



# 中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1888—2023

## 重组人源化胶原蛋白

Recombinant humanized collagen protein

2023-01-18 发布

2023-07-20 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。

本文件由国家药监局医疗器械技术审评中心归口。

本文件起草单位：复旦大学、四川大学、中国科学院生物物理研究所、重庆医科大学附属第二医院、四川医疗器械生物材料和制品检验中心有限公司（四川医疗器械生物材料和制品检验中心）、陕西省食品药品检验研究院、山东省医疗器械和药品包装检验研究院、四川省药品检验研究院（四川省医疗器械检测中心）、山西锦波生物医药股份有限公司、江苏创健医疗科技股份有限公司、上海中科新生命生物科技有限公司。

本文件主要起草人：陆路、王云兵、朱赟、杨立、林海、董晓静、梁洁、蔡虎、张敏、刘兴兰、王建、李海航、阮宏强、姜世勃、邓翔、王嫦鹤、侯丽、赵代国、于玉凤、凡孝菊、刘靖堂、花晨。

# 重组人源化胶原蛋白

## 1 范围

本文件规定了重组人源化胶原蛋白的质量控制、技术要求、试验方法、稳定性、生物学评价以及包装、运输和贮存等。

本文件适用于作为医疗器械原材料的不含非人胶原蛋白氨基酸序列的重组人源化胶原蛋白的质量控制。

注：本文件中验证的样品是基于重组Ⅲ型人源化胶原蛋白原材料。其他重组人源化胶原蛋白原材料如适用，可参考本文件。

## 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

YY/T 1849—2022 重组胶原蛋白

中华人民共和国药典

## 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

**重组人源化胶原蛋白 recombinant humanized collagen protein**

由DNA重组技术制备的人胶原蛋白特定型别基因编码的全长或部分氨基酸序列片段，或是含人胶原蛋白功能片段的组合。

### 3.2

**人胶原蛋白型别 human collagen types**

在遗传学上可以分为20余种不同，其氨基酸序列、分子组装形式或组织分布特征存在差异。

注：不同型别的人胶原蛋白一般由罗马数字依次命名，如human Type I collagen表示人I型胶原蛋白。每个型别的人胶原蛋白由一条或多条的胶原蛋白基因编码组装而成，如人I型胶原蛋白由人COL1A1和COL1A2基因编码组装而成。

### 3.3

**人胶原蛋白片段 human collagen fragment**

位于同一条人胶原蛋白氨基酸序列内具有一定连续长度能形成稳定结构的氨基酸序列片段。

## 4 质量控制

由于重组人源化胶原蛋白所选人胶原蛋白型别和氨基酸序列片段不同、表达体系差异，氨基酸序列和理化性质差异较大。作为医疗器械原材料使用，需建立适宜的方法对不同批次间的产品进行质量控

制,包括采用参比品和经验证的方法评估已知或潜在的成品相关物质和工艺相关物质,对其进行鉴别、理化、纯度、杂质等检测分析。

选择已证明足够稳定的批次或用一个代表性批次作为参比品,用于鉴别、理化、结构表征等各种分析,参比品应进行必要的分析鉴定,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,宜对蛋白质含量、等电点、纯度、氮端氨基酸序列、分子量、肽图、指纹肽图谱库、二硫键分析及糖基(酵母或其他真核细胞表达)等进行分析。

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,一般在 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下或经验证的贮存条件下保存。

## 5 技术要求

### 5.1 通则

用于医疗器械的重组人源化胶原蛋白检测项目取决于原料来源、工艺验证、成品一致性、工艺添加物和相关杂质的水平。应当采取适当方法对重组人源化胶原蛋白的质量进行检测验证,本文件适用的重组人源化胶原蛋白其型别应能够被明确,氨基酸序列应能够被检测,蛋白纯度应能够被测出。根据具体重组人源化胶原蛋白成品的特性,需要进行相应的特性分析。

