

· 全国药品安全与监管博士后论坛专栏 ·

## 动物源性医疗器械精准风险评价的关键技术研究

徐丽明, 邵安良, 陈亮, 魏利娜, 段晓杰 (中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

**摘要** **目的:** 动物源性医疗器械的主要安全风险是外源因子污染和不可预测的免疫学及毒理学反应。本文概述最新动物源性医疗器械的精准风险评价关键技术, 为相关产品研发和注册审评提供参考, 为科学监管提供技术支持。**方法:** 总结自主研发的针对动物源性医疗器械安全风险和质量控制的检测与评价关键技术、方法、标准, 以及免疫毒理学评价的几点专家共识。**结果和结论:** 动物源性生物材料DNA残留量测定、残留 $\alpha$ -Gal抗原检测方法及标准已发布实施; 研究建立了淋巴细胞增殖试验、采用Gal抗原缺失小鼠的免疫学评价方法等免疫毒理学评价技术手段。部分检测项目被《动物源性医疗器械注册技术审查指导原则》(2017修订版)收录。这些技术为动物源性医疗器械的精准风险评价和风险控制提供了技术支持。同时, 作者展望了正在研究的风险评价新技术, 提出了系统的精准风险评价体系仍需不断完善。

**关键词:** 动物源性医疗器械; 安全风险; 精准; 风险评价; 外源因子; 免疫学反应

中图分类号: R197.39; TH77 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2019)12-1348-08

doi:10.16153/j.1002-7777.2019.12.003

### The Critical Techniques Research in Accurate Risk Evaluation of Animal Tissue-Derived Medical Devices

Xu Liming, Shao Anliang, Chen Liang, Wei Lina, Duan Xiaojie (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

**Abstract Objective:** The main safety risks of animal tissue-derived medical devices are contamination and transmission of adventitious agents and undesirable immunological or toxicological responses. Therefore, this review summarizes critical techniques for accurate risk assessment of animal tissue-derived medical devices, and provides support for related product development and registration evaluation that provides technical support for scientific supervision. **Methods:** A series of critical techniques, methods, standards and strategies used for risk assessments and quality control of animal tissue-derived medical devices developed by the author's team were summarized, and some points of expert consensus on immunotoxicology evaluation in animal experiments were demonstrated. **Results and conclusion:** The methods and standards for the determination of DNA remnants and residual  $\alpha$ -Gal antigens in animal tissue-derived biological materials were published and implemented; the results from the studies on the establishment of lymphocyte proliferation tests and the use of Gal antigen deficient mice on immunology evaluation provided immunotoxicological evaluation techniques and strategies. Some of the testing items were included in the "Guidelines for the Technical Review of Registration of Animal Tissue-Derived Medical Devices"(2017, Revised Edition). These technologies provided technical support for accurate

基金项目: 国家科技重点研发计划(编号 2016YFC1103200); 生物源性材料及产品的检测与评价关键技术和标准化研究(2016-2020); 再生型医用植入器械国家工程实验室首席专家项目(编号 2012NELRMD002)

获奖项目: 本文获得“第四届全国药品安全与监管博士后论坛(2019)”优秀论文一等奖

作者简介: 徐丽明, 博士, 研究员; 研究方向: 医疗器械质量评价; Tel: (010) 53852556; E-mail: xuliming@nifdc.org.cn

risk assessment and control of animal tissue-derived medical devices. At the same time, the author looks forward to the new risk assessment technologies in the research, and proposes that the systematic accurate risk evaluation system still be improved.

**Keywords:** animal tissue-derived medical devices; safety risks; accurate; risk assessment; adventitious agents; immunological response

用于动物源性医疗器械的生物材料因具有良好的生物相容性和组织诱导活性,且材料来源方便,使动物源性医疗器械产品的研发成为热点,被广泛用于外科的创伤修复等再生医疗领域<sup>[1]</sup>。动物源生物材料的来源涉及的动物种属有猪、牛、马、鼠、鸡、蚕、海洋生物等。其组织来源为各种脱细胞基质、心包、表皮、真皮、血管、神经、肌腱、鸡冠、蚕丝、鼠尾等。其临床应用在我国有以下医疗器械:(1)植入材料,如异种皮质骨、人工骨、骨修复材料、骨填充材料;(2)心脏或组织修补材料,如牛或猪心包生物瓣膜、心脏补片;(3)眼科植入材料,如异种角膜(猪源)、结膜、眼内充填材料等;(4)接触式人工器官,如人工皮肤、异体脱细胞真皮;(5)医用卫生材料及生物敷料;(6)可吸收性止血、防黏连材料,如生物蛋白胶、医用胶原膜、透明质酸;(7)医用缝合材料,如医用可吸收胶原缝合线、羊肠线等。我国动物源性医疗器械产品的研发和应用居世界之首。

