附件2

重组人源化胶原蛋白原材料评价指导原则

本指导原则旨在指导注册申请人对医疗器械所用重组人源化胶原蛋白原材料进行充分的研究，并整理形成产品注册申报资料，同时也为技术审评部门对重组人源化胶原蛋白制成的产品注册申报资料包括所引用主文档相关内容的技术审评提供参考。

本指导原则系对医疗器械用重组人源化胶原蛋白原材料的一般要求，适用于人胶原蛋白的所有型别，注册申请人需依据具体医疗器械产品的特性对产品注册申报资料涉及的原材料相关内容进行充实和细化，并依据产品的具体特性确定本指导原则相关内容的适用性。本指导原则不直接涉及重组人源化胶原蛋白原材料制成的医疗器械终产品的安全性或有效性评价，具体产品的评价请参考相应的产品注册审查指导原则。

本指导原则是对注册申请人和技术审评人员的指导性文件，但不包括注册审批所涉及的行政事项，亦不作为法规强制执行，如果有能够满足相关法规要求的其他方法，也可以采用，但是需要提供详细的研究资料和验证资料；需在遵循相关法规和强制性标准的前提下使用本指导原则。

本指导原则是在现行法规和标准体系以及当前认知水平下制定的，随着法规和标准的不断完善，以及科学技术的不断发展，本指导原则相关内容也将进行适时的调整。

一、前言

近年来，随着基因重组、蛋白质组学等基础理论、技术手段和临床医疗探索研究的不断发展，重组胶原蛋白日益成为重要的生物材料，为相关医疗器械的研发提供了新的思路与方法。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。

重组人源化胶原蛋白仅是重组胶原蛋白的一类，材料特性并不能完全决定最终产品的安全性和有效性。本指导原则中的“原材料”是指用于生产制造医疗器械用的重组人源化胶原蛋白材料。除特别说明外，本指导原则中的“材料”等同于“原材料”。

重组人源化胶原蛋白是通过基因工程生产的蛋白，工程细胞构建过程、生产用细胞的质量控制及常规生产过程控制是该原材料生产工艺及风险评价的基础，此方面主要的验证资料，可参考本指导原则的资料性附件作为原材料研究资料的补充，但不作为产品注册申报资料的必要内容。结合重组人源化胶原蛋白的特点，该资料性附件修改引用了国家药监局药审中心《重组制品生产用哺乳动物细胞质量控制技术评价一般原则》《体外基因修饰系统药学研究与评价技术指导原则》等生物制品指导原则的相关内容。

二、评价要点

1. 重组人源化胶原蛋白原材料性能研究

为了确保重组人源化胶原蛋白原材料质量可控，重组人源化胶原蛋白需参考相关行业标准进行必要的鉴别、纯度和杂质等分析，可采用不同的分析方法对原材料的分子量、等电点、氨基酸序列、各种翻译后修饰（如脱酰胺化、氧化、糖谱/糖基化修饰、脯氨酸羟基化等）进行充分鉴定，并进行相应的检测，以确认终产物具有拟宣称的原材料构象、聚集状态、降解状态及胶原蛋白高级结构。

材料理化特性分析需按照医疗器械制备工艺和特点，结合其风险控制要求进行相关研究，建议对如下常规理化项目进行研究，例如氨基酸序列、蛋白空间结构、剂型（如溶液、冻干粉、凝胶、纤维、海绵等）、胶原蛋白型别等特异性性能，同时结合医疗器械特点，完善理化性能指标要求。

需根据不同的预期用途及使用部位、不同生产工艺、预期使用效果和最终医疗器械的状态，选择适用的指标；根据胶原蛋白原材料是否经过交联或化学修饰，宜提供交联剂或修饰剂的残留量、降解性能等的研究，提供相应的研究报告。

性能指标的建立及验证取决于胶原蛋白原材料性质和用途、生产和纯化工艺及生产工艺的经验等多种因素。新的分析技术及对现有技术的改进正在不断进行，适当时需使用这些新的技术。因现有技术原因而产生偏差的需进行合理性解释说明。

1.鉴别

1.1氨基酸序列及覆盖度

首先需明确氨基酸序列的选择依据，如为特定氨基酸序列片段组成的，还需明确片段重复次数及依据。需采用综合的方法测定目标胶原蛋白原材料的氨基酸序列，并与其基因序列对应的理论氨基酸序列进行比较验证。肽段覆盖率的检测结果需为100%覆盖，末端氨基酸序列检测结果需与理论序列完全一致。可按照《重组人源化胶原蛋白》行业标准的要求，直接使用供试品检测，并选择适宜的酶解条件进行水解，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。

如适用，目标胶原蛋白材料的理论氨基酸序列需包括二硫键连接方式。氨基酸序列测定还需考虑可能存在的N端甲硫氨酸（如大肠杆菌来源的胶原蛋白原材料），信号肽或前导序列。

1.1.1氨基酸组成

使用各种水解法和分析手段测定氨基酸的组成，并与目的蛋白基因序列推导的氨基酸组成或天然异构体比较。如需要时需考虑分子量的大小。多数情况下，氨基酸组成分析对肽段和小蛋白可提供有价值的结构资料，但对大蛋白一般意义较小。在多数情况下，氨基酸定量分析数据可用于确定蛋白含量。

1.1.2氨基酸末端序列

氨基酸末端分析用于鉴别N-端和C-端氨基酸的性质和同质性。用氨基酸序列分析仪或质谱法测定N端和/或C端氨基酸序列，其结果需符合理论预测。

若发现目的胶原蛋白材料的末端氨基酸发生改变时，需使用适当的分析手段判定变异体的相应变异数量。需将这些氨基酸末端序列与来自目的胶原蛋白基因序列推导的氨基酸末端序列进行比较。

1.2肽图

按照《中华人民共和国药典》 四部 通则 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，建立胶原蛋白原材料标准肽图。

推荐利用四极杆飞行时间串联质谱仪（Q-TOF MS）建立标准肽图，作为胶原蛋白材料的指纹图谱，用于材料的批间一致性和稳定性评价，以及材料特异性的鉴别。

需用合适的酶或化学试剂使所选的材料片段产生不连续多肽，应用高效液相色谱法（HPLC）或其他适当的方法分析该多肽片段。尽量应用氨基酸组成分析技术，N-末端测序或质谱法鉴别多肽片段。至少对材料成品放行来说,经验证的肽谱分析经常是确证目的材料结构/鉴别的适当方法。具体分析方法可参考《重组胶原蛋白肽图指纹图谱分析》行业标准。

1.3分子量

对申报医疗器械所用胶原蛋白材料可参照《中华人民共和国药典》高效液相色谱法、“电泳法”的“第五法 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法”、基质辅助激光解析电离飞行时间质谱方法建立分子量及分布检测方法，也可以运用其他适当技术测定分子量，如分子排阻色谱法等。需通过至少一种合理的、经验证的方法证明其实际分子量与理论预测一致。

高效液相色谱法目标蛋白的出峰保留时间需与参比品一致；高分辨质谱法分子量需与参比品一致；SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法分子量电泳条带位置需与参比品一致。同时，需就参比品的选择提供合理性依据。

1.4等电点

按照《中华人民共和国药典》 四部通则 电泳法第六法（等电聚焦电泳法）或0542毛细管电泳法进行检测，等电点需在标示范围内，也可以运用其他适当的方法测定。

1.5巯基和二硫键

如果目的胶原蛋白材料的基因序列存在半胱氨酸残基时，需尽可能确定巯基和/或二硫键的数量和位置。使用方法包括肽谱分析（还原和非还原条件下）、质谱测定法或其他适当的方法。

1.6消光系数（或克分子吸光度）

多数情况下，可取目的胶原蛋白材料于UV/可见光波长处测定消光系数（或克分子吸光度）。消光系数的测定为使用UV/可见光或分光光度计检测已知蛋白含量的溶液，蛋白含量应用氨基酸组成分析技术或定氮法等方法测定。

1.7电泳图型

应用PAGE电泳、等电聚焦、SDS－PAGE电泳、免疫印迹、毛细管电泳法或其他适当的方法,获得目的胶原蛋白材料的一致性，同一性和纯度的电泳图谱和数据。

1.8液相色谱图谱

应用分子筛色谱、反相液相色谱、离子交换液相色谱、亲和色谱或其他适当方法，获得目的胶原蛋白材料的一致性、同一性和纯度的色谱图谱和数据。

2.结构表征

2.1脯氨酸羟基化

若在设计时进行脯氨酸羟基化，需按YY/T 1849《重组胶原蛋白》中的要求进行分析，并规定标示值。

2.2高级结构分析

鉴于高级结构与重组人源化胶原蛋白表现出的性能和功能密切相关，若材料拟宣称具有相应的高级结构，采用多种方法对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。

2.2.1三螺旋结构分析

可采用圆二色谱在特定常规试验条件下的检测重组人源化胶原蛋白的CD光谱特征。若采用特定的非常规条件检测，则检测结果仅反映胶原蛋白材料在该条件下可（否）具有形成类似胶原蛋白三螺旋结构的CD光谱特征能力；此时需分析并阐述所检测样品是否代表“原材料样品”，还是“原材料样品”的特定处理（后续加工）样品。同时建议进行最低检出限分析，其结果需与生理性胶原蛋白相近（相差不超过一个数量级）。可采用X射线晶体学技术或冷冻电镜技术在原子结构水平考证胶原蛋白材料或其包含的特定氨基酸序列的三螺旋结构特性，计算有结构信息的序列占整个蛋白序列的百分比；可采用差示扫描量热法检测胶原蛋白材料结构变化的热效应辅助说明胶原蛋白的高级结构特征；可采用红外光谱进行结构分析，其非特征区（如：酰胺a、b）和特征区（如：酰胺I、酰胺II、酰胺III）的特征峰位置需与参比品一致；可采用拉曼光谱，其拉曼光谱图需与参比品一致；也可应用其它紫外或可见光吸收光谱法、核磁共振（NMR）等适当的方法检测。

