

T/GDMDMA

广东省医疗器械管理学会团体标准

T/GDMDMA XXXX—XXXX

重组胶原蛋白医用敷料体外透皮吸收评价 指南

Guidelines for evaluating percutaneous absorption in vitro of recombinant collagen
medical dressings

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

广东省医疗器械管理学会 发布

目 次

前言	II
引言	III
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 受试物要求	2
6 试验方法	2
7 试验数据和报告	5
参考文献	6

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。

本标准参照了GB/T 27818-2011《化学品 皮肤吸收 体外试验方法》和经济合作与发展组织(OECD)化学品测试方法 No. 428(2004)《皮肤吸收：体外试验》(英文版)的部分技术性内容。

本文件由广东省医疗器械管理学会和新型生物材料与高端医疗器械广东研究院提出。

本文件由广东省医疗器械管理学会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

引 言

关于重组胶原蛋白医用敷料应用于非慢性创面时，其所含重组胶原蛋白成分是否被人体部分或全部吸收的研究，目前主要参考GB/T 27818-2011《化学品皮肤吸收体外试验方法》、GB/T 27825-2011《化学品皮肤吸收体内试验方法》、《皮肤外用化学仿制药研究技术指导原则（试行）》等进行。相应标准对重组胶原蛋白医用敷料透皮与否的研究的不适用性体现在如下几个方面：首先上述标准适用于皮肤屏障完整的正常皮肤，而重组胶原蛋白医用敷料应用于非慢性创面，其皮肤屏障在功能及结构会有不同程度的损坏，相应标准的适用性有限。其次，与化学品和化学药品不同，重组胶原蛋白与皮肤组织中其他蛋白成分相似性极高，对常规的检测方法提出了较大挑战；GB/T-27818中同位素标记法难以在重组胶原蛋白生产过程中或生产后实现，且同位素的检测防护要求高，难以在检测机构实现。最后，GB/T-27818与《皮肤外用化学仿制药研究技术指导原则》仅提出指导性的要求，并无规范化的操作标准。针对以上的问题，本标准在法规、标准和文献调研以及试验预研的基础上，对重组胶原蛋白医用敷料透皮吸收实验方法提出了技术路线、规范化操作标准和判定标准。本标准在经过意见征集后由广东省医疗器械质量监督检验所、新型生物材料与高端医疗器械广东研究院、广东省华微检测股份有限公司、广东省科学院生物与医学工程研究所进行了验证。

重组胶原蛋白医用敷料体外透皮吸收评价指南

1 范围

本标准规定了重组胶原蛋白医用敷料透皮吸收试验方法的适用的范围、术语和定义、试验原理、试验用受试物的要求、试验方法、试验数据和报告。

本标准适用于重组胶原蛋白医用敷料用于非慢性创面时所含重组胶原蛋白透皮吸收的评价。标准适用的敷料类型为创面敷贴、凝胶敷料、液体敷料、膏状敷料。本标准并非适用于检测所有的情况，仅适用于皮肤透皮的最初定性评价。在某些情况下，应进一步参考体内试验数据。

医用敷料中常见的丝素蛋白、贻贝蛋白及其它蛋白类可参考本标准，但需要根据具体的产品特性进行评价。

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。

GB/T 27818-2011 《化学品皮肤吸收体外试验方法》

《皮肤外用化学仿制药研究技术指导原则（试行）》

《中华人民共和国药典》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

离体皮肤组织

从人或动物体表分离出的符合体外透皮吸收试验需要的皮肤组织，可直接用于试验，或经过一定创面制备流程后用于体外透皮吸收试验。

3.2

创面

正常皮肤（组织）在外界致伤因子如外科手术、外力、热、电流、化学物质、低温以及机体内在因素如局部血液供应障碍等作用下所导致的损害。常伴有皮肤完整性的破坏以及一定量正常组织的丢失，同时，皮肤的正常功能受损。