动物源性医疗器械的主要安全风险是外源因子微生物类污染和传播问题、热原、免疫学或毒理学反应。国际标准化组织先后发布了4项动物源性医疗器械的风险管理标准。我国也已及时进行了转化,成为医疗器械行业标准<sup>[2-5]</sup>。在这系列标准的“第1部分:风险管理应用”中,规定了鉴别与该类器械相关的危害与危害情况的判定、对所产生风险的评价、对这些风险的控制以及对控制有效性的监视程序。概述了残余风险可接受性的判断过程。提出了对采用动物组织或其衍生物制造的医疗器械有关危害的风险管理的要求和指南。然而,这些标准中提出的是原则和管理程序要求,侧重于微生物类外源因子污染的防控和病毒灭活验证的要求。动物源性生物材料应用于人体面临着免疫排斥反应潜在风险,直接影响着材料的安全性和有效性<sup>[6]</sup>。

而常规的医疗器械生物学评价系列标准(GB/T 16886)和其他医疗器械行业标准也都主要适用于常规材料(如金属、陶瓷、高分子等)的医疗器械,对动物源性医疗器械特有的异种免疫原性问题缺乏专属性和特异性。没有针对动物源性医疗器械专属的检测与评价标准,缺乏精准风险评价和风险控制手段。

中国食品药品检定研究院(以下简称中检院)医疗器械检定所的质量评价室,在再生型医用植入器械国家工程实验室首席专家项目(2012-2016)-动物源性生物材料免疫原性检测与评价技术研究(2012NELRMD002)和国家重点研发计划课题(2016-2020)-生物源性材料及产品的检测与评价关键技术和标准化研究(2016YFC1103203)的资助下,建立了一系列检测与评价动物源性医疗器械免疫原性风险和质量控制的关键技术、方法和标准。其中的部分检测技术涉及的检测项目已被《动物源性医疗器械注册技术审查指导原则》(2017年修订版)<sup>[7]</sup>收录。以下予以详细介绍。

## 1 残留DNA检测

动物源性生物材料大多是经脱细胞处理的组织基质类材料,以达到去除异种免疫原性,减少免疫排斥反应的目的。残留DNA检测是脱细胞基质类生物材料进行脱细胞工艺评价的重要指标之一。我国药典中虽然有生物制品DNA残留测定方法,但不能直接用于医疗器械的检测。因为医疗器械几乎都是固体或者凝胶状的材料,需要进行有效的样品前处理,消化固体的基质成分,释放残留的DNA后方能进行检测。另外,由于主要成分是基质纤维蛋白,即使进行充分的消化,基质纤维蛋白对检测的干扰也非常大,需要进行残留DNA的提取,然后再进行测定。为此,我们建立了三步法:酶分解基质释放核酸、核酸纯化(增加同步回收率实验)和

荧光染色进行核酸测定<sup>[8]</sup>。以该方法为基础制定了行业标准《组织工程医疗器械产品 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 0606.25-2014)<sup>[9]</sup>。该标准于2014年发布，2015年开始实施，填补了国内外脱细胞工艺评价方法标准的空白。该标准被2017年发布的修订版《动物源性医疗器械注册技术审查指导原则》收录，作为该类产品技术要求的必检项目，用于产品的工艺研究、工艺有效性验证、注册检验和质量控制。

关于DNA残留量的安全限值制定，需要结合产品的使用面积、使用量、创面类型、接触的部位、材料的来源及降解特性等，同时结合免疫原性残留风险分析和评价结果，综合评价其风险程度，确定限量值。

残留DNA是脱细胞工艺的评价指标，异种核酸本身虽然可能造成一定的不可预测的免疫反应，但不是主要的风险因素。为了降低DNA残留建议不使用核酸分解酶，因为这种方法虽降低了核酸的残留，但不能减少其他细胞成分的残留，达不到降低整体免疫原性的目的，反而引入了核酸分解酶试剂残留的额外风险。

该项标准是国际首创，ASTM正在研发中的标准“脱细胞基质材料(ECM)脱细胞工艺评价指南”(WK 57514)中把残留DNA检测列为首选项目，但是，没有提供标准化方法。中检院作为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/TC110/SC3)秘书处单位，正在组织申请国际标准的立项，于2019年国际标准化工作年度会议上已被列为外科植入物标准化技术委员会组织工程分技术委员会(ISO/TC150/SC7)的标准制定计划。该项工作的推进将把中国该项标准升级为国际标准，引领该领域国际标准化工作的发展。