2.2.2纤维质量/多孔网状结构表征

若材料预期形成纤维/网状结构时，宜使用扫描电子显微镜（SEM）、透射电子显微镜（TEM）或原子力显微镜（AFM）等方法观察胶原蛋白材料形成胶原纤维束/多孔网状结构等，需明确两种方法具体的制样和观察测定过程。与此相关的胶原分子自组装和聚合能力分析，可参考相关国内外相关标准进行研究。

3.纯度

关于纯度的要求可根据医疗器械终产品的用途和用法而确定。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需成倍增加，寡聚体需视为重组人源化胶原蛋白而非杂质。

4.含量

需建立重组人源化胶原蛋白含量检测方法，含量以质量/重量或质量/体积表示。含量检测可通过液相色谱法（HPLC）、凯氏定氮法、特征多肽法等。

5.杂质、污染物和添加剂

对胶原蛋白材料工艺相关杂质以及外源污染物等进行研究，如：细胞基质来源、细胞培养来源和下游工艺。需对潜在的工艺相关杂质（如宿主细胞蛋白质、宿主细胞DNA、细胞培养残留物、下游工艺的残留物等）进行鉴别、评估，并进行定性和/或定量分析，并采用适宜的方法评价其对生物学功能的影响。工艺相关杂质来源于生产工艺，可分三大类：来源于细胞基质、培养基和下游工艺。细菌内毒素、微生物限度和无菌性，是常规的污染物控制要求。

5.1源于细胞基质的杂质

来源于细胞基质的杂质包括源于宿主生物体的蛋白/多肽；核酸（宿主细胞/载体/总DNA）；多糖及病毒。对于宿主细胞蛋白，一般需用能检测出较宽范围蛋白杂质的灵敏的免疫检测方法。需用不含目的基因的生物体粗提物，即不含胶原蛋白编码基因的生产用细胞，制备上述试验使用的多克隆抗体。可通过对胶原蛋白材料的直接分析方法（如杂交技术法）检测宿主细胞的DNA水平，和/或通过标记试验（实验室规模）检测证实通过纯化工艺能去除核酸。对于有意导入的病毒，需验证生产工艺中去除/灭活病毒的能力。

5.1.1外源性DNA残留量

按照《中华人民共和国药典》“外源性DNA残留量测定法”的“荧光染色法”或“定量PCR法”进行测定，“荧光染色法”的样品加标回收率需满足70%～130%；“定量PCR法”的样品加标回收率需满足50%～150%，需规定残留限量。如果样品中外源性DNA残留量低于“荧光染色法”的检测限，则需采用“定量PCR法”进行测定。

需根据医疗器械产品的预期临床用途、使用量等，确定含重组人源化胶原蛋白的材料临床最大使用量的外源性DNA残留量限值。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。

建议参考生物制品中大肠杆菌或酵母菌表达的基因工程重组生物制品的外源性DNA残留量限度。

5.1.2宿主细胞蛋白质残留量

###### 5.1.2.1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测定。

###### 5.1.2.2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测定。

###### 5.1.2.3CHO细胞蛋白质残留量

采用经验证的酶联免疫试剂盒进行测定。

5.1.3促炎性污染物（肽聚糖）

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）检测残留肽聚糖，需根据其致热反应风险规定可接受的限量要求。

5.1.4碳水化合物结构

根据细胞基质等因素，必要时需考虑测定糖蛋白中碳水化合物的含量（中性糖、氨基糖、唾液酸）。此外，尽可能分析碳水化合物的结构、寡糖形态（长链状）和多肽的糖基化位点。

5.2源于培养基的杂质

来源于培养基的杂质包括诱导剂（多核苷酸，病毒）、抗生素、血清及其他培养基组分。需根据工艺中采用的表达体系和使用的抗生素类型，采用经验证的方法测定残余抗生素含量/活性，残余抗生素含量需符合《重组人源化胶原蛋白》行业标准等相关标准，不应有残余抗生素活性。

残余抗生素含量的测定按照YY/T 1849《重组胶原蛋白》中描述的方法或其他经验证的方法进行检测，残余抗生素活性按照《中华人民共和国药典》 四部通则 生物活性测定法中抗生素微生物检定法或《中华人民共和国药典》 四部通则 抗生素残留量检查法进行检测。

5.3源于下游工艺产生的杂质

来源于下游工艺产生的杂质一般包括酶、化学/生化处理试剂（如溴化氰、胍、氧化剂和还原剂）、无机盐（如重金属、砷、非有色金属离子）、溶剂、载体/配体（如单克隆抗体），及其他可滤过的物质。需结合实际情况制定相关理化指标。

5.3.1添加剂

如果使用了防腐剂、冻干保护剂等添加剂，需给出其限量要求和检测方法。

5.3.2重金属及微量元素含量需符合以下规定。

###### 5.3.2.1重金属元素

对工艺中添加的重金属元素，需符合规定限值。

###### 5.3.2.2重金属含量

重金属总量（以Pb计）需符合YY/T 1888《重组人源化胶原蛋白》行业标准等相关标准中的限值。

###### 5.3.2.3微量元素含量

微量元素含量：砷（As）、汞（Hg）、铅（Pb）、铬（Cr）、镉（Cd）、铜（Cu）、钼（Mo）、铁（Fe）、镍（Ni）需符合YY/T 1888《重组人源化胶原蛋白》等相关标准中的要求。

5.4细菌内毒素

细菌内毒素相关限量要求需考虑医疗器械终产品与人体的接触方式。

5.5微生物限度

若重组人源化胶原蛋白材料以微生物限度控制状态提供，按照《中华人民共和国药典》 四部通则 非无菌产品微生物限度检查：微生物计数法和非无菌产品微生物限度检查：控制菌检查法进行检测，结果需符合相关要求。

5.6无菌

若重组人源化胶原蛋白材料以无菌状态提供，按照《中华人民共和国药典》 四部通则 无菌检查法进行检测，结果需无菌。

5.7分子变异体

需对重组人源化胶原蛋白材料的各种分子变异体进行分离、鉴别和分析。如变异体的功能与目标产物一致时可不做杂质考虑。需考虑在生产和/或贮存期间胶原蛋白材料降解产物是否显著增加及其与免疫原性的相关性。以下为最常见的目的胶原蛋白材料的分子变异体，并列出了相应的检测方法。

5.7.1化学修饰类型

各种非预期的翻译后修饰是导致重组蛋白异质性的重要质量问题，如：脱酰胺化、氧化、糖谱/糖基化修饰等和其他可能的N端、C端修饰（如乙酰化、酰胺化或者由于外肽酶导致的部分降解以及C端加工、N端焦谷氨酸等），以及各种其他异质性（如异构化、碎片化、二硫键错配、N-连接和O-连接的寡糖、聚集等）。适用时，需按YY/T 1849《重组胶原蛋白》中的要求，参照《重组胶原蛋白肽图指纹图谱分析》行业标准等相关标准进行分析。需考虑脱酰胺、异构化、错配二硫键连接和氧化形式的分离和鉴别。对这些变异体的分离和鉴别，可采用层析法、电泳法（如毛细管电泳）、质谱法和/或光谱法（如圆二色谱）。需注意在修饰不会引起或只引起较小的分子量变化及结构变化的情况下，这些方法可能无法鉴别。此时，需要结合功能性试验，评价所发生的修饰是否影响预期的功能和使用。

5.7.2降解物和聚合体

降解物和聚合体：聚合体包括二聚体和多聚体，可用分子筛层析法（如SE-HPLC）进行定量；需建立成品中非预期降解物的判定标准，并对稳定性试验产生的降解产物进行监测。

6.热稳定性

如果重组人源化胶原蛋白是多聚体，可采用差示扫描量热分析（DSC）进行解聚温度分析。可参考《中华人民共和国药典》 四部。

如果是单链的蛋白肽，可参考《中华人民共和国药典》 四部，人免疫球蛋白3.3.2.4热稳定性试验，将供试品置（57±0.5）℃水浴中保温4h后，用可见异物检查装置，肉眼观察需无凝胶化或絮状物。

7.其它理化指标

胶原蛋白材料其它性能指标宜根据医疗器械终产品特性及相关通用要求制定，在适用时，需对相关性能指标检测方法使用的参比品进行性能研究，对照品技术参数需明确且性能稳定。用于理化测定等方面的参比品，需进行必要的分析鉴定，包括但不限于：

7.1外观（如性状、颜色）

用肉眼直接观测，需为白色/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，需根据原材料具体形态规定外观要求。

7.2可见异物

按照《中华人民共和国药典》 四部通则 可见异物检查法第一法（灯检法）进行检测，需无明显异物。

7.3溶解性

需根据供试品的溶解特性，对供试品在水、稀酸或中性盐溶液中的溶解程度进行表征和阐述。

7.4水分

适用时（如冻干样品），需明确水分含量。除另有规定外，取供试品约1g～2g，按照《中华人民共和国药典》“水分测定法”第二法（烘干法）测定，或取供试品约10mg按照《中华人民共和国药典》“热分析法”热重法（TG）测定，升温程序：从室温以10℃/min速率升温至105℃，保持60min。减失重量需符合所标示范围。规定仲裁方法为水分测定法。

7.5炽灼残渣

除另有规定外，取1.0-2.0g，按照《中华人民共和国药典》 四部通则 炽灼残渣检查法进行检测。

7.6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1mg/mL，按照《中华人民共和国药典》 四部通则“pH值测定法”进行检测，需符合所标示值的±1.0。

7.7渗透压摩尔浓度

适用时，液体和凝胶样品直接取样，固体样品用生理盐水稀释为1mg/mL按照《中华人民共和国药典》 四部通则 渗透压摩尔浓度测定法进行检测，渗透压摩尔浓度范围需符合相关标准要求。

7.8动力黏度（凝胶）

取供试品按照《中华人民共和国药典》“黏度测定法”的“旋转黏度计测定法”测定，需要详细描述试验条件，动力黏度值需符合所标示范围。

7.9装量及差异

根据供试品性状（溶液、凝胶、冻干海绵或冻干粉末等）和装量的不同确定装量的允差要求。例如：20g（mL）以下，单个装量不低于标示装量的93%；20g（mL）至50g（mL），单个装量不低于标示装量的95%；50g（mL）以上，单个装量不低于标示装量的97%；平均装量不低于标示装量。

