

YY

中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXXX—XXXX

重组胶原蛋白体表创面吸收试验方法

Test method for body surface wound absorption of recombinant collagen

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

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

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。

本文件由全国医用防护器械标准化工作组（SAC/SWG 30）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

引 言

现有的化学品皮肤吸收试验标准只适合已知单一化学品通过体表吸收后的化学色谱分析或荧光强度进行检测。重组胶原蛋白敷料类产品组成复杂，往往含有多种辅助成分或材料，对重组胶原蛋白的检测带来一定的干扰。各种重组胶原蛋白及其敷料类产品的重组胶原蛋白序列、长短不同，进而使得上市产品中重组胶原蛋白的分子量各异，重组胶原蛋白含量较少时，难以通过化学色谱分析的方法检测到。所以，迫切需要建立一种针对重组胶原蛋白产品的体外体表吸收试验方法以满足监管的需要。

重组胶原蛋白体表创面吸收试验方法

1 范围

本文件规定了重组胶原蛋白体表创面吸收试验的原理、步骤、创面模型及测试方法。
本文件适用于重组胶原蛋白体表创面吸收的检测。
本文件不适用于注射填充类重组胶原蛋白。

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 27818 化学品 皮肤吸收 体外试验方法

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

YY/T 1849-2022 重组胶原蛋白

3 术语和定义

YY/T 1849-2022界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1 重组胶原蛋白 recombinant collagen

采用重组 DNA 技术，对编码所需人胶原蛋白质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或类似胶原蛋白的多肽，经过提取和纯化等步骤制备而成。

3.2 生物素 biotin

一种水溶性维生素（维生素B7），分子式C₁₀H₁₆N₂O₃S，可作为标记物用于免疫印迹、ELISA、免疫组织化学技术（IHC）、免疫细胞化学技术（ICC）、免疫荧光（IF）和流式细胞分析。

4 试验原理

通过生物素标记（生物素与重组胶原蛋白中的伯位氨基共价结合，标记后的蛋白可以和亲和素结合，利用亲和素标记的酶对生物素标记的蛋白进行检测）的生物手段对重组胶原蛋白进行标记，选用适宜的创面模型进行体表创面吸收试验，用荧光显微镜观察切片中的生物素信号来定性和追踪标记后的胶原蛋白，对皮上、皮中、皮下中的重组胶原蛋白进行吸光度检测进行定量分析，从而评价标记后的重组胶原样品的透过率。

5 生物素标记重组胶原蛋白的要求

5.1 生物素标记重组胶原蛋白

选择合适的生物素标记试剂盒对重组胶原蛋白进行标记，并去除游离的生物素（若选择超滤纯化，可根据产品中重组胶原蛋白的分子量大小选择合适的超滤管，宜对超滤管匹配程度进行验证，确保良好的标记和回收率）。生物素标记后的重组胶原蛋白样品应尽快使用，如需保存，应验证保存条件并确保其标记稳定性，。

5.2 生物素标记效率评价

2-（4-羟基苯偶氮）苯甲酸（2-（4-Hydroxyphenylazo）benzoic acid，HABA）可以与亲和素特异性结合，其结合复合物为一种黄色或者橘黄色物质，在500nm有最大吸光值，但其结合能力远低于生物素与

亲和素的结合能力，当溶液中存在生物素的时候，生物素会强竞争让HABA解离下来，引起吸光值下降。基于此原理，可以根据500nm吸光值的变化计算出蛋白标记生物素的量（以标记后重组胶原蛋白实际浓度计算摩尔比，生物素与被标记蛋白的摩尔比应 $>1:1$ ），应确保标记前后重组胶原蛋白分子量无明显变化。

6 体表创面模型的构建

考虑到重组胶原蛋白类产品的临床应用场景一般为具有一定浅表创面的皮肤，因此需要对离体猪皮进行浅表创面的构建。

6.1 体表创面模型的构建方法

可以自行制备或采购市售的离体猪皮，选取1~2个月龄的巴马香猪腹/背部皮肤，厚度为0.8~1mm，优先选择新鲜离体猪皮，如选择低温保存的离体猪皮，可在 -80°C 保存，使用前在 4°C 条件下解冻，并用磷酸盐缓冲液（PBS，pH 6.8~7.4）冲洗5次后用无菌纱布吸干表面残留液体。根据临床使用情况采用适宜的方法对猪皮进行体表创面处理。

