

YY/T XXXX.2 《生物医用材料体外降解性能评价方法 第2部分：贻贝黏蛋白》标准编制说明

一、工作简况

1、任务来源

根据药监综械注〔2020〕48号《国家药监局综合司关于印发2020年医疗器械行业标准制修订计划项目的通知》确定的标准制修订工作计划，由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会归口，江阴贝瑞森生化技术有限公司等负责制订《生物医用材料体外降解性能评价方法 第2部分：贻贝黏蛋白》（项目编号：N2020061-T-JN）。

2、工作过程

在接到标准制定任务后，标准起草工作组在对国内外相关标准进行认真研究，于2020年3月召开首次视频工作组会议，召集共同验证单位确定工作组讨论稿和标准验证方案。经过前期开展的调研、验证和起草工作，于2020年7月份发出征求意见稿，向各有关单位征求意见。

3、标准体系

生物医用材料体外降解性能评价方法，包括以下部分：

- 第1部分：可降解聚酯类；
- 第2部分：贻贝黏蛋白。

有关其他生物医用材料体外降解性能评价用标准试验模型将有其他部分的标准。

二、标准编制原则和确定标准主要内容的依据

标准修订工作组按照GB/T 1.1—2020的规则制定本文件。

不同种类生物医用材料其作用机理和降解途径差异巨大。因此，建立学科而稳定的生物医学材料体外降解模型和评价方法是研究生物医学材料性能的基础，可以广泛用于生物医学材料的性质研究和产品开发，也可用于相关产品的质量控制方法。本文件中相关内容的解释如下：

（一）关键问题和研究思路

当前针对高分子可降解生物材料体内降解研究只是评价了降解过程中材料的各项物化性能以及对植入部位的影响，而对于材料在体内的吸收、分布、代

谢、排泄、残留的研究尚欠缺，也没有有效的评估方法。针对贻贝黏蛋白这种新型材料的降解研究更是空白。贻贝黏蛋白生物性能主要是指产品在应用到体内时，发生酶解或水解并有可能引发免疫反应的属性。人体的不同部位有着截然不同的生理环境，同一个生物材料在不同的应用环境中，其自身的变化和所引发的人体免疫系统的变化都是不相同的。因此，本文件对人体各组织中蛋白质水解酶的种类和分布、体液环境进行了全景式的调研，获得体外模拟所应包含的酶的种类，并制备成固定化酶，完成生物样本中酶活力的测定及模拟液中贻贝黏蛋白降解试验，形成了以模拟液和固定化酶构成的体外降解模型，可以替代动物试验，为生物源性材料的降解研究提供一种标准性的方法。

（二）人体各器官组织蛋白水解酶调研

根据贻贝黏蛋白产品的适应症，针对人体四种不同组织：皮肤、骨骼、血液和阴道粘膜在正常条件和炎症条件下的酶分布进行了文献调研，获得了这四种组织的蛋白水解环境的全景图谱。

对上述四种组织的蛋白酶含量的分析表明，体内蛋白水解环境非常复杂，主要的酶包含各种类胰蛋白酶和类糜蛋白酶，还有少量的弹性蛋白酶。因此，模仿体内情况构建体外降解模型方案：以胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶（糜蛋白酶），加入非常少量的胰弹性蛋白酶（比糜蛋白酶和胰蛋白酶浓度低十倍），这三种酶形成的混合物用来模拟体内正常条件下蛋白质水解环境。