8.降解特性及产物

需对胶原蛋白材料降解特性进行研究，可采用凝胶渗透色谱（GPC）测定降解产物的分子量分布及分子量，水解/酶解产物可使用氨基酸分析仪、高效液相色谱或其他适宜的方法测定。

9.生物学功能评价

重组胶原蛋白的生物学功能是指以重组胶原蛋白生物学特性相关属性为基础的生物学作用，对声称的生物学功能宜进行定性定量分析。胶原是细胞外基质的主要成分，重组人源化胶原蛋白作为重组胶原蛋白的一种，其主要生物学功能也同样是为细胞提供支架和良好的微环境，如促进细胞黏附、增殖、生长、分化等。因此，可通过评价细胞-胶原蛋白相互作用来评价重组人源化胶原蛋白的生物学功能。细胞增殖、分化、黏附性、迁移或移行评价方法可参考YY/T 1849《重组胶原蛋白》。

由于胶原类材料在分子组成、微结构、物理性能方面可能差异显著，需检测材料与细胞之间相互作用及其引导细胞基础响应的性能。细胞响应的参数包括细胞形态、面积和体积，均可通过二维（2D）或三维（3D）图像技术可视化评价，还包括存活率、增殖率、程序化凋亡以及迁移。

鼓励对重组人源化胶原蛋白对细胞的作用机理进行研究。例如，抗体阻断试验可用来确定细胞表面的何种受体参与了与胶原的作用，如整合素或盘状结构域受体（DDRs）。此外，细胞骨架成分（如肌动蛋白）的协同作用也可用来评价细胞与基质间的粘附与收缩解离。有多种在单细胞或多细胞水平上评价细胞引导的收缩解离的方法，包括自由漂浮组织构建物的尺寸随时间的变化、施加在培养-力学监测系统上力的大小，以及单个细胞在胶原网络的应力和形变等。

其它适用于干细胞和祖细胞类型的细胞-胶原相互作用的功能性检测包括细胞株的定向分化，特定干细胞或祖细胞的增殖，或组织形态发生（始于内皮祖细胞的血管形成）。按照《中华人民共和国药典》 四部 进行成纤维细胞生长因子生物学活性测定，对胶原蛋白肽-细胞相互作用评价，反映胶原蛋白肽与成纤维细胞增殖的构效关系。

按照《中华人民共和国药典》 四部 生物活性测定法对试验结果进行统计学分析，包括对验证指标结果的绘图和统计学分析，以及判断其是否符合可接受标准等。常规的统计学方法一般要求数据之间相互独立，并呈近似正态分布和方差齐性，通常采用相对效价的对数转换值进行数据分析。当无法满足上述统计学要求时，也可考虑采用其他适宜的替代方法进行数据分析。

上述关于胶原—细胞相互作用的功能性测定也可作为医疗器械产品标准化和质量控制的方法。三维支架材料中细胞活性评价方法可参考YY/T 1562《组织工程医疗器械产品 生物材料支架 细胞活性试验指南》。

1. 材料免疫学安全性研究

临床前安全性评价包括临床前安全性试验，其目的主要是确定新胶原蛋白材料是否会在人体引起未能预料的不良反应，免疫学安全性研究是重组人源化胶原蛋白材料生物安全性研究资料的主体。但是，用传统生物试验方法来评价重组人源化胶原蛋白往往有困难，并受多种因素的影响。例如高度的种属特异性，人的蛋白质对人的生物学活性远高于对动物的活性，而且人的蛋白质氨基酸序列，常常与来自其它种系的蛋白质不同，例如糖基。因而由基因工程技术所制备的蛋白质或肽类往往会在人体以外的其它宿主中产生免疫应答，其生物学效应有所改变，并可能因形成免疫复合物而导致有毒性反应，而这样产生的毒性反应与人体安全性显然无关。

另外，由于重组人源化胶原蛋白功能、生产工艺或者胶原蛋白材料稳定性等要求，对胶原蛋白材料进行修饰或者改构，需提供与未修饰或者改构材料比较的研究资料。以简化生产工艺为目的而引入的额外多肽片段如His-tag，在最终的材料成品中需符合相关行业标准的要求。

1.免疫原及免疫化学检验

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，不能完全排除其免疫原性风险，宜增加免疫学研究。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，需要根据临床评价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。

患者对蛋白质类材料产生免疫应答的风险将随医疗器械产品变化而变化。建议采用基于风险的方法来评价和减轻与影响人源化胶原蛋白安全性和有效性相关的免疫应答。人源化胶原免疫原主要源自生产过程中残留的可致免疫原性的各种因子，包括残留的各种杂蛋白（包括DNA转录过程中可能产生的异种蛋白）、残留的大肠杆菌及酵母菌外源性DNA、材料致热原、生产过程中菌体产生的细菌内毒素、DAMPs以及人源胶原特异性免疫等等。

为降低人源化胶原蛋白材料的免疫原性风险，一般需在材料设计及生产工艺中采取相应处理措施以降低其免疫原性，如宿主细胞选择，蛋白提取、蛋白纯化。注册申请人需对其降低材料免疫原性的有效性进行验证，并提供验证试验性数据或相关研究资料。注册申请人需提供免疫原性检测范例的理论依据，需使用经完全验证的检测法对来自关键性研究的样品进行检测，并提供支持该检测法的全面验证的数据。

杂蛋白的检测可参考YY/T 1453《组织工程医疗器械产品 I型胶原蛋白表征方法》，外源性DNA检测可参考YY/T 0606.25《组织工程医疗产品 第25部分 动物源性生物材料DNA残留量测定法：荧光染色法》。胶原蛋白材料的免疫原检验可通过流式细胞术（FCM）或酶联免疫吸附法（ELISA）测定，检测试验宜考虑，但不限于淋巴细胞增殖试验（YY/T 0606.15《组织工程医疗产品 第15部分 评价基质及支架免疫反应的试验方法：淋巴细胞增殖试验》）、细胞迁移试验（YY/T 0606.20《组织工程医疗产品 第20部分：评价基质及支架免疫反应的试验方法：细胞迁移试验》），采用非标方法时需进行方法学验证。

免疫原性检测可设计为检测不期望的生物或生理结果的抗体，重组人源化胶原蛋白抗体可能降低效果或者引起过敏等反应。抗体检测的免疫原试验可参考《中华人民共和国药典》，选择适宜的方法进行，包括桥联或均相酶免疫法、放射免疫沉淀试验等，并进行相关的方法开发和试验验证。试验过程中，可根据滴度试验和中和活性试验进一步对ADA进行分析，还可进行额外的抗体特征分析，包括抗体分型、抗原表位鉴定及交叉反应评价。

筛选检测法（也称为结合抗体（BAb）检测法）用于检测与材料结合的所有抗体。使用确证性检测法建立BAb对材料的特异性，使用滴定和中和检测法进一步表征重组人源化胶原蛋白抗体。使用滴定检测法表征抗体应答的量级，抗体对安全性和有效性的影响可能与其滴度和持续性而不是发生率相关。中和检测法评估抗体干扰材料-靶标相互作用的能力。中和抗体（NAb）是BAb的亚类，ADA对安全性和有效性的影响可能与NAb活性而不是抗体发生率相关。类似地，在一些情况下可能重要的是确定NAb滴度。用于检测抗体的首选检测法应当是检测低亲和力和高亲和力抗体的高灵敏度筛选检测法。注册申请人在开发检测方法以确认重组人源化胶原蛋白特异性抗体结合时，需选择合适的确证性检测法以防止抗体假阳性数据，这些假阳性数据会混淆抗体对安全性和有效性影响的分析。

注册申请人需提供支持该检测法的全面验证的数据。验证包括证明用于给定样品中抗体的定量测量的特定检测法对于预期用途是可靠和可重现的。抗体检测法有助于评价材料的免疫原性，然而抗体的检测依赖于检测法的关键操作参数（如灵敏度、专属性），一般来说，建议注册申请人开发针对灵敏度、专属性、选择性、精确度、重复性和稳定性进行优化后的检测法。

其他的免疫原评价及生物学性能及生物相容性评价等建议做医疗器械终产品的检测，因为加工工艺不同最终产品性能不同，例如有些交联工艺可能会封闭某些免疫原反应簇等等。

2.免疫毒理学评价

当拟生产医疗器械免疫原性风险与已上市产品无可比性，且无充分的文献数据评价其免疫原性，需进行免疫毒理学试验研究。通过免疫毒理学试验，对炎症反应、免疫抑制、免疫刺激、超敏反应以及自身免疫进行确证评价，评估免疫系统改变导致的潜在人体不良健康作用。

免疫毒理学可通过流式细胞术（FCM）、酶联免疫吸附法（ELISA）、组织病理切片等方法测定，试验方法可考虑结合生物学试验、体外T淋巴细胞转化试验（YY/T 1465.1《医疗器械免疫原性评价方法 第1部分 体外T淋巴细胞转化试验》）等，注册申请人需对选用检测方法的适用性进行评价，采用非标方法时需进行方法学验证。

可参考GB/T 16886.20《医疗器械免疫毒理学试验原则和方法》选择性进行功能性或非功能性免疫毒理学试验，通过啮齿动物试验方式检测和评价物质的不良作用。目前主要研究方法是将医疗器械/材料植入小鼠/模式小鼠，然后研究器械/材料整个降解周期内机体的体液和细胞的免疫应答，以及局部组织的免疫反应。功能性检测测定细胞和/或器官活性，例如淋巴细胞对有丝分裂原或特异性抗原的增殖反应、细胞毒性和特异性抗体的形成；非功能性检测涵盖形态学方面和/或定量的术语、淋巴组织变化程度、淋巴细胞数目和免疫球蛋白水平或其他免疫功能标志物。

1. 材料生物学风险评价

作为制备医疗器械产品的原材料，需参照GB/T 16886.1的要求对重组人源化胶原蛋白原材料进行必要的生物学评价，尤其通过胶原蛋白材料到医疗器械终产品的加工工艺分析发现，两者之间的生物学风险相近时。如预期用于植入产品的原材料，还需评估样品是否为内源性凝血系统激活物。若医疗器械终产品与胶原蛋白材料的使用方法不一致，需考虑生物学补充研究。

