ICS 11.040.40
CCS 45

YY

中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1561—XXXX
代替 YY/T 1561-2017

组织工程医疗器械产品 动物源性支架材料残留α-Gal抗原检测

Tissue engineering medical device products - remnant α-Gal antigen determination in scaffold materials utilizing animal tissues and their derivatives

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

（征求意见稿）

（本草案完成时间：2023年9月）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

国家药品监督管理局　　发布

目　　次

前言 II
引言 III
1　范围 1
2　规范性引用文件 1
3　术语和定义 1
4　试剂和仪器 1
5　试验步骤 2
6　抗原含量的计算 3
7　试验可接受准则 4
8　试验报告 4
参考文献 5

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。

本文件代替YY/T 1561-2017《组织工程医疗器械产品 动物源性支架材料残留α-Gal抗原检测》，与YY/T 1561-2017相比，除编辑性改动外，主要技术变化如下：

——修改前言中“国家食品药品监督管理总局”为“国家药品监督管理局”（见PII,2017版PII）；

——引言增加：“动物体内试验评价免疫原性风险的描述”（见PIII,2017版PII）；

——4.2 f）修改“匀浆仪”为 “低温研磨仪”（见P2,2017版P2）；

——5.1.1 修改样品的处理过程（见P2,2017版P2）；

——5.3.2 增加“（每份样品设2个复孔）”（见P3,2017版P3）；

——6.1 增加“使用2个复孔吸光度的平均数值”（见P3,2017版P3）；

——6.2 增加“或者将浓度（X）作合适数据处理后，再作直线拟合”（见P3,2017版P3）。

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这些专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国外科植入物和矫形器械标准化技术委员会组织工程医疗器械产品分技术委员会（SAC/TC110/SC3）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

引　言

动物源性生物材料及含动物源性生物材料的医疗器械或异种器官中残留的抗原是该类生物材料及器官移植中超急性免疫排斥反应及慢性免疫毒性的主要因素。尽管动物源性生物材料在制备过程中经过了脱细胞和去除抗原的处理，但残留的异种抗原仍存在着导致慢性免疫毒性反应的风险。

已有研究显示α-半乳糖基抗原(α1,3galactosyle, Alpha1,3Gal 或α-Gal)是引起动物源性生物材料或异种器官移植时超急性免疫排斥反应的主要靶抗原。α-Gal的结构为Galα1-3 Galβ1-4 GlcNAc-R，该抗原是半乳糖基与细胞膜上的蛋白或脂结合构成的一组完全性抗原。α-Gal主要受α-1,3半乳糖基转移酶(α1,3-galactosyltransferase,α-GT)及异红细胞糖苷酯合成酶（isoglobotriosylceramide synthase或isogloboside 3 synthase, iGb3S)调控。由于人体及类人猿、古世纪猴的半乳糖苷转移酶基因有2个碱基错位变异而不表达α-Gal抗原。但人肠道菌群持续表达α-Gal抗原，这种刺激致使人体免疫系统持续产生抗α-Gal抗体，达到循环免疫球蛋白的1～3%。因此，当人体接受含有α-Gal抗原的生物材料或异种器官移植时会引起超急性免疫排斥反应及慢性的免疫毒性反应。动物源性生物材料或异种器官移植中α-Gal抗原的去除成为降低免疫排斥反应和慢性免疫毒性反应的关键之一。目前，尚无动物源性生物材料中残留α-Gal抗原的定量检测方法。本标准通过使用α-Gal抗原特异性单克隆抗体M86，以人工合成的Gal-BSA抗原与Gal抗原阴性基质混合作为参照品建立标准曲线，通过竞争性ELISA抑制方法定量检测动物源性生物材料中残留的α-Gal抗原。同时，试验体系中加入了Gal抗原阳性和阴性参考品，使试验的灵敏性和特异性得以监控。

竞争性ELISA抑制方法是一种常用的方法，其原理是：首先将标准曲线样品及试验样品的α-Gal抗原与M86抗体反应（消耗部分M86抗体）；然后用Gal-BSA作为固相抗原，通过ELISA方法检测第一次反应后上清液中的剩余M86抗体；进而可利用标准曲线计算待测物中的α-Gal抗原含量。由于第一次待测物中的α-Gal抗原与M86抗体的反应对后续的剩余M86抗体与固相Gal-BSA抗原的反应构成了抑制效应，故称为ELISA抑制法。