## 2 残留Gal抗原检测

动物源性生物材料的残留异种免疫原是造成宿主免疫排斥反应的主要根源和潜在风险，直接影响着产品的安全性和有效性。免疫反应严重或者长期慢性的局部免疫反应，常常会导致植入物局部纤维化明显，形成纤维包裹，最后以填充在局部的异物形式存留，而无法实现所期望的真正的组织再生和重建。因此，检测产品的异种免疫原残留是质量控制和风险评价的重要指标。然而，可能引起人体

免疫排斥和免疫毒理学反应的异种免疫原有无数种类，有些比较明确，而大多数则是未知的，没有办法逐一检测和评价。因此，需要选择具有代表性的已知的异种免疫原，作为去除免疫原工艺评价的指征，进行工艺评价和质量控制。

已有研究表明异种 $\alpha$ -半乳糖基抗原( $\alpha$ -1,3-galactosyle,  $\alpha$ -Gal)是异种器官移植超急性免疫排斥反应中的主要靶抗原<sup>[1,6,10]</sup>。 $\alpha$ -Gal是含有聚乳糖胺核心，末端残基含有细胞表面分泌型糖蛋白或糖脂，广泛存在于猪、牛、马等低等动物体内。人体、类人猿、旧世纪猴的半乳糖苷转移酶基因有2个碱基错位变异而不表达Gal抗原<sup>[10-11]</sup>，但人类血清中存在高滴度的抗 $\alpha$ -Gal抗体(占总血清球蛋白的1%~3%)，而当人体接受含有Gal抗原的异种器官移植或生物材料植入时会导致超急性或慢性的免疫排斥反应<sup>[12-14]</sup>。因此，选择Gal抗原作为脱细胞工艺中免疫原除去的评价指标，可以作为重要的质控指标之一，评价产品的免疫原性风险。

本课题组首先研制了含有Gal抗原的阳性生物材料参考品和不含Gal抗原的阴性生物材料参考品，于2018年已作为国家标准物质上市(Gal抗原检测生物材料参考品，标准品号：380001-201701，提供单位：中国食品药品检定研究院)。本课题组在Gal抗原非定量检测方法研究的基础上不断改进，利用人工合成的Gal抗原(Gal-BSA)与不含Gal抗原的阴性生物材料参考品，制备模拟脱细胞基质的标准样品，再利用特异性的抗Gal抗体，建立了酶联免疫抑制方法，定量检测脱细胞基质材料中残留的Gal抗原<sup>[15-17]</sup>。基于该方法的行业标准《组织工程医疗器械产品 动物源性支架材料的残留 $\alpha$ -Gal抗原检测》(YY/T 1561-2017)<sup>[18]</sup>，于2017年发布，2018年实施。该标准方法填补了国内外去除免疫原工艺评价方法的空白，已被《动物源性医疗器械注册技术审查指导原则》(2017年修订版)收录；同时也被正在研发中的ASTM“脱细胞基质材料(ECM)脱细胞工艺评价指南”标准(WK 57514)收录。组织工程医疗器械产品分技术委员会正在计划将该项行业标准升级为国际标准，申请国际标准立项。

由于标准中的方法使用了进口的人工合成Gal抗原，其不同的合成批次所含的Gal抗原表位稍有差异；所使用的市售特异性抗Gal抗体是非纯化的

融合细胞上清液, 批次不同其活性有差异。这两个不确定因素导致采用标准方法时需要根据试剂的批次进行试验体系的优化。为此, 本课题组研制了Gal抗原检测试剂盒, 并申请了发明专利, 试剂盒专利于2015年获得授权<sup>[19]</sup>。为了支持行业标准的实施, 中检院进行了专利的转化, 组织研制优化了试验体系的“ $\alpha$ -Gal抗原定量检测试剂盒(标准方法)”(美坛, 07101)产品。

不同组织来源的基质材料, 其Gal抗原含量相差悬殊, 从几倍到上千倍, 因此, 需要综合评价其残留的风险, 如预期使用部位(植入体内、体表外用)、使用面积、使用量、创面类型及使用局部血运情况、材料的组织来源及降解特性等, 同时结合免疫原性残留风险分析和评价结果进行定值限量。比如猪角膜组织的Gal抗原很低, 而皮肤、心包类组织则高达角膜组织的数千倍, 因此, 单独依靠Gal抗原清除率作为质控指标是不科学的, 应进行定量检测。

