



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117659208 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 08

(21) 申请号 202311598555.6

A61L 27/54 (2006.01)

(22) 申请日 2023.11.27

(71) 申请人 天津医科大学第二医院
地址 300211 天津市河西区平江道23号

(72) 发明人 马士卿 邓嘉胤 刘子豪 马贝贝

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事
务所(普通合伙) 11277
专利代理师 李茂家 闫俊萍

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

A61L 27/22 (2006.01)

A61L 27/12 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

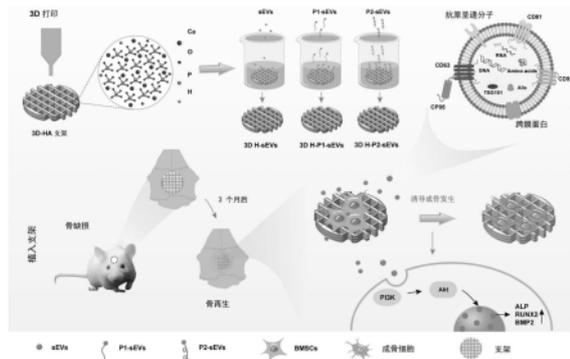
权利要求书2页 说明书15页
序列表(电子公布) 附图7页

(54) 发明名称

一种融合肽、包含其的复合支架、制备方法和用途

(57) 摘要

本发明公开了一种融合肽、包含其的复合支架、制备方法和用途。本发明提供了一种融合肽，其中，所述融合肽包括通过接头连接的羟基磷灰石结合肽和小细胞外囊泡锚定肽。本发明还提供了一种复合支架，其包括：羟基磷灰石支架；小细胞外囊泡；以及，所述融合肽；其中，所述小细胞外囊泡通过所述融合肽连接于所述羟基磷灰石支架。本发明提供的融合肽高效的将羟基磷灰石支架与小细胞外囊泡结合起来。本发明提供的由融合肽介导小细胞外囊泡靶向3D-HA的复合支架，可促进干细胞募集，调控细胞分化和增殖行为，从而加速骨愈合过程，用于骨缺损的临床治疗。



1. 一种融合肽,其中,所述融合肽包括通过接头连接的羟基磷灰石结合肽和小细胞外囊泡锚定肽。

2. 根据权利要求1所述的融合肽,其中,所述接头为柔性肽接头;优选地,所述柔性肽接头包括(GGGGS)_n,其中n选自1,2,3,4,5或6;更优选地,所述柔性肽接头包括如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列;和/或,

所述接头为刚性肽接头;优选地,所述刚性肽接头包括(EAAAK)_n,其中n选自1,2,3,4,5或6;更优选地,所述刚性肽接头包括如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1或2所述的融合肽,其中,所述羟基磷灰石结合肽结合羟基磷灰石;优选地,所述羟基磷灰石结合肽包括如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;和/或,

所述小细胞外囊泡锚定肽结合小细胞外囊泡;优选地,所述小细胞外囊泡锚定肽包括如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的融合肽,其中,所述融合肽的结构为[羟基磷灰石结合肽]-[接头]-[小细胞外囊泡锚定肽];或者,所述融合肽的结构为[小细胞外囊泡锚定肽]-[接头]-[羟基磷灰石结合肽];

优选地,所述融合肽包含以下序列中的一种或多种:

(i) 如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列;

(ii) 与SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列具有至少80%、82%、85%、87%、90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,并且其保留如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的活性;

(iii) 在SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列中添加、取代、缺失或插入1个或多个氨基酸残基的氨基酸序列,并且其保留如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的活性;或者,

(iv) 由核苷酸序列编码的氨基酸序列,所述核苷酸序列与编码如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的多核苷酸序列在严格条件下杂交,并且所述氨基酸序列保留如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的活性,所述严格条件是中等严格条件,中-高严格条件,高严格条件或非常高严格条件。

5. 一种生物材料,其中,所述生物材料包含以下的一种或多种:

(a) 分离的多核苷酸,其编码如权利要求1~4中任一项所述的融合肽;

(b) 载体,其包含(a)中所述的分离的多核苷酸;

(c) 细胞,其包含(a)中所述的分离的多核苷酸,和/或(b)中所述的载体。

6. 一种复合支架,其中,所述复合支架包括:

羟基磷灰石支架;

小细胞外囊泡;以及,

如权利要求1~4中任一项所述的融合肽;

其中,所述小细胞外囊泡通过所述融合肽连接于所述羟基磷灰石支架。

7. 根据权利要求6所述的复合支架,其中,所述羟基磷灰石支架通过3D打印获得,优选地,所述羟基磷灰石支架的孔隙率在50%-70%。

8. 根据权利要求6或7所述的复合支架,其中,所述小细胞外囊泡是来源于骨髓间充质干细胞的小细胞外囊泡,优选地,所述小细胞外囊泡表达CD63分子。

9. 一种如权利要求6~8中任一项所述的复合支架的制备方法,其中,所述制备方法包括以下步骤:

获得羟基磷灰石支架、小细胞外囊泡和融合肽的步骤;

修饰融合肽的步骤,采用含有融合肽的溶液,浸泡羟基磷灰石支架,得到融合肽修饰羟基磷灰石支架;

修饰小细胞外囊泡的步骤,将融合肽修饰羟基磷灰石支架与含有小细胞外囊泡的溶液混合,得到复合支架。

10. 如权利要求6~8中任一项所述的复合支架的在制备用于治疗骨缺损的制品中的用途。

一种融合肽、包含其的复合支架、制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明属于医用材料领域,涉及一种融合肽、包含其的复合支架、制备方法和用途,具体而言,涉及一种基于融合肽介导小细胞外囊泡靶向3D-HA的复合支架,及其制备方法和用于改善骨再生的用途。

背景技术

[0002] 医疗与健康领域的发展与计算机信息技术的进步息息相关,尤其是计算机视觉和图像处理技术极大地促进了医学影像技术的发展。基于患者的影像学检查(锥束CT(Cone Beam CT,CBCT)和磁共振成像(Magnetic Resonance Imaging,MRI),并借助于计算机辅助设计/计算机辅助制造(CAD/CAM),3D打印技术被广泛应用于医学领域。骨缺损是常见的骨疾病之一,常常利用骨植入物进行骨缺损修复。3D打印技术可以制造各种用于骨组织再生的支架,不仅可以依据患者缺损部位制造个性化支架,还可以提供三维多孔结构并维持细胞生长的空间。羟基磷灰石(Hydroxyapatite,HA)作为生物活性陶瓷的一种,具有与天然骨组织相似的成分、良好的生物相容性及骨传导性,常单独与其他生物活性材料组合用作骨缺损修复的填充材料。在此,基于挤压工艺的3D打印技术制造的3D羟基磷灰石支架(简称3D-HA支架),不仅可以模拟天然骨的孔隙大小、孔隙率和相互连通性,同时可促进细胞生长和黏附。

[0003] 骨髓间充质干细胞(Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells,BMSCs)作为骨组织工程常用的种子细胞,在成骨、成软骨和成脂分化方面发挥着重要作用。骨髓间充质干细胞来源的小细胞外囊泡(Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-small Extracellular Vesicles,BMSC-sEVs)是一类直径小于200nm的天然纳米载体,不仅具有与亲本细胞相似的特性,且具备的双层膜结构在运输过程中可保护其携带的物质(蛋白质、脂质及核酸)不被快速降解。许多研究表明,细胞外囊泡在细胞交流间发挥重要作用。BMSC-sEVs具有BMSCs相似的治疗效果,包括修复受损的组织、抑制巨噬细胞极化和促进血管生成。有人将细胞外囊泡与生物陶瓷类的支架材料组合用于大鼠临界骨缺损,在体内取得良好的成骨效果。因细胞外囊泡直接浸泡负载于支架,两者的结合极不稳定并可能产生细胞外囊泡的突释导致功能发挥欠佳。

[0004] 因此,仍有待开发新的将细胞外囊泡与生物陶瓷类的支架材料组合的方式,以提高其效果。

发明内容

[0005] 发明要解决的问题

[0006] 如前所述,羟基磷灰石作为生物陶瓷的一种,因其良好的生物相容性常用作骨填充材料,且钙磷比值赋予的骨传导性也得到了广泛认可。但羟基磷灰石无法诱导细胞分化,在骨组织工程中难以单纯用作支架材料。此外,骨髓间充质干细胞来源的细胞外囊泡具有与亲代细胞相似的治疗效果,且因其低免疫原性、无伦理争议、易于制备和修饰等优点被广

泛应用于纳米药物递送系统。然而,细胞外囊泡的结合方式包括物理吸附、电穿孔等方法易造成囊泡结构破坏或者破裂后携带物质溢出。因此,如何制备性能多样化的功能性复合支架,将羟基磷灰石与细胞外囊泡有效结合,仍是目前面临的问题。

[0007] 目前而言,在合规的使用范围中,没有一种高效的方法可将3D-HA支架与小细胞外囊泡(sEVs)结合起来,针对上述问题,本发明提供了一种融合肽,以及由融合肽介导的锚定小细胞外囊泡的3D-HA复合支架,可促进干细胞募集,调控细胞分化和增殖行为,从而加速骨愈合过程,用于骨缺损的临床治疗。

[0008] 用于解决问题的方案

[0009] [1].一种融合肽,其中,所述融合肽包括通过接头连接的羟基磷灰石结合肽和小细胞外囊泡锚定肽。

[0010] [2].根据[1]所述的融合肽,其中,所述接头为柔性肽接头;优选地,所述柔性肽接头包括(GGGGS)_n,其中n选自1,2,3,4,5或6;更优选地,所述柔性肽接头包括如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列;和/或,所述接头为刚性肽接头;优选地,所述刚性肽接头包括(EAAK)_n,其中n选自1,2,3,4,5或6;更优选地,所述刚性肽接头包括如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

[0011] [3].根据[1]或[2]所述的融合肽,其中,所述羟基磷灰石结合肽结合羟基磷灰石;优选地,所述羟基磷灰石结合肽包括如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;和/或,所述小细胞外囊泡锚定肽结合小细胞外囊泡;优选地,所述小细胞外囊泡锚定肽包括如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。

[0012] [4].根据[1]~[3]中任一项所述的融合肽,其中,所述融合肽的结构为[羟基磷灰石结合肽]-[接头]-[小细胞外囊泡锚定肽];或者,所述融合肽的结构为[小细胞外囊泡锚定肽]-[接头]-[羟基磷灰石结合肽]。