### 5.2 理化性质

#### 5.2.1 外观

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。

注:随着行业发展,可能存在其他外观要求,可根据原材料具体形态规定外观要求。

#### 5.2.2 可见异物

应无明显异物。

#### 5.2.3 水溶解性/盐溶解性

水溶解性/盐溶解性应符合表1的要求。

表1 水溶解性/盐溶解性要求

溶解度/(mg/mL)	指标要求
难溶	$\leq 0.1$
微溶	$> 0.1$ 且 $< 10$
可溶	$\geq 10$ 且 $< 100$
易溶	$\geq 100$

#### 5.2.4 水分

适用时(如冻干粉),水分含量应符合制造商的声称值。

#### 5.2.5 炽灼残渣

应 $\leq 2.0\%$ 。

### 5.2.6 酸碱度

适用时,酸碱度应在 5.5~8.0 之间。

### 5.2.7 等电点

应符合制造商的声称值。

### 5.2.8 渗透压摩尔浓度

适用时,渗透压摩尔浓度应在 270 mOsmol/kg~360 mOsmol/kg 之间。

### 5.2.9 总蛋白含量

应为标示量的 90%~110%。

### 5.2.10 纯度

应 $\geq$ 95%。

注:存在二硫键时重组人源化胶原蛋白可能会形成寡聚体,且其电泳分子量大小可能会成倍增加。寡聚体可视为重组人源化胶原蛋白而非杂质。

### 5.2.11 装量

装量应符合表 2 要求。

表 2 装量要求

规格/g(或 mL)	平均装量	每个容器装量
$\leq 20$	不少于标示装量	不少于标示装量 93%
$> 20$ 且 $< 50$		不少于标示装量 95%
$\geq 50$		不少于标示装量 97%

## 5.3 鉴别

### 5.3.1 氨基酸序列确认

根据《重组胶原蛋白生物材料命名指导原则》对重组人源化胶原蛋白进行定义,重组人源化胶原蛋白是由 DNA 重组技术制备的人胶原蛋白特定型别基因编码的全长或部分氨基酸序列片段,或是含人胶原蛋白功能片段的组合。依据 YY/T 1849—2022 中 8.2 的要求,企业应提供产品全部氨基酸序列用于人源化鉴别,包含胶原蛋白类型、氨基酸长度和编辑情况等信息。氨基酸序列从氮端和碳端应展示为人胶原蛋白某型序列的具体起止位点和编辑方式,例如用“人胶原蛋白 I 型 alpha-1 亚型(380G-641G)x2”表示人胶原蛋白 I 型 alpha-1 亚型 380 位~641 位氨基酸直接连接重复两次。

注 1:本文件适用的用于医疗器械的重组人源化胶原蛋白其氨基酸序列为全部由人胶原蛋白特定型别的氨基酸序列全长或片段组成,最终产品中任一人胶原蛋白功能片段中的氨基酸排列顺序需与人胶原蛋白对应片段的氨基酸排列顺序一致,氮端、碳端和中部如果有人胶原蛋白以外的序列,不适用于本文件。

注 2:“部分氨基酸序列片段”通常指位于同一条人胶原蛋白氨基酸序列内具有一定连续长度能形成稳定结构的氨基酸序列片段。

### 5.3.2 肽段覆盖率(氨基酸序列覆盖度)

根据理论序列进行对比,肽段覆盖率应为 100%。

注:直接使用供试品检测。选择适宜的蛋白酶进行酶解,酶解后选择不小于 5 个连续氨基酸的片段为基本的序列单元进行覆盖分析。

### 5.3.3 末端氨基酸序列

根据理论序列进行对比,应与设计的理论氨基酸序列一致(每年应至少检测一次)。

注 1:其结果需与设计的氨基酸序列完全一致。不含有除人胶原蛋白特定型别氨基酸序列以外的其他氨基酸序列片段。

注 2:样品检测前不经过任何额外处理步骤。

### 5.3.4 肽图

应与参比品肽图一致。

### 5.3.5 分子量

高分辨质谱法分子量应与参比品一致,误差范围 $\pm 1$  Da;SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法分子量电泳条带位置应与参比品一致。

## 5.4 杂质、污染物和添加剂

### 5.4.1 外源性 DNA 残留量

应符合制造商的声称值。

注 1:作为医疗器械使用的原材料,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,确定外源性 DNA 残留量限值。如含重组人源化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。