以脱细胞基质类生物材料为代表的动物源性医疗器械，其残留的动物细胞成分及异种免疫原存在导致一系列免疫毒理学反应的风险。在体外试验无法充分评估动物源性医疗器械的免疫原性风险时，往往需要结合动物体内试验对其免疫原性风险进行综合评价。然而，野生型实验动物因体内表达α-Gal抗原而对外源性α-Gal抗原刺激无免疫学反应，不能客观地评价脱细胞基质类材料的免疫原性风险。国际上早期即有GGTA1基因敲除(GGTA1 knock-out, GTKO)小鼠模型研究的报道，并用来研究异种移植排斥潜在机理。目前，国内也有GTKO小鼠或GTKO兔子的应用研究报道。建议采用GTKO小鼠或GTKO兔子等Gal抗原缺失动物模型来评价动物源性医疗器械的免疫原性风险。

组织工程医疗器械产品 动物源性支架材料残留α-Gal抗原检测

1 范围

本标准给出了组织工程医疗器械产品支架材料制备时使用的动物源性生物材料中残留α-Gal抗原的定量检测方法。

本标准适用于制备组织工程医疗器械产品支架材料的各种动物来源的生物材料或其衍生物的α-Gal抗原检测。

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 16886.20 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与方法（GB/T 16886.20-2010，ISO/TS 10993-20:2006，IDT）

YY/T 1876-2023 组织工程医疗产品 动物源性生物材料 DNA 残留量测定法：荧光染色法

3 术语和定义

GB/T 16886.20和YY/T 1876-2023中界定的界定的术语和定义适用于本文件。

4 试剂和仪器

4.1 试剂

试剂包括：

a) 磷酸盐缓冲液（PBS，phosphate buffered saline，pH 7.4）；
b) 碳酸盐缓冲液（pH 9.5）；
c) 市售α-Gal Epitope（Galα1-3Galβ1-4GlcNAc-R），mAb（M86），分装后-20 ℃保存；
d) 市售 Galα1-3gal-BSA（3 atom spacer,简称 Gal-BSA），溶于去离子水中，分装后-20 ℃保存备用；
e) 辣根酶标记的山羊抗小鼠二抗（IgM-HRP）；
f) TMB(3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine)显色液；
g) 血清白蛋白；
h) 裂解液（市售品，其主要组成成分包括：50 mM 三羟甲基氨基甲烷（Tris，pH 7.4），150 mM 氯化钠（NaCl），1 % （体积分数）聚乙二醇辛基苯基醚（Triton X-100），1 %（质量分数）脱氧胆酸盐(sodium deoxycholate)，0.1 %（质量分数）十二烷基硫酸钠(SDS)，原钒酸钠(sodium orthovanadate)，氟化钠(sodium fluoride)，乙二胺四乙酸 (EDTA)，亮抑酶肽(leupeptin）及苯甲基磺酰氟 (Phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)；
i) 洗液：0.05 %（体积分数）的吐温-20/PBS；
j) 10 %（体积分数）H_2SO_4；
k) Gal 抗原阳性生物材料参考品；
l) Gal 抗原阴性生物材料参考品。

4.2 仪器

仪器包括：

a) 37 ℃恒温摇床；
b) 酶标仪；
c) 冷冻离心机；
d) 震荡器；
e) 高精度天平（0.0001g）；
f) 低温研磨仪；
g) 移液枪；
h) pH 计。

5 试验步骤

5.1 样品准备

5.1.1 试验样品

精确称取试验样品，置于2.0 mL或 5 mL无菌离心管内。若为固态块状或片状试验样品，则用液氮低温研磨为粉末（≤100μm）样品；液态或粉末状试验样品无需特殊处理。加入裂解液（可使用市售品）配制成样品浓度为合适浓度[使用前加入1 %（体积分数）1 mmol/L PMSF，为操作方便推荐至少每份样品配制2 mL的裂解液]。室温（25℃±5℃）放置 30 min～3 h至样品充分裂解。震荡后取混悬液备用。

注 1：每份样品设平行样 3 份，最终测定结果取其平均值±SD。

注 2：可以根据委托方的要求，取不同批号或同一批号的样品 3 份，用以评价不同批次或同一批次内的工艺稳定性。

5.1.2 标准曲线样品

精确称取Gal抗原阴性生物材料参考品（冻干粉）样品2 mg，置于2 mL或 5 mL无菌离心管内，加入裂解液[使用前加入1 %（体积分数）1 mmol/L PMSF] 配制成样品浓度为2 mg/mL,含Galα1-3gal-BSA；室温（25℃±5℃）放置 30 min～3 h 至样品充分裂解，进行离心（3000 r/min～5000 r/min）后取上清，用裂解液进行倍比梯度浓度稀释，得到最少不低于5个Galα1-3gal-BSA系列稀释浓度的稀释液，用于做标准曲线。为得到每次试验的最低检测限，应稀释到检测OD值与Gal抗原阴性参考品检测OD值相等或相近的浓度，从而确定其上一个浓度为本次试验的最低检测限。