（三）供试品选择

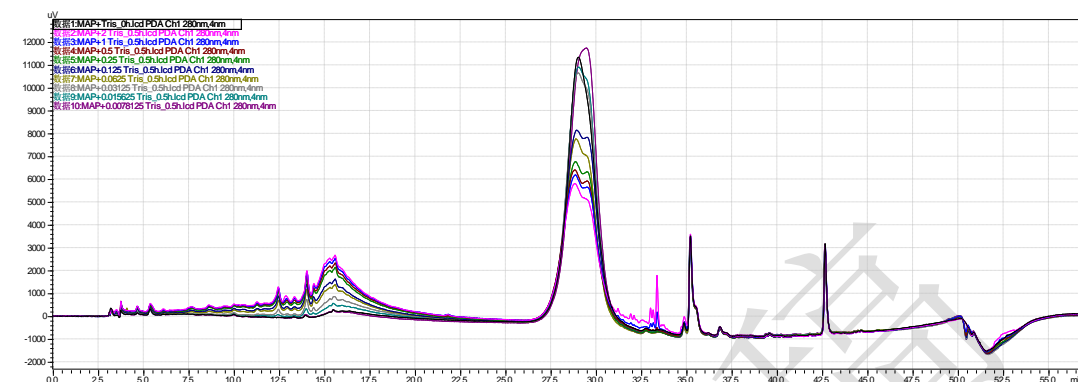
贻贝黏蛋白作为一种医用生物材料，具有很强的功能延展性。其产品形式可以为液态、半固体和固态。由于贻贝黏蛋白氨基酸组成的特殊性，它在生理环境下可以通过自氧化交联形成聚合态。因此，不论产品的初始形态是何种形式，只要使用到人体，就会以聚合态存在。因此，本标准直接研究聚合态的贻贝黏蛋白的降解。

（五）体外模拟体系酶浓度的确定

现配 168 U/mL 胰酶的 Tris-HCl (pH8.0) 溶液，并进一步向下稀释得到 84、42、21、10.5、5.25、2.63、1.31 和 0.66 U/mL 的稀释液。取 0.5mL 各胰酶稀释液与 0.5mL 的 1 mg/mL 的 MAP（贻贝黏蛋白）稀释液混合，同时配制 MAP 与

Tris-HCl、胰酶（168 U/mL）与 NS（生理盐水）的等体积混合液为对照，将所有混合液置于 37℃烘箱中孵化反应 30 分钟，取出后高速离心，取上清液检 HPLC。

结果如下图：



胰酶浓度 (U/mL)	峰 1 (7.5-25mins)	峰 2 (26-32mins)
168	517572	757132
84	498786	850479
42	459011	882044
21	435739	920167
10.5	333615	1065779
5.25	288075	992005
2.625	196501	1286806
1.3125	118062	1285916
0.65625	41567	1346056
NS	49418	1246267

峰 1 为贻贝黏蛋白的降解产物，峰 2 为贻贝黏蛋白峰。从上图种可见，只有当胰酶活力达到 1.3125 U/mL 以上才能够观察到降解产物，随着胰酶活力的升高，降解产物明显增多，而且 MAP 峰（峰 2）逐渐减小，直至 84 U/mL 浓度以上，产物的增加就极不明显了，且成倍增加胰酶用量（至 168 U/mL）也不会增加产物的量，说明降解反应基本完成。因此，体外降解推荐使用酶活力为不低于 84U/ml，在此浓度下，可以充分评估贻贝黏蛋白的降解特性。

（六）固定化酶制备

由于胰蛋白酶、糜蛋白酶和弹性蛋白酶在液态环境下不稳定，存在着自消化

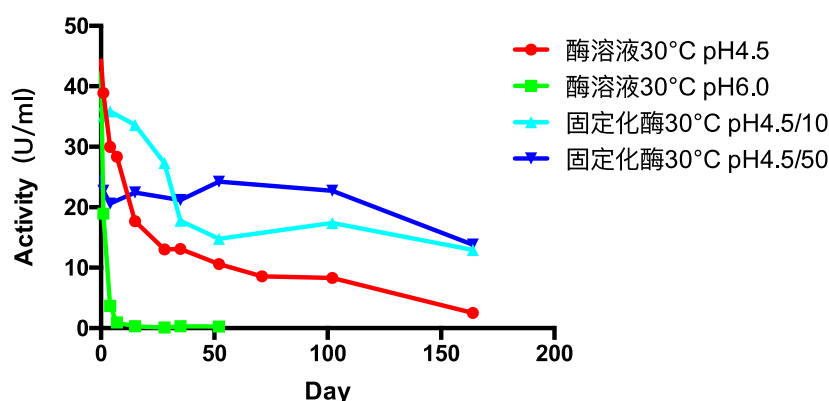
失活的问题，无法在长时间内维持稳定的酶活性，例如，胰酶溶液在其最佳酶解条件下（pH 7.4），2 小时就失活 40%，20 小时失活 80%以上，因此很难通过在模拟液中加入液态酶而形成稳定的体外降解体系。因此，要采用固定化酶的方式进行酶解反应。