### 5.4.2 宿主细胞蛋白质残留量

#### 5.4.2.1 大肠杆菌蛋白质残留量

应 $\leq 0.05\%$ (体内植入),或 $\leq 0.1\%$ (外用)。

#### 5.4.2.2 酵母蛋白质残留量

应 $\leq 0.05\%$ (体内植入),或 $\leq 0.1\%$ (外用)。

#### 5.4.2.3 CHO 细胞蛋白质残留量

应 $\leq 0.05\%$ (体内植入),或 $\leq 0.1\%$ (外用)。

### 5.4.3 肽聚糖

应符合制造商的声称值。

注:需根据其致热反应风险规定可接受的限量要求。

#### 5.4.4 添加剂

如果使用了防腐剂、冻干保护剂、交联剂等添加剂,应给出其限量要求。

#### 5.4.5 重金属及微量元素含量

重金属及微量元素含量应符合以下规定:

- a) 对工艺中添加的重金属元素,应符合制造商的声称值;
- b) 重金属总量(以 Pb 计)应 $\leq 10 \mu\text{g/g}$ ;
- c) 微量元素含量:砷(As) $\leq 1 \mu\text{g/g}$ ,汞(Hg) $\leq 4 \mu\text{g/g}$ ,铅(Pb) $\leq 10 \mu\text{g/g}$ ,铬(Cr)、镉(Cd)、铜(Cu)、钼(Mo)、铁(Fe)、镍(Ni)总量应 $\leq 50 \mu\text{g/g}$ 。

#### 5.4.6 残余抗生素含量

应 $\leq 50 \text{ ng/mg}$ 。

#### 5.4.7 残余抗生素活性

应无残余抗生素活性。

#### 5.4.8 微生物限度

如以非无菌的方式提供,每 1 g、每 1 mL 或每 10 cm<sup>2</sup> 需氧菌总数应 $\leq 10^2$  CFU,霉菌和酵母菌菌落数应 $\leq 10$  CFU,不应检出大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌。

#### 5.4.9 无菌

如以无菌的方式提供,结果应无菌。

#### 5.4.10 细菌内毒素

应符合制造商的声称值。

注 1: 作为医疗器械原材料的重组人源化胶原蛋白,细菌内毒素限量要求需考虑最终产品与人体的接触方式,以此来规定细菌内毒素限值要求。

注 2: 若作为植入医疗器械原材料使用,可参考《中华人民共和国药典》对注射剂的要求,人每千克体重每小时最大可接受的内毒素剂量为 5 EU。

### 5.5 结构表征

#### 5.5.1 氨基酸异质性分析

##### 5.5.1.1 脱酰胺化、氧化、糖谱/糖基化修饰等

适用时,应对脱酰胺化、氧化、糖谱/糖基化等修饰进行表征分析,并对其修饰位点、修饰比例进行标示。

##### 5.5.1.2 脯氨酸羟基化

适用时,应进行脯氨酸羟基化分析,结果应符合制造商的声称值。

## 5.5.2 高级结构分析

### 5.5.2.1 概述

如适用,可采用多种方法对重组人源化胶原蛋白高级结构进行研究分析,包括以下列举的方法及其他结构表征方法(如冷冻电镜、蛋白质晶体结构等方法。附录 A 给出了蛋白质高级结构分析方法的示例)。

### 5.5.2.2 圆二色(CD)光谱

适用时,重组人源化胶原蛋白的 CD 谱图应在 195 nm 附近有负峰,在 221 nm 附近有正峰。  
需标示样品的试验检测条件,可按照 YY/T 1849—2022 中 5.7.4 描述的方法进行分析。

### 5.5.2.3 微量差示扫描量热谱

适用时,样品吸收峰( $T_m$  值)应与参比品吸收峰( $T_m$  值)基本一致, $T_m$  值偏差应在标示温度范围内。

注:需标示样品的试验检测条件,在试验条件下有吸收峰表明有结构的变化。

### 5.5.2.4 红外光谱

适用时,红外光谱图的非特征区(如酰胺 A、B)和特征区(如酰胺 I、酰胺 II、酰胺 III)的特征峰位置应与参比品一致。波数偏差应在 $\pm 0.5\%$ 之间。

