



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1876—2023

代替 YY/T 0606.25—2014

组织工程医疗产品 动物源性生物材料 DNA 残留量测定法：荧光染色法

Tissue engineered medical products—Quantification of remnant DNA in biological materials utilizing animal tissues and their derivatives: Fluorescence method

2023-01-13 发布

2024-01-15 实施

国家药品监督管理局 发布

目 次

前言	III
引言	IV
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 试验原理	2
5 样品、试剂和仪器	2
6 试验过程	3
7 结果计算	6
8 结果判定	7
9 试验报告	7
参考文献	8

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。

本文件代替 YY/T 0606.25—2014《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》，与 YY/T 0606.25—2014 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 更改了范围(见第 1 章,2014 年版的第 1 章)；
- 更改了规范性引用文件(见第 2 章,2014 年版的第 2 章)；
- 删除了术语“基质”(见 2014 年版的 3.1),增加了术语“细胞外基质”“脱细胞”(见 3.1 和 3.6)；
- 增加了“试验原理”(见第 4 章),将 2014 年版的有关内容更改后纳入(见第 4 章,2014 年版的 5.1)；
- 增加了对供试品灭菌和病毒灭活的要求、增加了其他样品的说明[见 5.1 的列项 a)、b)、c)和 d)],将 2014 年版的有关内容更改为注(见 5.1 的注 1,2014 年版的 4.1)；
- 更改了蛋白酶 K 消化用试剂的说明(见 5.2.1,2014 年版的 4.2.1)；
- 更改了其他试剂(见 5.2.4,2014 年版的 4.2.4)；
- 更改了条款名称,将二级条款编号更改为列项(见 5.3,2014 年版的 4.3)；
- 更改了“供试品及反应液的准备”(见 6.1.1,2014 年版的 5.2.1.1)；
- 删除了“回收率样品及反应液的制备”(见 2014 年版的 5.2.1.2),增加了“加标回收样品及反应液的准备”(见 6.1.2)；
- 增加了“阴性对照样品及反应液的准备”(见 6.1.3)；
- 更改了 DNA 纯化的操作步骤(见 6.2,2014 年版的 5.2.2)；
- 增加了“纯化 DNA 的片段分析”(见 6.3),将 2014 年版的有关内容更改后纳入(见 6.3,2014 年版的 5.2.2.12 的注 2)；
- 更改了“DNA 含量测定(荧光染色法)”(见 6.4,2014 年版的 5.2.3)；
- 更改了结果计算(见第 7 章,2014 年版的第 6 章)；
- 更改了结果判定(见第 8 章,2014 年版的第 7 章)；
- 增加了“试验报告”(见第 9 章)。

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。

本文件由全国外科植入物和矫形器械标准化技术委员会组织工程医疗器械产品分技术委员会(SAC/TC 110/SC 3)归口。

本文件起草单位：中国食品药品检定研究院、四川大学(四川医疗器械生物材料和制品检验中心)、冠昊生物科技股份有限公司。

本文件主要起草人：邵安良、徐丽明、李秋、梁洁、许建霞、凌友、黄斯坦、范行良、袁曦。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 2014 年首次发布为 YY/T 0606.25—2014；
- 本次为第一次修订。

引 言

由哺乳动物细胞外基质构成的生物源性支架材料被用于外科的创伤修复,肌腱、皮肤、心血管、胃肠及下尿道组织的重建。这些细胞外基质支架材料取材于人和动物的各种组织,如猪的皮肤、角膜、小肠、尿道及膀胱、牛的皮肤等。由于细胞膜的表位抗原、细胞核酸(DNA)以及由损伤而来的小分子物质可能会引起人体广泛的免疫反应,因此动物源性基质材料的脱细胞过程被认为是非常重要的去除免疫原性工艺。尽管细胞外基质材料已经被广泛用于临床,但仍然存在由于残留 DNA 及残留蛋白质等所引起的炎症和免疫反应隐患。因此,动物源性生物材料中,残留 DNA 定量检测是控制产品质量的重要措施之一。