3.3

受试物

重组胶原蛋白经荧光标记后，按终产品生产工艺制备成的重组胶原蛋白医用敷料。

3.4

待测物

荧光标记后的重组胶原蛋白。

3.5

终产品

经受过所有加工过程处于“待上市”的医疗器械或医疗器械组件，其加工过程包括包装以及灭菌（如适用）。

4 试验原理

将重组胶原蛋白进行荧光标记后配置受试物，将离体猪皮制备创面后进行体外透皮吸收试验，用荧光信号来定量、定性和追踪重组胶原蛋白，从而评价重组胶原蛋白是否透过皮肤。

5 受试物要求

5.1 荧光标记

将荧光通过共价结合的方式标记到重组胶原蛋白上，常用荧光标记有Cy5、FITC、CyP等。

5.2 标记率考察

应提供标记前后全波段吸收峰扫描图和SDS-PAGE电泳，同时报告标记产物的荧光标记率。

5.3 受试物制备

应提供采用标记的重组胶原蛋白制备受试物的详细过程。受试物的制备过程应与终产品的工艺过程相同，如有不同，应给出理由。

5.4 受试物稳定性考察

应在与试验条件相同条件下（温度、湿度、光照程度等）考察受试物的荧光稳定性，建议受试物稳定性至少考察48 h。

6 试验方法

6.1 体外透皮吸收试验

6.1.1 扩散池的选取

考虑到设备的可及性，建议选择静止式（Franz）扩散池作为扩散设备。

6.1.2 离体皮肤组织的选取

考虑到物理结构和化学结构的相似性、创面制备的要求、以及对亲水性分子来说猪皮通透性高于人皮，离体皮肤组织选取1~2月龄巴马猪背部或腹部皮肤，厚度1 mm以下，新鲜离体皮肤组织或冷藏、冷冻后的离体皮肤组织使用前建议采用经皮失水仪对皮肤的经皮失水率进行检测，以便了解皮肤屏障功能的情况。

6.1.3 接收液

考虑到待测物重组胶原蛋白水溶性极好，推荐接收池的溶液为磷酸缓冲液、HBSS溶液等。温度建议设置为 $32\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

6.1.4 上样

- a) 半固体、固体受试物： $5\text{ mg}/\text{cm}^2$
- b) 液体受试物： $10\text{ }\mu\text{L}/\text{cm}^2$
- c) 或依据产品说明书使用量。

6.1.5 试验时长

依据终产品说明书确定产品每日积累使用时长，建议的试验时长最低为每日积累使用时长的2倍，最低试验时长不低于1 h，也不宜超过24 h。建议至少在试验开始和结束时间取样检测，不限制期间取样次数。

6.1.6 实验分组

为了去除猪皮本身的胶原蛋白带来的误差，设置空白对照组。空白对照组的受试物为与样品组受试物配方相同，但不加入重组胶原蛋白的空白对照品。样品组的受试物是重组胶原蛋白医用敷料。空白对照最少设置2个平行样、样品组最少设置4个平行样。

6.1.7 装置准备

将配套的磁子放置于扩散池的接收池内，并将离体皮肤组织固定于供给池和接收池之间，固定后在接收池中加满接收液。排尽空气，使离体皮肤组织的底面与接收液紧密接触。搅拌速率的选取以实现接收池内样品进行充分混匀但表面无涡旋为宜。

6.2 创面皮肤制备

应使用合适的方法制备皮肤创面，不恰当的处理可能完全破坏角质层，使离体皮肤组织无任何屏障功能。为了保证试验的顺利进行，创面的制备过程应结合终产品的临床用途，重点考虑角质层的损伤程度，建议保留角质层部分屏障功能；如有穿刺或切割伤，建议损伤仅达表皮层，不伤及真皮层。

角质层完整的皮肤经皮失水值为 $<15\text{ g}/\text{m}^2\cdot\text{h}$ ，考虑到经皮失水值在不同部位的差异和加严情况，建议造模后创面经皮失水值在 $20\text{ g}/\text{m}^2\cdot\text{h}$ 以上。

推荐的创面皮肤制备方法有胶带剥离法、微针穿刺法、砂纸擦伤法等。基于不同模型，不同受试物条件下，造模过程和透皮试验均受多种因素影响，创面制备方法不做具体规定，试验人员可参考相关文献。

6.3 受试物检测

6.3.1 定量检测

试验的2个空白对照平行样和至少3个样品组平行样应该用于重组胶原蛋白的定量检测。

荧光标记的重组胶原蛋白的检测可用酶标仪或荧光分光光度计测定皮上、皮中和皮下部分的荧光值，用荧光标记物制备重组胶原蛋白浓度-荧光强度的标准曲线，换算体外透皮吸收试验皮上、皮中和皮下的受试物的含量。

由于分析的样本涉及皮上、皮中和皮下三部分，且不同的基质对标准曲线有影响，因此检测皮上、皮中和皮下样本的检测方法均需要进行方法验证。定量检测的方法验证应考虑方法的定量限，精密度和准确度；

定量检测应计算体外透皮吸收试验中待测物在每个扩散池的回收率，且讨论回收率的合理性。

- a) 原始样本中待测物含量测定 (a_0)。
- b) 皮上待测物含量 (a_1)：皮肤组织表面洗出物的重组胶原蛋白含量，可包括皮肤清洗液、供给池清洗液等部分。
- c) 皮中待测物含量 (a_2)：皮肤组织中重组胶原蛋白含量，将皮肤剪碎或磨碎后用接收池溶液进行提取。
- d) 皮下待测物含量 (a_3)：接收液中重组胶原蛋白的含量，包括不同时间点的接收液、接收池清洗液等部分。
- e) 受试物回收率计算：

$$\frac{a_1+a_2+a_3}{a_0} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- a_0 ——原始样本中待测物含量测定；
- a_1 ——皮上待测物含量；
- a_2 ——皮中待测物含量；
- a_3 ——皮下待测物含量。

