

中国医药生物技术协会团体标准

T/CMBA 010—2020

用于关节软骨再生的植入物评价规范

Specification for evaluating implants intended to regenerate articular cartilage

2020 - 7 - 23 发布

2020 - 7 - 23 实施

目 次

前言	II
引言	III
用于关节软骨再生的植入物评价规范	1
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	2
4 软骨植入材料/支架材料（载体）	3
4.1 概述	3
4.2 一般评价项目	3
4.3 特殊性质软骨植入材料/支架材料的评价指标	4
5 细胞	5
5.1 概述	5
5.2 细胞的质量评价	5
5.3 细胞制备工艺控制与细胞制剂的评价	7
6 组织工程化软骨的制备工艺和终产品的评价	7
6.1 制备工艺控制	7
6.2 力学特性	7
6.3 效能测试	7
6.4 辅助材料的质量控制及生物相容性评价	8
6.5 产品的稳定性评价	8
6.6 效力或性能评价	8
6.7 细胞的体内动态	8
7 非临床研究及临床前动物实验研究	8
7.2 临床前动物实验研究	8
8 临床试验研究	9
附录 A（资料性附录）临床前大动物实验研究的考虑要点	10
参考文献	12

前 言

本标准按 GB/T 1.1-2009《标准化工作导则》给出的规则起草。

本标准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。

本标准由中国医药生物技术协会提出。

本标准由中国医药生物技术协会归口。

本标准起草单位：中国食品药品检定研究院、中国医药生物技术协会骨组织库分会、中国人民解放军总医院国家骨科与运动康复临床医学研究中心。

本标准主要起草人：徐丽明、孟淑芳、郭全义、陈亮、邵安良、魏利娜、孙雪莲。

引 言

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。针对严重的骨性关节炎的治疗，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，利用组织诱导性材料或与细胞组合的组织工程软骨修复技术为关节软骨损伤的早期治疗提供了有效的治疗手段，可以减缓严重骨关节炎的发生。目前，以治疗关节软骨损伤为目的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生物材料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。

美国 FDA 于 2007 年发布了“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”，于 2011 年发布了修订版本。FDA 把软骨修复或替代产品作为高风险医疗器械监管，要求申请人在拟开展新产品临床试验及进行临床使用前需要获得 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“关于关节软骨再生医疗产品的评价指标”指南文件，阐述了以损伤关节软骨的治疗为目的的人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。

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，有数个软骨修复材料的研发已处在注册前准备中，有的已经进入了临床试验研究阶段，也有数家企业正在将复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，再生型关节软骨（以膝、踝关节软骨为主）修复材料均在临床应用或处于研发热潮。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。本规范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，阐述再生型关节软骨植入物的评价规范，填补了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。

用于关节软骨再生的植入物评价规范

1 范围

本标准给出了用于关节软骨再生的植入物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求、临床前动物实验研究以及临床研究或临床试验的考量。本标准适用于以膝、踝等关节软骨损伤的治疗为目的的再生型植入物，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来源于人体的软骨细胞或者间充质干细胞的组织工程软骨。

本标准不适用于使用人 ES 细胞或 iPS 细胞及异种细胞、组织来源的细胞制备的产品以及使用基因修饰过的细胞制备的产品。

注：对于特定的产品，本规范中所建议的某些方法可能不完全适用时，可根据技术发展现状，结合国内外相关指南，进行个案（Case-by-case）分析。

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，仅所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 16886.1 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- GB/T 16886.11 医疗器械生物学评价 第 11 部分：全身毒性试验
- GB/T 16886.13 医疗器械生物学评价 第 13 部分：聚合物医疗器械降解产物的定性和定量
- GB/T 16886.16 医疗器械生物学评价 第 16 部分：降解产物和可溶出物的毒代动力学研究设计
- 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
- 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 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
- 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和方法
- GB/T 35823 实验动物 动物实验通用要求
- GB/T 36988 组织工程用人源组织操作规范指南
- YY/T 0513.1 同种异体修复材料 第 1 部分：组织库基本要求
- YY/T 0606.10 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
- 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实验方法：淋巴细胞增殖试验
- 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

YY/T 0771.1 动物源医疗器械 第 1 部分：风险管理应用

YY/T 0771.2 动物源医疗器械 第 2 部分：来源、收集与处置的控制

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

YY/T 0771.4 动物源医疗器械 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

YY/T 1435 组织工程医疗器械产品 水凝胶表征指南

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 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