根据GB/T 42062《医疗器械 风险管理对医疗器械的应用》描述的风险管理过程进行生物学风险评定，识别材料、添加剂、加工助剂和其他潜在可沥滤物中的危害，接触剂量等因素，绘制基于风险管理的生物学评价流程图。

如果医疗器械产品以非灭菌的方式提供，可将样品灭菌后用于生物学评价试验，需考虑灭菌方式及灭菌对重组人源化胶原蛋白的影响。

可能需要评价的生物学风险评定终点包括但不限于：

1.细胞毒性

2.致敏性

注射胶原、胶原止血剂等具有潜在生物可降解性材料，或体内植入材料以及材料制备过程中新增了化学成分和制造加工助剂、装配粘合剂/溶剂残留物，以及成品中可能存在灭菌残留物或灭菌过程所致的反应性产物时，需进行迟发型超敏反应试验。

3.皮肤刺激性

4.皮内反应

注射胶原、胶原止血剂等具有潜在生物可降解性材料或体内植入材料以及材料制备过程中新增化学成分和制造加工助剂、装配粘合剂/溶剂残留物以及灭菌残留物或灭菌过程所致的反应性产物可能存在于成品时需进行皮内刺激试验。

5.材料介导的致热性

6.全身毒性

7.溶血性

血管修复材料、创伤和烧伤修复材料、胶原止血剂、心脏瓣膜等与循环血液接触的外部接入材料和大部分植入材料以及全部植入血管系统材料需进行溶血试验。

8.植入反应

皮下植入（胶原支架、血管修复材料、创伤和烧伤修复材料、胶原止血剂等可降解/可吸收材料或需植入生物材料等需进行皮下组织植入试验进行评价）；肌肉植入；骨植入。

9.遗传毒性。

1. 稳定性研究与直接接触性容器/材料研究

1.稳定性研究

重组人源化胶原蛋白生产过程中间体如涉及到贮存，则需开展相应的稳定性研究。采用拟贮存阶段样品的代表性批次开展研究，一般包括贮存、运输（如适用）和使用稳定性研究等。研究开展前，需统筹制定稳定性研究方案，关注各稳定性研究所用样品、直接接触性容器/材料、检测时间点、检测条件和分析检项等。

研究中需对能够反映质量变化的敏感特征进行研究，如含量、完整性、纯度、微生物安全性和生物学特性等。需依据相应的医疗器械产品的贮存运输条件开展研究，涵盖设定的各项条件，如温度、光照、反复冻融（冷冻贮存时）、振摇等方面。根据实际使用情况，开展使用中的稳定性研究，例如复溶或解冻、与复溶稀释剂的相容性研究等。研究中需采用与实际使用相同材质的直接接触性容器/材料。

2.直接接触性容器/材料研究

如涉及贮存，需对直接接触的包装容器开展相应的包材相容性研究。根据相容性研究结果，结合稳定性研究，选择合理的包装容器。

另外，对制备工艺中与样品接触的容器和一次性使用材料（如贮存袋、过滤膜、层析介质、管路等），需开展风险评估和/或相应的相容性研究。

三、参考文献

[1]中华人民共和国国务院.医疗器械监督管理条例:中华人民共和国国务院令第739号[Z].

[2]国家市场监督管理总局.医疗器械注册与备案管理办法:国家市场监督管理总局令第47号[Z].

[3]国家药典委员会.中华人民共和国药典:三部[M].北京:中国医药科技出版社,2020.

[4]YY/T 0954,无源外科植入物 I型胶原蛋白植入剂[S].

[5]YY/T 1453,组织工程医疗器械产品 I型胶原蛋白表征方法[S].

[6]YY/T 0606.25,组织工程医疗产品 第25部分 动物源性生物材料DNA残留量测定法:荧光染色法[S].

[7]YY/T 1849,重组胶原蛋白[S].

[8]YY/T 1888,重组人源化胶原蛋白[S].

[9]YY/T1562,组织工程医疗器械产品生物材料支架 细胞活性试验指南[S].

[10]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[S].

[11]国家药品监督管理局药品审评中心.治疗用生物制品非临床安全性技术审评一般原则:2007年[Z].

[12]国家药品监督管理局药品审评中心.人用重组DNA制品质量控制技术指导原则:2003年[Z].

[13]国家药品监督管理局药品审评中心.特异性人免疫球蛋白药学研究与评价技术指导原则:国家药监局药审中心通告2022年第27号[Z].

[14]国家药品监督管理局药品审评中心.重组制品生产用哺乳动物细胞质量控制技术评价一般原则:2007年[Z].

[15]国家药品监督管理局药品审评中心.体外基因修饰系统药学研究与评价技术指导原则:国家药监局药审中心通告2022年第29号[Z].

[16]国家药品监督管理局.重组胶原蛋白生物材料命名指导原则:国家药监局通告2021年第21号[Z].

[17]U.S. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: For the Submission of Chemistry, Manufacturing, and Controls Information for a Therapeutic Recombinant DNA-Derived Product or a Monoclonal Antibody product for in vivo use [EB]. 1996-08.

[18]U.S. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products —Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection [EB]. 2019-01.

[19]European Medicines Agency. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues [EB]. 2014-12-18.

[20]MEYER M. Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties[J]. Biomedical engineering online, 2019, 18(1): 24-24.

[21]Rezvani Ghomi E, Nourbakhsh N, Akbari Kenari M, et al. Collagen‐based biomaterials for biomedical applications[J]. Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials, 2021, 109(12): 1986-1999.

[22]Gentile, Ferreira, A. M, et al. Collagen for bone tissue regeneration[J]. Acta Biomater, 2012 Sep, 8(9):3191-3200.

[23]Schor SL. Cell proliferation and migration on collagen substrata in vitro[J]. J Cell Sci, 1980 Feb, 41:159-175.

[24]Somaiah C, Kumar A, Mawrie D, et al. Collagen Promotes Higher Adhesion, Survival and Proliferation of Mesenchymal Stem Cells[J]. PLoS One, 2015 Dec 14, 10(12): e0145068.

[25]Luparello C, Sirchia R. Type V collagen regulates the expression of apoptotic and stress response genes by breast cancer cells[J]. J Cell Physiol, 2005 Feb, 202(2): 411-421.

[26]Urlaub, G., Kas, E., Carothers, A. M., et al. Deletion of the diploid dihydrofolate-reductase locus from cultured mammalian-cells[J]. Cell, 1983, 33: 405-412.

[27]Cregg J. M., Vedvick T. S., Raschke W. C.. Recent advances in the expression of foreign genes in Pichia pastoris[J]. Biotechnology, 1993 Aug, 11(8): 905-910.

[28]Jeong, H., Barbe, V., Lee, C. H., et al. Genome Sequences of Escherichia coli B strains REL606 and BL21(DE3) [J]. Journal of Molecular Biology, 2009, 394(4): 644–652.

[29]Gussow D., Clackson T. Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain-reaction[J]. Nucleic Acids Research, 1989, 17: 4000.

[30]Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction[J]. Molecular aspects of medicine, 2006, 27: 95-125.

[31]Cereghino, J. L., Cregg, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris[J]. Fems Microbiology Reviews, 2000, 24: 45-66.

[32]Cereghino, G. P. L., Cereghino, J. L., Ilgen, C., et al. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast Pichia pastoris[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13: 329-332.

[33]Hollenberg, C. P., Gellissen, G. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts[J]. Current Opinion in Biotechnology, 1997, 8: 554-560.

[34]Barker, J. Material change[J]. Nature, 1988, 333: 310.

Gräslund Susanne, Nordlund Pär, Weigelt Johan, et al. Protein production and purification [J]. Nature Methods, 2008, 5(2): 135-146.

附件：重组人源化胶原蛋白原材料制造过程控制

附件

重组人源化胶原蛋白原材料制造过程控制

制造过程控制主要涉及工程细胞构建过程、生产用细胞的质量控制及常规生产过程控制。本附件特别关注了较为复杂的动物细胞生产体系，细菌与酵母的生产过程控制需首先符合中国药典第三部中《生物制品生产检定用菌毒种管理及质量控制》的要求。植物与昆虫体系制造重组人源化胶原蛋白，可参考本附件中适用的内容并制定相应的控制要素。

一、重组工程细胞构建及生产用细胞的质量控制

重组人源化胶原蛋白属于采用重组DNA技术，对编码所需人胶原蛋白的基因进行遗传修饰，利用质粒等载体将目的基因导入适当的宿主细胞，表达并翻译成蛋白质，经过提取和纯化等步骤制备而成的重组胶原蛋白之一。

（一）工程细胞的构建

1.宿主细胞的选择、来源、历史和一般特性

经过全面检测的种子细胞是实现重组人源化胶原蛋白材料生产的前提和基础。生产用种子细胞需具有共同的始祖细胞，保持相同的遗传和生物学特征，在特定的培养环境和条件下持续稳定表达携带的外源目的基因。建议详细阐述共同始祖细胞的判定标准。只有经过研究确定细胞在扩增培养和生产过程中的变化，才能够有效控制风险性因素，满足生产的持续需求，使胶原蛋白材料质量保持一致。

本附件中的宿主细胞主要涵盖来自于人或动物的细胞系或者微生物细胞，动物来源的细胞系可来自所有后生动物，包括体外永生化的传代细胞系以及有限传代的二倍体细胞。微生物的来源包括细菌、真菌、酵母和其他单细胞生物。在宿主细胞选择、重组工程细胞构建以及生产细胞的培养扩增和监控过程中，不仅要关注细胞的适用性、目的产物表达生产能力，同时还需重视伴随细胞培养产生的内源性病毒、宿主细胞残余蛋白和DNA、致肿瘤成分等潜在的风险性因素对重组人源化胶原蛋白材料带来的安全性影响。在早期研究阶段，需同步开展库细胞、生产培养过程细胞、生产终末细胞的全面检定和控制。针对哺乳动物细胞，需进行病毒和/或致瘤性成分的去除/灭活工艺的验证。