6.3.2 定性检测

试验中至少1个样品平行样应用于重组胶原蛋白在皮肤组织中分布的定性检测。

进行皮上部分待测物清洗后，从离体皮肤组织取下约1 cm×1 cm大小的组织块，或浸没于多聚甲醛固定液后进行冷冻切片，或直接包埋于OCT速冻后进行冷冻切片。将制作好的冰冻切片进行封片后使用荧光显微镜或激光扫描共聚焦显微镜进行荧光成像，观察皮肤组织中的重组胶原蛋白的荧光分布。

6.4 受试物透皮评价标准

受试物中重组胶原蛋白是否透皮，应结合定量检测数据和定性检测结果综合判断。

- a) 若皮中待测物含量大于或等于零，而皮下待测物含量为零，（即 $a_2 \geq 0$ ， $a_3 = 0$ ），应结合定性检测结果进行判断，观察荧光标记的重组胶原蛋白残留部位。若荧光仅出现在角质层、皮肤附件（包括毛囊、汗腺和皮脂腺）、或创伤部位，则认为受试物不透皮吸收。若还出现在了上述皮肤组织之外的其它部位，建议进一步参考体内试验数据进行分析评价。
- b) 若 $a_3 > 0$ ，则认为透皮吸收。

7 试验数据和报告

7.1 数据

应列出皮上、皮中和皮下部分各个时间点的重组胶原蛋白浓度, 累计总量, 占理论上样总量的比例。

7.2 试验报告

试验报告应包含方案中规定的需求, 除包括应用试验系统的证明外, 还应包含以下内容:

a) 受试物:

- 1) 重组胶原蛋白分子量;
- 2) 重组胶原蛋白标记所选用荧光分子, 标记方法简述;
- 3) 重组胶原蛋白的标记率;
- 4) 受试物制备方法;
- 5) 受试物稳定性考察。

b) 试验条件:

- 1) 皮肤来源和位置、制备方法、使用前的储藏条件、所有预处理(清洗、抗生素处理等)、皮肤完整性测量、代谢状况等;
- 2) 创面造模的方法、使用的理由等;
- 3) 扩散池的设计、接收液的组分、接收液的温度、采样次数和规程;
- 4) 分组设置、上样量、上样方法、上样时长、检测时长;
- 5) 皮上部分重组胶原蛋白回收的详细操作;
- 6) 皮中部分重组胶原蛋白回收的详细操作;
- 7) 皮下部分重组胶原蛋白回收的详细操作;
- 8) 检测方法、定量限确定的方法, 以及分析方法的有效性;
- 9) 组织切片过程的详细操作。

c) 结果:

- 1) 皮上、皮中和皮下受试物检测的方法验证结果;
- 2) 皮上、皮中和皮下部分各个时间点的重组胶原蛋白浓度, 累计总量, 占理论上样总量的比例;
- 3) 皮上、皮中和皮下部分的每个反应池的受试物回收率;
- 4) 组织切片结果;
- 5) 透皮与否的判断。

d) 结果讨论:

结合方法验证结果, 讨论受试物回收率的合理性。结合受试物回收率结果及组织切片结果讨论受试物透皮吸收情况。

e) 结论

参 考 文 献

- [1]Neupane R, Boddu SHS, Renukuntla J, et al. Alternatives to Biological Skin in Permeation Studies: Current Trends and Possibilities. *Pharmaceutics*. 2020,12(2):152
- [2]Schreiber S, Mahmoud A , Vuia A, et al. Reconstructed epidermis versus human and animal skin in skin absorption studies. *Toxicology in Vitro*. 2005,19(6):813-22
- [3]Simon G A , Maibach H I .The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations--an overview. [J].*Skin Pharmacology & Physiology*, 2000, 13(5):229-234
- [4]Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method. OECD. 2004
- [5]In Vitro Permeation Test Studies for Topical Drug Products Submitted in ANDAs. FDA. 2022
- [6]Draft Guidance on Acyclovir. FDA. 2022
- [7]Bartosova L, Bajgar J. Transdermal drug delivery in vitro using diffusion cells. *Curr Med Chem*. 2012,19(27):4671-4677.
- [8]Akdeniz M , Gabriel S , Lichterfeld-Kottner A ,et al. Transepidermal water loss in healthy humans: a systematic review and meta-analysis update[J].*British Journal of Dermatology*, 2018,179(5):1049-1055.
-