
技术共识

再生型膝关节软骨植入物质量评价的考量

1 背景和意义

软骨一旦损伤，难以自身修复，病情逐渐进展，必然出现骨性关节炎。针对严重的骨关节炎的治疗，关节置换手术成了无奈的选择。随着生物材料和再生医学的发展，用于治疗关节软骨损伤的软骨修复材料（关节软骨再生性植入物）相继上市，为关节软骨损伤的早期治疗提供了有效的治疗手段，减缓了严重骨关节炎的发生。目前，以治疗关节软骨损伤为目的再生型软骨植入物包括：单独应用的软骨修复生物材料、配合微骨折技术使用的软骨修复膜、以及结合自体软骨细胞（也有用儿童异体软骨细胞的报道）或者间充质干细胞（自体或同种异体间充质干细胞）的组织工程软骨。其中，结合自体软骨细胞的组织工程软骨目前我国被作为医疗技术在临床应用。

美国 FDA 于 2007 年就发布了“预期用于膝关节软骨修复或替代产品的研究豁免申请（IDEs）和研究性新药应用申请（INDs）行业指南”¹，于 2011 发布了修订版本。FDA 把软骨修复或替代产品作为高风险医疗器械管理，要求申请人在拟开展新产品临床试验研究及进行临床试用前需要获得 FDA 的审批。日本厚生劳动省医药食品局审查管理科，医疗器械审查管理室在 2010 年（平成 22 年）发布了“关于关节软骨再生治疗产品的评价指标”指南文件²。其范围为：以损伤关节软骨的治疗为目的的软骨细胞加工医药品，或者人间充质干细胞加工医药品，在满足基本技术要求基础上，对其质量、安全性和有效性评价时需要考虑的事项。

我国在创伤关节软骨治疗方面并不比美国、日本落后，已有大量的软骨修复材料获得注册或者在注册前准备中。目前我国结合自体软骨细胞的组织工程软骨作为医疗技术已在临床应用多年，也有数家企业正在将配合软骨细胞使用的支架材料或载体按照创新医疗器械进行申报。因此，无论是作为医疗技术应用，还是作为医疗器械产品研发，再生型软骨修复材料均在临床应用和处于研发热潮。然而，针对再生型关节软骨植入物的质量评价，我国目前还没有一套相对全面的指导性文件来规范和指导行业的健康发展。本文件参考美国和日本关于关节软骨类产品的质量评价要求，结合我国的相关标准和技术文件，归纳了再生型膝关节软骨植入物质量评价的考量要点，将填补我国在该领域的空白，有助于推进和指导软骨再生医疗的发展。

2 适用范围

本文件给出了再生型膝关节软骨植入物的评价项目和相关可参考的标准及评价方法、组织工程化软骨的制备工艺和终产品的评价要点、临床前动物试验研究以及临床研究或临床试验的考量；适用于以膝关节软骨损伤

的治疗为目的再生型关节软骨植入物，包括各种单纯的软骨植入材料、配合微骨折技术使用的软骨修复膜，以及结合软骨细胞或者间充质干细胞的组织工程软骨；不适用于使用人源 ES 细胞、iPS 细胞及异种细胞的产品。

对于特定的产品，本文件中的某些方法可能不完全适用，应根据技术发展现状，结合国内外相关指南，进行个案（Case-by-case）分析。

3 软骨植入材料/支架材料（载体）

3.1 概述

本部分包括：作为软骨植入材料的产品和结合细胞使用的软骨组织工程支架材料或载体。

3.2 一般评价项目

3.2.1 物理性能

软骨植入材料产品或者支架材料/载体的物理性能可根据材料的来源和预期的临床使用选择适用的指标，参考YY/T 1616（组织工程医疗器械产品 生物材料支架的性能和测试指南）、GB/T 16886.19（医疗器械生物学评价 第19部分：材料物理化学、形态学和表面特性表征）进行物理性能的评价。可从如下指标中选择（但不限于）适用的物理性能指标：

a) 形态、结构与组成：对软骨植入材料产品或者支架材料/载体的形态（如膜状、凝胶状等）、结构和组分进行完整描述，如适用可图像分析进行结构表征，并阐述组分间相互的物理、化学作用。

b) 如果是多孔材料，应进行孔隙率、透气性等表征。

c) 机械（力学）性能：如：粘弹性、耐负荷性、伸展特性等。鉴于很多软骨修复材料的粘弹性等力学性能是植入体内后，在体内微环境和局部生理性力学作用下随着软骨的再生和成熟逐渐形成的，因此，力学性能可以结合动物实验样品进行再生软骨的评价。

d) 其它：如吸水性、密度、表面性质、可见异物、膜透气性（膜状材料时）、粒度和粒度分布（颗粒状时）、结晶性（结晶状时）等。

3.2.2 化学性能

应对软骨植入材料产品或者支架材料/载体进行化学性能描述，根据材料的性质选择必要的化学性能指标，参考GB/T 16886.18（医疗器械生物学评价 第18部分：材料化学表征）、GB/T 16886.19及YY/T 1616进行表征。

