

《重组人源化胶原蛋白》标准编制说明

一、任务来源及背景

按照国家药监局综合司关于《重组人源化胶原蛋白》医疗器械行业标准立项的通知（药监综械注〔2022〕44号）的有关规定和要求，标准计划项目《重组人源化胶原蛋白》（项目编号：N2022001-T-qs）由国家药监局医疗器械技术审评中心归口，标准起草单位：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、江苏创健医疗科技有限公司、上海中科新生命生物科技有限公司。

二、制定标准的必要性和重要意义

重组人源化胶原蛋白是采用重组 DNA 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片段，或是含人胶原蛋白功能片段的组合。重组人源化胶原蛋白制备技术，是我国具有自主知识产权的原创技术，具有国际领先地位。为推动我国原创技术在重组人源化胶原蛋白领域占领国际先机，有效促进重组人源化胶原蛋白生物新材料的基础研究、产品研发、产业的高效发展和临床的有效应用，最终引导行业规范、有序的发展，亟需制定重组人源化胶原蛋白的行业标准。

重组人源化胶原蛋白具有型别明确、组织生物相容性高、水溶性好、结构明确、生物活性优、可稳定大规模生产等优势。作为重要的新型生物医学材料和工业材料，重组人源化胶原蛋白预计将在手术缝合线、止血纤维、代血浆、水凝胶、敷料、人工皮肤、人工血管、人工骨和骨修复、角膜、神经修复等临床应用中发挥重大的作用。因此，重组人源化胶原蛋白在生物材料领域拥有广阔的应用前景。积极推动重组人源化胶原蛋白行业标准制定和成果转化，有望为我国取得该领域的国际先发优势，占据科技制高点，具有重大的社会效益和经济效益。

三、主要起草验证过程

2021年12月17日由国家药品监督管理局主持召开重组人源化胶原蛋白创新生物材料专题会，张兴栋院士介绍重组人源化胶原蛋白创新生物材料有关情况和建立专用标准的意见建议。会议最终确定，组织本领域专家组成标准研制专班，开始进行重组人源化胶原蛋白专用标准的研制工作。

2022年1月28日国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心组织召开重组人源化胶原蛋白标准专家组工作启动会，提出重组人源化胶原蛋白标准体系建设具有国际领先性、任务的重要性，是具有里程碑意义的重大工作，要坚持科学规范的原则，推进重组人源化胶原蛋白生物材料标准制定工作。

2022年3月28日国家药品监督管理局医疗器械标准管理中心发布关于征求《重组人源化胶原蛋白》医疗器械行业标准申请立项项目意见的通知，征求意见截止时间为2022年4月11日。

2022年4月24日国家药品监督管理局批准《重组人源化胶原蛋白》医疗器械行业标准制修订项目立项。按照《医疗器械标准制修订工作管理规范》有关要求，采用快速程序开展标准制订。

2022年4月26日国家药品监督管理局医疗器械注册司召开了重组人源化胶原蛋白行业标准推进会议，第一起草单位介绍了目前标准工作的研究进展，会议确定了标准起草单位和验证单位，共同协力完成标准制定和验证任务。同时开始面向全国相关企业征集标准验证样品，通过国家药品监督管理局协调，第一起草单位面向全国已有重组胶原蛋白企业发出征集样品需求，于4月27日第一次征集，考虑到广泛性于5月4日再次征集，最后征集到两家企业提供标准验证样品。

2022年5月8日完成样品征集工作，确定验证方案，保证草案中的每项指标有2家及2家以上的验证结果。按验证项目邮寄盲样给各验证单位。开展验证工作。

2022年5月30日开始收集、汇总分析各家验证结果，对各验证单位意见进行处理，形成验证总结报告。

九家验证单位按照验证单位分工、验证要求书及验证方案对企业提供的样品盲样按标准草案中推荐的试验方法进行验证，最终共收集九家验证单位27项验证数据；根据相关单位的验证结果，起草组对标准草案进行完善，并于2022

年6月8日、6月11日、6月20日组织标准起草单位和验证单位进一步研讨，完善和确定标准草案各项内容，形成标准草案讨论稿。

为进一步扩大各相关方对标准制定工作的参与，达成更广泛深入的共识，做到公开、透明、高效，国家药品监督管理局医疗器械审评中心于7月4日组织召开《重组人源化胶原蛋白》标准草案（工作组讨论稿）研讨视频会。来自重组人源化胶原蛋白标准工作专家组的专家及标准起草和验证单位有关人员，共计32人参加了本次会议。