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

YY/T 1571 组织工程医疗器械产品 透明质酸钠

YY/T 1576 组织工程医疗器械产品 可吸收生物材料植入试验

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

YY/T 1636 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

YY/T 1654 组织工程医疗器械产品 海藻酸钠

YY/T 1699 组织工程医疗器械产品 壳聚糖

《中华人民共和国药典》

ISO 13019-2018 组织工程医疗产品 用于评价软骨形成的硫氨多糖（sGAG）的定量测定（Tissue-engineered medical products—Quantification of sulfated glycosaminoglycan (sGAG) for evaluation of chondrogenesis）

3 术语和定义

YY/T 0606.10 和 YY/T 1445-2016 中界定的以及下列术语和定义适用于本文件。为便于理解和使用，部分术语和定义摘录自 YY/T 1445-2016。

3.1

支架 Scaffold

用于替代、修复或再生组织的支持物，具有促进细胞迁移、结合、输送，或生物活性因子输送功能。
[YY/T 1445-2016, 3.11]

3.2

软骨再生 cartilage regeneration

具有与正常软骨相似结构与功能的组织的形成过程。
[YY/T 1445-2016, 3.10]

3.3

软骨修复 cartilage repair

受损的软骨或其替代物通过细胞增殖和新细胞外基质合成的愈合过程。
[YY/T 1445-2016, 3.11]

3.4

辅助材料 Ancillary materials

是在细胞生产制备过程中与细胞或组织直接接触，但不在细胞或细胞治疗产品中残留的材料。

4 软骨植入材料/支架材料（载体）

4.1 概述

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

4.2 一般评价项目

4.2.1 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评价指标，可按照 YY/T 1616、GB/T 16886.19 进行物理性能表征。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，如适用可用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，宜进行孔隙率、透气性等表征。

c) 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中再生软骨的样品进行评价。

d) 其他：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。

4.2.2 化学性能

描述软骨植入材料产品或者支架材料/载体的化学性能，按照 GB/T 16886.18、GB/T 16886.19 及 YY/T 1616，根据材料的性质选择必要的化学性能指标进行表征。

以下给出一些举例，适用时，可按《中华人民共和国药典》的相应试验方法和要求进行检测，并根据风险分析给出可接受限值。如：

a) 杂质鉴定；

b) 分子量；

c) 残留物（溶剂残留）；

d) 重金属及其微量元素；

e) 其他指标：如：黏度、干燥失重、水分等。

f) 如果是动物源性脱细胞基质（ECM）类材料，可按照 YY/T0606.25，采用残留 DNA 检测进行脱细胞工艺评价和终产品的检测；按照 YY/T 1561，采用 Gal 抗原残留量检测进行去除抗原工艺评价。

4.2.3 生物学性能

对于软骨植入材料产品，可按照《中华人民共和国药典》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，还需在终产品阶段进行生物学性能检测。

4.2.4 生物学评价

对于软骨植入材料产品，可按照 GB/T 16886.1 在充分的风险分析基础上选择适用的评价项目，按照 GB/T 16886 相关的标准进行生物相容性评价，具体相关的评价项目可按照如下相应的标准进行。

- a) 体外细胞毒性，按照 GB/T 16886.5 进行；
- b) 全身毒性，按照 GB/T 16886.11 进行；
- c) 血液相容性（如溶血性），按照 GB/T 16886.4 进行；
- d) 皮内刺激，按照 GB/T 16886.10 进行；
- e) 皮肤致敏，按照 GB/T 16886.10 进行；
- f) 局部植入反应，按照 GB/T 16886.6 进行；
- g) 遗传毒性，按照 GB/T 16886.3 进行；
- h) 免疫原性，按照 GB/T 16886.20 进行。

对于预期用于复合细胞的支架材料/载体，有些项目（如免疫原性）需要结合细胞的风险分析考虑是否对终产品进行评价。

4.3 特殊性质软骨植入材料/支架材料的评价指标

4.3.1 可降解或/和可吸收材料

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

- a) 按照 GB/T 16886.9 进行潜在降解产物的定性和定量分析；
- b) 按照 GB/T 16886.13 进行聚合物降解产物的定性和定量分析；
- c) 按照 GB/T 16886.16 进行降解产物与可溶出物毒代动力学研究；
- d) 按照 GB/T 16886.17 建立可沥滤物允许限量；
- e) 按照 YY/T 1576 进行可吸收材料植入试验，分析其体内降解特性。

4.3.2 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，或动物组织提取的胶原。可按照 YY/T 0771.1-4 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 进行免疫毒理学评价。胶原类材料的表征按照 YY/T 1453 选择适用的项目。