以下给出一些举例，适用时，可按《中华人民共和国药典》（2015版）四部的相应试验要求进行检测，如：

a) 杂质鉴定；

b) 分子量；

c) 残留物（溶剂残留）；

d) 重金属；

e) 其它指标：如：粘度（凝胶状时）、干燥失重、水分等。

f) 如果是动物源性脱细胞基质（ECM）类材料，可参照YY/T0606.25（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），采用残留DNA检测等进行脱细胞工艺评价；参照YY/T 1561（组

织工程医疗器械产品 动物源性支架材料的残留 α -Gal 抗原检测），采用 Gal 抗原残留量检测等进行去除抗原工艺评价。其它可用于脱细胞工艺评价的指标，如细胞核染色、细胞膜磷脂成分检测、总蛋白检测、总糖检测、可溶性蛋白质检测、生物活性因子的检测等。

3.2.3 生物学性能

对于软骨植入材料产品，可参照《中华人民共和国药典》（2015版）四部的相应试验方法，进行下列项目的检测：

- a) 无菌
- b) 细菌内毒素
- c) 热原

对于预期用于复合细胞的支架材料/载体，可在终产品阶段进行生物学性能评价，如果仅在复合细胞前进行了生物学性能评价，则应提供足够的证据或综述资料证明其后续工艺、细胞及细胞培养液等不会引入新的生物学风险。

3.2.4 生物学评价

对于软骨植入材料产品，可参照GB/T16886.1(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)，在充分的风险分析基础上选择适用的评价项目，参照GB/T16886相关的标准进行生物相容性评价，具体相关的评价项目和可参照的标准如下：

- a) 体外细胞毒性，参照GB/T 16886.5(医疗器械生物学评价 第5部分：体外细胞毒性试验)；
- b) 全身毒性，参照GB/T 16886.11(医疗器械生物学评价 第11部分：全身毒性试验)；
- c) 血液相容性（如溶血性），参照GB/T 16886.4(医疗器械生物学评价 第4部分：与血液相互作用试验选择)；
- d) 皮内刺激，参照GB/T 16886.10(医疗器械生物学评价 第10部分：刺激与迟发型超敏反应试验)；
- e) 皮肤致敏，参照GB/T 16886.10；
- f) 局部植入反应，参照GB/T 16886.6(医疗器械生物学评价 第6部分：植入后局部反应试验)；
- g) 遗传毒性，按照GB/T 16886.3(医疗器械生物学评价 第3部分：遗传毒性、致癌性和生殖毒性试验)；
- h) 免疫原性，按照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)。

对于预期用于复合细胞的支架材料/载体，可在终产品阶段进行生物学评价。如果仅在复合细胞前进行了生物学学评价，则应提供足够的证据或综述资料证明其后续工艺、细胞及细胞培养液等不会引入新的生物学风险。

3.3 特殊性质软骨植入材料/支架材料的评价指标

3.3.1 可降解和 / 或可吸收材料

多数再生型软骨修复材料是可降解和/或可吸收的。可参照如下标准进行降解产物的表征与评价。

a) 参照 GB/T 16886.9 (医疗器械生物学评价 第 9 部分: 潜在降解产物的定性和定量框架), 进行潜在降解产物的定性和定量分析;

b) 参照 GB/T 16886.13 (医疗器械生物学评价 第 13 部分: 聚合物降解产物的定性和定量), 进行聚合物降解产物的定性和定量分析;

c) 参照 GB/T 16886.16 (医疗器械生物学评价 第 16 部分: 降解产物与可溶出物毒代动力学研究设计), 进行降解产物与可溶出物毒代动力学研究;

d) 参照 GB/T 16886.17 (医疗器械生物学评价 第 17 部分: 可沥滤物允许限量的建立), 建立可沥滤物允许限量;