标准起草小组介绍了标准草案的验证和修改情况。参会专家对标准草案逐条讨论，提出如下修改意见：

（1）在标准范围中增加“注：本文件中验证的样品是基于重组III型人源化胶原蛋白材料。其它重组人源化胶原蛋白原材料如适用，可参考本文件。”

（2）术语和定义修改：

1) 增加了“YY/T 1849-2022界定的术语和定义适用于本文件”；

2) 重组人源化胶原蛋白定义增加“引用文献”；

3) 参照ASTM标准修改了人胶原蛋白型别术语；

4) 将“人胶原蛋白功能片段”修改为“人胶原蛋白片段”，定义“位于同一条人胶原蛋白氨基酸序列内具有一定天然连续长度的至少连续21个氨基酸序列片段”修改为“位于同一条人胶原蛋白氨基酸序列内具有一定天然连续长度的氨基酸序列片段。注：研究文献显示，人胶原蛋白序列中一般需具备天然连续21个氨基酸片段才能形成稳定的结构等”。

（3）扫描电镜观察项目由于不同蛋白经冷冻干燥后可能也呈多孔网状结构，不能完全证实只是重组人源化胶原蛋白的特征，将该指标删除。

（4）将“人源化鉴别”修改为“氨基酸序列确认”；“其序列”修改为“最终产品”；删除“若重组胶原蛋白的氨基酸序列不满足此要求，则不属于重组人源化胶原蛋白的定义范畴，不适用于本标准的描述”。

（5）分子量、细菌内毒素、氨基酸异质性分析、包装、运输和贮存修改为引用YY/T 1849-2022标准要求。

（6）高级结构分析中删除“如适用，下述选项中至少满足2项检测项目要求，表明所测蛋白具有形成三螺旋结构的能力的描述”；圆二色（CD）光谱：将“注：可提示样品在实验检测条件下，可（否）具有形成三螺旋结构能力修

改为“可提示样品在实验检测条件下，可按照YY/T 1849-2022中5.7.4方法分析”；蛋白质晶体结构：移出标准正文作为资料性附录；差示扫描量热谱：将“注”修改为“应标示样品的实验检测条件”。

(7) 生物学评价 将标准草案中“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，特别是长期反复使用时，可能引起人体预测不到的免疫原性。因此，如果不能排除免疫原性风险，宜增加免疫学研究。试验方法可参照GB/T 16886.20及YY/T 1465系列标准”修改为“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系列标准”。

将标准草案中“重组人源化胶原蛋白作为医疗器械用原材料，免疫学评价时应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”修改为：“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”。

(8) 附录A“A.3.1.2 样品前处理中“注：样品前处理推荐使用PBS缓冲液进行溶解或稀释，溶解或稀释的样品在检测温度条件下过夜平衡修改为应标示样品前处理条件”，“A.3.3 仪器参数设定，测试温度：4℃修改为测试温度根据样品情况确定”；附录B“B.3.1 样品制备中注：样品前处理推荐使用PBS缓冲液进行溶解或稀释，溶解或稀释的样品在2-8℃条件下过夜平衡修改为应标示样品前处理条件”。

会后标准起草小组根据本次专家会达成的修改共识，完善了标准草案，形成了《重组人源化胶原蛋白》征求意见稿，并按照标准快速制定程序，报送标管中心，向全社会公开征求意见，同时向相关监管部门（国家药品监督管理局医疗器械注册司和监管司、中国食品药品检定研究院、食品药品审核查验中心、

药品评价中心)定向征求意见。

四、标准编制原则和确定标准主要内容的依据

本标准按照 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。本标准起草时参考了《中华人民共和国药典》“人用重组 DNA 蛋白制品总论”及各种检测方法、YY/T 1849-2022《重组胶原蛋白》、YY/T 0954-2015《无源外科植入物 I 型胶原蛋白植入剂》、ASTM F3089-2014《可聚合胶原基产品及相关的胶原-细胞相互作用的表征和标准化指南》。

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,表达体系的差异,氨基酸序列和理化性质差异较大。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和(或)潜在的成品相关物质和工艺相关物质进行鉴别、理化、纯度、杂质等检测分析。