在选择免疫学评价项目 and 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）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，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。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，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。

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。建议参考最新文献研究，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。

4.3.3 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。

起始生物材料表征可按照 YY/T 1453、YY/T 1571、YY/T 1654 和 YY/T 1699。

终产品表征可按照 YY/T 1435，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。

对于含有天然聚合物成分、生物制品及生物源初始材料制备的水凝胶，应进行外源因子污染风险评估及控制，必要时增加病毒去除灭活工艺，并进行工艺验证。

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，在相应临床前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制，包括水解、酶降解、氧化降解，以及本体降解和表面降解，这会对所需的测量频率和灵敏度产生影响。

4.3.4 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。可按照《同种异体植入性医疗器械病毒灭活工艺验证技术审查指导原则》（2011，2020修订版）设计病毒去除与灭活工艺，并进行工艺验证。可按照 GB/T 36988 和 YY/T 0513.1（2019 年修订版）标准进行供体筛查、样品制备、储存等风险管理和质量控制。

5 细胞

5.1 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，使用前将两者混合后进行局部植入/注入），建议按照以下我国细胞相关指导原则或规范和 GB/T 36988 标准的要求及参考相关国际标准（如 ISO 13022、ISO 18362），也可参考国际药品监管机构发布的与基于人源细胞的医药产品的相关法规或技术指导原则。以下列出了细胞质量评价的主要指标，但用于每一种产品所使用的人源细胞需根据其来源供体、细胞特性及其潜在风险、制备方式、终产品生产工艺及其风险降低程度、制剂状态、预期用途、作用途径或使用方式等参数进行充分评估后，制定其质量评价项目及标准。

5.2 细胞的质量评价

5.2.1 概述

一般来说，细胞的质量评价包括与支架复合前的质量评价及终产品中细胞的质量评价，主要包括细胞的生物学特性、微生物污染、生物学有效性及其安全性指标。可根据产品的生产工艺，最适样本原则，在生产工艺的不同阶段设置合理的评价指标。如对自体来源、传代极少且不能建库、使用无生物源性材料培养的细胞，微生物污染检测主要考虑细菌、真菌及支原体污染。异体来源可以建立细胞库的细胞（如脐带间充质干细胞），则需对细胞库进行充分的内、外源因子污染的检查；而在与支架复合前或复合后

外源因子的检查主要考虑从细胞库复苏到产品完成前可能潜在的外源因子污染风险。

此外，为降低细胞供体材料所带来的可传播性疾病的风险，可按照 GB/T36988 以及软骨植入的特定要求，制定或建立合格供体的质量要求，包括供体筛查、检测项目及可接受标准。

5.2.2 生物学特性评价指标

主要包括：细胞鉴别、细胞数量及存活率、纯度和均一性、增殖活性、细胞去分化状态（如 I 型胶原和 II 型胶原的表达情况）及染色体检查（异体来源或根据需要个案考虑）。

细胞鉴别试验需能证明所用细胞与其他种属细胞、其他个体细胞无交叉污染（必要时除外，但需有充分的评估）并能够体现细胞特异性，如细胞表型、特定因子或特定基因表达、分化特性等。对于自体来源的细胞，个体来源鉴别也可通过全生产过程采用唯一标识的可溯源系统替代，但在发生错误时，仅个体来源鉴别数据能够作为个体溯源依据。

细胞数量及活力的检测可根据检测的目的选择合适的方法，如在细胞分离、培养或与支架材料复合前，细胞数量及活力采用血球计数法、全自动细胞计数法或细胞增殖试验等进行检测。而对终产品中支架材料内细胞活性的评价可按照 YY/T 1562 进行支架材料中细胞的存活率、密度、形态学特征评价。

对于细胞纯度，可根据供体材料的组织来源特点、细胞分离制备工艺及其工艺清除验证的结果、质量研究结果及其可能存在的安全性风险，对供体材料分离的细胞、中间产品、终产品的目的细胞及其与目的细胞相关的产品相关杂质设定合理的纯度要求指标，即非目的细胞的比例或数量，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、未分化或者去分化细胞、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，且需对安全性确认试验的方法学进行充分验证，证明当有非目的细胞存在时该试验可检出其安全性风险。

如软骨植入物为细胞制剂，在进行细胞纯度检测的同时，还应建立工艺相关杂质的评价指标，如添加因子的残留量、培养包被基质的残留量等。

5.2.3 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。如细胞培养过程中使用了植物来源的成分，还需进行螺原体检查；如存在分枝杆菌污染的风险，还需对细胞进行分枝杆菌检查。