e) 参照 YY/T 1576 (组织工程医疗器械产品 可吸收材料植入试验), 进行可吸收材料植入试验, 分析其体内降解特性。

3.3.2 动物源材料

很多再生型软骨修复材料是来源于动物组织, 经脱细胞、去除抗原等工艺制备而成。可参照 YY/T 0771.1-4 (动物源医疗器械 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; 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) 系列标准进行外源因子污染的防控和风险评价及免疫原性评价。产品制备工艺中增加病毒去除和灭活工艺, 并按照《动物源性医疗器械注册技术审查指导原则》(2017 年修订版) 的附录 1 “动物源性医疗器械病毒灭活/去除有效性验证的原则” 的要求, 进行病毒灭活工艺验证; 同时, 参考附录 2 “动物源性医疗器械免疫原性研究、评价与控制的原则”、GB/T 16886.20 及 YY/T0606.15 (组织工程医疗产品 第 15 部分: 评价基质及支架免疫反应的实验方法——淋巴细胞增殖试验) 等进行免疫毒理学评价。

在选择免疫学评价项目和设计试验方案时应充分考虑人与实验动物的种属差异。例如: α -半乳糖基抗原 (简称 Gal 抗原) 被认为是动物组织、器官移植到人体引起超急性免疫排斥反应的主要靶抗原, 广泛存在于牛、猪和其他低等动物体内, 而人体由于有 2 个碱基错位变异而不表达 Gal 抗原, 但人血清中存在高滴度的抗-Gal 抗体, 因此当人体接受含有 Gal 抗原的组织或生物材料时就会引起补体介导的抗体依赖型细胞毒性效应, 引起免疫排斥及免疫毒理反应。因此, 采用野生型动物被认为不能客观地评价动物源性生物材料对人体的免疫原性风险。有研究证实利用 Gal 抗原缺失小鼠皮下植入野生型猪的软骨, 引起了特异性抗 Gal 抗体的显著性升高, 而植入 Gal 抗原缺失猪的软骨则与阴性对照组无显著性差异^[3]。因此, Gal 抗原缺失动物可能是评价动物源性生物材料免疫原性的合适模型。如果结合植入材料特异性抗体检测^[4], 就可以同时检测特异性抗 Gal 抗体之外的材料特异性抗体。Gal 抗原缺失小鼠已被广泛应用于异种免疫原性评价^[5-9]。

在选择体外免疫学试验时, 要充分考虑样品制备的合理性, 比如使用浸提液用于实验样品时要充分分析和证明抗原物质是否全部被有效浸提出来。应客观地分析实验体系的局限性。可参考最新文献研究^[10-12], 合理选择体外免疫学试验方法, 客观地评价异种免疫原性风险。

3.3.3 水凝胶类材料

有些再生型软骨植入材料是水凝胶状态的样品。水凝胶起始聚合物成分

可影响水凝胶的最终性能，因此需要对其进行表征，尤其是本身具有多样性的天然聚合物。

起始生物材料表征依据材料来源的不同，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）、YY/T 1571（组织工程医疗器械产品 透明质酸）、YY/T0606.7（组织工程医疗器械产品 壳聚糖）、YY/T1654（组织工程医疗器械产品 海藻酸钠）。

对于水凝胶类终产品表征可参考 YY/T 1435（组织工程医疗器械产品水凝胶评价指南），如：表征交联程度，在某些情况下，可简单地通过计算成胶后浸出物的比例来反映水凝胶交联程度，并可同时提供潜在的有害浸出物的信息；可利用合适的体外模型，评估水凝胶在体内的反应；另外，可通过凝胶化时间、溶胀速率、基质降解等进行动力学评价；通过表征水凝胶的环境稳定性、力学性能、细胞包埋等评价其物理与化学特性及稳定性；通过细胞迁移、营养与废物的传递、生物活性物质的释放速率检测进行物质传递特性的评价^[13]。

对于含有天然聚合物成分和生物制品，生物源初始材料制备的水凝胶应进行外源因子污染风险防控和增加病毒去除灭活工艺，并进行工艺验证（见动物源材料章节）。

降解行为是许多水凝胶产品发挥功能所必需的，当需要水凝胶作为持久的屏障或支持物时，不应发生非预期的降解。如果用于软骨的再生修复时预期伴随有宿主新的软骨组织再生，则需要评价其降解速率和新生组织再生替代的时间匹配性。进行降解研究时，宜模拟体内对水凝胶降解有直接影响的条件参数，在相应模型中评估水凝胶的降解。此外，在选择合适的检测方法时宜考虑降解的潜在机理，包括水解、酶降解、氧化降解，以及本体降解和表面降解，这些会对所需的测量频率和灵敏度产生影响。