因此本标准编制时主要考虑了以下技术内容(涵盖检测项目、技术要求和试验方法等),包括理化项目[外观、可见异物、水溶性/盐溶性、水分、炽灼残渣、酸碱度、等电点、渗透压摩尔浓度、总蛋白含量、纯度(色谱法、电泳法)、装量等]、鉴别[氨基酸序列确认、肽段覆盖率(氨基酸序列覆盖度)、末端氨基酸序列、肽图、分子量]、杂质、污染物和添加剂[外源 DNA 残留量、宿主细胞蛋白质残留量(大肠杆菌蛋白质残留量、酵母蛋白质残留量、CHO 细胞蛋白质残留量)、肽聚糖、添加剂含量、无菌、微生物限度、重金属总量及微量元素含量、抗生素含量/活性、细菌内毒素]、结构表征(氨基酸异质性分析、高级结构分析)等。

五、主要实验验证情况

验证单位: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)、四川大学、中科院生物物理研究所、上海中科新生命生物科技有限公司、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。

标准起草小组中的生产企业按照该标准草案的检测项目和推荐的试验方法,提供重组人源化胶原蛋白原材料的相应检测报告。验证单位使用企业提供的盲

样，按照标准草案的技术要求和推荐的试验方法进行了验证，主要试验验证结果部分总结如下：

1、水溶解性/盐溶解性 称取样品 101 mg 两份，各用水和 PBS 溶液 1mL 于 25℃±2℃进行溶解，每隔 5 分钟强力振摇 30 秒；观察 30 分钟内的溶解情况，无目视可见的溶质颗粒或液滴，判断在水和 PBS 的溶解度结果为易溶，推荐的试验方法具有可行性。

2、水分 按照《中华人民共和国药典》2020年版 四部通则 0832 水分测定法第二法（烘干法）测定，或按照《中华人民共和国药典》2020年版 四部通则 0661热分析法 的热重法（TG）测定，根据试验验证结果，结果均≤10%，符合标准限度要求，推荐的试验方法具有可行性。

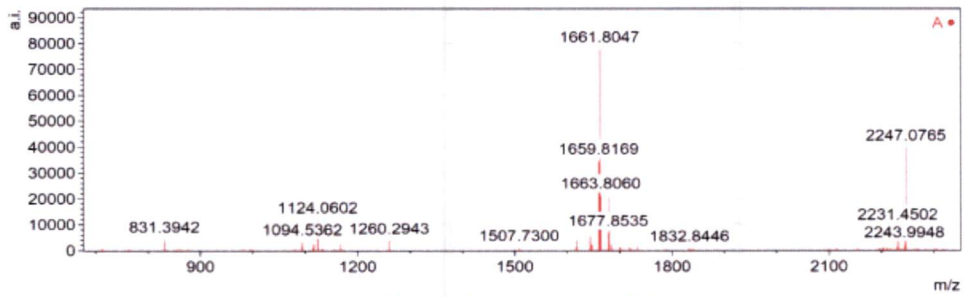
3、等电点 采用《中华人民共和国药典》0541 电泳法 第六法（等电聚焦电泳法）来测试标准品（pI marker）和供试品的等电点。根据试验验证结果，A样 pI在8.6~9.6之间；B样pI在8.1-8.8之间，推荐的试验方法具有可行性。

4、总蛋白含量 按照《中华人民共和国药典》四部通则 0731 蛋白质含量测定法 第一法（凯氏定氮法）检测或 YY/T 1805.3 -2022《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》规定进行检测。根据试验验证结果，结果均在 80 %~120 %之间，推荐的试验方法具有可行性。

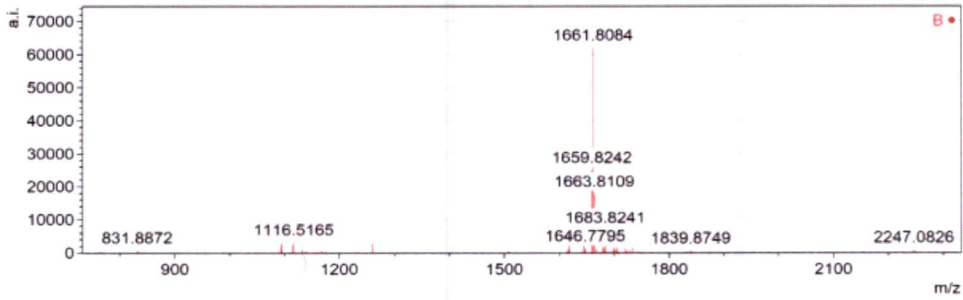
5、纯度 按照《中华人民共和国药典》四部通则 0521 高效液相色谱法 或 0514 分子排阻色谱法进行检测，根据试验验证结果，反向色谱法：A样品：99.96%；B样品：98.75%；均≥95%，推荐的试验方法具有可行性。

