

中华人民共和国医药行业标准

YY/T —XXXX

重组胶原蛋白降解试验方法通则

General guidance for degradation test methods of recombinant collagen protein

草案稿

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

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。

本文件由中国食品药品检定研究院归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

引 言

重组胶原蛋白是通过特定氨基酸序列设计，可能由不同重组表达体系生产，具有各种分子量和不同蛋白结构的蛋白。重组胶原蛋白可能与人体天然胶原蛋白不同。因此，当重组胶原蛋白作为体内材料应用时，应对其进行降解相关的表征研究，包括降解机制研究和降解产物的分析，以及表征体内降解周期、体内降解过程中可能影响安全性和有效性的材料特性变化等。

目前研究发现，生物材料在体内主要通过细胞介导的途径降解，包括巨噬细胞和/或异物巨细胞的吞噬作用，以及由细胞分泌的蛋白酶介导的细胞外降解。因此，应考虑这些因素来设计预期反映重组胶原蛋白体内降解机制的体外降解试验。体外降解试验有可控的试验条件和试验体系，有利于降解机制研究和降解产物的分析。试验条件受控的体外降解试验结果也可用于与重组胶原蛋白降解性能有关的质量控制。

重组胶原蛋白降解试验方法通则

1 范围

本文件给出了重组胶原蛋白降解表征研究的原则，体外降解试验方法，以及体内降解试验方法。本文件适用于重组胶原蛋白的降解表征研究。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

重组胶原蛋白荧光耦联物 fluorescent-recombinant collagen conjugate
结合了荧光染料的重组胶原蛋白。

4 降解表征研究的原则

4.1 体外降解

目前研究发现，生物材料在体内主要通过细胞介导的途径降解，包括巨噬细胞和/或异物巨细胞的吞噬作用，以及由细胞分泌的蛋白酶介导的细胞外降解。因此，应考虑这些因素来设计预期反映重组胶原蛋白体内降解机制的体外降解试验。体外降解试验有可控的试验条件和试验体系，有利于降解机制研究和降解产物的分析。试验条件受控的体外降解试验结果也可用于与重组胶原蛋白降解性能有关的质量控制。

4.2 体内降解

当重组胶原蛋白作为体内材料应用时，宜表征体内降解周期、体内降解过程中可能影响安全性和有效性的材料特性变化等。

5 体外降解试验

5.1 体外酶解试验

为进行模拟体内的重组胶原蛋白降解机制和降解产物研究，宜选择适宜的基质金属蛋白酶进行试验。

选择类似溶组织梭状芽孢杆菌来源的胶原蛋白酶（非人体存在的）进行体外降解研究，可用于与重组胶原蛋白降解性能有关的质量控制。但对其试验结果在降解机制和降解产物研究方面的合理性宜进行分析。

5.2 体外细胞降解试验

成纤维细胞、巨噬细胞等细胞可分泌基质金属蛋白酶。结合重组胶原蛋白预期的临床应用组织部位，可选择相应类型的组织细胞，建立细胞培养模型，利用细胞分泌的基质金属蛋白酶等蛋白酶，开展重组胶原蛋白的降解实验。

6 体内降解试验

6.1 采用重组胶原蛋白荧光耦合物的体内降解试验

6.1.1 试验原理

荧光标记蛋白的原理是荧光标记试剂与蛋白质所带的巯基、氨基及羧基等基团发生置换或缩合反应耦联在一起。借助小动物活体成像系统，通过观察耦合物荧光强度的变化反应材料的降解程度，评价重组胶原蛋白的体内降解周期。

6.1.2 试验方法

重组胶原蛋白荧光耦合物的体内降解试验见附录A。

附录 A (资料性附录)

A.1 试验原理

荧光素类中的 FITC 因荧光量高，有良好的光稳定性，常被用于蛋白质等大分子的荧光标记，其分子量为 389.4，最大吸收光波长为 495 nm，最大发射光波长为 525 nm，在碱性溶液中，蛋白质中氨基基团与荧光素 FITC 共轭反应，形成 FITC-蛋白的耦联物，即荧光标记蛋白。

活体荧光成像技术是指在向动物体植入标记有荧光染料的实验材料后，在外来激发光源对该材料进行荧光激发的条件下，活体成像系统收集体内由于荧光染料产生出的发射光信号，对从生物体内捕捉到的光信号依据强弱和分布进行影像学处理，通过观察荧光强度的变化反应材料的降解程度，具有非侵入性，可实现动物活体的连续观察。

A.2 主要设备

小动物活体成像系统 (IVIS)、分析天平、脱色摇床、紫外分光光度计、酶标仪、电推剪等。

A.3 试剂

FITC、磷酸盐缓冲液 (PBS)、pH 9.0 的 0.1M 碳酸氢钠缓冲液、凝胶层析柱、舒泰 50 (注射用盐酸替来他明盐酸唑拉西洋)、0.9% 氯化钠注射液、市售脱毛膏。

A.4 试验动物

A.4.1 总体要求

所有的动物试验均应在经国家认可机构认可的实验室内进行，并应遵守与试验动物福利有关的全部适用法规，以符合 GB/T 16886.2 的要求。这些研究应在良好实验室质量管理规范或其他经批准的质量保证体系的控制下进行。