3.3.4 同种异体材料

对于同种异体组织来源的再生型软骨植入材料，如同种异体来源的软骨组织，经适当处理后用于软骨植入物，或经粉碎等处理后重新构建的三维软骨支架材料。可参照《同种异体修复材料病毒灭活验证指导原则》设计病毒去除与灭活工艺，并进行工艺验证，病毒降低量应满足现行有效的规范性要求。可参照 GB/T36988（组织工程用人员源组织操作规范指南）和“同种异体修复材料 组织库一般要求”行业标准进行供体筛查、样品制备、储存等风险管理和质量控制。

4 细胞

4.1 概述

对于含细胞的组织工程软骨或者组合产品（细胞和支架材料单独包装，使用前将二者混合后进行局部植入/注入），建议参考以下我国细胞相关指导原则或规范的要求及相关国际标准：

- GB/T 36988-2018 组织工程用人员源组织操作规范指南；
- 《组织工程医疗产品研究及申报相关要求》（国食药监[2007]762）；
- 《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则》（试行，2017）；
- 《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》（2015）；
- 《人体细胞治疗制剂指南》（2016）；

——ISO 13022 Medical products containing viable human cells - Application of risk managements and requirements for processing practices;

——ISO18362 Manufacture of cell-based health care products — Control of microbial risks during processing.

4.2 细胞的质量评价

以下列出了细胞的主要评价指标，但不限于这些。目前我国开展研究和应用的软骨治疗用细胞主要为自体健康软骨来源的原代软骨细胞。国际也有采用自体或者异体间充质干细胞的研究。由于原代软骨细胞的扩增代数数和细胞数量有限，有些评价项目或性能指标可能不适用于产品的放行检测，有些指标可能只有通过相似软骨来源细胞进行工艺验证和评价，间接地作为产品的研发资料，对其安全性和有效性进行佐证。

4.2.1 基本生物学属性评价指标

主要包括：细胞存活率、纯度和均一性、生长活性、细胞脱分化状态（如 I 型胶原和 II 型胶原的表达情况）、染色体检查和细胞特异性鉴定（主要适用于间充质干细胞）。

根据细胞的种类（软骨细胞或间充质干细胞），临床修复的需要（决定于损伤的大小、所用的材料、手术的方法）进行细胞使用量要求的设定。

具体内容可包括：

- a) 最初细胞采集数量、细胞表型；
- b) 中间产品及细胞库（如适用）中细胞的数量、生存率和细胞表型；
- c) 终产品中细胞的数量、生存率和细胞表型。

对终产品中支架材料内细胞活性的评价可参考 YY/T 1562（组织工程医疗器械产品 生物支架材料 细胞活性评价指南），进行支架材料中细胞的存活率、密度、形态学特征评价。

其中，对于细胞纯度检测，建议根据制备工艺，非临床及临床研究结果，对原材料、中间产品、终产品的目的细胞特性分别设定纯度要求指标；非目的细胞混入率的要求，如：骨原细胞、血管内皮细胞、纤维原细胞、异常分化的体细胞样细胞、未分化或者脱分化细胞、异常增殖细胞、性质变异细胞；应设定混入细胞存在时其安全性确认试验及其判断标准。

4.2.2 微生物学安全性评价指标

主要包括：细菌、真菌、支原体、细胞内外源性病毒因子及细菌内毒素。可参照《中华人民共和国药典》（2015 年版）中相应的方法进行检测。

4.2.3 生物学安全性评价指标

主要包括：添加物残留量检测，异常免疫反应、非预期分化及过度形成/异常增生、成瘤性/促瘤性的评价。

添加了动物源性因子/制剂时，应进行相关可能污染的病毒检测。

其中，对于细胞的致瘤性和过度增生，应评价细胞团在局部的物理性障碍造成对宿主正常生理机能的影响；恶性肿瘤、良性肿瘤及过度增生的可能性。致瘤性评价方法可包括：细胞核型分析、软琼脂集落形成、免疫缺陷动物的致瘤试验。