细胞内、外源因子检测的种类应根据污染风险评估的结果确定，如自体还是异体来源、细胞培养过程中所用的所有生物源性材料中可能潜在的污染风险、细胞培养及传代或扩增过程中可能引入的污染风险等。对于自体来源的细胞，可在手术前对供体进行可传播性疾病病原体检测，如为阳性，后续细胞分离培养等操作应对操作者及环境采用足够的防护隔离措施。对于异体来源的细胞，除必须对供体进行筛查及检测外，通常建议再采用高灵敏的核酸检测方法对培养后的细胞进行可传播性病原体或其他人源病毒污染的检测。对于细胞培养过程中使用了牛源性材料或猪源性材料的细胞，除对原材料本身进行放行检验外，建议对每批原材料培养的至少一个批次的细胞进行一次牛源或猪源病毒的检测。

5.2.4 生物学有效性评价指标

主要包括：软骨组织再生潜能、种子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，检测方法按照 ISO 13019-2018 进行。有效性评价方法如可行，尽可能采用定量检测方法，并验证其定量检测能力。

5.2.5 安全性评价指标

主要包括：异常免疫反应、非预期分化及过度形成/异常增生、成瘤性/促瘤性等。对于细胞的成瘤性和过度增生，应评价细胞团在局部的物理性障碍造成对宿主正常生理功能的影响，恶性肿瘤、良性肿

瘤及过度增生的可能性。成瘤性评价方法可包括：软琼脂集落形成、端粒酶活性、免疫缺陷动物的成瘤试验（包括组织病理区分软骨形成）或其他更敏感的方法。细胞核型分析有时也可作为成瘤性风险评价的指标。

超过培养期的细胞，应评价是否有非预期目的形质转化、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的产品，需要设计 2 种或 2 种以上的试验方法评价其成瘤性，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。如使用自体来源的细胞，是否进行成瘤性评价可通过对细胞特性、工艺、使用方法等评估的基础上确定。

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。疑有成瘤性时，应注意分析原因，如：原材料、制备方法和原发性肿瘤。

5.3 细胞制备工艺控制与细胞制剂的评价

a) 细胞采集：应建立细胞采集工艺及质控标准，如采集物大小、分离细胞的数量及活力、目的细胞的含量等；

b) 细胞制备工艺及其过程控制：应进行细胞分离、培养、扩增或诱导分化的工艺研究，确定细胞扩增培养时间及条件以及最大传代水平，以确保细胞在规定的培养时间内不会去分化（如软骨细胞），或者不会出现多分化能力的减弱（如间充质干细胞）、增殖速度异常等，并设定相应的过程控制评价指标，保证植入（人体）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。

6 组织工程化软骨的制备工艺和终产品的评价

6.1 制备工艺控制

含细胞组织工程化软骨的制备可按照 GB/T 36988 和参照 ISO 13022 及 ISO 18362 的要求进行制备过程质量控制，建立质量体系，进行风险管理。

6.2 力学特性

含细胞组织工程化软骨，宜考虑设定与软骨组织类似的力学特性，如：耐负荷性、弹性、伸展特性要求。

注：由于软骨产品植入体内随着体内力学的刺激才会接近正常软骨的力学，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。

6.3 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（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（Surrogate marker）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，需要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，宜设定发挥预期机能的传代数和分裂次数。

6.4 辅助材料的质量控制及生物相容性评价

制备工艺中与细胞接触的任何材料或者辅助材料，如局部封闭用的膜、黏着剂等，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 和 ISO/TS 20399-3 进行质量控制；按照 GB/T 16886 系列标准进行生物相容性评价。

用于组织工程软骨支架的生物材料、支持膜、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、黏着剂等，应参照第 4 条款进行质量、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。

6.5 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。特别是宜充分评价细胞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。

考察超过规定标准的制备期间和保存期间的长期保存时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。

6.6 效力或性能评价

可通过主要药效学/概念验证研究（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。

6.7 细胞的体内动态

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。

7 非临床研究及临床前动物实验研究

7.1 非临床研究

需要有充足的非临床研究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。非临床研究可结合源于动物实验、实验室实验或两者相结合的药理和毒理学数据，选择适当的试验来证明产品的有效性和安全性。非临床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实验及必要的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。关键的非临床试验的评估产品应与临床试验中使用的产品规格型号及版本相同。如果使用了不同规格型号及版本，则应提供原理来说明产品的众多规格型号的不同和为什么从一个不同规格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。用于动物实验研究的产品版本应与临床试验所用版本及注册申报的终末版定型产品一致。