### 3 免疫原性残留风险评价

由于生物体免疫学反应的复杂性, 异种免疫原性反应包括细胞免疫和体液免疫, 是生物体内的全身性、系统性反应, 也是无数异种免疫原的综合反应。动物源性生物材料的异种免疫原性残留风险需要结合脱细胞工艺的评价和质量控制(如残留DNA、残留Gal抗原检测), 一级免疫学反应评价(如局部刺激、致敏等)、体外细胞免疫评价(如淋巴细胞增殖试验等), 进行综合的免疫原性残留风险分析。如果不能充分评价其最终的免疫原性风险是否可接受, 则需要进行生物体内的免疫毒理学评价。

#### 3.1 体外免疫原性残留风险评价

中检院组织工程分技术委员会(SAC/TC110/SC3)制定了“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 0606.15-2015)<sup>[20]</sup>行业标准。该标准提供了评价动物源性医疗器械的细胞免疫方法。然而, 由于淋巴细胞在体外培养困难, 需要先建立相对稳定的试验体系。本课题组系统考察了如淋巴细胞的来源、接种数量、受试物暴露时间及细胞培养周期、阳性对照品的选择等试验条件<sup>[21-23]</sup>。研究发现动物源组织(原材料)虽能引起淋巴细胞增殖, 但不是典型的T淋巴细胞增殖, 而常被用于阳性对

照品细胞分裂原(Con A)则是典型的T淋巴细胞增殖。因此, 如果选择Con A作为阳性对照品, 应考虑其局限性; 建议增加动物源组织(原材料)作为阳性对照品, 可以更客观地评价试验体系对动物源材料的敏感性, 从而客观地评价动物源性医疗器械产品的免疫原性风险。另外, 受试样品的暴露/添加方式(如浸提液、匀浆液)检测淋巴细胞活性的方法(如MTT法、CCK-8法的敏感性等), 需要充分考察其对试验结果的影响。

#### 3.2 体内免疫原性残留风险评价

所有低等动物体内都表达Gal抗原, 人体却不表达Gal抗原, 而由于肠道细菌携带大量的Gal抗原使得人体内存在高水平的抗Gal抗体。因此, 科学研究表明动物组织中的Gal抗原是引起人体超急性免疫排斥反应的主要靶抗原。如果按照常规的免疫毒理学评价方法, 采用野生型动物(如小鼠)评价动物源材料的免疫原性, 显然是不科学、不合理的。早在1984年, 关于Gal抗原相关的异种免疫学研究即已开始<sup>[22]</sup>。国际上已有关于Gal抗原缺失(调控基因GGTA1被敲除)小鼠、猪、甚至牛的研究。其中, GGTA1基因敲除小鼠是最早被用来研究 $\alpha$ -Gal相关的免疫学反应的模式动物<sup>[24-25]</sup>。既往研究证明GGTA1基因敲除小鼠免疫后诱导的抗-Gal抗体与 $\alpha$ -Gal结合的亲和性和人的抗Gal抗体相似, 能够诱导Gal抗原阳性异种心脏补片的超急性免疫排斥反应<sup>[26]</sup>。异种角膜虽然免疫原性较低, 但没有进行任何处理的新鲜猪角膜移植到Gal抗原缺失小鼠眼部, 仍然出现显著的血清特异性抗-Gal IgG抗体的升高, 局部抗-Gal IgG和IgM抗体的增加, 而野生型小鼠未出现明显变化; 同时, 与新鲜猪角膜相比, 脱细胞处理后的猪角膜局部抗-Gal IgG和IgM抗体明显减少<sup>[27]</sup>。这一研究结果充分证明Gal抗原缺失小鼠可以用于动物源材料的免疫原性评价。膜类动物源材料, 如心包组织, 在用于生物瓣膜时最大的问题是钙化, 从而导致瓣膜渗漏, 其中, 局部免疫原性反应与钙化是密切相关的。有研究将猪和牛的心包组织植入到Gal抗原缺失小鼠, 并与野生型小鼠对比评价了异种免疫反应, 结果发现Gal抗原缺失小鼠具有更高的敏感性<sup>[28]</sup>。然而, 目前Gal抗原缺失小鼠只限于国外研发团队使用, 无法进口到国内。 $\alpha$ -Gal主要受 $\alpha$ -1, 3半