### 5.5.2.5 拉曼光谱

样品的拉曼光谱图应与参比品一致。

## 6 试验方法

### 6.1 理化性质

#### 6.1.1 外观

用肉眼直接观察。

#### 6.1.2 可见异物

按照《中华人民共和国药典》“可见异物检查法”的第一法“灯检法”进行检测。

#### 6.1.3 水溶解性/盐溶解性

称取适量样品,溶解于  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  一定体积的溶剂中,每隔 5 min 强力振摇 30 s;观察 30 min 内的溶解情况,如无目视可见的溶质颗粒或液滴时,即视为完全溶解。

注:本文件规定的盐溶解性为 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)溶解。

#### 6.1.4 水分

除另有规定外,取样品 1.0 g~2.0 g,按照 YY/T 1849—2022 中 5.2.4 中描述的方法进行检测。

#### 6.1.5 炽灼残渣

除另有规定外,取样品 1.0 g~2.0 g,按照《中华人民共和国药典》“炽灼残渣检查法”进行检测。

### 6.1.6 酸碱度

液体和凝胶样品直接取样,固体样品用生理盐水稀释为 1 mg/mL 按照《中华人民共和国药典》“pH 值测定法”进行检测。

### 6.1.7 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”进行检测。

### 6.1.8 渗透压摩尔浓度

液体和凝胶样品直接取样,固体样品用生理盐水稀释为 1 mg/mL 按照《中华人民共和国药典》“渗透压摩尔浓度测定法”进行检测。

### 6.1.9 总蛋白含量

总蛋白含量的测定按照 YY/T 1849—2022 中 5.6 描述的方法进行检测。

### 6.1.10 纯度

#### 6.1.10.1 色谱法

按照《中华人民共和国药典》“高效液相色谱法”或“分子排阻色谱法”进行检测,按面积归一化法计算纯度。

#### 6.1.10.2 电泳法

如适用,按照 YY/T 1849—2022 中 5.4.1 描述的方法进行检测。

### 6.1.11 装量

按照《中华人民共和国药典》“最低装量检查法”进行检测。

## 6.2 鉴别

### 6.2.1 氨基酸序列确认

根据企业提供的产品氨基酸序列,将氨基酸序列与人胶原蛋白数据库进行比对,如 NCBI 数据库 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。

### 6.2.2 肽段覆盖率(氨基酸序列覆盖度)

按照《中华人民共和国药典》“质谱法”进行检测。

肽段覆盖率的计算,可通过分析软件计算,或按式(1)手工计算。

$$C = \frac{P_1}{P_2} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

$C$  ——肽段覆盖率;

$P_1$  ——检测到的肽段氨基酸数量;

$P_2$  ——蛋白质总氨基酸数量。

注 1: 肽段覆盖率是指检测到肽段的氨基酸数量占该蛋白质总氨基酸数量的比例。蛋白质经过酶切后,采用 LC-MS 进行检测,鉴定到的酶切后肽段占理论序列氨基酸数量的比例。

注 2: 直接使用供试品进行酶切, 不使用电泳跑胶后切胶样品, 且酶解后采用不小于 5 个连续氨基酸的片段为基本的序列单元。

注 3: 如胰蛋白酶或一种酶不能水解, 选择适宜的其他蛋白酶, 结合多种酶切的鉴定结果, 进行肽段覆盖率计算。

### 6.2.3 末端氨基酸序列

使用供试品或者取供试品溶解后, 用氨基酸序列分析仪或质谱法直接测定氮端和/或碳端氨基酸序列。

### 6.2.4 肽图

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”进行检测。

注: 如胰蛋白酶不能水解, 选择适宜的其他蛋白酶。

### 6.2.5 分子量

按照 YY/T 1849—2022 中 5.3.3 描述的方法进行检测。

## 6.3 杂质、污染物和添加剂

### 6.3.1 外源性 DNA 残留量

按照 YY/T 1849—2022 中 5.5.2 描述的方法进行检测。

### 6.3.2 宿主细胞蛋白质残留量

#### 6.3.2.1 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检测。

#### 6.3.2.2 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检测。

#### 6.3.2.3 CHO 细胞蛋白质残留量

采用经验证的酶联免疫试剂盒进行检测。

### 6.3.3 肽聚糖

若重组人源化胶原蛋白的生产过程有可能引入肽聚糖(促炎性污染物)的风险, 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)进行检测。