注：宜根据待测样品Gal抗原含量的高低，通过预实验确定Galα1-3gal-BSA 的浓度范围，保证待测样品的检测OD值在标准曲线范围内。

5.1.3 Gal 抗原阳性和 Gal 抗原阴性参考品样品

分别精确称取2 mg Gal抗原阳性和阴性参考品（冻干粉），放于2 mL或 5 mL无菌离心管内，加入裂解液配制成2 mg/mL[使用前加入1 %（体积分数）1 mmol/L PMSF]，室温（25℃±5℃）放置 30 min～3 h至样品充分裂解；将裂解后样品进行离心后取上清备用。

5.1.4 对照孔样品

设定M86/Gal抗原阴性生物材料参考品裂解液反应样品1份作为100 %的反应值；裂解液反应样品1份作为背景值。

5.2 M86 抗体孵育

5.1中每个样品分别取200 μL置于1.5 mL离心管中，标记，每管分别加入等体积（200 μL）稀释比例为1:100～1:200的M86抗体溶液（应保证M86抗体是过量的, 可通过预实验确认）。混匀后在室温（25℃±5℃）温和摇动（如：100 r/min）条件下反应2 h，之后置于4 ℃孵育过夜。次日，在离心速度为14 000 g，4 ℃条件下离心30 min后取上清备用。

注：因M86是一种非纯化的抗体，不同批次之间的活性可能存在差异。建议在新试剂使用前先确认抗体活性与既往使用批次是否有差异，必要时重新验证抗体稀释比例的合理性。

5.3 ELISA 抑制法检测上清液中剩余 M86 抗体

5.3.1 固相抗原包被板的制备

首先用去离子水将Galα1-3gal-BSA（如：500 μg/mL Gal-BSA）稀释一定倍数（如：25倍），再用pH 9.5的碳酸盐缓冲液再次稀释（如：10倍）,制备2μg/mL Galα1-3gal-BSA 稀释溶液。取100μL/孔，加入酶标板，混匀后在室温温和摇动2 h，之后置于4℃孵育过夜进行包被。次日用洗液（0.05 %的吐温-20/PBS）洗板至少3次(伴随温和摇动，100 rpm)，在吸水纸上拍干。加入1 %（质量浓度）的血清白蛋白200μL/孔 进行封闭，置于37 ℃，2 h，伴随温和摇动。之后再次洗板拍干备用。

注1：一次制备的Galα1-3gal-BSA包被板可于4 ℃密封保存，一周内使用。

注2：配制碳酸盐缓冲液：称取碳酸钠0.3562 g,碳酸氢钠0.8401 g,用约80 mL超纯水溶解，在pH仪下调整至pH为9.5，定容至100 mL。

5.3.2 剩余 M86 抗体检测

分别取100μL 在5.2中准备的试验样品与M86抗体反应后的反应物上清液（含有M86剩余抗体）加入固相抗原包被的96孔板中（每份样品设2个复孔），用封口膜密封96孔板，置于37 ℃振荡孵育2 h后，用洗液洗板3次(伴随温和摇动)。加入IgM-HRP，37 ℃振荡孵育1 h后，用洗液洗板3次(伴随温和摇动)。加100μL TMB显色液避光显色15 min，用10 % H_2SO_4 50μL终止液显色后，在酶标仪上于450 nm 波长处测吸光度值。

6 抗原含量的计算

6.1 根据测定的吸光度值，使用 2 个复孔吸光度的平均数值计算各样品的 M86 结合抑制率。

$$IR = [(M-b)-(T-b)]/(M-b)\times 100\ \% \quad \text{.....(1)}$$

式中:

IR --M86结合抑制率,%;

M --对照孔反应OD值均值（100 %反应）;

T --试验样品反应OD值均值（剩余M86抗体的反应）;

b --裂解液反应OD值均值。

6.2 标准曲线的绘制

以 Galα1-3gal-BSA 的浓度（μg/mL）为横坐标，其 M86 的结合抑制率(%)为纵坐标绘制最佳曲线方程,如：指数曲线，获得指数曲线方程 $Y= A_1*\exp(-X/t_1)+y0$；或者对数曲线，获得对数曲线方程 $Y=a*\ln(X)+b$；或者将浓度（X）作合适数据处理后，再作直线拟合。其中 Y 代表 M86 的结合抑制率；X 代表样品浓度。