6、氨基酸序列确认 鉴别人源化序列，A样品提供了含480个氨基酸的完整序列，B样品未提供全部序列，提供了19条酶切肽段序列。根据酶切肽段质谱情况分析，A样品和A参比品质谱结果一致，经对比与A样品理论序列一致；B样品和B参比品质谱结果一致，经企业确认，与B样品提供的理论序列一致，推荐的试验方法具有可行性。

A样品/A参比品：提供了完整氨基酸序列，验证结果如下：



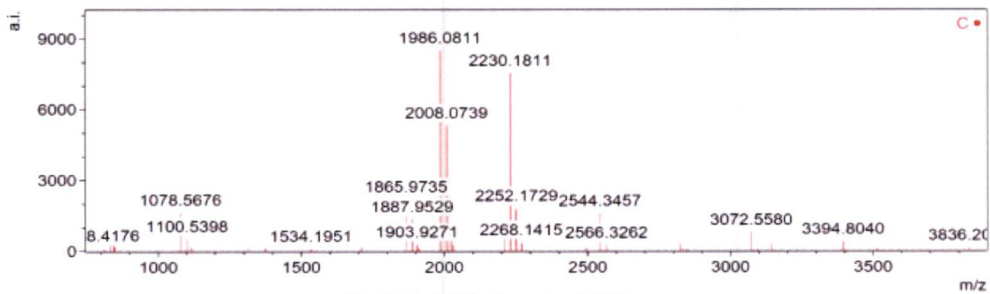
A 样品酶解肽段一级质谱



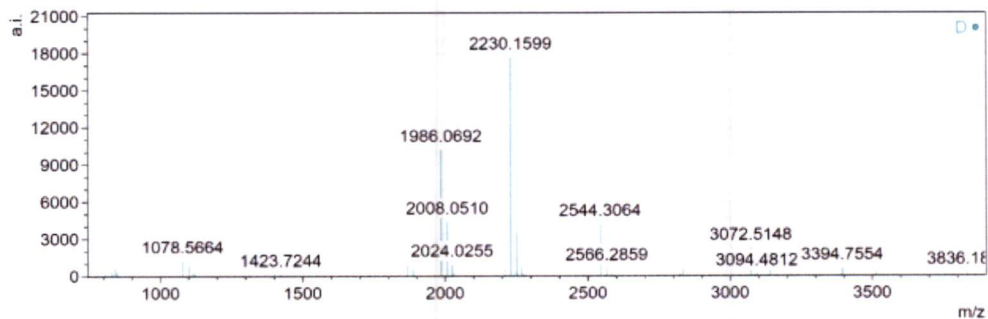
A 参比品酶解肽段一级质谱

检索数据库，A 样品氨基酸序列与人胶原蛋白 III 型序列片段一致，不含非人胶原蛋白氨基酸序列。

B 样品/B 参比品：B 样品共提供了 19 个酶切肽段序列，验证结果如下：



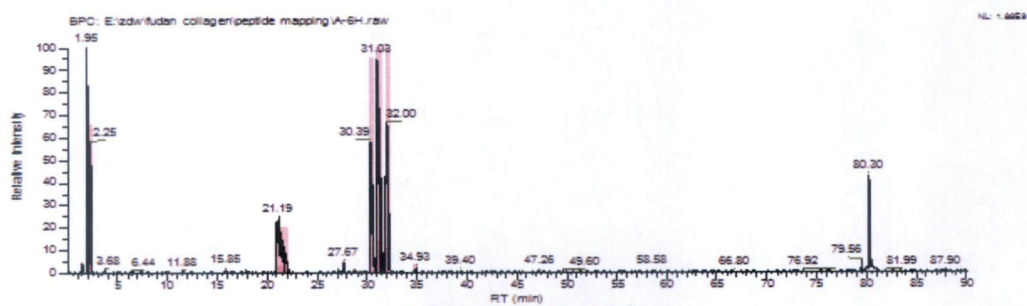
B 样品酶解肽段一级质谱



B 参比品酶解肽段一级质谱

B 样品鉴于企业机密，完整的氨基酸序列未知，无法与生物数据库中的人胶原蛋白全长氨基酸序列进行比对，无法对其进行溯源化鉴别。

7、肽段覆盖率 按照《中华人民共和国药典》2020年版 四部通则 0431质谱法进行测定，根据试验验证结果，A样和B样覆盖率均为100%，推荐的试验方法具有可行性。