超过培养期的细胞，应评价是否有目的外的形质转化、增殖速度的异

常亢进。

使用间充质干细胞时，含有软骨细胞分化潜能的细胞及分化的软骨细胞产品，其致瘤性评价需要设计复数的试验，并根据产品的特性及当时的技术水平说明试验选择的合理性。

关于特殊情况分析，由于供体的年龄和原发疾病可能会有一定频度的染色体异常，因此，出现染色体异常检测结果时需要分析是否有其他原因，如：供者的背景、培养条件等。疑有致瘤性时，应注意分析原因，如：原材料、制备方法和原发性肿瘤。

4.2.4 生物学有效性评价指标

主要包括：软骨组织再生潜能、（间充质干细胞的）成软骨能力评价。如：细胞的 II 型胶原蛋白表达水平（基因水平和蛋白质水平）；细胞或结合体外构建的软骨植入物或植入到动物体内后的软骨植入物及其再生软骨的硫酸多糖（GAG）含量检测。

4.3 细胞制备工艺质控与细胞制剂的评价项目

a) 细胞采集：应记录供者信息和病史，进行必要的病原体筛查，如：HIV, HBV, HCV, EBV, HCMV, HTLP, IP（自体细胞可只进行常规的手术前检测项目）。

b) 细胞的稳定性：为评价细胞培养时间的合适性和细胞的稳定性。设定在预定的培养时间后细胞不会去分化（软骨细胞），或者不会发生多分化能的减弱（间充质干细胞）、增殖速度的异常变化等评价指标。预期在体内增殖及分化的情况时，根据设定标准限定传代数和分裂次数，保证植入体前细胞的功能。

c) 细胞制剂的评价：细胞与支架材料或载体单独包装（临床使用前负载或混合）时，细胞作为制剂应设定如下检测项目：外观、装量（细胞数）、pH 值、渗透压、存活率、无菌检测、支原体检测、内毒素检测和添加物残留量检测等。

d) 由于细胞量的限制，或者产品复杂特性不能对终产品进行充分的评价时，应证实（论证）中间产品（或细胞原材料）的特性与终产品质量的相关性，阐述能够作为终产品评价指标的合理性。

5. 组织工程化软骨的制备工艺和终产品的评价

5.1 制备工艺控制

含细胞组织工程化软骨的制备可参考 GB/T 36988 及 ISO 13022 和 ISO18362 进行制备过程质量控制，建立质量体系，进行风险管理。

5.2 机械性能

含细胞组织工程化软骨，应设定与软骨组织类似的机械性能要求，如：耐负荷性、弹性，伸展特性要求。然而，由于软骨植入物产品一般需要在植入体内后，随着体内力学的刺激才会接近正常软骨的机械性能，人体软骨的力学来源于儿童到成年的连续受力，逐渐形成。因此，力学特性可能需要通过动物试验获得数据。

5.2 效能测试

a) 设定以软骨再生为目的组织工程软骨的有效性评价试验，如：粘弹性试验（通过动物试验获取的体内软骨修复组织）；

b) 或者，确定体内有效性的代替指标用于效能试验。如：II型胶原/I型胶原的基因表达比，作为软骨细胞的分化指标。选择使用替代指标时，应预先评价替代指标与体内有效性的相关性。

c) 预期在体内增殖、分化的细胞，应设定发挥预期机能的传代数和分裂次数。

5.3 辅料的生物相容性

制备工艺中与细胞接触的任何材料或者辅料，如局部封闭用的膜、粘合剂等，应进行质量、安全性和生物相容性评价；与受体及制品中细胞的相互作用评价；终产品整体与治疗部位周边组织的相互作用评价。

细胞制备、培养过程中使用的辅料可参照 ISO/TS 20399-1 (Biotechnology -- Ancillary materials present during the production of cellular therapeutic products -- Part 1: General requirements) 和 ISO/TS 20399-3 (Biotechnology -- Ancillary materials present during the production of cellular therapeutic products -- Part 3: Best practice guidance for ancillary material users) 进行质量控制；参考GB/T 16886系列标准进行生物相容性评价。

5.4 产品的稳定性评价

含细胞组织工程化软骨或者其中细胞和支架材料作为2种组分，单独包装时（临床使用时将细胞与支架材料混合或者负载于支架材料）的组合产品，应设定细胞组分在保存、流通期间以细胞存活率、代表效能的代谢指标为考察项目的稳定性试验，从而确定储存方法和有效期。特别是冻存和解冻后培养的可能期间的设定，及对产品质量的影响应进行充分评价。