注：可使用Origin软件或其它软件，如四参数方程软件直接计算。

6.3 样品中所含抗原表位数计算

a)将试验样品的 M86 结合抑制率代入 6.2 中标准曲线的指数曲线方程，计算出试验样品对应的标准曲线样品 Gal-BSA 的质量浓度（X，μg/mL）。

b)计算试验样品的单位质量 Gal 抗原表位数

$$N_t = (X\times V\times N_S)/M_t \quad \text{.....(2)}$$

式中:

N_t --试验样品单位质量Gal抗原表位数，单位为个每毫克或个每微克（个/mg或者个/μg）;

X --标准曲线样品Gal-BSA质量浓度,即：6.2中标准曲线指数曲线方程中“X”， 单位为微克每毫升（μg/mL）;

V --试验样品的反应体积，单位为毫升（mL）;

N_S --单位Gal-BSA的Gal抗原表位数，1.82×10^{14}个/μg;

M_t --试验样品质量（等于试验样品在反应体系中的质量浓度乘以反应体积），单位为微克或毫克（μg或mg）。

注1：此处的质量浓度指的是反应体系中样品与M86反应时的终浓度；体积是指加入96孔板时的体积。

注2：根据Gal-BSA（Galα1-3gal-BSA）质量 ≈ BSA含量 （已经过蛋白质测定验证），BSA分子量：M=66.33 kD，

BSA单位质量分子数：n = 9.08×10^{18}个/g；因此，单位质量Gal-BSA中BSA分子数：9.08×10^{18}个/g；根据每个Gal-BSA中BSA分子含有的Gal抗原残基数约20个，因此，单位质量Gal-BSA中Gal抗原残基数 = 1.82×10^{14}个/μg。

如果试验样品中α-Gal抗原微量或者痕量而难以定量时，应给出本次检测试验的最低检测限，表示出低于最低检测限的水平。可同时对比检测脱细胞或去除抗原工艺前的样品，作为考察工艺有效性的参考。

6.4 最低检测限的确定

通过找到标准曲线最低稀释样品的检测OD值与Gal抗原阴性参考品检测OD值相等或相近的浓度，这个浓度就是未能测定的浓度，从而确定其上一个浓度为本次试验的最低检测限。

7 试验可接受准则

7.1 Gal 抗原阳性参考品的 Gal 抗原测定值与标准品定值的相对偏差（relative deviation，RD）应小于 20%；

7.2 阴性参考品的α-Gal 抗原测定为阴性；

7.3 标准曲线的 R^2 应大于或等于 0.95；

7.4 样品检测结果的变异系数（CV）应小于或等于 30%。

8 试验报告

试验报告应包括：

a) 试验是否符合可接受准则及具体指标值；
b) 试验结果（平均值±标准差）；单位质量的α-Gal 抗原数（个/mg 或个/μg），应标明干重/或湿重；
c) 给出本次试验的最低检测限。

参 考 文 献

[1] Galili U, LaTemple DC, Radic MZ. A sensitive assay for measuring alpha-Gal epitope expression on cells by a monoclonal anti-Gal antibody. Transplantation. 1998,65(8):1129-32

[2] Galili U, Shohet SB, Kobrin E, Stults CL, Macher BA. Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. J Biol Chem. 1988,263(33):17755-62

[3] Galili U. The α-Gal epitope (Galα1-3Galβ1-4GlcNAc-R) in xenotransplantation. Biochimie. 2001,83(7):557-63

[4] Lu Y，Shan Y，Shao A，Zeng B, Xu L. Assessment of α1,3-Gal antigen in animal tissues by ELISA inhibition method[J]. Chinese journal of pharmaceutical analysis, 2015, 35(10):40-46

[5] Macher BA, Galili U. The Galalpha1,3Galbeta1,4GlcNAc-R (alpha-Gal) epitope: a carbohydrate of unique evolution and clinical relevance. Biochim Biophys Acta. 2008,1780(2):75-88

[6] Naso F, Gandaglia A, Iop l, Spina M, Gerosa G. First quantitative assay of alpha-Gal in soft tissues: presence and distribution of the epitope before and after cell removal from xenogeneic heart valves. Acta Biomater, 2011, 7(4): 1728-1734

[7] Shan Y, Xu L, Ke L, Lu Y, Shao A, Zhang N, Zeng B. Assessment Method of Remnant α-1,3-Galactosyle Epitopes in Animal Tissue-derived Biomaterials[J].Journal of Biomedical Engineering, 2015,32(2):680-687