需选择来源、背景十分清楚的适宜宿主细胞，明确存在的内源性病毒和/或致瘤性等影响胶原蛋白材料安全性的因素，并结合胶原蛋白材料纯化的程度、细胞培养和生产过程中风险性成分的去除/灭活能力及残留量控制水平，以及临床应用适应证和用法用量等特点综合分析，经利弊权衡后确定与特定胶原蛋白材料相适应的宿主细胞。尽可能选择致瘤性试验阴性和低增殖代次水平的宿主细胞。对于改良的传代细胞、全新构建的转化细胞，甚至肿瘤细胞等，由于前期研究、背景资料和致瘤性风险等积累的认识有限，其开发应用将引入新的安全性隐患，需要慎重权衡利弊，确保遗传背景清晰，在开展充分研究的基础上严格控制其潜在的风险性。

用于构建重组工程细胞的宿主细胞其来源和培养历史需足够清楚，可溯源有关的背景资料。例如最初分离建立株/系的机构，在不同机构内引进和传代经过，既往进行过的检测分析项目和确证研究结果，细胞保存状态，经体外传代培养已达到的增殖代次/水平及传代过程中所用过的人源或动物源性材料等。需提供宿主细胞来源的相关资料和证明性文件，说明是否曾进行过遗传操作引入了外源基因序列，描述已进行过的研究检定项目例如细胞鉴定、内源和外源性因子检测等的结果及引进时进行的复核检定结果。对于微生物细胞而言，需提供产生细胞系的物种、株和已知的遗传和表型特征。如可能，还需提供其致病性、毒素产物和其他生物危害方面的资料。需说明所用细胞基质的细胞来源(实验室制备或来源于菌种库)，引证科学文献上的相关参考资料。直接从实验室获得的资料是首选的，如果没有这些资料，也可以利用文献。

需阐述宿主细胞的基本特征，如形态、培养和生长一般特征、培养条件和培养液要求，新构建的动物细胞系需检测致瘤性特征。对宿主系统（原核、真核、哺乳细胞等）的特性、遗传背景、基因型、表型、抗性、质粒转化条件特征都需有详细的文献或实验资料。基本特征信息举例如表1。

表1 宿主细胞基本特征信息表（举例）

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 细胞株名称 | Chinese Hamster Ovary (CHO) | Pichia pastoris | Escherichia coli |
| 出品公司 | Sigma | Invitrogen | Invitrogen |
| 宿主系统类型 | 中国仓鼠卵巢细胞 | 毕赤酵母GS115 | 大肠杆菌 BL21(DE3) |
| 生长条件 | 36.5℃，有氧 | 28℃，有氧 | 37℃，兼性厌氧 |
| 质粒转化条件 | 电转 | 电转 | 电转 |
| 基因型 | Wild type | His4 | F-ompT hsdSB(rB-mB-)gal dcm rne131(DE3) |

2.宿主细胞鉴定

宿主细胞（原核、真核、哺乳细胞等）污染和营养缺陷表型(或基因敲除)、过表达及导入外源基因等鉴定检测方法都需有详细的文献或实验资料。举例如表2。

表2 宿主细胞鉴定项目（举例）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 检测项目 | 检测方法 | 质量标准 |
| 污染 | 平板划线，显微镜检测、支原体检测试剂盒 | 无污染 |
| 营养缺陷表型鉴定 | 营养缺陷平板生长鉴定 | 不生长 |
| 甲醇利用性 | 含甲醇的平板生长鉴定 | 符合菌株表型 |
| 导入外源基因鉴定 | PCR扩增，产物测序 | 符合菌株基因型 |
| 过表达基因鉴定 | qPCR检测过表达基因转录水平 | 符合菌株表型 |

3.重组工程细胞克隆构建过程、筛选及相关鉴定

工程细胞的构建一般包括基因获得、质粒构建和表达体系构建三个阶段。举例如图1。



图1 工程细胞构建一般流程

目前可采用多种表达载体、宿主细胞、基因导入方法和筛选标记等进行工程细胞的构建和筛选，构建成功的标志是工程细胞能够稳定、高效地表达结构正确且具有生物活性的目的产物，包括共表达的产物。因此，需尽可能提供关于重组工程细胞构建和鉴定的详细资料，重点描述的内容举例如表3。

表3 工程细胞鉴定项目（举例）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 检测项目 | 检测方法 | 质量标准 |
| 工程质粒线性化 | 核酸电泳法 | 单一条带，大小正确 |
| 线性质粒纯化 | 紫外分光光度扫描 | DNA浓度不低于100ng/μL；OD260/280=1.8~2.0 |
| 转化表达受体细胞 | 平板筛选，PCR扩增产物测序 | 测序结果正确 |
| 表达鉴定 | SDS-PAGE电泳考马斯亮蓝染色法 | 分子量符合预期 |
| 免疫印迹法 | 分子量符合预期 |
| 水解氨基酸测定 | 氨基酸组成正确 |
| 表达筛选 | SDS-PAGE/Western bloting/酶联免疫吸附法（酵母除外） | 按表达量前5%选择 |

3.1目的基因来源及插入目的基因的设计

需包括最初获得目的基因序列的来源和背景方面的资料，包括但不限于用于制备目的基因cDNA的方法，以及必要的初步序列分析。

需根据人胶原蛋白的氨基酸序列和学术研究，检索公开数据库，如美国国立生物技术信息中心（National Center for Biotechnology Information，简称NCBI）生物信息数据库（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/）、公开发表的蛋白质学术论文等，获取人胶原蛋白的氨基酸序列及其对应的核酸序列，包括全长人氨基酸序列、片段人氨基酸序列、片段重复人氨基酸序列等。衡量目的基因质量时至少需考量下述项目：

表4 衡量目的基因质量的项目（举例）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 检查项目 | 检测方法 | 质量标准 |
| 目标序列 | DNA测序 | 测序结果正确 |
| 限制性酶切 | 核酸电泳法 | 插入片段大小正确，无预期外片段 |
| DNA质量 | 紫外分光光度扫描 | OD260/280=1.8~2.0 |

根据所选的核酸序列及质粒进行插入目的基因的设计，明确插入位点、标签序列或分泌表达信号肽。将目的插入序列翻译成氨基酸序列，需提供该序列与人胶原蛋白氨基酸序列比对图。带有非胶原蛋白设计与修饰(标签、抗性等)，则需提供具体序列及修饰位点，最终产物的胶原蛋白序列与修饰需符合相关行业标准的要求。

3.2载体选择与重组质粒的构建

需详述表达载体构建或改建的过程，对构建成功的表达载体需进行必要的鉴定，并提供相关试验资料如构建中所用位点的酶切图谱等。根据设计的重组人源化胶原蛋白氨基酸导入宿主细胞的不同，选择合适的质粒以满足目标克隆的构建，并提供质粒的完整序列信息。举例如下：

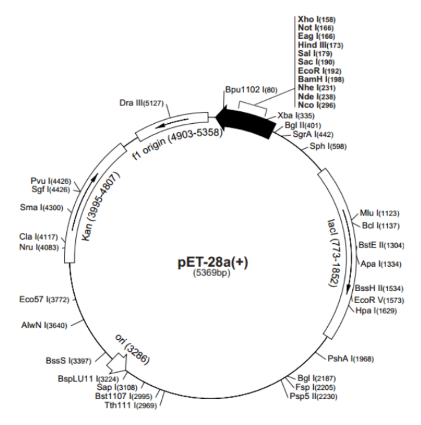


图2 完整的质粒信息示例

需提供有关表达载体详细资料，包括基因的来源、克隆和鉴定，表达载体的构建、结构和遗传特性。需说明表达载体组成成分以及主要元件的来源和功能，包括插入基因和侧翼区序列、复制子、启动子、增强子、抗性标记以及主要的酶切位点等。提供至少包括构建中所用位点的酶切图谱。

将目的基因序列插入质粒中时，为保证重组质粒构建正确，需提供重组质粒至少含目的插入基因完整开放读码框的测序报告，并提供测序序列与设计序列的比对结果，二者需一致。需提供插入基因和表达载体两侧端控制区的核苷酸序列。所有与表达有关的序列均需详细叙述。主要质量控制参数举例：

表5 目的基因序列插入质粒过程中的主要质控参数（举例）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 检查项目 | 检测方法 | 质量标准 |
| 限制性酶切验证 | 核酸电泳法 | 插入片段大小正确，无预期外片段 |
| 目标序列 | DNA测序 | 测序结果正确 |
| DNA质量 | 紫外分光光度扫描 | OD260/280=1.8~2.0 |

需明确质粒与菌种/细胞的储存条件，例如质粒溶液为-20℃，甘油菌为≤-60℃，等等。

3.3载体引入宿主细胞的方法及重组工程细胞的筛选

需详细说明载体引入宿主细胞的方法和操作过程，重组工程细胞的筛选原理、条件和标准，以及采用何种方法增加基因拷贝数等。阐述外源基因引入宿主细胞后产生的变化，符合筛选标准的候选细胞可能为多个细胞株，但拟用于建库的细胞株需为经研究比较后确定的单一细胞克隆。

###### 3.3.1载体引入宿主细胞的方法

非病毒载体类基因修饰系统可通过物理、化学或生物转导方式递送进入细胞。进入目的细胞后，通过转录、剪切、翻译等方式发挥作用。

外源基因导入受体细胞有多种方法，宿主细胞类型不同，载体不同，导入方法也有差异。举例如大肠杆菌属于原核生物，常用的是热击转化方法，将重组表达载体DNA分子转化至感受态细胞。酵母生长较迅速且细胞分散，常用的酵母细胞转化方法包括氯化锂、电穿孔、基因枪和玻璃珠方法。这些方法常用于酿酒酵母，但也可用于其他真菌转化，如酵母（例如粟酒裂殖酵母、白色念珠菌和毕赤酵母）和丝状真菌（例如曲霉属菌种）。将外源DNA导入哺乳动物细胞的转染方法包括磷酸钙转染法、DEAE葡聚糖转染法、原生质体融合、电穿孔、脂质体和胞核微注射法等，各种转染方法的作用机制、转染效率和优缺点各不相同。