考察超过规定标准的制备期间和保存期间的长期保存时的稳定性极限的可能范围。

应设定运输条件的要求，包括：容器、运输液、温度等，并阐述其设定的合理性。

5.5 效力或性能评价

如适用，可通过一次药理学试验 (Primary pharmacodynamic/Proof-of-concept study) 评价细胞的功能、作用持续性和其他预期临床效果实现的可能性。评价方法可以利用动物源性细胞或者组织，在软骨损伤模型上进行评价。

5.6 细胞的体内动态

如适用，为评价治疗细胞预期之外的体内分布，在科学和技术允许的范围内进行实验动物研究，包括体内分布、吸收、游走（移行）、附着等体内动态试验。不进行试验时应说明其合理性。

6 临床前研究

6.1 动物试验研究

可参考YY/T 0606.10-2008“组织工程医疗产品 第10部分：修复或再生关节软骨的植入物体内评价指南”开展临床前动物试验研究。治疗效果的评价方法，可参考国际软骨评级体系(ICRS Score; O`Driscoll score; Wakitani score)进行评分。

需要有充足的临床前数据为做临床试验的产品提供科学的依据，并且证明产品进行人体临床研究的安全性。需要结合源于动物试验、实验室实验或两者相结合的药理和毒理学数据；需要选择科学的试验来证明产品的有效性和安全性。研究的方法要依据准确的产品成分分析。建议在一项研究中结合动物物试验和实验室实验来设计实验方案，以保证实验结果的有效性。

一个产品由多种成分复合而成时，应对每种独立的成分进行描述和分析，关键的非临床试验所评估的产品应与临床试验中使用的产品型号、尺寸相同。如果使用了不同型号，则应提供原理来说明产品的众多型号的不同和为什么从一个不同型号产品分析得来的非临床数据用于支持临床研究的合理性。

6.1.1 动物试验的评价指标

通常，可考虑如下评价指标：

a) 生物反应：用于产品及一个组合产品中每个组分的生物活性（概念和安全性验证）的评价，可以通过动物试验的研究证明终产品中的某个组分有临床效果。

b) 耐久性评价：评估软骨损伤修复的时间，产品的耐磨损性能，降解和随着时间推移承受生理负载的性能。可以通过大动物试验评估耐久性。研究通常需要最少一年的时间，建议设定充足的完全愈合时间，这个持续时间通常要足够评价治疗的有效性。研究持续期间应基于产品的特性，型号和有效数据的数量。例如，一个产品降解需要较长的时间，就需要长期跟进获得降解曲线。

c) 毒性评价：产品成分可能存在潜在的局部和全身毒性。局部毒性可能是由于产品与关节的成分相互作用，或产品降解物的作用。系统性毒性可能是由于细胞或粒子或降解物迁移关节以外的空间。产品潜在的致癌性和不适当的分化会出现在关节区域内外。因此，常规的材料浸提液方法可能无法客观地评价这些风险，需要结合局部原位植入的动物试验进行全面评价。

d) 剂量效应：例如：材料组成成分，细胞数，和其它能影响损伤修复的特性。剂量效应可根据组织学和生物学分析，通常在大动物试验中获得数据。

e) 创面尺寸和部位：动物试验应按适当比例模仿临床数据。如果在临床上需要多种器械联合使用，那么这一点也需要在动物实验设计中考虑到。此外，动物实验中损伤部位应设置在与植入人体的相似部位。

f) 合理的研究终点：动物试验应设计恰当的研究终点来反映临床试验的情况。可结合次级临床终点的评价，如：组织学评价。可参考YY/T1636行业标准的附录A及美国ASTM标准(F3224-2017)，使用核磁共振影像技术

(MRI) 评估。在动物试验中为了减少每个时间点处死的动物可以适当使用关节镜和/或核磁共振技术评估局部组织再生与修复情况。

局部取材时总体观察指标中应包含软骨组织的完整性。

6.1.2 动物模型的选择

尽管可能很难找到完美的关节软骨损伤的动物模型，选择和确定动物模型的适应性需要充分论证。可参考YY/T 0606.10及文献中描述的许多评价关节软骨修复或替代产品的非临床试验模型和方法。但是，不是所有的方法都适用于一种特定的软骨修复或替代产品。软骨修复试验的大动物模型最常使用的是山羊、绵羊或马。

选择模型时需要比较动物模型损伤大小和负载，年龄，骨发育成熟度，关节软骨损伤类型（如：部位、大小、类型、深度等）和关节软骨损伤的位置。应讨论关节软骨损伤创面的准备，总体描述和组织学评价，并描述多种机械性评价及其适用性。

