens by FT-IR spectroscopy and imaging for a molecular investigation of skeletal muscle connective tissue[J]. Anal Bioanal Chem, 2006, 386(7-8):1961-6.
-

中华人民共和国医药  
行业标准  
重组胶原蛋白

YY/T 1849—2022

\*

中国标准出版社出版发行  
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)  
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址: [www.spc.org.cn](http://www.spc.org.cn)

服务热线: 400-168-0010

2022年1月第一版

\*

书号: 155066·2-36322

版权专有 侵权必究



YY/T 1849-2022



码上扫一扫 正版服务到