[0013] 优选地,所述融合肽包含以下序列中的一种或多种:

[0014] (i)如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列;

[0015] (ii)与SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列具有至少80%、82%、85%、87%、90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,并且其保留如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的活性;

[0016] (iii)在SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列中添加、取代、缺失或插入1个或多个氨基酸残基的氨基酸序列,并且其保留如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的活性;或者,

[0017] (iv)由核苷酸序列编码的氨基酸序列,所述核苷酸序列与编码如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的多核苷酸序列在严格条件下杂交,并且所述氨基酸序列保留如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的活性,所述严格条件是中等严格条件,中-高严格条件,高严格条件或非常高严格条件。

[0018] [5].一种生物材料,其中,所述生物材料包含以下的一种或多种:

[0019] (a)分离的多核苷酸,其编码如[1]~[4]中任一项所述的融合肽;

[0020] (b)载体,其包含(a)中所述的分离的多核苷酸;

[0021] (c)细胞,其包含(a)中所述的分离的多核苷酸,和/或(b)中所述的载体。

[0022] [6].一种复合支架,其中,所述复合支架包括:

[0023] 羟基磷灰石支架；

[0024] 小细胞外囊泡；以及，

[0025] 如[1] ~ [4]中任一项所述的融合肽；

[0026] 其中，所述小细胞外囊泡通过所述融合肽连接于所述羟基磷灰石支架。

[0027] [7].根据[6]所述的复合支架，其中，所述羟基磷灰石支架通过3D打印获得，优选地，所述羟基磷灰石支架的孔隙率在50% -70%。

[0028] [8].根据[6]或[7]所述的复合支架，其中，所述小细胞外囊泡是来源于骨髓间充质干细胞的小细胞外囊泡，优选地，所述小细胞外囊泡表达CD63分子。

[0029] [9].一种如[6] ~ [8]中任一项所述的复合支架的制备方法，其中，所述制备方法包括以下步骤：

[0030] 获得羟基磷灰石支架、小细胞外囊泡和融合肽的步骤；

[0031] 修饰融合肽的步骤，采用含有融合肽的溶液，浸泡羟基磷灰石支架，得到融合肽修饰羟基磷灰石支架；

[0032] 修饰小细胞外囊泡的步骤，将融合肽修饰羟基磷灰石支架与含有小细胞外囊泡的溶液混合，得到复合支架。

[0033] [10].如[6] ~ [8]中任一项所述的复合支架的在制备用于治疗骨缺损的制品中的用途。

[0034] 发明的效果

[0035] 在本发明的一些实施方案中，本发明提供的融合肽包括两个不同的功能域，一端是羟基磷灰石结合肽，一端是细胞外囊泡锚定肽，并借柔性/刚性接头连接。其中，羟基磷灰石结合肽可以黏附于任何含有羟基磷灰石的物质并形成牢固结合，细胞外囊泡锚定肽可以特异性识别小细胞外囊泡(大部分富集的外泌体)并与其靶向结合，从而使得可以通过本发明的融合肽靶向的小细胞外囊泡负载于羟基磷灰石支架上，将小细胞外囊泡与羟基磷灰石支架相结合，在骨缺损治疗中协同发挥功效。

[0036] 在本发明的一些实施方案中，本发明提供的融合肽高效的将羟基磷灰石支架(例如3D-HA支架)与小细胞外囊泡结合起来。

[0037] 在本发明的一些实施方案中，本发明提供的由融合肽介导小细胞外囊泡靶向3D-HA的复合支架，发挥促进细胞增殖、黏附和诱导干细胞分化的作用，从而加速骨愈合过程，用于骨缺损的临床治疗。

[0038] 在本发明的一些实施方案中，本发明提供的由融合肽介导小细胞外囊泡靶向3D-HA的复合支架具有良好的机械性能和适宜的孔径大小、孔隙率，并在细胞间传递信息，进而调节受体细胞的行为改善成骨微环境，发挥促成骨的生物功能。

[0039] 在本发明的一些实施方案中，本发明提供的由融合肽介导小细胞外囊泡靶向3D-HA的复合支架，可促进干细胞募集，调控细胞分化和增殖行为，从而加速骨愈合过程，用于骨缺损的临床治疗。

附图说明

[0040] 图1显示了两种融合肽(P1和P2)的结构预测以及小细胞外囊泡的鉴定。图1中的A显示了两种融合肽的结构；图1中的B显示纳米颗粒为典型的双层膜结构；图1中的C和D显示

大部分颗粒的粒径范围和强度分布;图1中的E显示免疫蛋白印迹检测检测证实小细胞外囊泡的标志性蛋白如Alix、CD63、CD81的结果。

[0041] 图2显示了功能化的3D HA支架的形态和理化性质。图2中的A显示各组支架的扫描电子显微镜示意图;图2中的B显示了融合肽介导的sEVs负载于支架后,HA支架的理化性质;图2中的C显示了各组支架在体外的体重变化;图2中的D显示了各组支架的孔隙率;图2中的E显示了各组支架的压缩强度。

[0042] 图3显示了细胞摄取sEVs的行为并对各组复合支架释放sEVs进行观察的结果。图3中的A为sEVs和多肽负载于支架的结果示意图;图3中的B为各组支架与sEVs浸泡后的上清液浓度的结果示意图;图3中的C显示各组支架随时间变化负载sEVs的示意图;图3中的D为sEVs被细胞内吞的结果示意图。

[0043] 图4显示了复合支架对培养细胞的生物学行为的影响。图4中的A显示了复合支架在与细胞共培养,细胞的活力和增殖状态结果图;图4中的B显示了各组支架对细胞迁移的影响。图4中的C显示了各组支架对细胞活力的影响。图4中的D为(a) 3D HA支架;(b) 3D H-sEVs支架;(c) 3D H-P1-sEVs支架;(d) 3D H-P2-sEVs对细胞黏附和增殖的影响的示意图;图4中的E显示各组支架的细胞形态。

[0044] 图5显示了功能化复合支架对细胞体外成骨分化的影响。图5中的A和图5中的B显示各组支架在与细胞培养7和14天时ALP的表达水平以及ALP活性的量化分析;图5中的C和图5中的D显示茜素红染色中各组支架产生的钙结节数量;图5中的E和图5中的F显示各组支架与细胞培养后,收集细胞提取蛋白进行蛋白免疫印迹分析的结果;图5中的G为实时聚合酶链式反应(qPCR)分析结果。

[0045] 图6显示了复合支架植入老鼠颅骨临界骨缺损模型3个月后体内骨形成情况。图6中的A显示植入后3个月的骨形成情况的三维重建;图6中的B示出了缺损骨体积分数定量分析(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$);图6中的C显示在HE染色和Masson染色结果;图6中的D显示免疫组化染色结果。在图6中,M:材料;F纤维结缔组织;NB:新生骨组织。

[0046] 图7显示了3D打印羟基磷灰石复合支架的制备及植入大鼠颅骨临界骨缺损模型3个月内骨发生的示意图。

具体实施方式

[0047] 以下将详细说明本发明的各种示例性实施例、特征和方面。在这里专用的词“示例性”意为“用作例子、实施例或说明性”。这里作为“示例性”所说明的任何实施例不必解释为优于或好于其它实施例。

[0048] 另外,为了更好地说明本发明,在下文的具体实施方式中给出了众多的具体细节。本领域技术人员应当理解,没有某些具体细节,本发明同样可以实施。在另外一些实例中,对于本领域技术人员熟知的方法、手段、器材和步骤未作详细描述,以便于凸显本发明的主旨。

[0049] 如无特殊声明,本说明书中所使用的单位均为国际标准单位,并且本发明中出现的数值,数值范围,均应当理解为包含了工业生产中所不可避免的系统性误差。

[0050] 本说明书中,使用“可以”表示的含义包括了进行某种处理以及不进行某种处理两方面的含义。

[0051] 本说明书中,所提及的“一些具体/优选的实施方案”、“另一些具体/优选的实施方案”、“实施方案”等是指所描述的与该实施方案有关的特定要素(例如,特征、结构、性质和/或特性)包括在此处所述的至少一种实施方案中,并且可存在于其它实施方案中或者可不存在于其它实施方案中。另外,应理解,所述要素可以任何合适的方式组合在各种实施方案中。

[0052] 本说明书中,使用“数值A~数值B”表示的数值范围是指包含端点数值A、B的范围。

[0053] 本说明书中,使用“常温”、“室温”时,其温度可以是10-40℃。

[0054] 根据本公开,术语“多肽”、“蛋白质”、“肽”在本文中可互换的使用,指任何长度的氨基酸的聚合形态,可包括编码的和非编码的氨基酸,化学或生物化学修饰的或衍生的氨基酸,和具有相似的肽骨架的多肽。

[0055] 根据本公开,“融合肽”、“融合多肽”是指包含来自至少两种不同蛋白质的蛋白质结构域的杂化多肽。本文提供的任何蛋白质/多肽可通过本领域已知的任何方法产生。例如,本文提供的多肽可经由重组蛋白质表达和纯化来产生,这尤其适合于包含肽接头的融合蛋白。用于重组蛋白质表达和纯化的方法是公知的,并且包括以下中所述的那些:Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012)), 其全部内容通过引用并入本文。

[0056] 根据本公开,术语“氨基酸”可以包括天然氨基酸、非天然氨基酸、氨基酸类似物以及所有它们的D和L立体异构体。根据本公开,所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 *J. biol. chem.*, 243, p3558 (1968) 中所述。本公开中氨基酸及缩写和英文简称如下所示:组氨酸(His, H);丝氨酸(Ser, S);谷氨酸(Glu, E);谷氨酰胺(Gln, Q);甘氨酸(Gly, G);苏氨酸(Thr, T);苯丙氨酸(Phe, F);天冬氨酸(Asp, D);酪氨酸(Tyr, Y);亮氨酸(Leu, L);异亮氨酸(Ile, I);精氨酸(Arg, R);丙氨酸(Ala, A);缬氨酸(Val, V);色氨酸(Trp, W);甲硫氨酸(Met, M);天冬酰胺(Asn, N);半胱氨酸(Cys, C);赖氨酸(Lys, K);脯氨酸(Pro, P)。