6.2 模型经皮失水率测定

试验开始前，使用经皮失水仪测定猪皮的经皮失水值，若测得经皮失水率小于 $15\text{ g/m}^2\cdot\text{h}$ ，则该猪皮符合试验要求，宜选择与重组胶原蛋白产品临床使用情况相近的创面创建方法，如胶带剥离法（见附录A）或微针穿刺法（见附录B）在恒温恒湿条件下对猪皮进行处理，当经皮失水率在 $20\sim 25\text{ g/m}^2/\text{h}$ 时，认为浅表创面猪皮模型制备完成。

7 试验方法

7.1 扩散系统的设置

推荐选择Franz cell扩散池作为扩散系统。确保离体猪皮真皮层与接收液之间无气泡或间隔。推荐使用磷酸盐缓冲液（PBS，pH 6.8~7.4）作为接收液，水浴温度为 $32\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，电磁搅拌器转速为300 rpm。

7.2 试验采样时间点

根据产品使用说明书设置采集样本时间点，建议不少于4h，最长不超过24 h。

7.3 试验分组设置

7.3.1 空白对照组

用基质（纯化水代替重组胶原蛋白，其他配方及工艺与成品相同的液体），设置至少3组平行；

7.3.2 样品组

通过生物素标记后的重组胶原蛋白样品，定性、定量至少各设置3组平行。

7.4 体表创面吸收试验

7.4.1 皮肤模型-Franz cell 扩散系统装配

将创面模型固定于Franz cell扩散池的供给室和接收室之间，创面模型的角质层面向供给室，真皮层一侧朝向接收室固定于Franz cell扩散池；向接收室中加入适宜接收液，将猪皮绷紧固定好后，通过取样器向接收室中添加适量接收液（PBS），排净空气，使创面模型的真皮层面与接收液紧密接触。

7.4.2 供试样品制备

7.4.2.1 液体样品

将经过与成品相同加工工艺的重组胶原蛋白原液进行标记，然后与其他与成品相同加工工艺的其他液体基质，按照成品中重组胶原蛋白与其他液体基质的混合比例配制后备用；

7.4.2.2 固体样品

将经过与成品相同加工工艺的重组胶原蛋白干粉定量溶解后进行标记，然后与经过与成品相同加工工艺的其他干粉基质定量溶解后，按照成品中重组胶原蛋白与其他基质的混合比例配制后备用。

将固体敷料生产过程中经过与成品相同加工工艺的重组胶原蛋白原液进行生物素标记，然后与经过与成品相同加工工艺的其他液体基质，按照成品中重组胶原蛋白与其他液体基质的混合比例配制后备用；并将经过灭菌等其他与成品相同加工工艺的无纺布或其他支撑材料裁剪成与扩散池等面积的片状备用。

将固体、半固体类敷料生产过程中经过与成品相同加工工艺的重组胶原蛋白原液进行生物素标记，然后与经过与成品相同加工工艺的固体、半固体基质，按照成品中重组胶原蛋白与其他固体、半固体基质的混合比例配制混匀后备用。

7.4.3 上样

7.4.3.1 液体或溶解成液体的冻干粉样品

接加样量：扩散池有效渗透面积不低于 $10\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 直接加至供给室的创面皮肤表面并确保完全覆盖扩散池内皮肤表面；

7.4.3.2 含无纺布或其他支撑材料的固体敷料

将提前制备的与扩散室面积相同的受试小样均匀紧密地贴于供给室的创面皮肤表面，再加入按产品配比等比例标记后的成品溶液；

7.4.3.3 固体、半固体类样品（凝胶、乳膏类）

接加样量：扩散池有效渗透面积不低于 $5\text{mg}/\text{cm}^2$ 的比例加至供给室的创面皮肤表面并确保完全覆盖扩散池内皮肤表面。

7.4.4 体表创面吸收过程

开启电磁搅拌器，以合适的速度搅拌，保持 $(32\pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温水浴，并确保水浴夹层无气泡。

7.4.5 收样

收集供给室内样品（无纺布或其他支撑材料需用镊子取出），根据扩散室大小使用适量的PBS 清洗3次后合并为“皮上样品”；取出有效渗透面积的皮肤模型，作为“皮中样品”；收集接收室部分样品，作为“皮下样品”。