若采用基因编辑系统，建议对靶向序列、目的基因序列和基因编辑用酶等的序列和比例等进行优化。通过特定细胞中的基因编辑效果确认基因编辑用酶和靶向序列的特异性，筛选最佳的靶向结合序列（如sgRNA序列），并采取措施降低基因脱靶、插入突变的概率及对目的细胞基因组稳定性的不良影响。对于转座子系统，建议考虑整合位点的特异性和分布趋势，以及转座子在基因组中的移动（genomicmobilization）等特征，进行转座子序列、转座酶及相应调控元件的优化，合理设置转座序列/转座酶的比例、序列分布等。

###### 3.3.2重组工程细胞的筛选

需检测重组后细胞基本性状的改变，比较研究插入外源基因后细胞致瘤性特征的改变。需说明表达载体在宿主细胞内的状态（是否整合到染色体）并采用适宜的方法测定其拷贝数，需提供宿主和载体结合后的遗传稳定性资料。说明启动和控制目的基因在宿主细胞中表达所采用的方法，并进行初步的表达产物鉴别和表达水平检测。

对于选定的工程细胞株需进行充分的目的基因全序列确认，以保证用于编码和表达目的产物的基因在初始核酸序列上的正确性。需详细叙述在生产过程中，启动和控制克隆基因在宿主细胞中的表达所采用的方法及表达水平。

3.4合成表达系统构建过程中关键质量控制

此过程的质量研究通常包括鉴别、结构特征、理化特性、生物学活性、纯度和杂质分析等，建议采用多个代表性批次开展研究。

###### 3.4.1鉴别和序列确认

鉴别研究中，可采用限制性内切酶进行酶切，对酶切产物进行电泳分析，观察是否存在特征性的带型；也可以用PCR方法进行扩增，分析片段大小是否与理论大小一致等方法。序列确认研究中，建议开展全序列测定，重点关注目的基因和调控元件的序列正确性。

###### 3.4.2结构

建议采用适用的方法对结构完整性和大小均一性进行研究。如对于DNA，可关注其是否存在单链、双链、线性/开环、环状和超螺旋等多种结构形式，以及可能的高级结构等。

###### 3.4.3理化特性

建议开展分子量、核酸浓度/含量、修饰位点及比例（如有）、物理特性（如pH、渗透压）等方面的研究。

###### 3.4.4生物学活性

根据作用机制，生物学活性研究通常包括对基因修饰效率、目的基因表达的水平、表达产物的功能或体外模拟生理功能的测定等。建议首选定量检测方法，如可通过目的基因或基因编辑产物的表达量和功能进行分析，关注表达产物是否与预计一致或蛋白表达/基因是否被抑制、空间结构是否符合设计（如多聚体）等。当采用体外转染检测细胞的方法时，需关注选择的检测细胞是否具有代表性和合理性。

###### 3.4.5其他特性研究

对于使用基因编辑工具酶的修饰系统，质量研究中建议持续关注对应细胞中修饰系统的残留情况，采用生物信息学工具分析靶细胞基因组结构变化、单点和小规模基因突变以及外源DNA在基因组中的插入位置、拷贝数等，监控基因编辑用酶的细胞内持续表达时间，考察脱靶效应及相应的安全性影响等。对于制备过程中使用的酶类试剂，建议重点关注酶的功能活性，例如需关注所用DNA聚合酶的保真度和活性，消化酶的酶解作用、酶的非特异性消化条件等，同时需要关注酶的纯度、生产过程中引入的杂质等。对于核苷酸、5’-帽或帽类似物等原材料，其整体的质量需符合制备的要求，建议关注鉴别、浓度、纯度和杂质等。制备过程建议避免使用氯化铯、溴化乙锭、氯仿等毒性物质，避免使用动物源胰蛋白胨、核酸酶等可能引入外源因子等风险的原材料。对于用作递送系统的材料，其制备涉及的关键原材料（脂质、阳离子聚合物等）需进行充分的筛选和质量控制。

（二）生产用细胞的质量控制

连续传代细胞生产重组人源化胶原蛋白材料的最大优点是使每批胶原蛋白材料都有一个经过检定的共同起源细胞，因此建立细胞库的目的就是为了保证生产的可持续性和胶原蛋白材料质量的稳定。重组人源化胶原蛋白材料的生产必须建立在有良好的细胞库管理基础上，载体细胞可以是细菌、酵母或其他真核细胞，已通过筛选、育种、复苏等程序验证建立细胞库而实现工程化，具有稳定的遗传表达和相应的质量控制体系。本部分以针对动物细胞库的管理为例，进行相关阐释。

需建立细胞库系统（细菌、酵母、哺乳细胞等其他）保存管理的相应制度及文件，保证细胞库符合相关标准要求，保障细胞库的稳定性，需对细胞库进行质量检测，包括质粒核酸序列、拷贝数、丢失率检测；杂菌检测（计数、菌落形态观察、菌种鉴定）等；需提供细胞库检测报告。

1.细胞库建立

细胞库可为三级即原始细胞库、主细胞库（MCB）和工作细胞库（WCB）；也可采用主细胞库和工作细胞库组成的两级细胞库；在某些特殊情况下，也可使用主细胞库一级库。用于建库的初始工程细胞株需为经过克隆选择而形成的均一细胞群体，必要时须经与实际生产过程所用培养基和培养条件相一致的适应性培养。

2.建库细胞的管理

在制备工作细胞库过程中不得进行单克隆筛选，以避免由于个别基因突变引起工作细胞库中细胞群体性的遗传特性改变；为了保证细胞库中每个容器中的内容物完全一致，如培养细胞采用几个器皿的，需将所有培养皿中的细胞混合成单批后再分装。

在细胞库的建库期间需采取适宜的预防措施，以确保细胞不被污染（包括微生物污染和实验室中其他类型细胞的交叉污染等）。各级种子库的细胞需按照特定的要求经过全面检定合格后方可使用（具体要求参见本文细胞库检定）。

动物细胞库建库的具体过程、方法和管理需符合中国药典要求。

3.细胞库检定

正确的起始细胞是实现良好生产的前提和基础。检定的目的是为了确认经过初步筛选建库的细胞符合预期设计要求，携带有稳定的目的基因，能够持续表达有功能活性的目的产物，没有微生物污染和混杂其它细胞，能够直接扩增储备或者应用于生产。

对于原始库细胞和/或主库细胞，通常需要进行一次全面系统的研究检定，包括遗传学、生物学和微生物学，以便从源头开始严格控制起始细胞的一致性和防止污染。经过传代稳定性研究的主细胞到工作细胞，只经过简单的传代、扩增，可以适当简化检定项目，重点检测外源因子污染和防止混入了其它细胞。保存的数目和传代水平需保证生产用细胞的持续稳定供应。

3.1细胞鉴定

要进行目的蛋白表达稳定性分析，即确证表达产物的蛋白质序列与预期相符。

表6 目的蛋白表达稳定性分析（举例）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 检查项目 | 检测方法 | 质量标准 |
| 表达稳定性 | SDS-PAGE电泳考染法 | 与供试品一致 |
| 含量 | 紫外分光光度扫描 | 不低于初始工程菌 |
| 污染检测 | 显微镜检测、支原体检测试剂盒 | 无污染 |

###### 3.1.1细胞种属的鉴定

需验明细胞的种属来源，分析细胞的同一性，排除与其它细胞的交叉污染。鉴别试验可利用细胞的表型或遗传型特征，通常对MCB作鉴别试验，而对每个WCB仅作有限的鉴别试验。

目前常用的方法有细胞生长特征和培养形态学检查、种属特异性抗原检测、染色体核型分析、同工酶分析、限制性内切酶分析、基因多态性分析等。需结合具体细胞固有的特性进行适宜的组合和选择，以实现正确鉴别为目的。

真核细胞用于生产时，细胞的鉴别标志，如特异性同功酶或免疫学或遗传学特征，对鉴别所建立的种子是有用的。有关所用传代细胞的致癌性需有详细报告。如采用微生物培养物为种子，则需叙述其特异表型特征。

###### 3.1.2致瘤性试验

对于动物细胞，需检测分析目的基因引入细胞后的致瘤性特征，对于阳性细胞，需研究确定致瘤性改变对胶原蛋白材料带来的安全性风险。种子批不应含有外源致癌因子。

###### 3.1.3目的基因和表达框架分析

目的基因和表达框架的确证是种子库细胞检定的重要组成部分，对于表达正确的目的产物具有先决性意义。常用的方法包括：通过PCR扩增样本DNA来进行DNA序列分析；通过限制性内切酶谱和Southern杂交来检测基因的完整性，确定目的基因的拷贝数，并检测是否有任何序列插入或缺失等。

基因序列分析资料需包括试验方案和步骤、原始的测序图、测得序列以及翻译后的氨基酸序列，同时需将实际测得序列与理论序列进行对比。清楚标注两者之间的异同。一般情况下，在原始种子阶段需确证克隆基因的DNA序列。但在某些情况下，例如传代细胞基因组中插入多拷贝基因。在此阶段不适合对克隆基因作DNA序列分析。在此情况下，可采用总细胞DNA的杂交印染分析，或作mRNA的序列分析。对最终胶原蛋白材料的特征鉴定需特别注意。

为保证胶原蛋白材料结构的正确和稳定，基因序列分析需贯穿于重组工程细胞的筛选和鉴定、细胞库的建立和检定以及生产细胞培养监控的全过程。

###### 3.1.4表达产物检测

需检测分析目的产物的表达量和生物活性。活性测定需选择与其预期用途相对应并能够定量的方法。活性测定方法学研究可贯穿于重组人源化胶原蛋白原材料研究的始终，并经相关验证分析。

3.2微生物污染检测

###### 3.2.1细菌、真菌和支原体检查

对于动物细胞库，需对MCB、WCB和EPC（生产终末期细胞）进行全面检查，对生产培养过程中的细胞进行监测。在进行支原体检查时，需注意同时进行培养法和指示细胞法两种方法，或经验证的qPCR法。必要时可采用扫描电镜法检查细胞是否受到特殊微生物的污染。在设计检测微生物细胞库中外源微生物因子和外源细胞污染的特异性试验方法时，需考虑以下问题：建库细胞的性质、科技文献中报道的可能存在的污染、用于细胞培养的细胞来源、方法和材料以及存在于建库实验室中的其他生物等。