[0057] 根据本公开,氨基酸“添加”指在氨基酸序列的C端或N端添加氨基酸。根据本公开,氨基酸“缺失”指可以从氨基酸序列中删除1、2或3个以上氨基酸。根据本公开,氨基酸“插入”指在氨基酸序列中的适当位置插入氨基酸残基,插入的氨基酸残基也可以全部或部分彼此相邻,或插入的氨基酸之间都不彼此相邻。根据本公开,氨基酸“取代”指在氨基酸序列中的某个位置的某个氨基酸残基被其他氨基酸残基替代;其中,“取代”可以是保守氨基酸取代。

[0058] 根据本公开,“保守修饰”、“保守取代”或“保守置换”是指具有类似特征(例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等)的其它氨基酸置换蛋白中的氨基酸,使得可频繁进行改变而不改变蛋白的生物学活性。本领域技术人员知晓,一般而言,多肽的非必需区域中的单个氨基酸置换基本上不改变生物学活性(参见例如Watson等(1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., 第224页, (第4版))。另外,结构或功能类似的氨基酸的置换不大可能破坏生物学活性。示例性保守取代于以下“示例性氨基酸保守取代”中陈述。

[0059] 示例性氨基酸保守取代

[0060]	原始残基	保守取代
	Ala (A)	Gly; Ser

Arg (R)	Lys;His
Asn (N)	Gln;His;Asp
Asp (D)	Glu;Asn
Cys (C)	Ser;Ala;Val
Gln (Q)	Asn;Glu
Glu (E)	Asp;Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn;Gln
Ile (I)	Leu;Val
Leu (L)	Ile;Val
Lys (K)	Arg;His
Met (M)	Leu;Ile;Tyr
Phe (F)	Tyr;Met;Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr;Phe
Tyr (Y)	Trp;Phe
Val (V)	Ile;Leu

[0061] 根据本公开,“中等至非常高等严格条件”包括“中等严格条件”,“中-高严格条件”,“高严格条件”或“非常高严格条件”,其描述了核酸杂交和洗涤的条件。进行杂交反应的指导参见Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,N.Y.(1989),6.3.1-6.3.6,其通过引用并入本文。在该文献中描述了含水的和非含水的方法,且可以使用任一种。例如,具体的杂交条件如下:(1)低严格性杂交条件在 $6\times$ 氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中,在约 45°C ,然后在至少 50°C ,在 $0.2\times$ SSC, 0.1% SDS中洗涤2次(对于低严格性条件,可以将洗涤温度升高到 55°C);(2)中等严格性杂交条件在 $6\times$ SSC,在约 45°C ,然后在 60°C ,在 $0.2\times$ SSC, 0.1% SDS中洗涤1次或多次;(3)高严格性杂交条件在 $6\times$ SSC,在约 45°C ,然后在 65°C ,在 $0.2\times$ SSC, 0.1% SDS中洗涤1次或多次且优选;(4)非常高的严格性杂交条件是 0.5M 磷酸钠, 7% SDS,在 65°C ,然后在 65°C ,在 $0.2\times$ SSC, 1% SDS中洗涤1次或多次。

[0062] 如本文所用,术语“接头”可指共价接头(例如,共价键)、非共价接头、化学基团或连接两个分子或部分的分子,例如,融合肽的两个结构域,如羟基磷灰石结合肽和小细胞外囊泡锚定肽。

[0063] 在一些实施方案中,接头可以是一个氨基酸或多个氨基酸(例如,肽或蛋白质),称为肽接头。在一些实施方案中,所述接头的长度可为约5至100个氨基酸,例如约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、20至30、30至40、40至50、50至60、60至70、70至80、80至90或90至100个氨基酸的长度。在一些实施方案中,接头的长度可为约100至150、150至200、200至250、250至300、300至350、350至400、400至450或450至500个氨基酸。也可以考虑更长或更短的接头。

[0064] 根据本公开,“同一性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似

性。当两个比较序列中的位置均被相同碱基或氨基酸单体亚基占据时,例如如果两个DNA分子的每一个位置都被腺嘌呤占据时,那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同一性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数 $\times 100\%$ 的函数。例如,在序列最佳比对时,如果两个序列中的10个位置有6个匹配或同源,那么两个序列为60%同源。一般而言,当比对两个序列而得到最大的同一性百分率时进行比较。

[0065] <融合肽>

[0066] 本发明的一些方面提供了一种融合肽,其包括通过接头连接的羟基磷灰石结合肽和小细胞外囊泡锚定肽。

[0067] 在一些实施方案中,所述羟基磷灰石结合肽的N端和/或C端通过接头与所述小细胞外囊泡锚定肽连接。

[0068] 在一些具体的实施方案中,所述融合肽的结构(从N端至C端)为:

[0069] [羟基磷灰石结合肽]-[接头]-[小细胞外囊泡锚定肽]。

[0070] 在另一些具体的实施方案中,所述融合肽的结构(从N端至C端)为:

[0071] [小细胞外囊泡锚定肽]-[接头]-[羟基磷灰石结合肽]。

[0072] 本发明提供的融合肽包括两个不同的功能域,一端是羟基磷灰石结合肽,一端是细胞外囊泡锚定肽,并借柔性/刚性接头连接。其中,羟基磷灰石结合肽可以黏附于任何含有羟基磷灰石的物质并形成牢固结合,细胞外囊泡锚定肽可以特异性识别小细胞外囊泡(大部分富集的外泌体)并与之靶向结合,尤其是小细胞外囊泡的标志蛋白CD63,从而可以通过本发明的融合肽靶向的小细胞外囊泡负载于羟基磷灰石支架上,将小细胞外囊泡与羟基磷灰石支架相结合,在骨缺损治疗中协同发挥功效。

[0073] (接头)

[0074] 在一些实施方案中,所述接头的氨基酸是不具有除连接以外的额外功能(例如蛋白定位、酶切位点等)的无意义多肽。

[0075] 在一些实施方案中,所述接头为柔性肽接头。

[0076] 在一些实施方案中,所述接头的氨基酸序列选自Gly、Ser、Pro、Ala以及Glu中的一种或多种。

[0077] 在一些实施方式中,所述接头的氨基酸序列选自(GGGGS) n 、(GGGS) n 、(GGS) n 、(GS) n 或(G) n ,其中 n 选自1,2,3,4,5或6。

[0078] 在一些具体的实施方案中,所述柔性肽接头的序列包括(GGGGS) n ,其中 n 选自1,2,3,4,5或6。在一些更具体的实施方案中,所述柔性肽接头的序列包括(GGGGS) n ,其中 $n=3$,即,所述柔性肽接头的序列包括GGGGSGGGSGGGGS(如SEQ ID NO:1所示)。

[0079] 在另外的实施方案中,接头是刚性肽接头;即相对非柔性的肽接头。刚性肽接头不要求完全缺乏柔性,而是比柔性肽接头如富甘氨酸肽接头柔性少。由于其相对缺乏柔性,刚性肽接头降低通过刚性肽接头连接在一起的两个蛋白/多肽结构域的运动,提供有序链(例如 α 螺旋结构)的肽接头可提供刚性肽接头。例如,精氨酸、亮氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺和甲硫氨酸都显示出相对高的螺旋接头结构倾向。然而,包含许多脯氨酸残基的非螺旋接头也可表现显著的刚性。刚性肽接头的进一步描述由Wriggers等,Biopolymers,80,第736-46页(2005)提供。此外,刚性肽接头在由George等,Protein Engineering,15,第871-79页(2003)描述的接头数据库中描述。

[0080] 在一些具体的实施方案中,所述刚性肽接头的序列包括(EAAAK)_n,其中n选自1,2,3,4,5或6。在一些更具体的实施方案中,所述刚性肽接头的序列包括(EAAAK)_n,其中n=4,即,所述刚性肽接头的序列包括EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK(如SEQ ID NO:2所示)。

[0081] (羟基磷灰石结合肽)

[0082] 在本发明中,可以使用本领域已知的可以结合羟基磷灰石的羟基磷灰石结合肽,例如DDDDDD(简称Asp6;SEQ ID NO:7)、SVSVGMPKSPRP(SEQ ID NO:8)、EEEEEEE(简称为E7;SEQ ID NO:3)。

[0083] 在一些优选的实施方案中,所述羟基磷灰石结合肽的氨基酸序列包含EEEEEEE(如SEQ ID NO:3所示)。在本说明书中,如SEQ ID NO:3所示的羟基磷灰石结合肽简称为E7,E7(EEEEEEE)可以黏附于任何含有羟基磷灰石的物质并形成牢固结合。

[0084] (小细胞外囊泡锚定肽)

[0085] 在本发明中,可以使用本领域已知的可以结合小细胞外囊泡的小细胞外囊泡锚定肽。在一些优选的实施方案中,所述小细胞外囊泡锚定肽特异性结合小细胞外囊泡的标志蛋白CD63。

[0086] 在一些优选的实施方案中,所述小细胞外囊泡锚定肽的氨基酸序列包含CRHSQMTVTSRL(如SEQ ID NO:4所示)。在本说明书中,如SEQ ID NO:4所示的小细胞外囊泡锚定肽简称为CP05,CP05(CRHSQMTVTSRL)可以特异性识别小细胞外囊泡(大部分富集的外泌体)的标志蛋白CD63并与其靶向结合。

[0087] 在一些具体的实施方案中,融合肽包括两个不同的功能域,一端是羟基磷灰石结合肽(E7),一端是细胞外囊泡锚定肽(CP05),并借柔性/刚性接头连接。E7(EEEEEEE)可以黏附于任何含有羟基磷灰石的物质并形成牢固结合;CP05(CRHSQMTVTSRL)可以特异性识别小细胞外囊泡(大部分富集的外泌体)的标志蛋白CD63并与其靶向结合。因此,凭借融合肽靶向的细胞外囊泡负载于3D-HA支架上,一方面发挥支架维持细胞三维生长空间的优势,另一方面靶向募集更多的sEVs发挥其诱导干细胞增殖、分化的特性。

[0088] 在一些更具体的实施方案中,融合肽包含以下序列中的一种或多种:

[0089] (i) 如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列;

[0090] (ii) 与SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列具有至少80%、82%、85%、87%、90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,并且其保留如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的活性;

[0091] (iii) 在SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列中添加、取代、缺失或插入1个或多个氨基酸残基的氨基酸序列,并且其保留如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的活性;或者,

[0092] (iv) 由核苷酸序列编码的氨基酸序列,所述核苷酸序列与编码如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的多核苷酸序列在严格条件下杂交,并且所述氨基酸序列保留如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的活性,所述严格条件是中等严格条件,中-高严格条件,高严格条件或非常高严格条件。

[0093] 在一些实施方案中,融合肽P1(E7-GGGGS-CP05)的氨基酸序列为(SEQ ID NO:5):