目前,国际上还没有对该类产品残留 DNA 的检测方法标准。国际标准化组织发布了动物源医疗器械系列标准(ISO 22442),我国已转化为“动物源医疗器械”系列行业标准(YY/T 0771)。此系列标准包括第 1 部分“风险管理应用”;第 2 部分“来源、收集与处置的控制”;第 3 部分“病毒和传播性海绵状脑病(TSE)因子去除与灭活的确认”和第 4 部分“传播性海绵状脑病(TSE)因子的去除和/或灭活及其过程确认分析的原则”。我国于 2009 年出台了“动物源性医疗器械产品注册技术审查指导原则”,2017 年发布了修订版。该指导原则在对动物源性医疗器械产品注册申报资料的要求中提到,注册申报资料在满足一般性要求的基础上,需要增加涉及控制病毒和/或传染性病原感染以及免疫原性风险方面有关的技术内容。其中要求提供对清除(或降低)动物源性材料免疫原性工艺过程的描述、质量控制指标与验证性实验数据或相关资料。对于动物源性材料带来的免疫原性风险的降低,一般采用在生产工艺中降低其免疫原性的方法,包括脱细胞、去除杂蛋白,以及使蛋白质变性等物理的和/或化学的处理步骤,移走或覆盖抗原决定簇。生产企业需对其降低材料免疫原性的有效性进行验证。其中验证手段之一就是检测残留 DNA 含量。基于生物制剂残留 DNA 检测方法主要包括 DNA 探针杂交法、荧光染色法及定量 PCR 方法(见《中华人民共和国药典》2020 年版三部,通则 3407 外源性 DNA 残留量测定法),其中荧光染色法操作简便、灵敏度高、再现性好,得到广泛使用。然而:a)动物源性生物材料来源于动物组织(主要是基质组织),经脱细胞等工艺制备而成,大多为固体状态(有的为胶体或液体状态),不能直接采用上述方法检测;b)基质组织中含有大量的结构蛋白质,影响荧光测定的结果。因此,生物制剂残留 DNA 检测方法不能直接用于动物源性生物材料残留 DNA 的定量检测。

本文件给出了适用于动物源性生物材料残留 DNA 的定量检测方法。

组织工程医疗产品 动物源性生物材料

DNA 残留量测定法:荧光染色法

1 范围

本文件规定了动物源性生物材料中 DNA 残留量的测定方法。

本文件适用于动物源性生物材料及其衍生物的终产品或中间产品、用于组织工程医疗产品基质或支架的动物源性支架材料,也可用于人源脱细胞基质材料。

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。

YY/T 0771.1 动物源医疗器械 第 1 部分:风险管理应用

YY/T 0771.3 动物源医疗器械 第 3 部分:病毒和传播性海绵状脑病(TSE)因子去除与灭活的确认

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

细胞外基质 extracellular matrix; ECM

由细胞产生并分泌到组织内细胞外空间,包括均质状态的基质(蛋白多糖和糖蛋白)和细丝状的胶原纤维,具有连接和支持细胞的作用,是细胞附着的基本框架和代谢场所,其形态和功能直接影响所构成的组织形态和功能。

3.2

支架 scaffold

促进替代、修复或再生组织的细胞或生物活性因子迁移、结合或输送的支持物、释放载体或基体。许多有机物(生物源性物质)、无机物及高分子物质都可以用作组织工程医疗产品的支架材料。

3.3

动物 animal

除人类以外的脊椎动物或无脊椎动物,包括两栖动物、节肢动物(如甲壳类动物)、鸟类、珊瑚虫、鱼类、爬行动物、软体动物和哺乳动物等。

[来源:YY/T 0771.1—2020,3.1]

3.4

衍生物 derivatives

通过制造工艺从动物源性材料中获得的物质。例如:透明质酸、胶原、明胶、单克隆抗体、壳聚糖、白蛋白等。