### 6.3.4 添加剂含量

如果使用了防腐剂、冻干保护剂等添加剂应给出相应的检测方法, 按给出的检测方法进行检测。

### 6.3.5 重金属及微量元素含量

#### 6.3.5.1 重金属总量

按照《中华人民共和国药典》“重金属检查法”进行检测。

#### 6.3.5.2 微量元素含量

按照《中华人民共和国药典》“原子吸收分光光度法”“电感耦合等离子体原子发射光谱法”或“电感耦合等离子体质谱法”进行检测。

#### 6.3.6 残余抗生素含量

残余抗生素含量的测定按照 YY/T 1849—2022 中 5.5.6 描述的方法或其他经验证的方法进行检测。

#### 6.3.7 残余抗生素活性

可采用培养法(微生物法)或其他经验证的方法进行检测,具体按照《中华人民共和国药典》“抗生素微生物检定法”或“抗生素残留量检查法”进行检测。

#### 6.3.8 微生物限度

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”进行检测。

#### 6.3.9 无菌

按照《中华人民共和国药典》“无菌检查法”进行检测。

#### 6.3.10 细菌内毒素

按照《中华人民共和国药典》“细菌内毒素检查法”或“细菌内毒素检查法应用指导原则”(重组 C 因子法)进行检测。

### 6.4 结构表征

#### 6.4.1 氨基酸异质性分析

##### 6.4.1.1 脱酰胺化、氧化、糖谱/糖基化修饰等

按照 YY/T 1849—2022 中 5.7.1 和 5.7.8 描述的方法进行检测。

##### 6.4.1.2 脯氨酸羟基化分析

按照 YY/T 1849—2022 中 5.7.7 描述的方法进行检测。

#### 6.4.2 高级结构分析

##### 6.4.2.1 圆二色(CD)光谱

按照附录 B 规定的方法进行检测。

##### 6.4.2.2 微量差示扫描量热谱

按照附录 C 进行检测。

##### 6.4.2.3 红外光谱

按照《中华人民共和国药典》“红外分光光度法”进行检测。

#### 6.4.2.4 拉曼光谱

按照《中华人民共和国药典》“拉曼光谱法”(建议入射光与所检测的拉曼散射光之间的夹角为 $0^\circ$ 、 $90^\circ$ 或 $180^\circ$ )进行检测。

### 7 稳定性

重组人源化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。重组人源化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人源化胶原蛋白进行。在工艺条件有变化时,应考虑对重组人源化胶原蛋白稳定性的影响,必要时进行再次验证。

### 8 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 的要求对重组人源化胶原蛋白进行相应的生物学评价。

基于部分人胶原蛋白氨基酸序列进行编辑组合重组制备的蛋白质产物,特别是作为植入物长期反复使用时,可能引起人体预测不到的免疫原性。需进行免疫学研究,试验方法可参照 GB/T 16886.20 及 YY/T 1465(所有部分)进行。

重组人源化胶原蛋白作为医疗器械用原材料,可采用适宜方法,进行免疫学评价。若用动物进行免疫学试验,可能因为动物模型与临床应用之间存在种属差异,带来对评价试验结果或评价试验数据使用上的局限,应当根据临床试验获得的免疫学评价数据及动物模型获得的免疫评价数据进行综合评价分析。

### 9 包装、运输和贮存

应符合 YY/T 1849—2022 中 8.1、8.2 的规定。

**附 录 A**  
**(资料性)**  
**蛋白质晶体结构信息**

### A.1 重组人源化胶原蛋白结构的设计

如适用,重组人源化胶原蛋白在材料设计阶段,筛选人胶原蛋白片段时,可选择蛋白质晶体学方法,确认原子结构信息,进行结构解析验证。

### A.2 蛋白质晶体学

用试验手段,通过对重组人源化胶原蛋白所含的人胶原蛋白型别的氨基酸序列(全长或部分)制备蛋白质单晶。利用 X 射线晶体学等方法收集晶体衍射数据,解析该晶体的原子结构(一般要求结构分辨率优于 3 埃)。