乳糖基转移酶 ( $\alpha$  1,3-galactosyltransferase,  $\alpha$ -GT or GGTA1) 或 (和) 异构神经酰胺三己糖苷合成酶 (isoglobotriosylceramide synthase 或 isogloboside 3 synthase, iGb3S) 调控<sup>[29]</sup>。有研究显示GGTA1基因敲除不能完全消除Gal抗原的表达<sup>[30-31]</sup>, 提示iGb3S可能是另一个合成Gal抗原的酶。因此, 本课题组研制了GGTA1和iGb3S基因单独敲除的小鼠 (GGTA1 KO, iGb3S KO) 和2个基因同时敲除的双基因敲除小鼠 (GGTA1/iGb3S DKO)。本课题组所研制的具有中国知识产权的3种Gal抗原缺失小鼠申请了3项发明专利, 其中2项发明专利已获授权<sup>[32-33]</sup>。研究结果在国际上首次证明了iGb3S基因参与了Gal抗原的表达调控, iGb3S基因敲除减少了Gal抗原表达 (心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏) 约5.19%~21.74%<sup>[34]</sup>。但是, 研究表明, 由于Gal抗原表达仅轻度减少, iGb3S KO小鼠与野生型小鼠一样, 对动物源性组织并不产生明显的免疫反应。研究结果表明, GGTA1 KO小鼠的Gal抗原表达 (心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏) 减少了约98.45%~99.77%, 这一结果与国际报道相近, 证明GGTA1是Gal抗原的主要调控基因, 但不是唯一的调控基因。GGTA1/iGb3S DKO小鼠的研究结果在国际上首次证明了GGTA1和iGb3S 2个基因同时敲除可以使Gal抗原表达全部消失。通过研究GGTA1 KO和GGTA1/iGb3S DKO对含Gal抗原受试物 (兔红细胞及牛源骨) 的敏感性, 证实了二者对动物源性组织同样具有足够高的敏感性; GGTA1/iGb3S DKO对兔红细胞膜 (含有大量Gal抗原) 的免疫诱导并没有比GGTA1 KO具有更高的敏感性<sup>[35]</sup>, 但对牛源骨组织显示有更多的免疫学指标的变化。基于上述2种Gal抗原缺失小鼠对不同动物组织的敏感性尚需开展大量研究, 考察其免疫毒理学反应特点。

在大量基于GGTA1基因敲除Gal抗原缺失小鼠的评价和应用研究<sup>[36-39]</sup>中, 研究结果表明, 无论是含异种免疫原较低的角膜, 还是中度免疫原性的异种骨, 高免疫原性的异种真皮和心包, Gal抗原缺失小鼠试验体系都能够一定程度上反映原材料与免疫原去除产品的差异, 提示可以应用于动物源性材料免疫毒理学评价。中检院已将基于Gal抗原缺失小鼠的免疫学评价试验方法, 作为非标方法获得了CNAS认证。

在基于Gal抗原缺失小鼠对动物源性材料进行免

疫毒理学评价体系中, 本课题组同时建立了材料特异性抗体的检测方法。其实验原理: 用没有去除免疫原的原材料匀浆液 (含有全部的免疫原蛋白), 制备固相抗原包被酶标板, 捕获植入了试验样品的Gal抗原缺失小鼠血清中的材料 (试验样品) 特异性抗体, 并作为非标方法已获得了CNAS认证。

通过建立这些针对异种免疫原性的精准风险评估评价方法和手段, 为许多动物源性医疗器械生产企业提供了拟注册产品的免疫原性评价报告。特别是为数家因免疫学评价资料不符合要求而被要求补发资料的企业提供了能客观地反映产品残存免疫原风险的免疫学评价报告。为注册前产品的精准风险评估和风险控制提供了有力的技术支持。

### 3.3 临床免疫原性残存风险监测

由于种属的遗传学差异, 以及动物源组织引起人体免疫排斥反应的异种免疫原的复杂性, 尽管使用Gal抗原缺失小鼠, 其免疫原性风险评估结果也不能完全外推到人体的免疫原性风险。因此, 在临床试验研究中应尽量设定一些对动物源性材料特异性的免疫学指标进行残存免疫原风险监测。如: 接受动物源性医疗器械植入手术的病人血清中抗GalIgG、抗GalIgM的检测。可通过患者术前和术后不同时间的特异性抗Gal抗体水平的对比, 分析产品的残存免疫原性风险。中检院已建立了能够相对定量的人血清中抗GalIgG、抗GalIgM检测方法, 开发了相应的检测试剂盒; 收集了300余份健康人血清的基础数据, 可以为相关临床试验研究提供技术支持。