[0094] EEEEEEGGGSGGGSGGGGSCRHSQMTVTSRL

[0095] 在一些实施方案中,融合肽P2(E7-EAAAK-CP05)的氨基酸序列为(SEQ ID NO:6):

[0096] EEEEEEEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKCRHSQMTVTSRL

[0097] <生物材料(多核苷酸、载体、细胞)>

[0098] (多核苷酸)

[0099] 本发明的一些方面提供了一种分离的多核苷酸,其编码上述的融合肽。

[0100] 在一些实施方案中,编码的融合肽的核苷酸列是密码子优化的。这种类型的优化可能需要编码融合肽的核苷酸序列的突变以模拟预期的宿主生物体或细胞的密码子偏好同时编码相同蛋白质。

[0101] (载体)

[0102] 本发明的一些方面提供了一种载体,其包含上述的多核苷酸。

[0103] 在一些实施方案中,所述载体为表达载体,更具体为重组表达载体。适合的表达载体包括病毒表达载体(例如,基于以下病毒的病毒载体、牛痘病毒、脊髓灰质炎病毒、腺病毒、腺相关病毒、SV40、单纯疱疹病毒、人类免疫缺陷病毒、逆转录病毒载体(例如,鼠白血病病毒、脾坏死病毒和源自诸如劳斯肉瘤病毒、哈维肉瘤病毒的逆转录病毒的载体、禽白血病病毒、慢病毒、人类免疫缺陷病毒、骨髓增生肉瘤病毒以及乳腺肿瘤病毒)等。

[0104] 根据所用的宿主/载体系统,可在表达载体中使用许多合适的转录和翻译控制元件中的任一种,包括组成型启动子和诱导型启动子、转录增强子元件、转录终止子等。

[0105] 将核酸引入宿主细胞中的方法是本领域已知的,并且可使用任何方便的方法来将核酸(例如,表达构建体)引入细胞中。合适的方法包括例如病毒感染、转染、脂质体转染、电穿孔、磷酸钙沉淀、聚乙烯亚胺(PEI)介导的转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质体介导的转染、粒子枪技术、磷酸钙沉淀、直接微注射、纳米颗粒介导的核酸递送等。

[0106] (细胞)

[0107] 本发明的一些方面提供了一种细胞,其包含以下的一种或多种:

[0108] (a) 上述的多核苷酸;和,

[0109] (b) 上述的载体。

[0110] 所述细胞可以是多种细胞中的任一种,包括例如体外细胞、体内细胞、离体细胞、原代细胞、癌细胞、动物细胞、植物细胞、藻类细胞、真菌细胞等。

[0111] 在一些具体的实施方案中,细胞的非限制性实例包括:原核细胞、真核细胞、细菌细胞、古细菌细胞、单细胞真核生物体的细胞、原生动物细胞、来自植物的细胞、藻类细胞、真菌细胞、动物细胞、来自无脊椎动物的细胞、来自脊椎动物的细胞、来自哺乳动物(例如,有蹄类动物;啮齿动物;非人灵长类动物;人类;猫科动物;犬等)的细胞等。在一些情况下,细胞是不来源于天然生物体的细胞(例如,细胞可以是合成的细胞;也称为人造细胞)。

[0112] <复合支架>

[0113] 本发明的一些方面提供了一种复合支架,所述复合支架包括:

[0114] 羟基磷灰石支架;

[0115] 小细胞外囊泡;以及,

[0116] 前文所述的融合肽;其中,

[0117] 所述小细胞外囊泡通过所述融合肽连接于所述羟基磷灰石支架。

[0118] 在复合支架中,融合肽中的羟基磷灰石结合肽与羟基磷灰石支架连接,融合肽中的小细胞外囊泡锚定肽与小细胞外囊泡连接(特异性结合),从而形成复合支架,也即经融

合肽介导小细胞外囊泡功能化的3D-HA复合支架。

[0119] 针对生物陶瓷与细胞外囊泡组合在骨组织工程领域的应用不足,本发明的提供了所述复合支架,其是具有提高成骨能力的3D-HA支架与细胞外囊泡高效结合的多肽体系。利用融合肽(示例性地,羟基磷灰石结合肽(E7)、柔性linker(GGGGS)/刚性linker(EAAAK)以及小细胞外囊泡锚定肽(CP05)所形成的融合肽)构建多肽体系(H-P-sEVs,其中H表示羟基磷灰石,P表示融合肽,sEVs表示小细胞外囊泡),并借此形成融合肽介导小细胞外囊泡功能化的3D-HA复合支架,即功能化的3D H-P-sEVs复合支架。使其具有良好的机械性能和适宜的孔径大小、孔隙率,并在细胞间传递信息,进而调节受体细胞的行为改善成骨微环境,发挥促成骨的生物功能。

[0120] (羟基磷灰石支架)

[0121] 在本发明中,对于羟基磷灰石支架的尺寸没有特别的限制,可以根据待治疗骨缺损的骨植入物的尺寸进行设置。

[0122] 在本发明中,羟基磷灰石支架可以根据本领域已知的方法制备,例如通过生物3D打印机(如Bio-**Architect**®WS生物3D打印机)3D打印获得。

[0123] 在一些实施方案中,羟基磷灰石支架的孔隙率在50%-70%,例如:55%、60%或70%等。在该孔隙率下,一方面发挥支架维持细胞三维生长空间的优势,另一方面,有利于充分通过融合肽结合小细胞外囊泡,靶向募集更多的小细胞外囊泡发挥其诱导干细胞增殖、分化的特性。

[0124] (小细胞外囊泡)

[0125] 在一些实施方案中,小细胞外囊泡是来源于骨髓间充质干细胞(Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, BMSCs)的小细胞外囊泡,其可促进干细胞募集,调控细胞分化和增殖行为,从而加速骨愈合过程,用于骨缺损的临床治疗。

[0126] 在一些具体的实施方案中,小细胞外囊泡表达CD63分子。

[0127] 在本发明中,细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)是一种由活细胞释放的纳米级囊泡,含有丰富的蛋白质,miRNA和脂质等生物大分子物质,是生物标志物的理想来源。根据EVs的生物产生过程、大小以及生理特性等进行进一步分类,如微囊泡(microvesicles, MVs)和外泌体。MVs来自于质膜的“出芽”,直接从细胞脱落,直径在100-1000nm不等。外泌体是由细胞膜两次内陷形成,并且在细胞内经过复杂的物质交换,由细胞分拣后释放到细胞外,直径位于30-150nm之间,具有较高的生物研究价值。差速超速离心法是收集外泌体的金标准,通过差速超速离心法可以分离到直径位于40-160nm的小粒径EVs (small EVs, sEVs),其主要成分为外泌体,由于难以直接证明传统差速离心方法分离的小粒径EVs为完全纯化的外泌体,建议使用sEVs的命名,因此本发明的一些实施方案中,使用sEVs命名差速超速离心所得产物。

[0128] 在一些示例性的实施方案中,根据文献(例如,Gao X,Ran N,Dong X,Zuo B,Yang R,Zhou Q,Moulton HM,Seow Y,Yin H.Anchor peptide captures,targets,and loads exosomes of diverse origins for diagnostics and therapy.Sci Transl Med.2018Jun 6;10(444):eaat0195)的记载获得小细胞外囊泡。

[0129] 在一些示例性的实施方案中,可以根据以下方法获得小细胞外囊泡:在4℃条件下依次离心800g×30min,2000g×30min,12000g×1h以去除细胞碎片;然后上清用0.22μm的

过滤器过滤后,100000g离心90min得到沉淀物。最后,加入无菌磷酸盐缓冲液100000g离心冲洗90min得到细胞外囊泡。

[0130] <复合支架的制备方法>

[0131] 本发明的一些方面提供了上述复合支架的制备方法,其包括以下步骤:

[0132] 获得羟基磷灰石支架、小细胞外囊泡和融合肽的步骤;

[0133] 修饰融合肽的步骤,采用含有融合肽的溶液,浸泡羟基磷灰石支架,得到融合肽修饰羟基磷灰石支架;

[0134] 修饰小细胞外囊泡的步骤,将融合肽修饰羟基磷灰石支架与含有小细胞外囊泡的溶液混合,得到复合支架。

[0135] 在一些实施方案中,在修饰融合肽的步骤中,所述融合肽的溶液中,融合肽的浓度在20~100 $\mu\text{mol/L}$,优选40~80 $\mu\text{mol/L}$,例如40 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 或60 $\mu\text{mol/L}$ 等。

[0136] 在一些实施方案中,在修饰融合肽的步骤中,采用含有融合肽的溶液,在1~10 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,优选2~8 $^{\circ}\text{C}$,例如2 $^{\circ}\text{C}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 或6 $^{\circ}\text{C}$ 等,浸泡羟基磷灰石支架。浸泡时间在12~36h,优选18~30h,例如18h、24h或30h等。

[0137] 在上述温度和时间、以及融合肽浓度等条件下,融合肽可以更有效地与羟基磷灰石支架结合,并有利于后续进一步与小细胞外囊泡结合。

[0138] 在一些实施方案中,在修饰小细胞外囊泡的步骤中,含有小细胞外囊泡的溶液中,小细胞外囊泡的浓度在0.1~5mg/mL,优选0.5~3mg/mL,例如0.8mg/mL、1mg/mL或1.5mg/mL等。在上述的小细胞外囊泡的浓度下,有利于小细胞外囊泡与融合肽修饰羟基磷灰石支架结合,并发挥促进干细胞募集,调控细胞分化和增殖行为,加速骨愈合过程等功能。

[0139] 在一些示例性的实施方案中,复合支架的制备方法,包括以下步骤:融合肽制成浓度60 $\mu\text{mol/L}$ 的多肽溶液;羟基磷灰石支架在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下完全浸泡于多肽溶液24h,得到融合肽修饰的羟基磷灰石支架;将融合肽修饰的羟基磷灰石支架与1mg/mL小细胞外囊泡溶液混合后得到功能化的复合支架。

[0140] <用途>

[0141] 本发明的一些方面提供了一种上述复合支架在制备用于治疗骨缺损的制品中的用途。

[0142] 在一些具体的实施方案中,所述用于治疗骨缺损的制品是用于骨缺损修复的骨植入物,也即骨缺损修复的填充材料。

[0143] 本发明的复合支架凭借融合肽靶向的细胞外囊泡负载于3D-HA支架上,一方面发挥支架维持细胞三维生长空间的优势,另一方面靶向募集更多的sEVs发挥其诱导细胞增殖、分化的特性。本发明的复合支架具有良好的机械性能和适宜的孔径大小、孔隙率,并在细胞间传递信息,进而调节受体细胞的行为改善成骨微环境,发挥促成骨的生物功能,可促进干细胞募集,调控细胞分化和增殖行为,从而加速骨愈合过程,用于骨缺损的临床治疗。