参照上面条件，任何一种大型动物物种都可能适合研究的设计，以支持关节软骨的修复或替代产品安全性和有效性。然而，在选择动物模型的物种时仍需要慎重考虑，该模型应能反映临床预期效果，阐述非临床研究动物模型的选择依据和合理性。可先进行预实验来分析产品对选择的动物物种的适用性。可能需要许多不同的动物试验研究和/或物种研究，针对单一产品的功能和潜在毒性方面建立合适的模型。而且需要的实验数量需要根据产品的相关结构和生物特性而定，而不是根据产品组成而定。

可以同时使用大型、小型动物进行组合研究以评估产品的降解、耐久性、安全性和有效性。

对于含有人体细胞的产品，在动物体内进行研究时通常需要使用免疫抑制剂，防止对产品产生排斥反应，或者针对所选择的实验动物使用同源细胞产品。同源细胞产品是指源于同种动物的细胞产品用于实验，其与最终应用于临床的产品的细胞特性和生物活性相似。在使用同源细胞产品做毒理实验前，应在初步研究中描述与人源产品类比的水平。

在设计含细胞等活性成分的再生修复软骨产品的非临床试验时，可参照有关细胞治疗产品的指导性文件。

6.1.3 动物试验报告

动物试验研究应包括如下主要信息：

a) 完整的动物实验方案，无论是不利的还是有利的，只要是有关评价被研究产品的安全性和有效性的信息。

b) 动物试验报告中至少要包含：研究目的，动物模型的合理性，构建模型的详细方法，包括创面制备、尺寸和软骨缺损的位置，固定的时间，试验动物的步态分析报告，列出6.1中的所有评价指标（如适用），病理学、组织学和放射学评价。另外，宜详细描述动物试验的产品与临床试验产品之间的不同之处。

6.2 机械性能测试

6.2.1 力学试验的适用性

宜提供关节软骨植入物的力学测试数据或合理地阐述为什么有限的力学测试加上完整的动物试验数据能够合理地建立所评价产品的可接受安全性概况。

力学试验的适用性可能依赖于产品的设计、材料、与软骨下骨和/或未受损软骨周围的接触方式。

一般情况下，机械性能测试通常包含：

- a) 植入体内后预期的静态和动态负载能力，例如：压缩、剪切、张力；
- b) 固定方法分析，例如：产品和健康周围组织的整合强度；
- c) 产生磨屑的可能性；

建议评估产品的静态力学行为，如：最大可恢复的压缩应变, 总模量 (H_A)，剪切模量 (μ) 和渗透率 (κ)，及动态力学行为，如：复杂的剪切模量 (G)。这些机械特性的测试宜包括任何相关的产品各向异性和非线性的测定。

另外，宜对产品的失效性能进行评价。对于含有可降解支架材料的产品，评估经时的失效性能是很重要的。许多机械测试方法可以用来测量产品的机械性能，包括，但不限于，限制性或非限制性压缩和压痕。

某些类型的产品在植入时不能完全承受负荷（如一种由骨膜皮瓣或柔性支架固定的细胞产品），最终在体内形成承重组织。对于这些产品，可在合适的动物模型上，于再生的软骨组织成熟后，在离散时间点上描述（测试）各种力学特性。应该首先评估产品在加载的关节内维持其位置的能力（对固定或界面强度的分析），然后继续评估这个特性，同时对新形成的组织进行评估，以确定其承受应用负荷的能力。这些测试的样本可能包括从动物模型或其他适当的样本中移植的再生组织。当所测试产品与临床用产品之间存在差异时，应解释为什么结果与产品的临床安全性有关。

无论是进行什么评估，应该比较修复或再生软骨组织与正常组织的性质（例如，从一个未操作的关节软骨收集）。而据了解，修复组织可能会不同于正常软骨的特性，应该说明为什么这些差异与本产品体内和临床性状无关。

6.2.2 力学测试报告

力学测试报告包括：

- a) 确认所测试产品的组分；
- b) 描述所采用的参数；
- c) 描述测试过程；
- d) 支持作为最坏情况测试环境的理由；
- e) 负载模式选择的理由；
- f) 研究结果；
- g) 结果讨论，关于预期的体内和临床的系统性能。