7.2 临床前动物实验研究

按照《医疗器械动物实验研究技术审查指导原则 第一部分：决策原则》（2019），确定所研发产品是否需在活体动物上进行在体实验。按照《医疗器械动物实验研究技术审查指导原则 第二部分：实验设计、实施质量保证》（征求意见稿，2020.01），GB/T 35823 及 YY/T 0606.10 开展临床前动物实验研究。软骨治疗效果的评价方法，可参考国际软骨评级体系 (ICRS) 进行临床观察的评分及按照 YY/T 1636（附录 A）体内核磁方法进行评价。

关于动物实验通常用来评价关节软骨再生型植入物有效性的指标、实验方案设计的考虑要点和研究内容及主要信息详见附录 A。

无论是进行什么评估，宜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的组织）。修复组织不可能与正常软骨的特性完全一致，宜说明这些差异存在的原因和继续临床试验的可行性。

8 临床试验研究

按照《医疗器械临床试验质量管理规范》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。横向弛豫时间成像（T2 Mapping）和磁共振软骨延迟增强成像（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和成熟软骨特有的糖氨多糖（GAG）含量。可按照 YY/T1636 进行为期至少一年的临床跟踪评价。

附录 A

(资料性附录)

临床前大动物实验研究的考虑要点

A.1 有效性评价指标

动物实验通常用来评价软骨再生植入物的有效性指标如下：

a) 生物反应：对于产品的生物反应及一个组合产品中每个组分的生物活性，可以通过动物实验的研究证明终产品中的某个组分有临床效果。

b) 耐久性：即评估软骨损伤修复的时间、产品的耐磨损性能、降解特性和随着时间推移承受生理负载的性能。通过大动物实验评估耐久性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。研究持续期间宜基于产品的特性、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) 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，或产品降解产物的作用。系统性全身毒性可能是由于细胞或粒子或降解物迁移至关节以外的空间。产品潜在的致瘤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实验进行全面评价。

d) 剂量效应：例如，矿物组成、细胞数和其他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，通常在大动物实验中获得数据。

A.2 实验方案设计的考虑要点

评价软骨再生植入物的动物实验方案设计时宜重点考虑以下因素：

a) 创面尺寸和部位：动物实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。

b) 研究终点：动物实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：组织学评价和按照 ISO 13019-2018 进行再生软骨组织糖胺多糖含量检测。可按照 YY/T 1636 的附录 A 及参考美国 ASTM 标准 (F3224-2017)，使用磁共振影像技术 (MRI) 评估。在动物实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)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。

c) 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 (Kitamura et al.) 中描述的许多评价关节软骨修复或替代产品的临床前实验动物模型。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。评价软骨修复试验时最常使用的大动物模型是山羊、绵羊，犬、猪也被用于评价软骨修复的模型 (YY/T 0606.10, Kitamura et al., Ahern et al., 郝春香等, 张雨等)。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：类型、大小、深度等) 和关节软骨损伤的位置。应阐述关节软骨损伤的准备方法，创面的总体描述和组织学评价，并描述各种机械性能 (力学) 评价及其适用性。

d) 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。

e) 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用于

实验，其与最终应用于临床的细胞产品的特性和生物活性相似。在使用同源细胞做毒理实验前，应在初步研究中描述与人源细胞产品类比的水平。

f) 在设计含细胞等活性成分的软骨再生修复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。

参考上述条件，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。

A.3 动物实验研究的主要信息

动物实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) 动物实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，包括制备、尺寸和软骨损伤的位置、固定的时期、实验动物的步态分析报告、列出的所有参数适用性，病理学、组织学和放射学评价，详细描述动物实验的产品与临床试验的产品之间的不同之处。

再生型关节软骨植入物产品在植入初期往往不能完全承受负荷(如一种由骨膜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。当临床产品和测试产品之间存在差异时，应该解释为什么结果与该产品的临床安全性有关。