[0144] 实施例

[0145] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0146] 实施例1:小细胞外囊泡(sEVs)的获取

[0147] 采用差速离心法制备小细胞外囊泡(即外泌体)。首先,购自于武汉普诺赛生命科技有限公司的大鼠骨髓间充质干细胞(BMSC,货号:CP-R131)使用添加DMEM、10%胎牛血清和1%青/链霉素的完全培养基,在37℃、5%CO₂温箱中进行细胞培养,当细胞达到80-85%汇合时,在培养基中用无外泌体的血清代替胎牛血清,以保持培养48小时。收集BMSCs的上清液并保存在-80℃冰箱备用。

[0148] 收集细胞培养上清液离心^[1]:在4℃条件下依次离心800g×30min,2000g×30min,12000g×1h以去除细胞碎片;然后上清用0.22μm的过滤器过滤后,100000g离心90min得到沉淀物。最后,加入无菌磷酸盐缓冲液100000g离心冲洗90min得到细胞外囊泡。

[0149] [1]Gao X,Ran N,Dong X,Zuo B,Yang R,Zhou Q,Moulton HM,Seow Y,Yin H.Anchor peptide captures,targets,and loads exosomes of diverse origins for diagnostics and therapy.Sci Transl Med.2018Jun 6;10(444):eaat0195.

[0150] 实施例2:3D HA支架的制备

[0151] 委托杭州捷诺飞生物科技股份有限公司使用生物3D打印机(Bio-Architect®WS)制作3D打印支架,尺寸为直径8mm,高度2.5mm的圆柱体。具体打印参数如下:针头0.41mm,层高0.33mm,打印间距0.78mm,喷头温度-室温,平台温度-室温,气压0.3MPa,速度10mm/s。支架打印结束后用5% CaCl₂交联10s,交联后室温条件下风干48h。孔隙率要求在50%-70%之间,机械强度需要根据成品进行测定。

[0152] 实施例3:融合肽的制备

[0153] 融合肽P1(E7-GGGGS-CP05)氨基酸序列:EEEEEEEGGGGSGGGGSGGGGSCRHSQMTVTSRL

[0154] 融合肽P2(E7-EAAAK-CP05)氨基酸序列:EEEEEEEA AAKEAAAKEAAAKEAAAKCRHSQMTVTSRL

[0155] 委托江苏申琅生物科技有限公司合成,利用Fmoc多肽合成法合成。

[0156] 实施例4:经融合肽介导小细胞外囊泡功能化的3D-HA复合支架的制备

[0157] 通过混合实施例2中制备的3D HA支架、实施例1中获得的sEVs、实施例3中获得的融合肽P1或P2溶液得到3D H-P-sEVs复合支架(简称:3D H-P-sEVs复合支架/支架或H-P-sEV复合支架/支架)。

[0158] 具体而言,3D H-P-sEVs复合支架的制备包括以下步骤:

[0159] 首先,将实施例3中合成的融合肽P1(E7-GGGGS-CP05)和P2(E7-EAAAK-CP05)分别制成浓度60μmol/L的多肽溶液;然后将实施例2中制备的单个3D-HA支架在4℃条件下完全浸泡于多肽溶液24h,得到融合肽修饰的3D-HA支架;最后,将融合肽修饰的3D-HA支架与1mg/mL sEVs溶液混合后得到功能化的3D H-P-sEVs复合支架/支架。

[0160] 对比例:未采用融合肽介导小细胞外囊泡功能化的3D-HA复合支架(H-sEVs)的制备

[0161] 将实施例2中制备的单个3D-HA支架,与1mg/mL sEVs溶液混合后得到sEVs功能化的3D-HA复合支架,简称H-sEVs复合支架/支架,或3D H-sEVs复合支架/支架。

[0162] 性能测试

[0163] 1、融合肽和小细胞外囊泡的表征

[0164] 通过PSIPRED软件根据氨基酸序列预测了两条融合肽的二级结构,同时借助

trRosetta软件得到相应的PDB文件并通过VMD软件分析预测两条融合肽的三维结构。

[0165] 透射电子显微镜(TEM)观察实施例1中离心所得沉淀物的形态。具体操作步骤如下:在室温下将25 μ L样品滴到碳涂层铜网格上2分钟,然后用滤纸吸去多余的液体。然后将磷钨酸溶液滴到铜网上2分钟进行负染,随后在灯下干燥10min后上机观察。

[0166] 纳米粒径分析(NTA)技术检测实施例1中所得沉淀物的粒径大小和范围,每个样本重复测量三次。

[0167] 利用免疫蛋白印迹技术检测实施例1中所得沉淀物是否表达sEVs标志性蛋白CD63、CD81、CD9和Alix。首先将提取好的sEVs溶液和细胞裂解液进行蛋白定量和变性,然后进行电泳、转膜、封闭、抗体孵育,最后在显影剂的作用下条带显色。

[0168] 图1显示了两种融合肽(P1和P2)的结构预测以及小细胞外囊泡的鉴定。图1中的A显示了两种融合肽的均具有明显的 α 螺旋结构,融合肽P1中E7和CP05由活动度明显的转角和卷曲结构连接;在融合肽P2中则是由刚性的 α 螺旋连接,这表明了P2较P1具备更大的刚性,易保持两端功能域的完整性。图1中的B显示利用透射电子显微镜观察离心得到sEVs的形态,呈圆形或杯状的双层膜结构;图1中的C和D显示纳米粒径分析技术检测sEVs的粒径大小和分布,直径在50-200nm;图1中的E显示免疫蛋白印记实验检测sEVs表面标志性蛋白,与细胞裂解液相比,只检测到CD63、CD81、CD9和Alix,未检测到细胞色素C。以上结果证明离心得到的沉淀物实为小细胞外囊泡。

[0169] 2、复合支架的理化性质

[0170] 实验分组:空白对照(Cont)组、HA组、H-sEVs组、H-P1-sEVs组、H-P2-sEVs组。其中HA表示单纯3D-HA支架(实施例2中制备),H-sEVs表示通过含sEVs的溶液完全浸泡得到的负载sEVs的3D-HA支架(对比例中制备),H-P1-sEVs表示经融合肽P1介导小细胞外囊泡功能化的3D-HA复合支架(实施例4中制备),H-P2-sEVs表示经融合肽P2介导小细胞外囊泡功能化的3D-HA复合支架(实施例4中制备)。

[0171] 扫描电子显微镜(SEM)观察各组支架的形貌;X射线衍射(XRD)分析观察经融合肽和sEVs修饰是否改变支架的理化性质;并在体外PBS溶液中观察各组支架的重量损失,在每个时间点取出支架干燥并称量;并通过水置换法、万能试验机测量支架的孔隙率和压缩强度。

[0172] 图2展示了功能化的3D HA支架的形态和理化性质。图2中的A显示扫描电子显微镜下各组支架表面光滑,高倍镜下可见纳米颗粒状突起。图2中的B显示XRD分析各组支架都有典型的HA衍射峰,经过融合肽介导的sEVs负载于支架后,并不会改变HA支架的理化性质。图2中的C显示复合支架在体外经过3个月降解率可高达12%,图2中的D显示各组支架的孔隙率维持在52%左右,图2中的E显示压缩强度可达1.8MPa。以上支架的物理表征可见实施例4中制备的3D H-P-sEVs复合支架是能够满足骨组织工程的使用需求。

[0173] 3、细胞摄取实验和sEVs释放实验

[0174] 用DiR染料标记sEVs,将其与骨髓间充质干细胞在爬片上共同培养,并在不同的时间点观察细胞摄取sEVs的行为。爬片上的细胞用4%多聚甲醛固定,细胞核染色,在共聚焦激光显微镜下观察拍照。

[0175] 采用实施例4类似的方法制备H-sEVs组、H-P1-sEVs组、H-P2-sEVs组支架时,将sEVs替换为DiR染料标记的sEVs,在不同时间点观察各组支架上存留的sEVs。

[0176] 图3显示了细胞摄取sEVs的行为并对各组复合支架释放sEVs进行观察结果。图3中的A显示了DiR标记的sEVs、rhodamine B标记的P1和FITC标记的P2的荧光,H-P2-sEVs支架上sEVs明显较多。图3中的B显示了H-sEVs、H-P1-sEVs和H-P2-sEVs支架负载sEVs后溶液中剩余sEVs的量。图3中的C显示了H-sEVs、H-P1-sEVs和H-P2-sEVs支架上保留的sEVs,在第7天各组支架上仍然存在部分sEVs,H-P2-sEVs组数量更多一些。图3中的D显示了DiR标记的sEVs,随着培养时间的延长,越来越多的sEVs被细胞内吞,荧光强度也越高。

[0177] 4、功能化复合支架对细胞活力、形态和行为的影响

[0178] 将各组支架铺于24孔板中,以 1×10^5 个/孔的密度接种生长状态良好的BMSCs细胞;

[0179] 细胞活性检测:将各组支架浸提液与细胞培养1、3d后进行AO/EB染色,荧光显微镜下随机选取5个视野观察存活细胞数量;

[0180] 细胞迁移能力检测:培养1、3d后利用Transwell实验观察各组支架对细胞迁移能力的影响。

[0181] 细胞增殖能力检测:培养1、3、5、7d后采用CCK-8法检测材料对细胞增殖能力的影响。

[0182] 细胞形态观察:细胞培养1d后,4%多聚甲醛固定,梯度酒精脱水,SEM观察细胞形态。

[0183] 细胞骨架观察:细胞培养1、3d后,4%多聚甲醛固定细胞30min后用0.1% TritonX-100渗透5min。鬼笔环肽染料染肌动蛋白,DAPI染细胞核,最后在激光共聚焦显微镜下观察细胞形态。