7.4.6 样品前处理

具体样品前处理方法如下：

- 皮上样品：采用1 mL 移液枪吸取多次反复吹打混匀，备用；
- 皮中样品：使用手术剪剪取有效渗透面积下的皮肤组织，制备匀浆悬液，10000 rpm，离心10 min，收集上清液，备用；
- 皮下样品：采用1 mL 移液枪吸取多次反复吹打混匀，备用。

7.5 组织学检测

试验结束后，取3个复孔用于组织学检测，同时将未进行创面处理的离体猪皮作为对照，用于对比说明创面制备情况。采用适宜的切片技术进行切片，后进行免疫组化染色。

7.6 ELISA 法检测

收集皮上、皮中、皮下样品，以相应基质或者以相同稀释倍数的基质做溶剂分别进行标曲的配制，并用标记后已知浓度的重组胶原蛋白产品进行梯度稀释，与样品同时检测吸光度，重复测定3次，取平均数计算获得各自标准曲线回归方程（相关系数 R^2 均应大于0.95）和样品浓度，方法检测限应满足不高于 $10\text{ng}/\text{mL}$ 。

7.6.1 标准曲线方程计算

利用梯度稀释后的样品吸光度值为纵坐标（y），浓度值（ng/mL）为横坐标（x），绘制标准曲线，获得回归方程式（1）：

$$x = \frac{y-a}{b} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

x—重组胶原蛋白浓度值，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

y—重组胶原蛋白吸光度值，无单位；

a—常数；

b—常数。

7.6.2 回收率计算

按式（2）计算，回收率应在 100%±20%。

$$M = \frac{m_1+m_2+m_3}{m_0} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

式中：

M ——回收率；

m₁ ——皮上样本中重组胶原蛋白质量，ng；

m₂ ——皮中样本中重组胶原蛋白质量，ng；

m₃ ——皮下样本中重组胶原蛋白质量，ng；

m₀ ——标记后重组胶原蛋白添加质量，ng。

8 创面吸收结果判定

在试验操作结束后尽快同步开展组织学检测、ELISA法检测，皮下ELISA法检测结果高于检出限时，判定为创面吸收。皮下、皮中ELISA法检测结果低于检测限时，需结合组织学检测结果综合考量，若组织学检测结果在表皮以下表达阳性则判定为创面吸收；若仅在角质层、皮肤附件（包括毛囊、汗腺和皮脂腺）、创伤部位表皮细胞等处表达阳性则判定为创面不吸收。皮中ELISA法检测结果高于检测限时，需结合组织学检测结果综合考量，若组织学检测结果在表皮以下表达阳性则判定为创面吸收，若组织学检测结果在表皮以下表达阴性和/或仅在角质层、皮肤附件（包括毛囊、汗腺和皮脂腺）、创伤部位表皮细胞等处表达阳性则判定为创面不吸收。

9 试验数据和报告

9.1 试验数据

应提供皮上、皮中和皮下的样品组织学检测和ELISA法检测结果及回收率。

9.2 试验报告

试验报告应有下列信息：

- a) 产品名称、型号或规格、生产批号等产品信息；
- b) 标明耗材、试剂、仪器和设备；
- c) 试验前准备：
 - 1) 选择生物素标记及标记效果，应简述试验方法；
 - 2) 稳定性试验方法及结果；
 - 3) 样品标记前后分子量；
 - 4) 体表创面模型的构建方法及创面模型构建后的经皮失水率、储存环境与时间；
 - 5) 扩散池的温度、湿度和磁力选择转速的设置。
- d) 试验步骤：
 - 1) 标明分组设置、上样量、取样时间、取样后样品保存环境；
 - 2) 切片制备的过程和免疫组化染色定量检测的结果；
 - 3) 结果的计算。
- e) 结果：

- 1) 组织学检测: 切片定位并观察标记后的样品在皮层的位置, 并给出结果;
 - 2) ELISA 法检测: 需提供皮上、皮中、皮下的检测结果, 并计算提供各自标准曲线回归方程。
- f) 结论: 结合组织学检测和 ELISA 法检测结果分析, 给予体表创面吸收与否的判断。

征求意见稿

附录 A

(资料性)