参 考 文 献

- [1] YY/T 1445-2016 组织工程医疗器械产品术语
- [2] 《动物源性医疗器械注册技术审查指导原则》(2017年修订版)
- [3] 《同种异体植入性医疗器械病毒灭活工艺验证技术审查指导原则》(2011, 及修订版)
- [4] 《组织工程医疗产品研究及申报相关要求》(国食药监[2007]762)
- [5] 《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则》(试行)(2017年12月22日发布)
- [6] 《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》(2015)
- [7] 《医疗器械动物实验研究技术审查指导原则 第一部分: 决策原则》(2018年发布)
- [8] 《医疗器械动物实验研究技术审查指导原则 第二部分: 实验设计、实施质量保证》(征求意见稿, 2020.01)
- [9] 《医疗器械临床试验质量管理规范》(2016年03月23日发布)
- [10] ISO 13022-2012 含活细胞的医疗产品 风险管理的应用和制备工艺要求(Medical products containing viable human cells - Application of risk managements and requirements for processing practices)
- [11] ISO 18362-2016 细胞保健产品的制造 加工过程中微生物风险的控制(Manufacture of cell-based health care products — Control of microbial risks during processing)
- [12] ISO/TS 20399-1:2018 生物技术 细胞治疗产品生产过程中的辅助材料 第1部分: 一般要求 (Biotechnology -- Ancillary materials present during the production of cellular therapeutic products -- Part 1: General requirements)
- [13] ISO/TS 20399-3:2018 生物技术 细胞治疗产品生产过程中的辅助材料 第3部分: 对辅助材料使用者的最佳操作指南(Biotechnology -- Ancillary materials present during the production of cellular therapeutic products -- Part 3: Best practice guidance for ancillary material users)
- [14] ASTM F3224-2017 Standard Test Method for Evaluating Growth of Engineered Cartilage Tissue using Magnetic Resonance.
- [15] Preparation of IDEs and INDs for Products Intended to Repair or Replace Knee Cartilage. Guidance for Industry(关节软骨修复替代产品的 IDE 及 IND 准备行业指南), 2011, 美国 FDA 生物制品评价和研究中心、器械和放射防护中心联合发布
- [16] Articular Cartilage Repair (关节软骨修复), 2010, 日本厚生劳动省医药食品局审查管理科发布
- [17] Kim MS, Jeong S, Lim HG, et al. Differences in xenoreactive immune response and patterns of calcification of porcine and bovine tissues in α -Gal knock-out and wild-type mouse implantation models. Eur J Cardiothorac Surg, 2015, 48(3):392-399.
- [18] Kim MS, Lim HG, Kim YJ. Calcification of decellularized and alpha-galactosidase-treated bovine pericardial tissue in an alpha-Gal knock-out mouse implantation model: comparison with primate pericardial tissue. Eur J Cardiothorac Surg, 2016, 49(3):894-900.
- [19] 王泽昊, 邵安良, 魏利娜, 等. 采用 Gal 抗原缺失鼠评价 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(6):561-564.
- [20] 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. 药物分析杂志, 2018, 38(8):1288-1295.
- [21] 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.
- [22] 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, 39(8):1370-1378.

- [23] Park MS, Kim TG, Lee KM, et al. Effects of reduction in the alpha-gal antigen on bony union: a model of xenobone graft using GalT knockout mouse. *Xenotransplantation*, 2014, 21(3):267-273.
- [24] Shao A, Ling Y, Xu ML, et al. Xenogeneic bone matrix immune risk assessment using GGTA1 knockout mice. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(s3): S359-S369.
- [25] 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. *药物分析杂志*, 2019, 39(8):1354-1361.
- [26] 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. *药物分析杂志*, 2019, 39(8):1339-1346.
- [27] 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. *药物分析杂志*, 2019, 39(8):1347-1353.
- [28] 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.
- [29] Chu CR, Szczodry M, Bruno S. Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue Eng Part B Rev*, 2010, 16(1):105-115.
- [30] 张雨, 刘舒云, 郭维民, 等. 人脐带间充质干细胞复合脱细胞软骨细胞外基质取向支架修复山羊膝关节全层软骨缺损的实验研究. *中国医药生物技术*, 2016, 11(6):502-509.
- [31] 郝春香, 马宁, 睦翔, 等. 早期体内力学刺激促进藻酸钙复合自体软骨细胞修复羊关节负重区软骨缺损的实验研究. *中国医药生物技术*, 2018, 13(3):207-212.
- [32] Kitamura N, Yokota M, Kurokawa T, et al. In vivo cartilage regeneration induced by a double-network hydrogel: Evaluation of a novel therapeutic strategy for femoral articular cartilage defects in a sheep model. *J Biomed Mater Res A*, 2016, 104(9):2159-2165.
- [33] Ahern BJ, Parvizi J, Boston R, et al. Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009, 17(6):705-713.
-