A.4.2 动物选择

选用 SPF 级健康初成年啮齿类动物，推荐使用大鼠 (6 周龄~12 周龄)，雌雄不限，动物数目不少于 5 只。

A.5 试验样品

重组胶原蛋白产品。

A.6 试验步骤

A.6.1 FITC 与重组胶原蛋白耦联

按下面试验步骤进行操作：

- pH 9.0 的 0.1M 碳酸氢钠缓冲液将重组胶原蛋白配制为 5.0 mg/mL；
- pH 9.0 的 0.1M 碳酸氢钠缓冲液将 FITC 粉末配制为 1.0 mg/mL；
- 将 1mL 重组胶原蛋白溶液加入反应瓶中；
- 在搅拌的同时，向反应瓶中滴加 250 μ L 的 FITC 稀释液；
- 用铝箔纸完全覆盖反应瓶，以避免光线照射，将所有反应瓶于室温下置脱色摇床轻轻晃动 2 小时，以使 FITC 与重组胶原蛋白充分耦联。

A. 6.2 FITC-重组胶原蛋白耦联物的纯化

按下面试验步骤进行操作：

- a) 取下凝胶层析柱顶部盖子，切开柱子下端，让层析柱保存液流出，用 30 mL PBS 溶液（6 × 5 mL）平衡柱；
- b) 将 FITC-重组胶原蛋白耦联物加至凝胶柱床的顶部，并收集通过的洗脱液；
- c) 用 10mL PBS 洗脱层析柱，分别收集至 10 个离心管内，每管收集 1 mL，在 280nm 处监测各部分的吸光度，不要收集 A280<0.4 的洗脱液；
- d) 用 50mL（10×柱体积）PBS 洗涤层析柱以除去未结合的荧光素 FITC；
- e) 分别测定 FITC-重组胶原蛋白耦联物溶液 495nm、280nm 处的吸光度；
- f) 按下列公式计算荧光素和重组胶原蛋白的摩尔比值（F/P），F/P 应位于 3~6，若 F/P 值在此范围之外则应调整 FITC 浓度后重新进行耦联标记。

$$F/P = \frac{A_{495} \times a}{A_{280} - 0.35 \times A_{495}}$$

式中：

F/P——摩尔比值；

a——给定的常数值；

A495——FITC-重组胶原蛋白耦联物溶液于 495nm 处的吸光度；

A280——FITC-重组胶原蛋白耦联物溶液于 280nm 处的吸光度；

0.35×A495——FITC 在 280nm 处的吸收而产生的校正因子。

按下列公式计算 a 值。

$$a = \frac{MW \times E_{0.1\%}}{389 \times 195}$$

式中：

MW——重组胶原蛋白分子量；

E0.1%——1.0 mg/mL 重组胶原蛋白在 280 nm 处的吸收值；

389——FITC 的分子量；

195——1.0 mg/mL FITC 在 495 nm 处的吸收值。

- g) FITC-重组胶原蛋白耦联物的标记测定，按下列公式计算 FITC-重组胶原蛋白耦联物浓度：

$$C = \frac{A_{280} - (0.35 \times A_{495})}{1.4}$$

式中：

C——FITC-重组胶原蛋白耦联物浓度，单位为 mg/mL；

A280——FITC-重组胶原蛋白耦联物溶液于 280nm 处的吸光度

0.35×A495——FITC 在 280nm 处的吸收而产生的校正因子。

1.4——蛋白在 pH=7.0 浓度为 1.0mg/ mL 的 A280。

A. 6.3 FITC-重组胶原蛋白耦联物动物试验

按下面试验步骤进行操作。

- a) 试验动物准备：按照 25mg/kg · BW 的剂量腹腔注射注射用盐酸替来他明盐酸唑拉西泮麻醉动物，采用电推剪剃除动物背部毛发，再涂抹脱毛膏至动物背部毛发完全脱落。
- b) 模拟重组胶原蛋白产品临床使用，将 FITC-重组胶原蛋白耦联物注射到大鼠皮内或皮下组织内，皮下注射方式推荐每位点 0.2 mL，皮内注射方式推荐每位点 0.1 mL，每只动物推荐仅注射 1 个位点。借助小动物活体成像系统观察，测得荧光信号结果记为 0d，为重组胶原蛋白未发生降解的初始值。
- c) 根据重组胶原蛋白产品降解特性结合体外降解试验结果设计合适的试验观察周期，使用小动物活体成像系统对各观察周期大鼠体内的 FITC-重组胶原蛋白耦联物局部降解情况进行连续观察，分别拍照记录不同观察周期的荧光信号直至观察到胶原蛋白产品完全降解。

A.7 结果评价

各观察周期小动物荧光成像观察完成后在所得图像上添加感兴趣的区域 (Range of interest, ROI) 从而得出特定区域的荧光强度。框选 ROI 后, 软件会根据选取的区域给出区域内的荧光强度总和, 以此荧光强度作为材料降解性能的判断依据。据各观察周期植入试验动物体内荧光标记 FITC-重组胶原蛋白耦合物的荧光强度变化可以绘制出重组胶原蛋白的体内降解曲线。

A.8 试验报告

试验报告中宜包含下列信息。

- a) 试验样品: 生产厂家、规格型号及批号、重组胶原蛋白分子量。
 - b) FITC: 耦合剂品牌及耦合方法。
 - c) 重组胶原蛋白耦合后浓度。
 - d) FITC-重组胶原蛋白耦合物的纯化方法。
 - e) 试验动物:
 - 1) 试验动物的种属、品系、级别、数量、体重、性别、来源;
 - 2) 试验动物饲养环境;
 - 3) 试验动物设施使用许可证号。
 - f) FITC-重组胶原蛋白耦合物动物试验方法。
 - g) 结果: 绘制重组胶原蛋白的体内降解曲线。
 - h) 结论。
-