**注 1:** 制备蛋白质单晶是指利用纯化的包含人胶原蛋白特定型别氨基酸序列的蛋白或多肽,制备出周期有序重复排列结构的晶体,包括但不限于气相扩散法、微量透析法、微量静置法等。其特征是在 X 射线照射下能产生高分辨率的衍射信号并解析出晶体的原子结构(一般要求结构分辨率优于 3 埃)。

**注 2:** 目前大部分胶原蛋白的结构信息来自 X 射线晶体学方法。考虑技术进步等原因,如果能采用其他方法解析得到包含人胶原蛋白特定型别氨基酸序列的原子结构(一般要求结构分辨率优于 3 埃),包括但不限于核磁共振波谱法(NMR)、电镜技术(EM)等,可视与 X 射线晶体学方法等效。

### A.3 晶体结构占比标注

若通过蛋白质晶体学解析出结构,并被国际蛋白质数据库(PDB)验证和收录,可标注晶体结构占整个蛋白产品序列的百分比(X%)。

**注 1:** 可解析重组人源化胶原蛋白中包含的某段人胶原蛋白片段氨基酸序列的高分辨率晶体结构信息(分辨率优于 3 埃),描述其具体的三螺旋结构参数,计算有结构信息的序列占整个蛋白产品序列的百分比(X%)。可提示样品的 X%的氨基酸序列具有形成胶原蛋白三螺旋结构的能力。

**注 2:** 重组人源化胶原蛋白所含的人胶原蛋白特定型别的氨基酸序列(全长或部分)可以通过蛋白质晶体学的方法解析高分辨率原子结构,对供试品形成三螺旋高级结构的功能进行辅助表征。所提供的原子结构坐标需通过国际蛋白质结构数据库的校验,其三螺旋结构参数需与已报道的胶原蛋白三螺旋结构保持一致。

**附 录 B**  
(规范性)  
**圆二色(CD)光谱分析法**

**B.1 试验原理**

一束入射的平面偏振光可以看作由两束振幅相同相位相反的左、右圆偏振光组成的偏振光,当其通过光学活性分子后,光学活性分子对左、右圆偏振光的吸收也不同,引起左、右圆偏振光振幅的变化,使左、右圆偏振光透过后组成了椭圆偏振光,振动平面偏离入射振动平面,形成一定夹角,这种现象称为圆二色性。圆二色谱扫描就是利用蛋白质的圆二色性及不对称分子对左右圆偏振光吸收的不同来进行结构分析。蛋白质是由氨基酸通过肽键连接而成的具有特定结构的生物大分子。在蛋白质或多肽中主要的光活性基团是肽链骨架中的肽键、芳香氨基酸残基及二硫键等。当平面圆偏振光的吸收不相同,产生吸收差值。由于这种吸收差的存在,造成了偏振光矢量的振幅差,圆偏振光变成了椭圆偏振光,这就是蛋白质的圆二色性。通过蛋白质的圆二色性的原理,判断重组人源化胶原蛋白样品的结构变化。

**B.2 试验仪器、材料和试剂**

试验用仪器、材料和试剂如下:

- a) 圆二色光谱仪;
- b) 石英比色皿(0.5 mm、0.1 mm)、制冰机;
- 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) 樟脑磺酸(CSA)标准品;
- e) 氯化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)、十二水合磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )、磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ );
- f) 去离子水。

**B.3 试验步骤和方法****B.3.1 样品制备****B.3.1.1 配制磷酸盐缓冲溶液(PBS)1×**

在 800 mL 蒸馏水中溶解 8 g NaCl、0.2 g KCl、3.62 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  和 0.24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,用 HCl 调节溶液的 pH 至 7.4 加水定容至 1 L,高压灭菌后,保存于室温,若保存时间大于 1 周,使用时需经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤。