（七）固定化蛋白酶活力的研究

将吸附有胰蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶的 CNBr（溴化氰）活化琼脂抽滤，溶解于 5mL 的生理盐水溶液中，再与 2mg/mL 的贻贝黏蛋白溶液等量混合，震荡均匀，静置于 37 摄氏度恒温培养箱中，定期取样，分别测定固定化蛋白酶的活性。

结果表明，胰蛋白酶、糜蛋白酶和弹性蛋白酶的固定化的浓度均可以达到 50mg 酶/ml 介质左右。

（八）固定化酶稳定性考察



将不同 pH 值的酶溶液、不同稀释浓度的固定化酶（稀释 10 倍、50 倍）置于 30°C 环境中，不同时间取样测定酶活性。结果表明，胰蛋白酶在溶液状态下极不稳定，在 30° C，pH 为 6.0 时，一天后酶活仅剩 45%。而固定化酶可以在较长时间内保持保持较高的酶活性，去除掉由于固定化导致的酶活测定偏差，样品在 164 天时仍然有 50%以上的活性，完全可以满足体外降解模型的需要。

（九）降解及其降解产物的检测方法

由于本标准研究的贻贝黏蛋白聚合态的降解过程，其降解产物依据产品的形态和使用部位而不同，因此采用将所有蛋白和肽段完全降解为基本氨基酸再进行比较的方式评估降解的过程。对于蛋白质和肽段的完全降解采用传统的酸水解方式，该方法会完全破坏色氨酸，胱氨酸和蛋氨酸的回收率也较低，但是，贻贝黏蛋白中上述三种氨基酸的含量很少，不构成主要影响。如果未来其他亚类的

贻贝黏蛋白或者基因工程蛋白中上述氨基酸含量较高,则需要采用其他的完全水解方式获得检测样品。

氨基酸浓度测定依照通用的方法进行。可以采用 HPLC 测定,也可以采用氨基酸分析仪,具体操作条件根据相关的仪器进行调整。

三、主要实验(或验证)的分析、综述报告、技术经济论证,预期的经济效果。

验证试验由江阴贝瑞森生化技术有限公司、山东省医疗器械产品质量检验中心、中国食品药品检定研究院共 3 家验证单位完成。本次验证主要是研究根据本文件进行不同剂型的贻贝黏蛋白产品降解研究。所用试验方法是可行的,试验结果是可靠的。

本文件对贻贝黏蛋白降解性能建立适宜的标准方法,可以广泛用于贻贝黏蛋白的性质研究和产品开发,也可用于相关产品的质量控制方法。

四、采用国际标准和国外先进标准的程度,以及与国际、国外同类标准水平的对比情况,或与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况。

无。

五、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系。

本文件与有关的现行法律、法规和强制性国家标准无冲突和交叉。

六、重大分歧意见的处理经过和依据。

无。

七、行业标准作为强制性行业标准或推荐性行业标准的建议。

该标准为方法标准,供使用者选择参考,建议作为推荐性行业标准。

八、贯彻行业标准的要求和措施建议(包括组织措施、技术措施、过渡办法等内容)

本文件给出了评价贻贝黏蛋白降解特性的体外模型,适用于评价贻贝黏蛋白等的降解性能。因为标准中规定的检测方法经国内多家机构验证,并可以开展该标准中试验,建议自发布之日后12个月开始实施。标准发布后,秘书处挂靠单位-济南中心将在标准实施日期前采用在网页上开辟该标准宣贯专栏、公布标准宣贯资料、召开标准宣贯会等形式对该标准的技术内容进行宣贯。

九、废止现行有关标准的建议。

无。

十、其他应予说明的事项。

无。

标准起草工作组

2020 年 7 月