[0184] 图4展示了复合支架对培养细胞的生物学行为的影响。图4中的A显示了复合支架在与细胞共培养1和3天后,相较于空白对照组,各组支架的细胞都有明显活力和增殖状态,且第3天时H-P2-sEVs支架组细胞增殖状态更加明显。图4中的B显示了各组支架对细胞迁移的影响,相较于空白对照组,H-P1-sEVs和H-P2sEVs支架组细胞迁移数量更多。图4中的C显示了各组支架对细胞活力无明显影响。图4中的D中(a)3D HA支架(HA);(b)3D H-sEVs支架(H-sEVs);(c)3D H-P1-sEVs支架(H-P1-sEVs);(d)3D H-P2-sEVs(H-P1-sEVs)支架都有明显的细胞黏附,细胞伪足明显。图4中的E显示各组支架的细胞形态没有差异,不过相较于空白对照组,H-P2-sEVs支架细胞伸展形态最佳,肌动蛋白丝明显。以上结果说明了制备的功能化复合支架具有良好的生物相容性,对细胞没有明显的毒性,且刚性肽接头的融合肽明显比柔性肽接头的融合肽具备更好的活性。

[0185] 5、功能化复合支架对细胞成骨能力的影响

[0186] ALP染色:培养BMSCs 7d和14d后进行碱性磷酸酶染色并观察拍照,并进行ALP活性定量分析。

[0187] 茜素红染色:培养BMSCs 14d和21d后进行茜素红染色并观察拍照,并进行钙结节定量分析。

[0188] Western blot:取细胞裂解上清液并测定样品蛋白含量,行凝胶电泳,转膜,室温封闭1h。一抗4℃孵育过夜,再与二抗在室温下孵育1h,显色后照相并分析RUNX2、ALP、OPN、BMP-2的蛋白表达水平。

[0189] RT-PCR:Trizol法提取总RNA,逆转录为cDNA.qRT-PCR技术检测RUNX2、ALP、OPN、

BMP-2的基因表达水平。

[0190] 图5展示了功能化复合支架对细胞体外成骨分化的影响。图5中的A和B显示各组支架在与细胞培养7和14天时ALP的表达水平以及ALP活性的量化分析。相较于空白对照组和单纯HA支架,负载了sEVs的支架明显具有更好的成骨能力,其中3D H-P2-sEVs复合支架(H-P2-sEVs)的ALP活性最高。图5中的C和D显示茜素红染色中各组支架产生的钙结节数量,相比于空白对照组和其他支架,H-P2-sEVs复合支架产生的钙结节数量最多。图5中的E和F显示各组支架与细胞培养后,收集细胞提取蛋白进行蛋白免疫印迹分析,发现H-sEVs、H-P1-sEVs和H-P2-sEVs组的成骨相关因子ALP、OPN、RUNX2以及BMP2的蛋白表达量多于空白对照组和HA组,其中H-P2-sEVs组的蛋白表达量最高。同样地,图5中的G显示在进行实时聚合酶链式反应(qPCR)分析后,发现H-P2-sEVs组的成骨相关因子的基因表达水平最高。

[0191] 6、功能化复合支架对体内成骨作用的影响。

[0192] 建立大鼠颅骨缺损模型:于北京维通利华实验动物技术有限公司购入6-8周雄性320-350Sprague-Dawley大鼠,全麻下在大鼠颅骨正中用牙钻制备直径为8mm的孔,分组植入支架,空白孔作为对照,逐层缝合关闭创面。

[0193] 3个月后,将动物处死获取标本,应用micro-CT行三维重建,计算相关骨组织参数;行H&E染色和Masson染色,显微镜下观察血管及新骨形成情况,行半定量分析,计算新骨比例;免疫组化染色观察成骨相关蛋白表达情况。

[0194] 图6显示了复合支架植入老鼠颅骨临界骨缺损模型3个月后体内骨形成情况,未植入支架的空白组作为对照。图6中的A显示植入后3个月的骨形成情况的三维重建。图6中的B示出了缺损骨体积分数定量分析(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。术后3个月,各组支架具有不同程度的降解,在三维孔径中可见新形成的骨组织,H-P2-sEVs支架有明显的骨岛,并与周围组织发生明显的骨结合。图6中的C显示在HE染色和Masson染色发现,相比于空白组和其他支架组,H-P2-sEVs支架无明显的炎症细胞浸润,胶原纤维较多,形成的新骨数量最多。图6中的D免疫组化染色进一步阐明复合支架可促进成骨标志物OCN和COL-1的表达。

[0195] 图7显示了3D-HA支架以及功能化3D-HA复合支架的制备以及植入大鼠颅骨临界骨缺损模型后发生的成骨变化。

[0196] 综上所述,本发明制备的3D H-P-sEVs复合支架具有良好的力学性能、生物相容性和间充质干细胞募集能力。并通过体外和体内实验,阐明了它在成骨发生中的重要作用。

[0197] 需要说明的是,尽管以具体实例介绍了本发明的技术方案,但本领域技术人员能够理解,本发明应不限于此。

[0198] 以上已经描述了本发明的各实施例,上述说明是示例性的,并非穷尽性的,并且也不限于所披露的各实施例。在不偏离所说明的各实施例的范围和精神的情况下,对于本技术领域的普通技术人员来说许多修改和变更都是显而易见的。本文中所用术语的选择,旨在最好地解释各实施例的原理、实际应用或对市场中的技术改进,或者使本技术领域的其它普通技术人员能理解本文披露的各实施例。