A 样品 TIC 色谱图

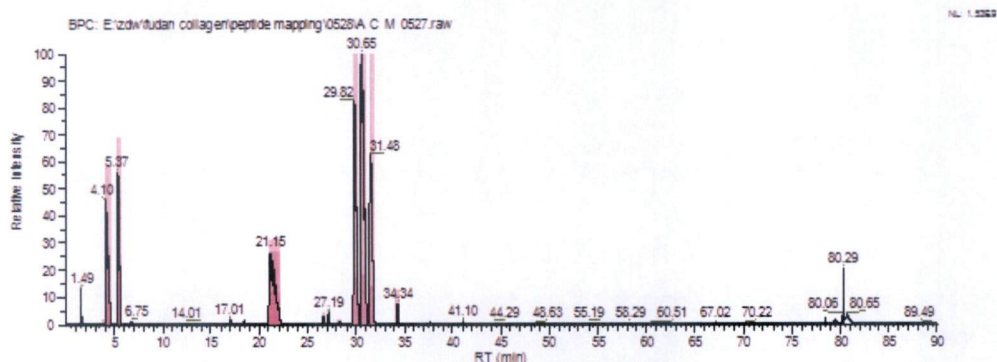
Sequence Coverage Map - User Defined

Created on 06/01/22 by dell
 Data Folder = E:\zdw\fudan collagen\peptide mapping\
 Minimum MS Signal = 0
 Data File = A-6H.raw
 Protease = Trypsin

Proteins	Number of MS Peaks	MS Peak Area	Sequence Coverage	Abundance (mol)
1:chain 1	74	100.0%	100.0%	0.0000%
Unidentified	0	0.0%		

Minimum Recovery = 0%
 Minimum Recovery of Overlapping Peptides = 0%
 Minimum Confidence = 0
 Maximum Mass = 20000

A样品肽图序列覆盖度结果



A 参比品 TIC 色谱图

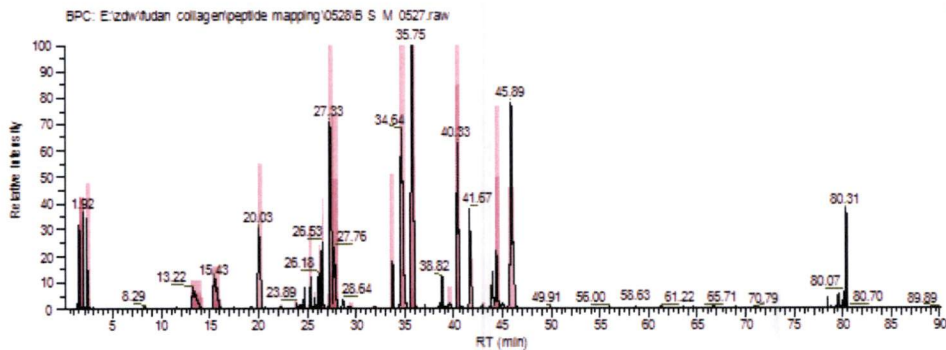
Sequence Coverage Map - User Defined

Created on 06/01/22 by dell
 Data Folder = E:\zdw\fudan collagen\peptide mapping\0528\
 Minimum MS Signal = 0
 Data File = A C M 0527.raw
 Protease = Trypsin

Proteins	Number of MS Peaks	MS Peak Area	Sequence Coverage	Abundance (mol)
1:chain 1	77	100.0%	100.0%	0.0000%
Unidentified	0	0.0%		

Minimum Recovery = 0%
 Minimum Recovery of Overlapping Peptides = 0%
 Minimum Confidence = 0
 Maximum Mass = 20000

