



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1561—2017

组织工程医疗器械产品 动物源性支架材料残留 α -Gal 抗原检测

Tissue engineering medical device products—
Remnant α -Gal antigen determination in scaffold materials utilizing
animal tissues and their derivatives

2017-03-28 发布

2018-04-01 实施

国家食品药品监督管理总局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本标准由国家食品药品监督管理总局提出。

本标准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。

本标准起草单位:中国食品药品检定研究院、中国人民解放军第四军医大学、冠昊生物科技股份有限公司。

本标准主要起草人:徐丽明、邵安良、陆艳、赵红妮、金岩、张勇杰、汤银喜、张伟、柴媛。

引 言

动物源性生物材料及含动物源性生物材料的医疗器械或异种器官中残留的抗原是该类生物材料及器官移植中超急性免疫排斥反应及慢性免疫毒性的主要因素。尽管动物源性生物材料在制备过程中经过了脱细胞和去除抗原的处理,但残留的异种抗原仍存在着导致慢性免疫毒性反应的风险。

已有研究显示 α -半乳糖基抗原(α 1,3galactosyle, Alpha1,3Gal 或 α -Gal)是引起动物源性生物材料或异种器官移植时超急性免疫排斥反应的主要靶抗原。 α -Gal 的结构为 Gal α 1-3 Gal β 1-4 GlcNAc-R, 该抗原是半乳糖基与细胞膜上的蛋白或脂结合构成的一组完全性抗原。 α -Gal 主要受 α -1,3 半乳糖基转移酶(α 1,3-galactosyltransferase, α -GT)及异红细胞糖苷酯合成酶(isoglobotriosylceramide synthase 或 isogloboside 3 synthase, iGb3S)调控。由于人体及类人猿、古世纪猴的半乳糖基转移酶基因有 2 个碱基错位变异而不表达 α -Gal 抗原,但人肠道菌群持续表达 α -Gal 抗原,这种刺激致使人体免疫系统持续产生抗 α -Gal 抗体,达到循环免疫球蛋白的 1%~3%。因此,当人体接受含有 α -Gal 抗原的生物材料或异种器官移植时会引起超急性免疫排斥反应及慢性的免疫毒性反应。动物源性生物材料或异种器官移植中 α -Gal 抗原的去除成为降低免疫排斥反应和慢性免疫毒性反应的关键之一。目前,尚无动物源性生物材料中残留 α -Gal 抗原的定量检测方法。本标准通过使用 α -Gal 抗原特异性单克隆抗体 M86,以人工合成的 Gal-BSA 抗原与 Gal 抗原阴性基质混合作为参照品建立标准曲线,通过竞争性 ELISA 抑制方法定量检测动物源性生物材料中残留的 α -Gal 抗原。同时,试验体系中加入 Gal 抗原阳性和阴性参考品,使试验的灵敏性和特异性得以监控。

竞争性 ELISA 抑制方法是一种常用的方法,其原理是:首先将标准曲线样品及试验样品的 α -Gal 抗原与 M86 抗体反应(消耗部分 M86 抗体);然后用 Gal-BSA 作为固相抗原,通过 ELISA 方法检测第一次反应后上清液中的剩余 M86 抗体;进而可利用标准曲线计算待测物中的 α -Gal 抗原含量。由于第一次待测物中的 α -Gal 抗原与 M86 抗体的反应对后续的剩余 M86 抗体与固相 Gal-BSA 抗原的反应构成了抑制效应,故称为 ELISA 抑制法。

组织工程医疗器械产品

动物源性支架材料残留 α -Gal 抗原检测

1 范围

本标准给出了组织工程医疗器械产品支架材料制备时使用的动物源性生物材料中残留 α -Gal 抗原的定量检测方法。

本标准适用于制备组织工程医疗器械产品支架材料的各种动物来源的生物材料或其衍生物的 α -Gal 抗原检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 16886.20 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与方法 (GB/T 16886.20—2015, ISO/TS 10993-20:2006, IDT)

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

3 术语和定义

GB/T 16886.20 和 YY/T 0606.25 界定的术语和定义适用于本文件。

4 试剂和仪器

4.1 试剂

试剂包括:

- 磷酸盐缓冲液(PBS, phosphate buffered saline, pH 7.4);
- 碳酸盐缓冲液(pH 9.5);
- 市售 α -Gal Epitope(Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R), mAb(M86), 分装后 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存;
- 市售 Gal α 1-3gal-BSA(3 atom spacer, 简称 Gal-BSA), 溶于去离子水中, 分装后 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用;
- 辣根酶标记的山羊抗小鼠二抗(IgM-HRP);
- TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)显色液;
- 血清白蛋白;
- 裂解液(市售品), 其主要组成成分包括: 50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris, pH 7.4), 150 mmol/L 氯化钠(NaCl), 1% (体积分数) 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100), 1% (质量浓度) 脱氧胆酸盐(sodium deoxycholate), 0.1% (质量浓度) 十二烷基硫酸钠(SDS), 原钒酸钠(sodium orthovanadate), 氟化钠(sodium fluoride), 乙二胺四乙酸(EDTA), 亮抑酶肽