创面皮肤制备方法（胶带剥离法）

A.1 仪器/耗材

A.1.1 吸水纸

A.1.2 胶带: D-Squame® 胶带、Scotch® 胶带、Corneofix® 胶带或是其他等效的通用型胶带。

A.1.3 经皮失水仪: delfin 经皮水分流失测量仪或是其他等效的经皮失水仪。

A.2 制备过程

A.2.1 Scotch® 胶带剥离法

A.2.1.1 取符合试验要求的离体猪背部/腹部皮肤，用吸水纸吸干猪皮正反两面水分，角质层面朝上置于用石蜡膜覆盖的软木板上并拉伸。

A.2.1.2 将 Scotch® 胶带（每 1 cm 宽度所需平均力为 1.0 N）有胶面覆盖在猪皮肤上，用手轻轻快速按压胶带，使胶带完全贴合在皮肤上，然后沿同一方向缓慢匀速剥离胶带。每次剥离都使用一条新的胶带，并将其放置在完全相同的区域上。每个部位重复剥离胶带 13~15 次，每剥离 2~3 次可用经皮失水仪监测经皮失水率，当经皮失水率在 20~25 g/m²/h 时，则停止剥离，认为皮肤创面制备完成。每次剥离后注意观察胶带上粘附的残留物。

A.2.1.3 按扩散池面积及试验所需的数量，将制备好的创面皮肤剪切成合适的尺寸进行试验。

A.2.2 D-Squame® 胶带剥离法

A.2.2.1 取符合试验要求的离体猪背部/腹部皮肤，用吸水纸吸干猪皮正反两面水分，角质层面朝上置于用石蜡膜覆盖的软木板上并拉伸。

A.2.2.2 按扩散池面积及试验所需的数量，将制备猪皮剪切成适合尺寸。

A.2.2.3 将圆形 D-Squame® 胶带有胶面覆盖在猪皮肤上，使用配套 D-Squame® 压力器（225 g/cm²）将胶带按压 10s（即快速按压 20 次），然后快速剥离胶带。每次剥离都使用一条新的胶带，并将其放置在完全相同的区域上。每个部位重复剥离胶带 4~7 次，每剥离 1 次可用经皮失水仪监测经皮失水率，当经皮失水率在 20~25 g/m²/h 时，则停止剥离，认为皮肤创面制备完成。每次剥离后注意观察胶带上粘附的残留物。

注1：由于角质层的过度剥离可能使离体皮肤组织无任何屏障功能，一般剥离次数越多，角质层破坏越严重，且表层物质去除量越多，皮肤屏障功能越差，建议不损伤到活性表皮层。

注2：胶带剥离法制备皮肤创面影响因素较多，为规范试验操作、避免偏差，各机构在试验前进行探索、验证与操作演练，确保皮肤制备达到试验要求，建议各机构在预试验或前期探索时制定角质层剥离操作的标准操作规程。

附 录 B
(资料性)
创面皮肤制备方法（微针穿刺法）

B.1 耗材

B.1.1 皮肤点刺针

针体长度固定（0.25 mm）或可调，针体直径0.2 μm及以上，针体密度为34针/cm²及以上。

B.1.2 皮肤滚针

针体长度为0.25 mm，针体直径0.2 μm及以上，针体密度为34针/cm²及以上。

B.2 制备过程

B.2.1 通则

每次试验应使用新的皮肤点刺针或皮肤滚针，以保证微针无磨损，所有穿刺孔的穿透深度在试验间应保持大致相同。

B.2.2 皮肤点刺针穿刺法

B.2.2.1取符合试验要求的离体猪背/腹部皮肤，用吸水纸吸干猪皮正反两面水分，角质层面朝上置于用石蜡膜覆盖的软木板上并拉伸。

B.2.2.2调整针体长度至0.25 mm，将皮肤点刺针垂直于皮肤表面，同一点刺针面积的皮肤上至少穿刺一次进行皮肤创面制备。

B.2.2.3按扩散池面积及试验所需的数量，将制备好的创面皮肤剪切成合适的尺寸进行试验。

B.2.3 皮肤滚针穿刺法

B.2.3.1取符合试验要求的离体猪背/腹部皮肤，用吸水纸吸干猪皮正反两面水分，角质层面朝上置于用石蜡膜覆盖的软木板上并拉伸。

B.2.3.2为了保持微针辊施加的力大致恒定，将其上具有皮肤的软木板放置在平坦表面厨房天平上。

B.2.3.3将皮肤滚针应用于皮肤所有表面，滚动一次，滚动时施加力度保持在4N~5 N的范围内，即滚动时厨房秤显示400g~500 g范围内。

B.2.3.4按扩散池面积及试验所需的数量，将制备好的创面皮肤剪切成合适的尺寸进行试验。