A参比品肽图序列覆盖度结果



B 样品 TIC 色谱图

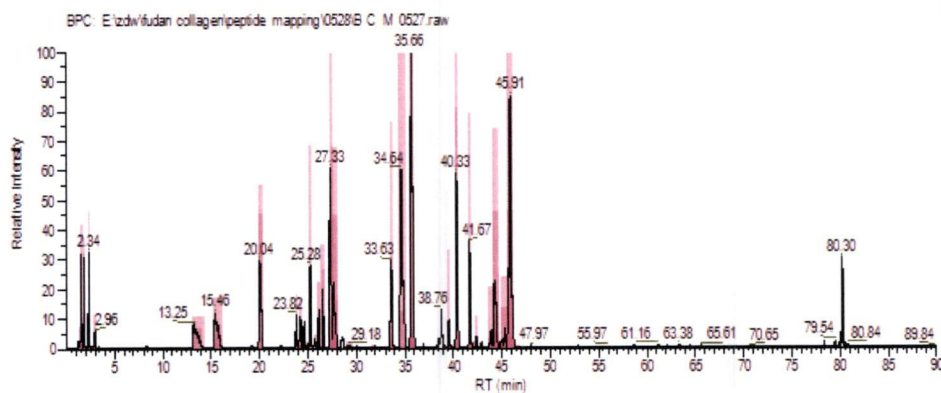
Sequence Coverage Map - User Defined

Created on 06/01/22 by dell
 Data Folder = E:\zdw\fidan collagen\peptide mapping\0528\
 Minimum MS Signal = 0
 Data File = B S M 0527.raw
 Protease = Trypsin

Proteins	Number of MS Peaks	MS Peak Area	Sequence Coverage	Abundance (mol)
1:chain 1	178	100.0%	100.0%	100.00%
Unidentified	0	0.0%		

Minimum Recovery = 0%
 Minimum Recovery of Overlapping Peptides = 0%
 Minimum Confidence = 0
 Maximum Mass = 20000

B样品肽图序列覆盖度结果



B 参比品 TIC 色谱图

Sequence Coverage Map - User Defined

Created on 06/01/22 by dell
 Data Folder = E:\zdw\fidan collagen\peptide mapping\0528\
 Minimum MS Signal = 0
 Data File = B C M 0527.raw
 Protease = Trypsin

Proteins	Number of MS Peaks	MS Peak Area	Sequence Coverage	Abundance (mol)
1:chain 1	184	100.0%	100.0%	100.00%
Unidentified	0	0.0%		

Minimum Recovery = 0%
 Minimum Recovery of Overlapping Peptides = 0%
 Minimum Confidence = 0
 Maximum Mass = 20000

B参比品肽图序列覆盖度结果

8、末端氨基酸序列 用氨基酸序列分析仪和质谱法进行测定，A样品氮末端序列为GERGAPGFRGPAGPNGIPGEK、碳末端序列为GPAGERGAP；B样品氮末端序列为AGNTGAPGSPGVSGPK、碳末端序列为GPPGNPGAPGSPGPAGQQGAIGSPGPAHHHHHH，均与理论序列一致，推荐的试验方法具有可行性。

9、肽图 按照《中华人民共和国药典》2020年版 四部通则 3405 肽图检查法第一法（胰蛋白酶裂解-反相高效液相色谱法）进行测定，根据试验验证结果，A样和B样肽图与参比品肽图一致，推荐的试验方法具有可行性。

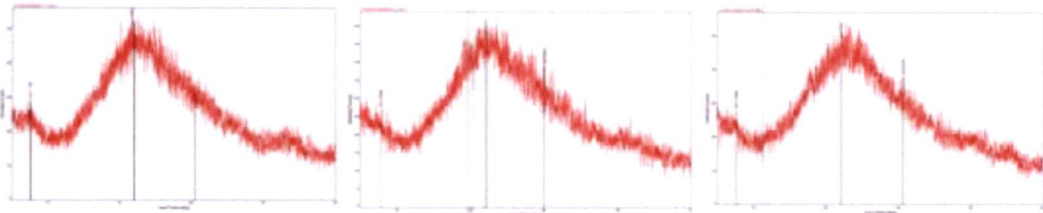
10、外源DNA残留 按照《中华人民共和国药典》2020年版 四部通则 3407 外源性DNA残留量测定法的荧光染色法或定量PCR法进行检测，根据试验验证结果，荧光染色法A样品1.0497ng/mg；B样品0.63ng/mg，定量PCR法A样0.27pg/mg，B样6.4pg/mg，荧光染色法与PCR法两个方法检测结果存在差异，是由于方法检测限和灵敏度的区别，推荐的试验方法具有可行性。

11、残余抗生素含量 采用液质联用的方法检测，A样和B样均小于 ≤ 10 ng/mg，推荐的试验方法具有可行性。

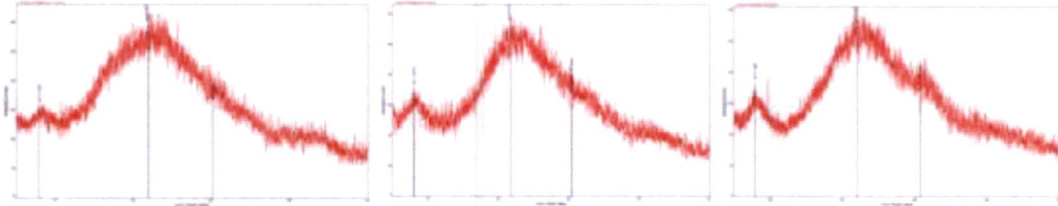
12、氨基酸异质性分析 使用高分辨率色谱质谱技术（LCMS-QTOF）对样品胰蛋白酶酶解产物进行肽图指纹图谱分析，根据试验验证结果，A样品鉴定到脱酰胺修饰，未鉴定到氧化等修饰。B样品鉴定到脱酰胺修饰、氧化等修饰。所以全面的异质性分析是必要的，推荐的试验方法具有可行性。