## 4 基于动物试验的免疫毒理学评价的几点共识

由于生物体对异种免疫原的免疫毒理学反应是体内系统反应, 包括细胞免疫和体液免疫, 还有非特异性的炎症反应, 对植入物的异物反应等也会参与免疫反应的最终表现。而需要进行免疫学风险评估的医疗器械产品大多是以固体形式为主的植入材料, 很多具有免疫原性风险的材料具有可降解特性。因此, 开展体内免疫毒理学评价试验时试验方案的设计很重要。医疗器械国家标准GB/T16886.20仅提供了免疫毒理学试验原则, 具体的试验方案设计需要根据产品的特性和预期用途, 进行个案考虑 (Case-by-Case)。

中检院国家重点研发计划“生物源性材料及

产品的检测与评价关键技术和标准化研究”课题组，在2018年11月组织召开了动物源性医疗器械免疫学评价与质量控制关键技术与应用专家研讨会。参会专家来自国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心、北京市医疗器械检验所、天津市医疗器械质量监督检验中心、清华大学、空军军医大学、西南交通大学和冠昊生物科技股份有限公司。会上就基于动物试验的免疫毒理学评价实验方案设计几个关键问题进行了深入研讨，并初步达成以下共识。

#### 4.1 试验动物的选择

1) Gal抗原缺失模式动物应用具有如下优势：

①能够客观反映包括Gal抗原残留的综合免疫毒理学风险，而野生型小鼠由于与其他低等动物（如猪、牛等）一样体内表达Gal抗原，不能客观反映动物源材料对人体（不表达Gal抗原，但表达高水平的抗Gal抗体）的潜在免疫毒理学风险；②与野生型小鼠一样，可反映其他异种抗原及其工艺中引入抗原的免疫毒理风险，如各种加工助剂的残留、交联等导致的分子结构、分子量大小的改变，可能会导致终产品的免疫原性增强。

2) 对有必要进行免疫学试验的动物源性医疗器械，包括脱细胞基质类产品及由含Gal抗原的原材料提纯的动物源产品，应对Gal抗原残留量进行质量控制；建议采用Gal抗原缺失模式动物，结合材料特异性抗体的检测进行抗原残存风险评价。

3) 纯化胶原蛋白类产品，如果胶原蛋白提取的原材料（如牛、猪跟腱）含有一定量的Gal抗原，胶原蛋白类产品中可能存在Gal抗原的残留，有必要参照上述建议进行质量控制，并对残存抗原进行风险评价。

#### 4.2 试验体系中阳性对照品的选择和组别设计

1) 阳性对照品设定的目的：证实试验体系的敏感性和作为产品免疫原性的阳性对照品。

2) 常规采用的“BSA+佐剂”阳性对照品只能验证实验动物的基础免疫反应能力，不能反映试验体系对动物源材料中异种免疫原的敏感性，因此，作为动物源产品免疫原性的阳性对照有局限性。

3) 用未脱细胞及去除免疫原工艺前的原材料作为阳性对照品，可以反映试验体系对动物源材料中异种免疫原的敏感性，同时作为产品的含免疫原阳性对照品，可以反映产品去除免疫原工艺的有效性。

4) 可设定假手术组作为阴性对照组。

#### 4.3 受试物暴露方式和实验周期的设计

1) 暴露方式选择的原则是尽可能模拟临床使用。一般采用局部皮下或者肌肉植入的方式。如果植入物预期临床使用的部位受力学因素影响，则选择肌肉植入的方式更能相对客观地反映材料的实际降解特性。

2) 植入周期和观察时间点可结合产品的材料特点和降解特性确定。如果是非降解性或者降解很慢的材料，只要科学合理，可考虑只设定1个植入时间点（如4周）。如果为可降解材料，可根据材料降解的快慢，采用涵盖降解周期的多个时间点，至少包括植入初期、最大反应期（降解最多的时期）和反应平稳期或者反应消失期。

#### 4.4 植入剂量的确定

1) 可结合产品预期临床最大使用量、实验动物可承受的最大植入量和毒理学种属放大倍数确定植入剂量。

2) 种属放大倍数应尽可能反应预期临床使用的最大暴露风险，结合产品的特性综合考虑。最低放大倍数可参考“人体最高用量的10倍”原则（参见《腹腔、盆腔外科手术用可吸收防粘连产品注册技术审查指导原则》）。

#### 4.5 剂量-效应组别设计

如果最大植入剂量的免疫学反应是可接受的，则可不设定剂量-效应组别；如果最大植入剂量的免疫学反应与空白对照组相比有显著性差异且是不可接受的，则应进行剂量-效应评价。