**B.3.1.2 样品前处理**

用 PBS 或其他经验证适宜的溶剂溶解或稀释样品。

注:需标示样品前处理条件。

**B.3.2 标准品校正**

用樟脑磺酸(CSA)标准品溶液对设备状态进行确认,可设定扫描波长 180 nm~340 nm,采集 1 mg/mL 标准品溶液的圆二色远紫外吸收,对其波峰波谷 CD 值的比值进行计算,有效比值范围为  $2.08 \pm 0.06$ ,同时进行背景测试、空白缓冲液测试。

### B.3.3 仪器参数设定

带宽:1.0 nm,步长:1.0 nm,扫描范围:190 nm~260 nm,时间点:1 s,扫描速率:50 nm/min,重复次数:3次,测试温度根据样品情况确定。

### B.3.4 样品 CD 扫描

供试品检测采用适宜的溶剂将样品稀释到 CD 光谱仪的检测灵敏度范围,含盐浓度高的样品可使用超滤管进行浓缩及缓冲液置换,供试品在 190 nm~260 nm 远紫外扫描并采集数据。

注:样品检测推荐稀释成 1 mg/mL,设备检测扫描温度设置为经验证适用的条件(通常 4 ℃~37 ℃)。

### B.3.5 扫描图谱处理

对扫描后的所有图谱用仪器自带软件(如 subtract baseline 和 smoothing 等)进行处理。

**附 录 C**  
**(规范性)**  
**微量差式扫描量热法**

### C.1 试验原理

微量差示扫描量热法是研究物质受热过程所发生的晶型转变、熔融、蒸发等物理变化或热分解、氧化等化学变化以及伴随发生的温度、能量或质量改变的方法。蛋白质在受热过程中因为自身结构的改变可能会出现吸热或放热现象,通过测量输入给样品和参比物的功率差和温度的关系,可以反映出蛋白质本身可能具有的结构特征。目前微量差示扫描量热法(DSC)是研究蛋白质多级结构变化的主要手段之一,主要用于研究特定升温速率下的蛋白吸放热情况,判断其在不同温度下多级结构的变化。本试验以空白溶剂为参比,检测重组人源化胶原蛋白溶液在受热升温过程中胶原蛋白的吸放热情况,以反映该样品在待测状态时存在的蛋白结构特征。

### C.2 试验仪器、材料和试剂

试验用仪器、材料和试剂如下:

- a) 微量差示扫描量热仪(灵敏度:0.2  $\mu$ W),制冰机;
- b) 供试品和参比品:包括名称、性状、浓度或质量、纯度、保质期等信息;
- c) 空白缓冲液(PBS):在 800 mL 蒸馏水中溶解 8 g NaCl、0.2 g KCl、3.62 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  和 0.24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,用 HCl 调节溶液的 pH 至 7.4,加水定容至 1 L,高压灭菌后保存于 4  $^{\circ}\text{C}$ 。

### C.3 试验步骤和方法

#### C.3.1 样品制备

将供试品和参比品用空白缓冲液稀释至蛋白质量浓度约 1 mg/mL。

注:需标示样品前处理条件。

#### C.3.2 仪器扫描参数设定

检测选择温度扫描范围为 15  $^{\circ}\text{C}$ ~90  $^{\circ}\text{C}$ ,升温速率为 1.5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。

#### C.3.3 样品 DSC 扫描

在测定池中缓慢加入空白缓冲液,拧紧加压盖后进行扫描。待基线响应值小且重复性良好,进行供试品和参比品测定。抽去样品池中的溶液,缓慢加入处理后的供试品或参比品至样品池,拧紧加压盖后进行扫描。

#### C.3.4 扫描图谱处理

通过 DSC 仪器分析软件,分析测定样品数据。

参 考 文 献

- [1] 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
  - [2] YY/T 1465(所有部分) 医疗器械免疫原性评价方法
  - [3] 重组胶原蛋白生物材料命名指导原则
  - [4] ASTM F3089-2014 Standard Guide for Characterization and Standardization of Polymerizable Collagen-Based Products and Associated Collagen-Cell Interaction
  - [5] ASTM F2212-2019 Standard Guide for Characterization of Type I Collagen as Starting Material for Surgical Implants and Substrates for Tissue Engineered Medical Products (TEMPs)
-