13、高级结构表征

a) X射线衍射谱 按照《中华人民共和国药典》0451 X射线衍射法第二法（粉末X射线衍射法）检测，根据试验验证结果，X射线衍射仪检测变性前后样品和参比品，样品X射线衍射谱应有3个主要的衍射峰，分别位于 $d=11 \times 10^{-10}$ m， $d=4 \times 10^{-10}$ m和 $d=2.9 \times 10^{-10}$ m附近；其中在 $d=2.9 \times 10^{-10}$ m附近的衍射峰不显著。变性后 $d=4 \times 10^{-10}$ m处衍射峰消失不明显。利用X射线衍射进行结构表征需进一步研究，此项目暂不定入标准中。



A 样品变性前后X射线衍射图谱

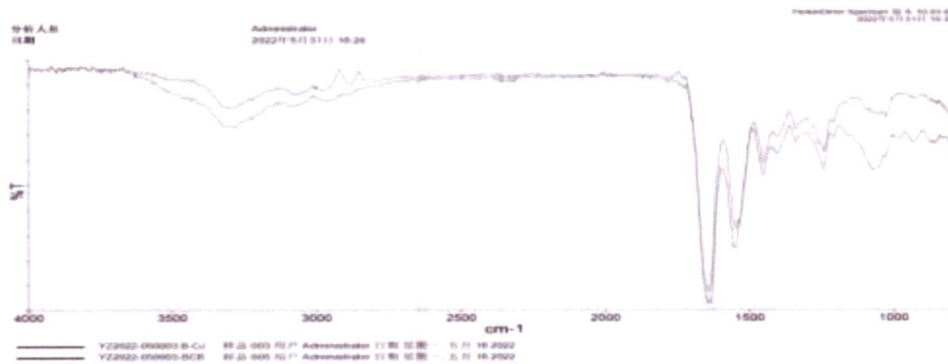


B 样品变性前后X射线衍射图谱

b) 红外光谱 按照《中华人民共和国药典》2020年版 四部通则 0402 红外分光光度法检测，A 样品和 A 参比品；B 样品与 B 参比品红外光谱图非特征区（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，推荐的试验方法具有可行性。



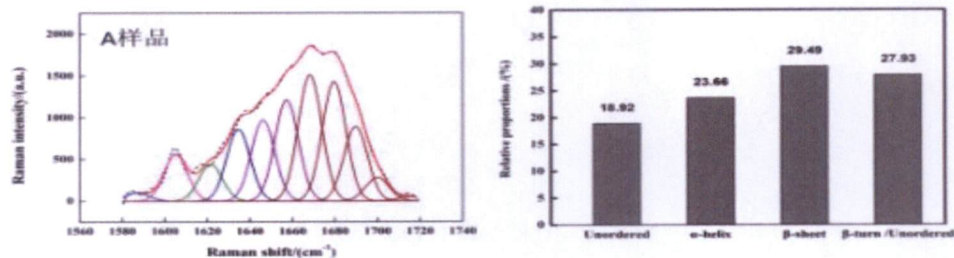
A样和A参比品红外光谱图



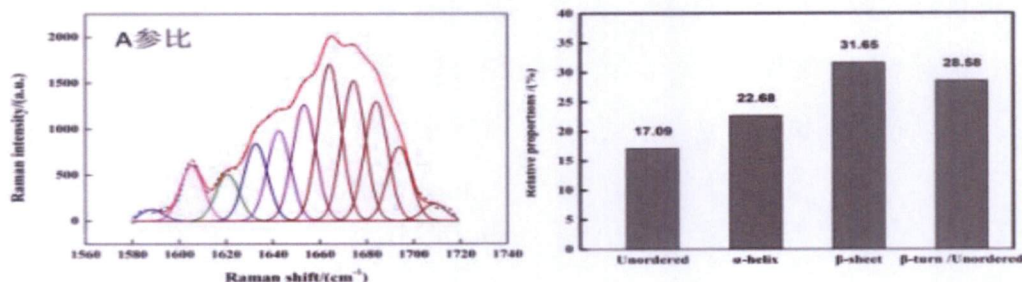
B样和B参比品红外光谱图

c) 拉曼光谱 按照《中华人民共和国药典》2020年版 四部通则 0421 拉曼光谱法，入射光与所检测的拉曼散射光之间的夹角为 0° 、 90° 或 180° ，进行测定。A样品和A参比品；B样品与B参比品拉曼光谱图基本一致，推荐的试验方法具有可行性。