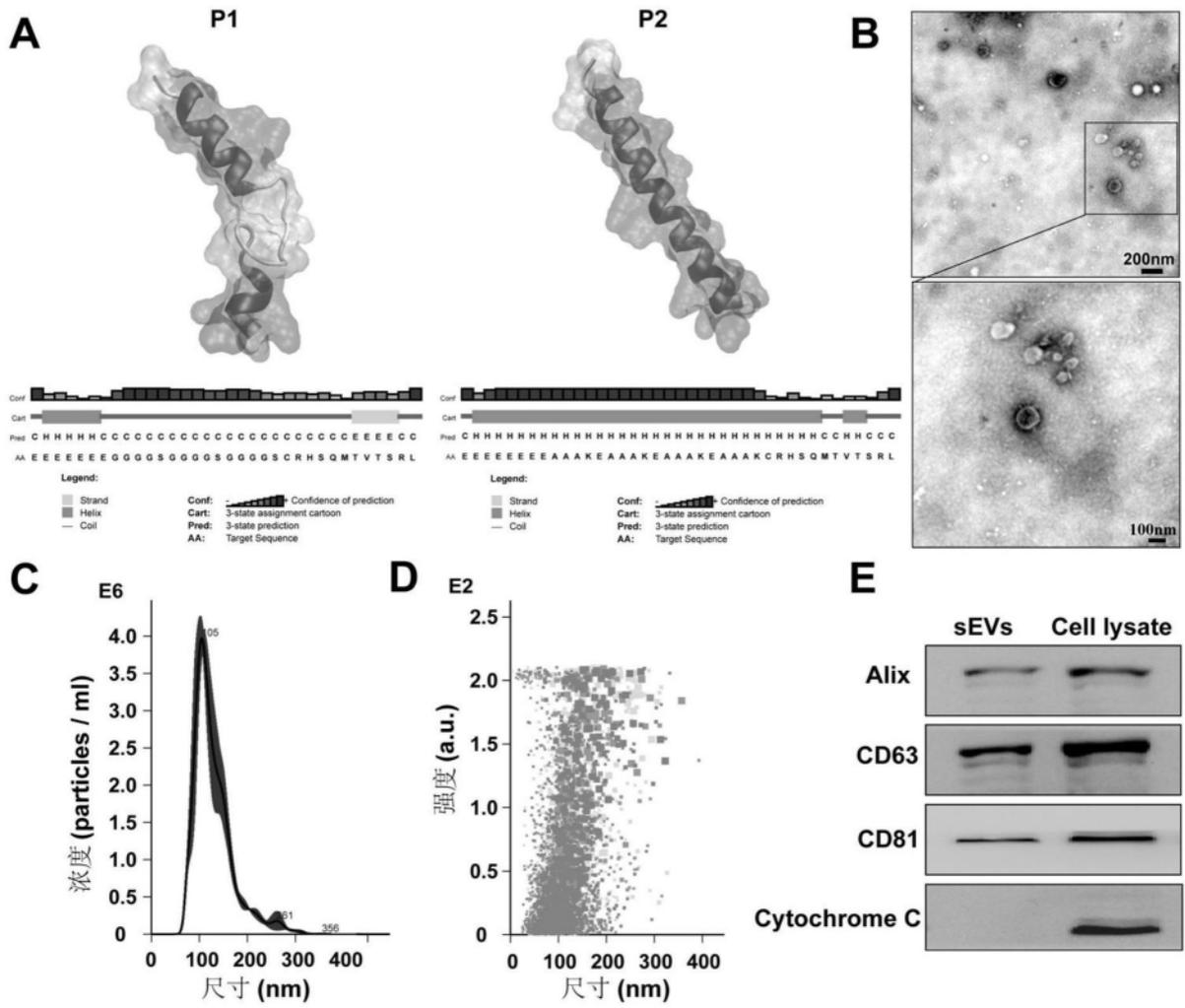


图1

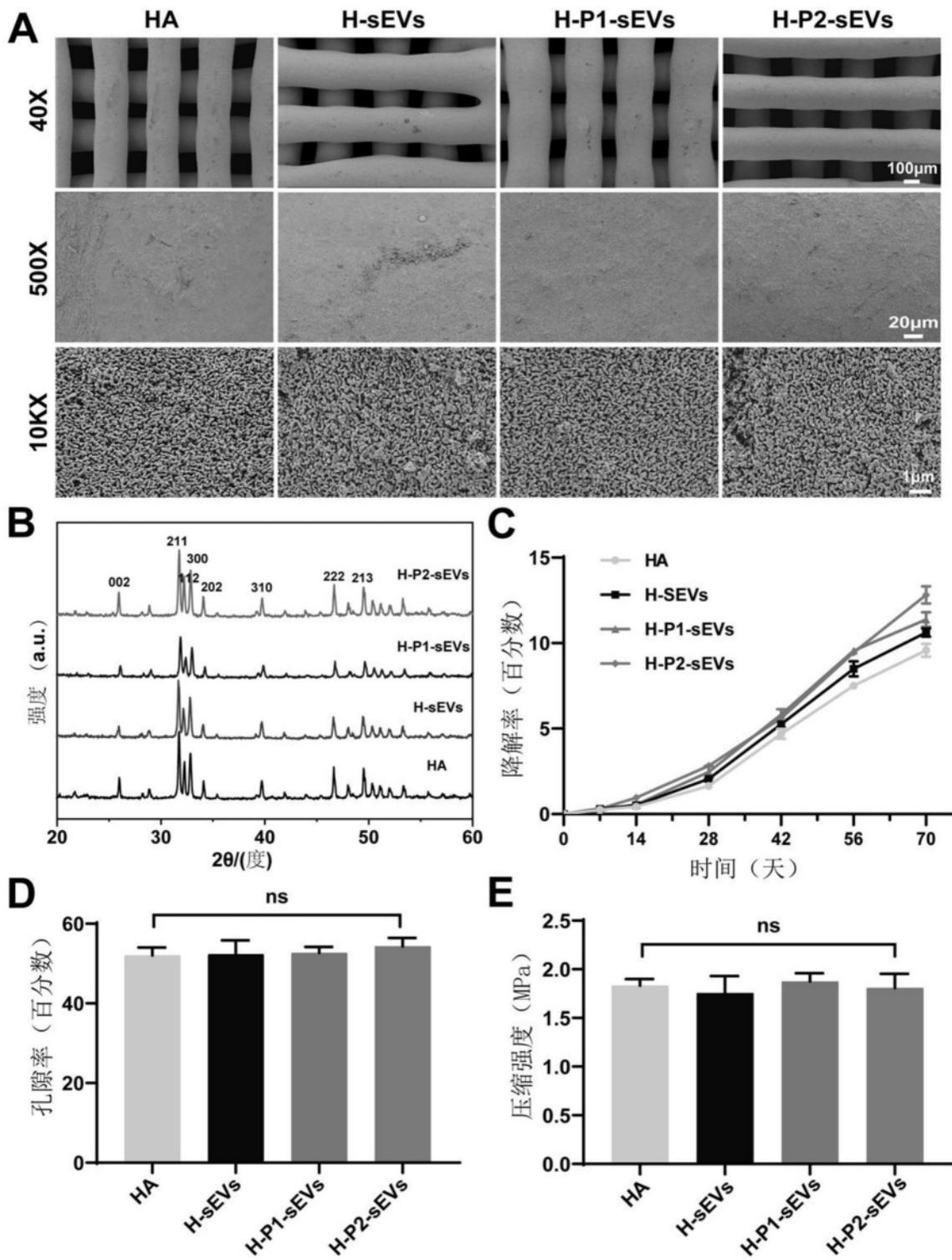


图2

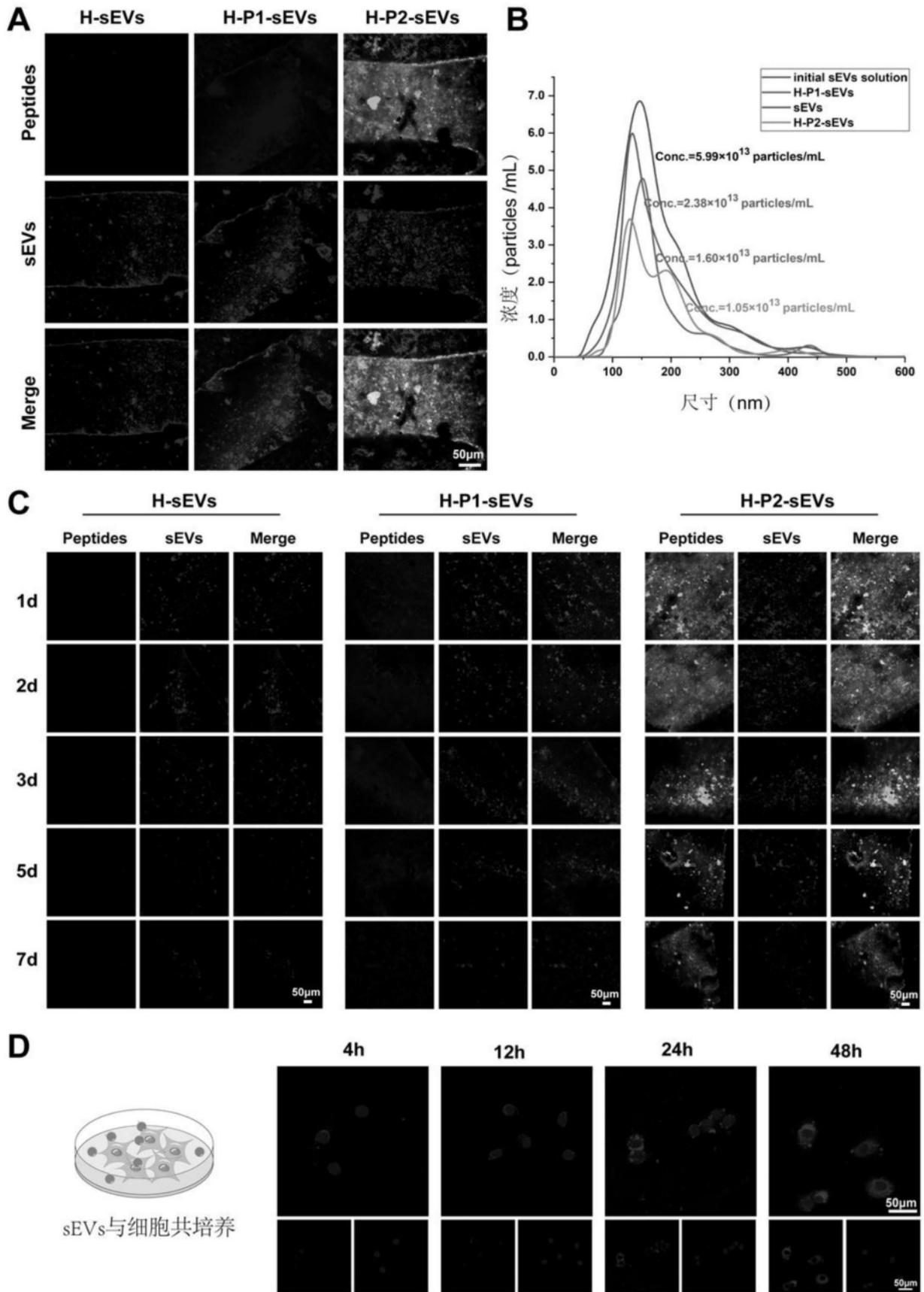


图3

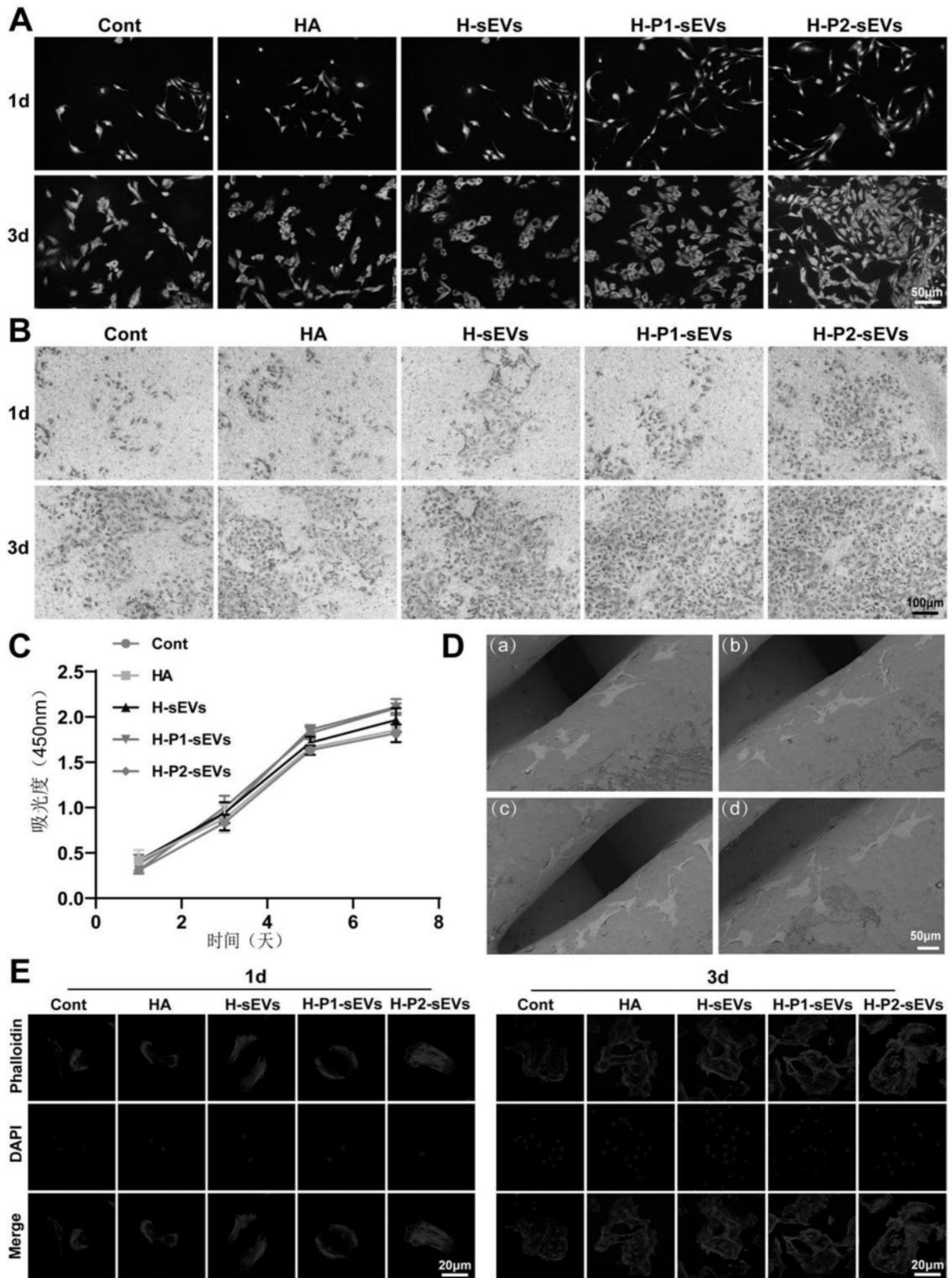