宜提供一份合理的所有力学测试的总结和每一项试验的完整报告。包括软骨损伤程度的评价（如通过墨水染色后目视评价）。

有些产品可能无法进行植入物机械负载试验（如注入损伤局部的细胞，通过骨膜瓣或柔韧的支架覆盖，最终将被聚集的细胞填充，逐渐形成一个承重组织）。对于这些产品，可以在一个合适的动物模型上，伴随着再生软骨的成熟，选择适宜的离散时间点表征各种机械性能。可以先评价产品在加载负荷的关节内保持其位置的潜能，如：固定或界面强度分析。然后

继续评价这一特性，同时增加新形成组织的评价，测定其承受施加载荷的能力。做这些试验的样品可以来自动物模型的植入物再生组织或其他适当的样品。

当试验用样品与预期临床用产品不同时，宜解释如何不同，为什么结果与判断临床安全性相关。

无论进行何种评价，宜将修复或再生组织和对照组织（如从非手术对照关节收集的软骨）进行比较。修复再生的软骨特性可能不同于正常生理性软骨。宜阐述为什么这些不同可能与产品的体内或者临床行为无关。

7 临床试验研究

按照《医疗器械临床试验质量管理规范》（2016年03月23日发布）的要求开展临床试验研究。应考虑疾病类型、目的效能及期待的临床效果，并结合非临床研究资料进行综合评价。临床试验研究时，期待的理想的临床效果是全部或部分透明软骨的再生，而不是纤维化软骨。T2 Mapping 和 dGMERIC 核磁技术可以很好地评价再生软骨的胶原蛋白及水分含量及成熟软骨特有的糖氨多糖（GAG）含量。可参考 YY/T1636 “组织工程医疗器械产品 再生膝关节软骨的体内磁共振评价方法”进行为期一年的临床跟踪评价。

参考文献

- [1] Guidance for Industry, Preparation of IDEs and INDs for Products Intended to Repair or Replace Knee Cartilage, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research Center for Devices and Radiological Health, 2011, <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>.
- [2] 关于关节软骨再生治疗产品的评价指标，日本厚生劳动省医药食品局审查管理科，医疗器械审查管理室，2010年（平成22年）。公布新一代医疗器械评价指标的公告（食药发 1215 第 1 号）。
- [3] 王泽昊，邵安良，魏利娜，等. 采用 Gal 抗原缺失小鼠评价 GGTA1/B4GalNT2/CMAH 基因敲除猪软骨组织的免疫原性. 解放军医学院学报，2019, 40(5); online.
- [4] Courtman DW, Errett BF, Wilson GJ. The role of crosslinking in modification of the immune response elicited against xenogenic vascular acellular matrices. Immunogenicity of xenogenic acellular matrices, 576-586.
- [5] Shao A, Ling Y, Xu L, *et al.* Xenogeneic bone matrix immune risk assessment using GGTA1 knockout mice. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 2018, DOI:10.1080/21691401.2018.1493489.
- [6] 邵安良，魏利娜，范昌发，等. 2 种 Gal 抗原缺失小鼠的免疫学特性比较研究[J]. 药物分析杂志，2018, 38(8):1288-1295.
- [7] 邵安良，魏利娜，范昌发，等. Gal 抗原缺失小鼠的应用示范：动物源性硬脑膜补片的免疫原性反应评价. 药物分析杂志，2018, 38(8):1296-1303.
- [8] 陈亮，邵安良，魏利娜，等. 应用 Gal 抗原缺失小鼠评价可降解异种脱细胞真皮基质的免疫原性. 药物分析杂志，2019, 38(8):
- [9] 魏利娜，邵安良，黄立静，等. 去细胞异种角膜基质与去细胞异种结膜基质的免疫原性研究. 药物分析杂志，2019, 38(8):

-
- [10]邵安良, 穆钰峰, 陈亮, 等。人外周血淋巴细胞增殖试验的优化及其应用[J]. 药物分析杂志, 2019, 38(8):
- [11]陈亮, 穆钰峰, 邵安良, 等。动物源性生物材料体外淋巴细胞增殖试验方法的建立[J]. 药物分析杂志, 2019, 38(8):
- [12]陈亮, 穆钰峰, 邵安良, 等。不同种属小鼠用于淋巴细胞增殖试验的比较研究[J]. 药物分析杂志, 2019, 38(8):
- [13]段晓杰, 刘珊, 马跃, 等。I型胶原水凝胶的物质通透性评价. 中国医疗器械杂志, 2018, 42(2), 150-153

征求意见稿 (中检院)