###### 3.2.2病毒因子的检查

包括细胞来源宿主动物潜在的内源性病毒和由于操作带入的外源性病毒的检查。对细胞进行病毒检查的种类和方法，需根据细胞的种属和组织来源、传代历史和细胞特性选择。

3.2.1.1体外试验

需将MCB、WCB和EPC细胞活细胞或细胞裂解产物接种到尽可能多的病毒易感的指示细胞上。可以根据细胞来源，传代史和细胞培养基的原料使用情况来选择适宜的指示细胞。检测结果需为阴性。

3.2.1.2体内试验

通过接种乳鼠、成年小鼠、鸡胚、豚鼠、家兔或其它敏感动物来检测细胞培养物中潜伏性病毒。通常要对MCB、EPC进行体内试验。

3.2.1.3种属特异性病毒的检定

通过抗体产生试验来检测可能存在于MCB细胞中的种属特异性病毒，如啮齿类动物来源的细胞需进行小鼠、仓鼠或大鼠的抗体生成试验。严格控制对于人类有危害的鼠源性病毒。

3.2.1.4逆转录病毒的检测

逆转录病毒的试验需包括感染性试验、逆转录酶（RT）检测和电镜技术检查。需采用上述方法对MCB和EPC细胞进行逆转录病毒的检测。

3.2.1.4.1感染性试验

需根据细胞的特性及可能存在的逆转录病毒种类选择适宜的检测方法，如XC空斑试验（XC plaque）、延时XC空斑试验、S＋L－灶点分析（S＋L－Focus）等。试验时需注意设立恰当的阴/阳性对照。

3.2.1.4.2逆转录酶检测

为提高检测的敏感性，通常需要将受试细胞经适当的化学诱导剂诱导后，收集上清液分别与检测细胞联合培养，再检测逆转录酶的活性，注意设立恰当的阴/阳性对照。

3.2.1.4.3透射电镜检查

透射电镜下可观察细胞基质超微结构的形态学特征以及逆转录病毒和病毒样颗粒的存在，需比较未经和经过化学诱导剂诱导的细胞。另外，需要对细胞培养液超速离心后所得的沉淀物经负染后进行检查。观察有无逆转录病毒颗粒以及颗粒的类型。

上述三种方法具有不同的检测特性和灵敏度。因此，需采用不同的方法联合检测。若逆转录酶活性检测阳性时，建议进行透射电镜检查或感染性试验，如果确证对人或者其它灵长类动物细胞有感染性的逆转录病毒颗粒，该细胞不可用于生产。

4.细胞稳定性研究

需包括库细胞、生产过程中细胞、生产终末期和/或超过生产终末期等不同培养时期的细胞。库细胞需重点考察贮存、复苏等操作处理因素的影响和传代过程中的遗传稳定性，在此基础上确定库细胞传代限度，也需基于质粒拷贝数及其在载体细胞内的状态限定生产过程中载体细胞的最高传代次数，验证试验所涉及的传代范围需等于或超过规定的细胞最高限定代次。生产过程中细胞、生产终末期和/或超过生产终末期细胞需考察模拟生产工艺和培养条件对细胞生长状况、表达能力等的影响，并确定生产细胞增殖限度和/或连续培养时间；使细胞始终能够持续、稳定地表达重组人源化胶原蛋白，并将对最终胶原蛋白原材料产生安全性影响的风险因素严格控制在最低限度。

4.1贮存条件下的稳定性

当储存的细胞复苏后用于生产胶原蛋白材料时，需进行细胞存活率和功能活性等与细胞质量密切关联项目的研究测定，以证实复苏细胞表达能力的稳定性，需有对建库细胞贮存条件下稳定性监测的方案。这种监测需在一支或多支冷冻保藏的WCB复苏后制备生产用细胞时进行，或当一支或多支冷冻保藏的MCB复苏并用于制备新WCB时进行。如果长时间未进行生产时，需按上市申请时所述的间隔时间对生产用细胞库进行活力测试。如果细胞的活力没有明显的减退，一般不需对MCB或WCB作进一步检定。

4.2传代/扩增过程中的稳定性

需对库细胞和生产过程细胞进行传代/扩增的稳定性研究，可将复苏的库细胞连续传代培养至一定的代次和将工作库细胞在模拟实际生产条件下连续培养、扩增（逐级放大扩增过程），直至预期培养时间以及超过预期时间之外的延长时间点，收获后进行检测分析。通过考察目的基因、表达框架等在重组工程细胞中的传代稳定性和目的产物表达的稳定性，制定库细胞的限传代次和生产细胞的增殖限度以保证实际生产过程中细胞整体扩增水平以及伴随的内源性病毒和/或致瘤性风险等的抑制状态在预期限度范围内。至少需包括以下方面的试验研究：

###### 4.2.1基因水平的比较

目的基因编码序列和表达框架不应有错误，包括突变、缺失、插入。并注意比较基因拷贝数的变化。

###### 4.2.2目的产物表达水平的比较

目的产物的表达量和表达活性不应有明显降低，根据不同的重组人源化胶原蛋白和具体研究结果确定适宜的可接受标准。

###### 4.2.3细胞自身的稳定性

需重点检测细胞在传代/扩增过程中的形态、生长、代谢等基本状况，遗传特征和致肿瘤特性的变化。

###### 4.2.4内源因子检查

需动态考察内源因子的复制是否得到有效抑制。重点检测由细胞来源动物和宿主细胞特性所决定的易染病毒如内源性逆转录病毒，分析其对于人类的致病性和重要性，严格控制其产生的条件。

###### 4.2.5致瘤性监测

对于致瘤性试验阳性的细胞，尤其对动物细胞，需通过比较研究考察细胞培养传代过程中致瘤性特征的改变，例如试验阳性时的细胞代次、最低接种量、肿瘤转移扩散、肿瘤增殖时间、瘤组织病理特征等。建议对不同剂量（低、中、高）进行不同宿主细胞的致瘤性试验，直至筛选出低致瘤性细胞。

5.生产过程细胞质量控制

种子库细胞需在全面质量研究和检测分析基础上，模拟实际生产过程进行扩增培养，并检测分析目的基因表达的稳定性、细胞生长状况、污染控制、致肿瘤风险性等；规模化生产后须建立细胞生产培养过程的监控标准，生产细胞培养终末期需符合质量控制相关要求。

对于内源性逆转录病毒和/或致瘤性试验阳性的细胞，需依据工艺处理能力制定风险性成分的控制条件，并根据模拟生产状态下取得的试验研究数据制定废弃收获液的标准；生产工艺须包括有效的病毒和/或致瘤性成分的灭活/去除方法并经过充分验证。

如果整个培养过程中的关键环节例如培养基、培养条件、培养时间和/或限制代次、培养方式等发生重大改进，细胞培养工艺进行了放大，影响了原已确定的监控标准，需重复进行一次全面的检测验证。

5.1常规生产过程监控

经研究确定了生产工艺条件之后，常规生产过程中可重点监测微生物污染和细胞生长状况，例如活细胞数目和形态、代谢和功能状态、目的蛋白表达状况、潜伏性逆转录病毒基因组激活状况、细菌和支原体污染以及其它要求等，在比较分析的基础上确定批次或者连续培养生产的终末细胞的检测项目及可接受标准。

5.2细胞增殖限度

在细胞稳定性试验研究的基础上，需结合细胞培养、维持等工艺过程中实际采用的生产方式如批式培养（batch culture）、流加培养(fed-batch culture)、灌注培养(perfusion culture)等各自特点，考察细胞体外连续扩增、培养过程中发生的变化，例如细胞的生长状态、内源性病毒抑制状态、目的蛋白表达的下降程度以及致瘤性改变等确定适宜的收获方式、收获时间、细胞终止培养时间和/或增殖代次，并预留充分的安全储备。实际生产过程中细胞不得超过预先设定的培养时间和/或增殖限度

5.3其它风险性因素控制

培养基对细胞的质量有直接的影响，也是细胞污染的可能来源之一。需明确培养基的组成、来源及质量标准。对于动物源性添加成分，需尽可能控制并减少其使用；如确需使用，需阐明选择的理由，并说明该成分的来源和病毒安全性控制方法。目前提倡采用无血清培养基，并尽可能减少用于处理细胞（例如从贴壁状态中游离或者分散）的动物来源的蛋白酶。各种培养基的来源和质量检测数据均需有可追溯的文件记录。如培养中使用了牛源性物质，需明确其来自非BSE疫区，并需按照国家食品药品监督管理局的相关规定提供必要的证明性文件。

细胞培养条件的研究中，需考察使内源性逆转录病毒复制和癌基因相关序列激活或者复制受抑制的控制条件，对模拟生产条件下的状况进行分析，确定可实际控制的程度。生产中需严格执行研究确定的控制条件。

6.风险评估与控制

细胞系/库的建立，其序列的设计、生产用材料、制备工艺、质量、稳定性、内包材的要求可依具体情况，结合细胞系/库的质量研究结果进行综合评估。可结合生产使用情况和细胞系/库的研究和检测情况，制定重组人源化胶原蛋白原材料的风险控制策略。良好的重组人源化胶原蛋白原材料质量研究与控制有利于筛选、建立出质量良好的细胞系/库，有利于后续的生产研究。在细胞系/库建立过程中，建议对细胞系/库进行检定和传代稳定性研究，关注细胞系/库功能是否符合理论设计和预期、安全是否可控，必要时对工程细胞进行相应的质量研究，以确认其适用性。

随着技术不断更新和研究经验的逐步积累，研发过程常常伴随重组人源胶原合成表达系统的升级和工艺的优化，因此研发各阶段有可能发生变更。系统的变更可能显著影响工程细胞的安全性和有效性，是重要风险之一，研发者需评估变更引入的影响和风险。根据风险评估情况，对重组人源胶原合成表达系统及其工程细胞的质量、工艺控制、稳定性等方面进行深入研究，合理设计变更可比性研究方案。