### 5 总结和展望

本文所介绍的针对动物源性医疗器械免疫原性检测与评价技术、方法、标准及其应用研究，为动物源性医疗器械脱细胞、去除免疫原的工艺有效性评价，体外免疫原性残余风险评价，体内免疫原性残余风险评价，临床免疫原性风险监测提供了切实可行的手段；为生产企业的质量体系中风险管理和产品生产的质量控制，为该类产品科学审评审批，指导原则等法规的制定提供了有力技术支持。

为更充分地评价动物源性医疗器械免疫原性风险和进行有效的质量控制，还需要考虑更全面的脱细胞工艺评价，如残留细胞核的染色可以考察残留细胞的分布；细胞膜成分如磷酸酯、膜蛋白的定量检测；细胞内分子如肌动蛋白等定量检测；其他

免疫相关的损伤相关小分子物质、细胞内蛋白定量(S100、HMGB)等。

动物源性医疗器械的另一大风险是微生物等外源因子污染和传播。为有效控制这些风险,要求医疗器械生产企业进行有效的源头控制,并可能需要增加病毒去除/灭活工艺,提供工艺验证资料。病毒去除/灭活工艺验证通常采用传统的病毒滴定法,该方法全部依靠肉眼观察细胞的病毒病变,每项实验需要对大约50多块96孔板逐孔观察,具有受人的因素影响大、数据不能溯源的缺点。中检院正在推进96孔细胞病毒培养板实时自动图像扫描存储的研究工作,以期实现图片数据溯源;同时构建细胞病毒病变图像数据库,开发人工智能辅助阅片软件,以实现传统病毒滴定法的改进;另外,正在研究建立细胞培养-定量PCR联合方法,可缩短实验时间,减少人的因素影响,数据可溯源,有望实现传统的病毒滴定法的补充或替代。

动物源性材料脱细胞,去除免疫原的工艺中,加工助剂的残留也是造成毒理反应的重要潜在风险,如常被用于脱细胞去除免疫原的十二烷基硫酸钠(SDS)、聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100),以及用于分解蛋白和核酸的酶类制剂。对任何的加工助剂应进行残留量检测,并进行剩余风险分析,规定可接受限量。中检院正在建立相关加工助剂残留的检测方法,并推进行业标准制定。

#### 参考文献:

- [1] Sandrin MS, McKenzie IF. Gal alpha (1,3)Gal, The Major Xenantigen(s) Recognised in Pigs by Human Natural Antibodies[J]. Immunol Rev, 1994, 141: 169-90.
- [2] 全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会. YY/T 0771.1.《动物源医疗器械 第1部分:风险管理应用》[S]. 2009.
- [3] 全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会. 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》[S]. 2009.
- [4] 全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会. 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》[S]. 2009.
- [5] 全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会.《动物源医疗器械 第4部分:传播性海绵状脑病(TSE)因子去除与灭活和验证试验的原则》[S]. 2015.
- [6] Stephen F. Badylak and Thomas W. Gilbert. Immune Response to Biologic Scaffold Materials[J]. Semin Immunol. 2008, 20(2): 109-116.
- [7] 国家药品监督管理局.《动物源性医疗器械注册技术审查指导原则》(2017年版)[S]. 2017.
- [8] 徐丽明,邵安良,赵艳红.动物源性生物材料残留DNA的定量检测法[J].生物医学工程学杂志,2012,3: 479-485.
- [9] 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. YY/T 0606.25.《组织工程医疗器械产品 第25部分:动物源性生物材料DNA残留量测定法:荧光染色法》[S]. 2014.
- [10] Oriol R, Ye Y, Koren E, et al. Carbohydrate Antigens of Pig Tissues Reacting with Human Natural Antibodies as Potential Targets for Hyperacute Vascular Rejection in Pig-to-man Organ Xenotransplantation[J]. Transplantation, 1993, 56: 1433-1442.
- [11] Galili U, Shohet SB, Kobrin E, et al. Man, Apes, and Old World Monkeys Differ From Other Mammals in the Expression of  $\alpha$ -galactosyl Epitopes on Nucleated Cells[J]. J Biol Chem, 1988, 263: 17755-17762.
- [12] Galili U, Rachmilewitz EA, Peleg A, et al. Unique Natural Human IgG Antibody with Anti- $\alpha$ -galactosyl Specificity[J]. J Exp Med, 1984, 160: 1519-1531.
- [13] Galili U, Macher BA, Buehler J, et al. Human Natural Anti- $\alpha$ -galactosyl IgG. II. The Specific Recognition of  $\alpha$ (1,3)-linked Galactose Residues[J]. J Exp Med, 1985, 162: 573-582.
- [14] Galili U, Anaraki F, Thall A, et al. One Percent of Human Circulating B Lymphocytes are Capable of Producing the Natural Anti-Gal Antibody[J]. Blood, 1993, 82: 2485-2493.
- [15] 陆艳,单永强,邵安良,等.ELISA抑制法检测动物组织中 $\alpha$ 1,3-Gal抗原[J].药物分析杂志,2015,35(10): 40-46.
- [16] 单永强,徐丽明,柯林楠,等.动物源性生物材料中残留 $\alpha$ -Gal抗原检测方法[J].生物医学工程学杂志,2015,32(3): 680-687.
- [17] Lu Y, Shao A, Xu L et al. A Standardized Quantitative Method for Detecting Remnant Alpha-Gal Antigen in Animal Tissues or Animal Tissue-derived Biomaterials and its Application[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 15424.