A 样品拉曼光谱谱图：

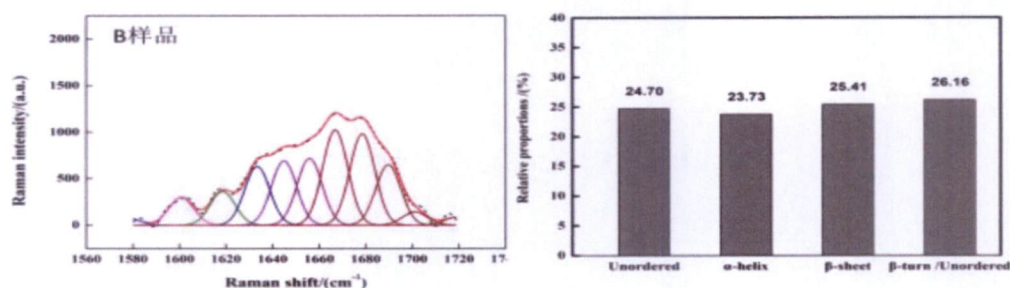


A 参比品拉曼光谱谱图：

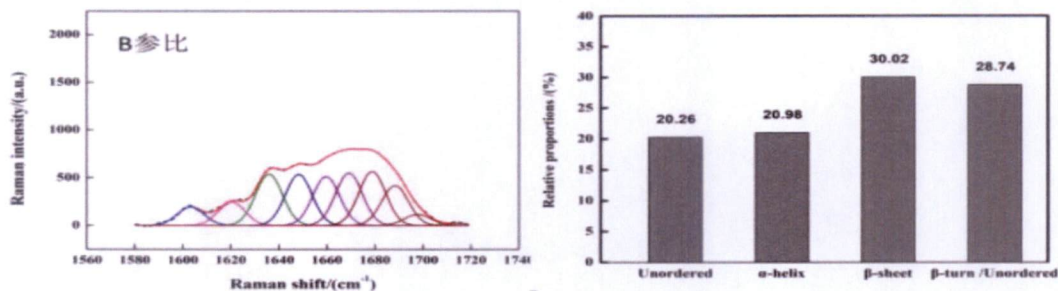


A 样品和 A 参比品拉曼光谱图

B 样品拉曼光谱谱图：



B 参比品拉曼光谱谱图：



B 样品和 B 参比品拉曼光谱图

六、采用国际标准或国外先进标准程度的说明，以及与国内外同类标准的对比情况

目前国际或国外尚未见有适用于医疗器械用重组人源化胶原蛋白原材料的标准。国内外目前有针对组织提取 I 型胶原蛋白的相关标准和重组胶原蛋白标准，如 YY/T 0954 -2015《无源外科植入物 I 型胶原蛋白植入剂》、YY/T 1849-2022《重组胶原蛋白》、ASTM F2212-2019《组织工程医（TEMPs）外科植入物和基质用 I 型胶原蛋白的特性标准指南》。

七、与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系。

与现行法律、法规和强制性国家标准无冲突。

八、重大分歧意见的处理依据和结果的说明

目前无重大分歧意见。

九、作为强制性行业标准或推荐性行业标准的建议

建议作为推荐性行业标准。

十、贯彻标准的要求和措施建议

标准发布后，适时召开标准宣贯会议。向生产企业、监管部门、技术评审部门、检验机构及其它相关使用单位发放标准宣贯资料，并解答标准中相关技术难点和疑点。建议本标准从发布之日起6个月后开始实施。

十一、废止现行有关标准的建议

无。

十二、其他应予说明的事项

按照国家药品监督管理局办公厅国家药监局综合司关于《重组人源化胶原蛋白》医疗器械行业标准立项的通知（药监综械注〔2022〕44号）的有关规定和要求，本标准采用快速程序开展标准制订，公开征求意见周期为一个月。

《重组人源化胶原蛋白》标准起草工作组

2022年07月19日