二、常规生产过程控制

重组人源化胶原蛋白的结构特性容易受到各种理化因素的影响，且分离提纯工艺复杂，因此其质量控制体系是针对生产全过程，采用化学、物理和生物学等手段而进行的全程、实时的质量控制。生产过程中每一环节或制备条件的改变均可能影响其非临床安全性评价的合理性。

（一）载体制备工艺

不同目的基因和表达载体的载体制备工艺可能有差异。以质粒DNA为例，其制备步骤一般包括微生物培养及发酵、菌体收集、菌体裂解、质粒纯化、浓缩、灌装等。工艺研究与确定过程需对关键工艺参数进行探索和优化，建立稳定的制备工艺。关键工艺参数可能包括发酵培养基组成、发酵培养温度、补料培养基组成、补料时间和补料量、溶氧量、碱裂解缓冲液及中和缓冲液的组成、碱裂解时间、层析柱载量、层析流速等。研究中建议关注制备全过程对质粒结构和功能的可能影响，如碱裂解步骤可能产生的质粒不可逆变性的情况等。纯化工艺开发过程中，可以根据质粒的实际大小和性质选择合适的柱层析填料，最大程度去除宿主RNA、宿主DNA、DNA碎片和细菌内毒素等杂质。根据研究，设置合理的过程控制指标和可接受标准，如质粒中间产物的浓度、超螺旋比例、杂质残留量等。

（二）发酵

需对生产过程中使用的各种原材料进行质量控制，以保证这些原材料符合既定用途的要求。需根据生产过程中培养、增殖和蛋白表达量一致性的研究资料，确定转罐、诱导、终止培养的技术参数。需根据生产工艺验证资料，明确生产过程中的工艺参数，如培养基灭菌时间灭菌温度、培养周期等；同时根据表达系统差异，针对性的建立细胞（细菌、酵母或其他）生长的主要质控指标（包括但不限于发酵液OD值、pH值、目标蛋白分子量、蛋白表达量、质粒稳定性等）。

1.有限代次生产

对于哺乳动物细胞等随着传代次数增加可能丧失稳定表达的宿主细胞，需予以有限代次生产；对于大肠杆菌、毕赤酵母等表达相对稳定的宿主细胞，必要时进行代次稳定性验证后，可不限定代次生产。用于培养和诱导基因产物的材料和方法需有详细的资料。培养过程及收获时，需有敏感的检测措施控制微生物污染。

需提供培养生长浓度和产量恒定性方面的数据，并需确立废弃一批培养物的指标。根据宿主细胞／载体系统的稳定性资料，确定在生产过程中允许的最高细胞倍增数或传代代次，并需提供最适培养条件的详细资料。

在生产周期结束时，必要时监测宿主细胞/载体系统的特性，例如质粒拷贝数、宿主细胞中表达载体存留程度、含插入基因的载体的酶切图谱。一般情况下，用来自一个原始细胞库的全量培养物进行监测，宜适时做一次目的基因的核苷酸序列分析。

2.连续培养生产

基本要求同“1.有限代次生产”。

必要时监测经长期培养后所表达基因的分子完整性，以及宿主细胞的表型和基因型特征。每批培养的产量变化需在规定范围内。对可以进行后处理及应废弃的培养物，需确定指标。从培养开始至收获，需有敏感的检查微生物污染的措施。

根据宿主/载体稳定性及表达产物的恒定性资料，需规定连续培养的时间。如属长时间连续培养，需根据宿主/载体稳定性及产物特性的资料，在不同间隔时间作全面检定。

（三）纯化

根据生产工艺需求，可以将纯化过程分为粗纯、精纯、换液、浓缩等工序，关于纯度的要求可视胶原蛋白材料的用途和用法而确定。例如，仅使用一次或需反复多次使用时，用于健康人群或用于重症患者时，都可对纯度有不同程度要求。不同载体细胞表达系统可能对纯化过程的要求有所不同，但所采用的分离、纯化、浓缩方法或技术，需能适用于规模化生产并保持稳定。

生产中可能引入一些特定的工艺杂质，纯化工艺需保证能将其去除或降低至可接受的水平。杂质主要包括与工艺相关的杂质和胶原蛋白材料相关杂质以及环境污染杂质。工艺相关的杂质是指生产过程中产生的杂质，如宿主细胞蛋白、DNA，培养物（诱导剂、抗生素或其他培养基成分等），纯化等工艺产生的杂质（酶、化学试剂、无机盐、溶剂、载体、抗体等）；胶原蛋白材料相关杂质是指胶原蛋白材料异质性，如肽链的截短或延长形式、修饰形式（去酰胺化、异构体、二硫键错配、糖基化、磷酸化等）、聚合体、多聚体等；环境污染杂质包括细菌内毒素、可能携带的病毒和有害微生物等，宿主细胞（如细菌、酵母、昆虫、植物和哺乳动物细胞）的污染也存在潜在的危险性。具体内容详见本指导原则“二（一）5.杂质、污染物和添加剂”的内容。

对于生产过程中的收获、分离和纯化方法需详细记述，需特别注意污染病毒、核酸以及有害抗原性物质的去除，如采用亲和层析技术，例如用单克隆抗体，需有检测可能污染此类外源性物质的方法，不应含有可测出的异种免疫球蛋白。需验证这些分离、纯化关键工序及杂质检测方法。对整个纯化工艺需进行全面研究，包括对宿主细胞蛋白、核酸、糖、病毒或其它杂质以及在纯化过程中加入的有害的化学物质等的去除。可以采用过滤、离心等操作进行分离，通过洗滤参数、相对离心力等工艺参数进行必要的控制；可以采用蛋白层析或者离子交换层析等技术进行纯化。

可使用层析的方法提高胶原蛋白材料的纯度，但需充分考虑到层析参数的选择和层析树脂的质量对胶原蛋白材料质量的影响，需要重点关注工艺对病毒的灭活与去除能力。病毒灭活/去除验证需符合《中华人民共和国药典》通则“生物制品病毒安全性控制”等技术文件的要求。所采用的分离、纯化工艺需能确保较好地保留胶原蛋白材料的理化和生物学性质，保留目标肽段的生物学活性。

采用乙醇等沉淀法时，需对乙醇等试剂的质量进行控制，并对胶原浓度、温度、pH值、离子强度、处理时间等进行研究，明确可接受的限度范围。采用层析方法时，需根据产物中胶原的性质和浓度，优化色谱条件、确定合理的参数，如层析柱的容量、料液及缓冲液的离子强度和缓冲液的 pH值、流速、接触时间和温度等，这些参数的确定需以工艺开发的研究数据为基础，均需制定限度标准和容许范围。同时，还需对层析树脂的清洁、再生（使用寿命）、层析柱的载量、浸出物等进行研究，尤其是使用具有潜在有害配体的层析填料。需关注每一步分离纯化步骤的体积、胶原浓度、回收率、电泳纯度等，评估对工艺相关杂质和胶原蛋白材料相关杂质的去除能力。必要时，为了证明该工艺对杂质的清除能力，可能需要采用加标试验评估工艺对某些潜在污染物的清除能力。如涉及中间产物的暂存、运输等可能影响产品质量的操作时，需有必要的稳定性研究数据支持。

鼓励采用创新和改进工艺（包括对乙醇分离工艺的改进），提高胶原利用率和质量。在前期工艺开发过程中，需注意关键工艺参数的识别，关注不同分离阶段工艺控制的完整性、工艺参数设置的合理性。如注册申请人已有相同分离纯化工艺的胶原蛋白材料上市，已有工艺研究数据、控制参数等可供借鉴时，需开展新胶原的3批生产规模工艺验证。

换液可将蛋白溶剂置换至工艺要求的工作液中，浓缩将蛋白浓缩至工艺要求的浓度。质控点通常包括膜截留效率、蛋白含量、电导率等。

需建立重组人源化胶原蛋白原材料成品的鉴别、纯度、稳定性和活性等方面的试验方法，详见正文“二、（一）重组人源化胶原蛋白原材料性能研究”。对生产过程中的原液、半成品及生产原辅料，需注意如下方面。

1.原液要求

经纯化、换液、浓缩后即为重组人源化胶原原液。如需加入稳定剂或赋形剂，需不影响质量检定，否则需在添加辅料前取样进行原液检定。原液的检测项目取决于工艺的验证、一致性确认、预期胶原蛋白材料相关杂质与工艺相关杂质的水平、预期用途等，需采用适当方法对原液质量进行检测，必要时需与参比品进行比较。原液的储存需通过稳定性验证确定储存条件和时间。参比品的建立和制备需参照《中华人民共和国药典》“生物制品国家标准物质制备和标定”的相关要求或YY/T 1849《重组胶原蛋白》中的相关要求。

原液的检测项目可包括蛋白表征研究（如肽段覆盖率、C端序列、N端序列、氨基酸组成、异质组成、X-射线衍射分析（XRD）、扫描电镜分析、晶体结构学研究、红外光谱、圆二色谱、差示扫描量热分析、等电点、肽图等指标）；理化性能指标检测（如鉴别、pH、蛋白含量、纯度、分子量等指标）；污染物残留指标检测（如外源性DNA残留、宿主细胞蛋白残留、糖类残留、抗生素残留、诱导剂残留、重金属总量及微量元素残留等指标）；生物性能指标检测（如微生物限度/无菌、内毒素残留、热原等指标）。基于胶原蛋白材料应用风险评估，提供研究性资料或验证报告。

2.半成品要求

可由一批或多批原液合并生产半成品。拟混合的每批原液应在有效期内，需按规定的工艺生产、单独检验，并符合相应的质量标准；混合的各批原液需可有效追溯；需对混合工艺进行验证。

如需对半成品进行稀释或加入其他辅料，如防腐剂或赋型剂甘油、甘露醇及缓冲盐等，需确定半成品的质量控制要求，包括检定项目和可接受标准。检定项目可包括蛋白含量、pH等指标。

3.生产原辅料要求

原辅料需按照国家药品监督管理局有关规定执行。动物源性原料的使用需提供来源及质控检测资料；发酵用培养基若添加β内酰胺类抗生素，最终材料成品中不得检出。