- [18] 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. YY/T 1561.《组织工程医疗器械产品 动物源性支架材料的残留 $\alpha$ -Gal抗原检测》[S]. 2017.
- [19] 徐丽明, 邵安良, 柯林楠, 等. 一种检测 $\alpha$ -1,3Gal抗原的试剂盒[P]. 专利号: NL 201410187336.3, 授权公告日: 2016年01月06日, 授权公告号: CN 103983767 B.
- [20] 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. 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》[S]. 2015.
- [21] 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, 39(8): 1354-1361.
- [22] 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, 39(8): 1339-1346.
- [23] 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, 39(8): 1347-1353.
- [24] Tearle RG, Tange MJ, Zannettino ZL, et al. Alpha-1,3-Galactosyltransferase Knockout Mouse. Implications for Xenotransplantation[J]. Transplantation, 1996, 61(1): 13-19.
- [25] Thall AD. Generation of Alpha 1,3 Galactosyltransferase Deficient Mice[J]. Subcell Biochem, 1999, 32: 259-279.
- [26] Chiang TR, Fanget L, Gregory R, et al. Anti-GAL Antibodies in Humans and 1,3 Alpha-Galactosyltransferase Knock-out Mice[J]. Transplantation, 2000, 69(12): 2593-2600.
- [27] Choi HJ, Kim MK, Lee HJ, et al. Effect of  $\alpha$  Gal on Corneal Xenotransplantation in a Mouse Model[J]. Xenotransplantation, 2011, 18(3): 176-182.
- [28] Kim MS, Jeong S, Lim HG, et al. Differences in Xenoreactive Immune Response and Patterns of Calcification of Porcine and Bovine Tissues in  $\alpha$ -Gal Knock-out and Wild-type Mouse[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2015, 48(3): 392-399.
- [29] Milland J, Christiansen D, Lazarus BD, et al. The Molecular Basis for Gal $\alpha$ (1,3)gal Expression in Animals with a Deletion of the Alpha1,3 Galactosyltransferase Gene[J]. J Immunol, 2006, 176(4): 2448-2454.
- [30] Puga Yung GL, Li Y, Borsig L, et al. Complete Absence of the  $\alpha$ -Gal Xenoantigen and Isoglobotrihexosyl Ceramide in  $\alpha$ 1,3 Galactosyltransferase Knock-out Pigs[J]. Xenotransplantation. 2012, 19(3): 196-206.
- [31] Milland J, Christiansen D, Sandrin MS. Alpha1,3-Galactosyltransferase Knockout Pigs are Available for Xenotransplantation: Are Glycosyltransferases Still Relevant? [J] Immunol Cell Biol, 2005, 83(6): 687-693.
- [32] 徐丽明, 邵安良, 范昌发, 等. 一种制备iGb3S基因敲除的非人哺乳动物的方法及应用[P]. 专利号: NL 201410313280.1, 授权公告日: 2018年02月02日, 授权公告号: CN 104120147A.
- [33] 徐丽明, 邵安良, 范昌发. 一种制备GGTA1和iGb3S双基因敲除的非人哺乳动物的方法及应用[P]. 专利号: ZL20151 0122581.0, 授权公布日: 2019年01月18日, 授权公告号: CN 104894163 B.
- [34] Shao A, Xu L, Wu X, et al. Gal Epitope Expression and Immunological Properties in iGb3S Deficient Mice[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 15433.
- [35] 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.
- [36] Shao A, Ling Y, Xu L, et al. Xenogeneic Bone Matrix Immune Risk Assessment Using GGTA1 Knockout Mice[J]. Artificial Cells, Nanomed, and Biotechnol, 2018, DOI:10.1080/21691401.
- [37] 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[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(8): 1296-1303.
- [38] 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[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(8): 1362-1369.
- [39] 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[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(8): 1370-1378.

(收稿日期 2019年10月25日 编辑 范玉明)