图4

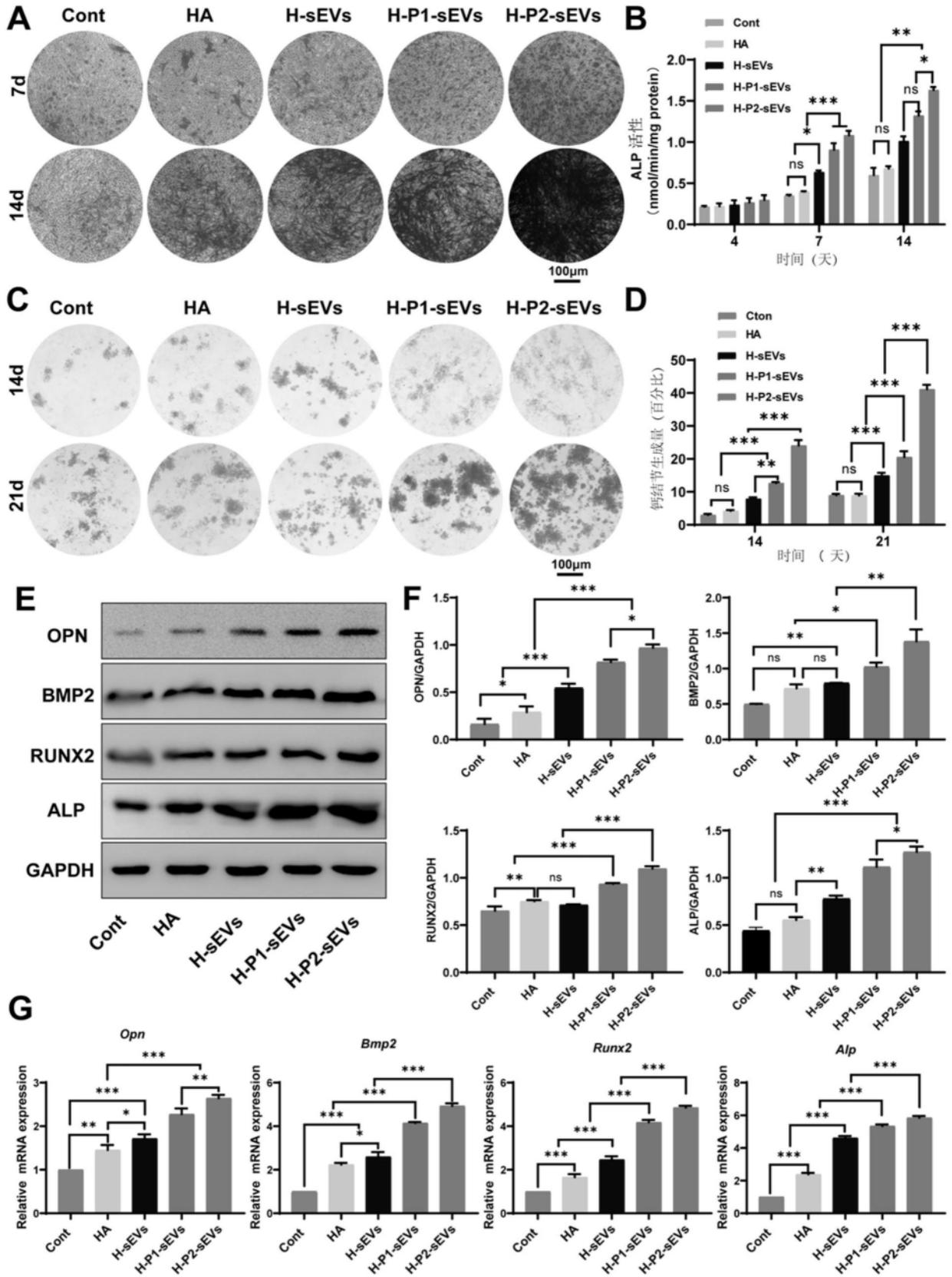


图5

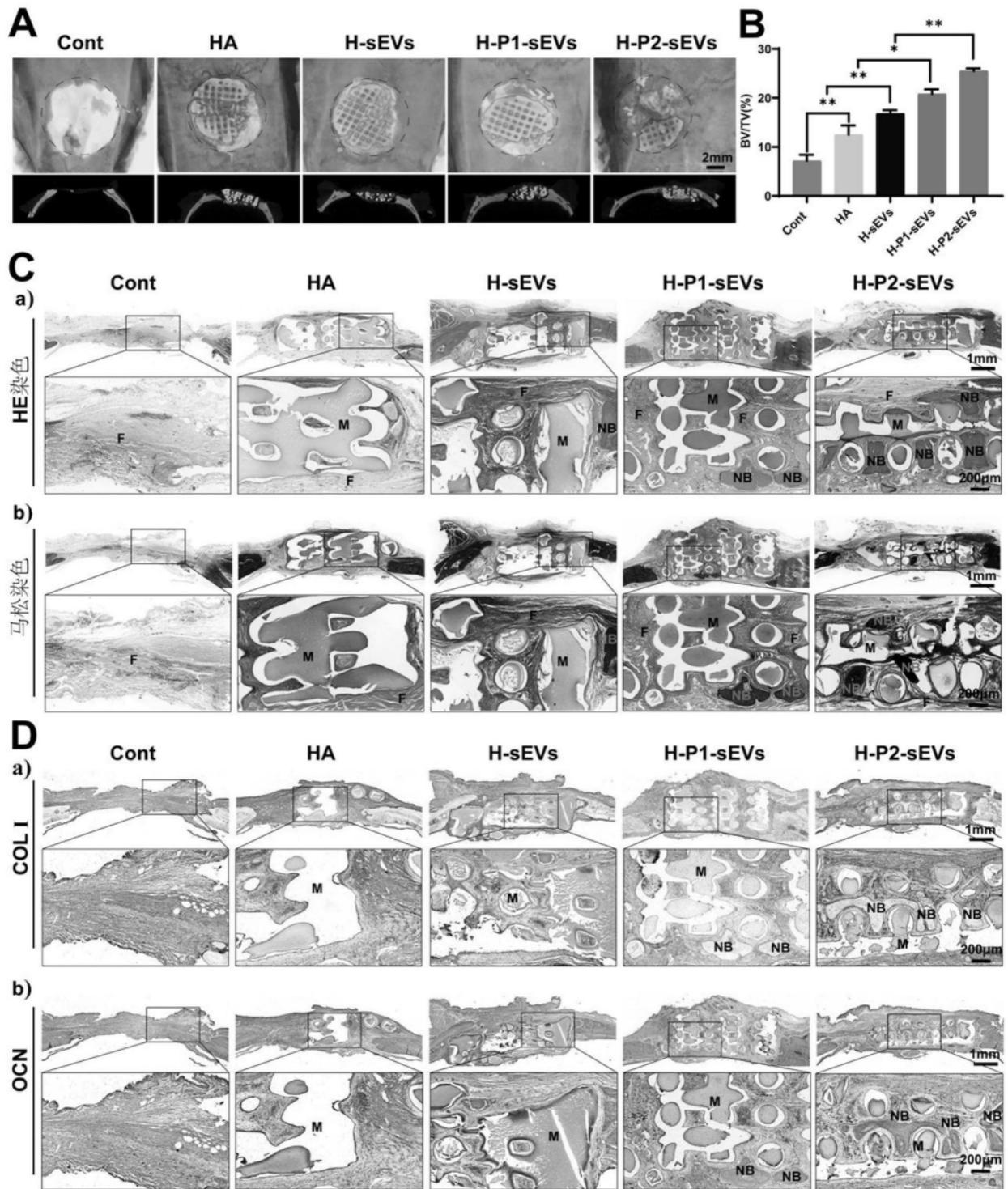


图6

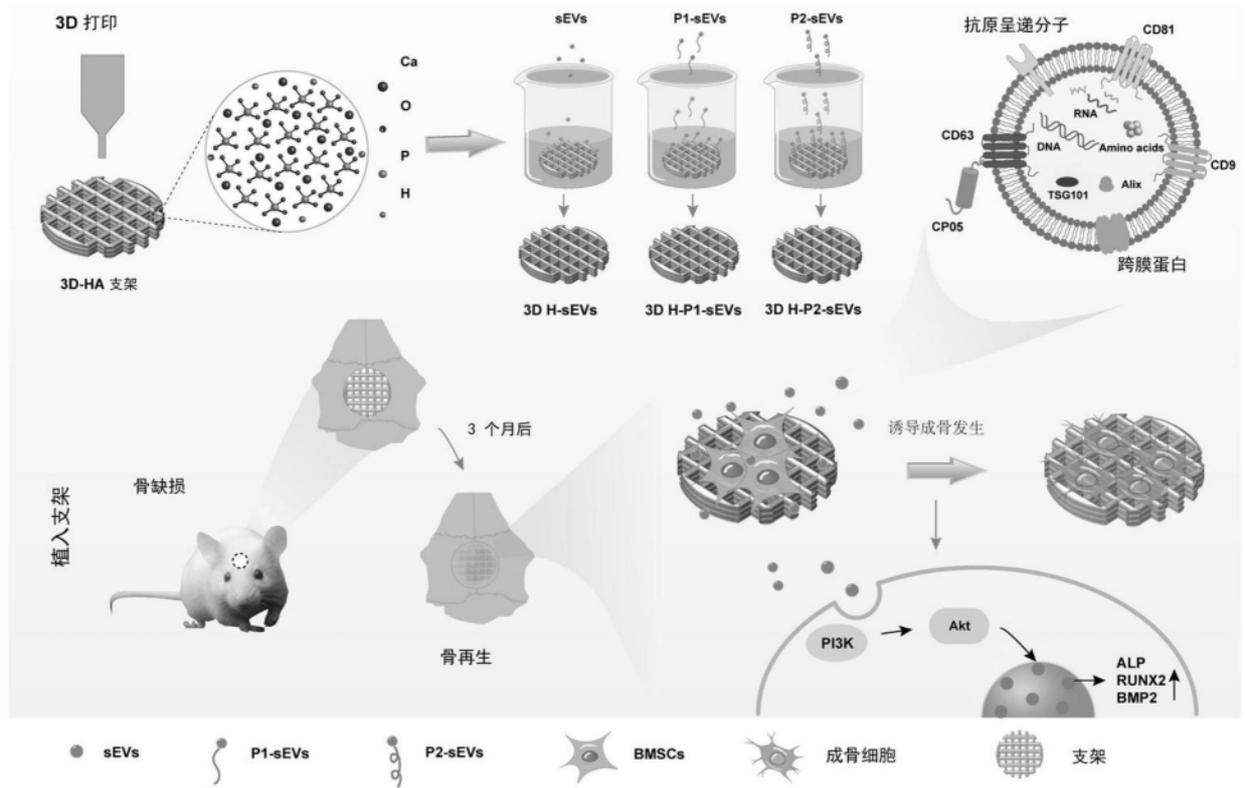


图7