



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108498786 A

(43)申请公布日 2018.09.07

(21)申请号 201810148948.X

A61P 9/00(2006.01)

(22)申请日 2018.02.13

(71)申请人 南昌大学第二附属医院

地址 330006 江西省南昌市东湖区民德路1号

(72)发明人 周建良 李杨 丁静丽 刘季春
徐建军 易应萍 高日峰 朱志刚
樊虎熊 许伟长

(74)专利代理机构 北京格旭知识产权代理事务所(普通合伙) 11443

代理人 雒纯丹

(51)Int. Cl.

A61K 38/17(2006.01)

A61K 9/50(2006.01)

A61K 47/34(2017.01)

权利要求书1页 说明书11页 附图19页

(54)发明名称

载骨保护素的缓释纳米粒及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明涉及生物学领域,具体涉及一种载骨保护素的缓释纳米粒及其制备方法和应用。本发明提供了一种载骨保护素的缓释纳米粒,所述纳米粒通过含有骨保护素、马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯和聚己内酯的原料制备得到。本发明还提供了一种载骨保护素的缓释纳米粒的制备方法,其是将骨保护素、马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯和聚己内酯及有机溶剂形成的混合物作为油相,将水溶性聚合物的水溶液作为水相,进行超声处理得到。本发明将骨保护素包封于纳米粒中构建纳米载药控释系统,使骨保护素能从纳米粒中以一定的速率在局部缓慢的释放,这样既能达到治疗的浓度,也可避免骨保护素在体内被蛋白酶水解,提高了生物利用度。

1. 一种载骨保护素的缓释纳米粒,其特征在于,所述纳米粒通过含有骨保护素、马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯和聚己内酯的原料制备得到。

2. 根据权利要求1所述的纳米粒,其中,所述骨保护素为0.5-3重量份,优选为0.5-2重量份;所述马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯为4000-8000重量份,优选为4000-6000重量份;所述聚己内酯为12000-24000重量份,优选为12000-18000重量份。

3. 根据权利要求1所述的纳米粒,其中,所述纳米粒通过含有骨保护素、磷脂、马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯和聚己内酯的原料制备得到。

4. 根据权利要求3所述的纳米粒,其中,所述骨保护素为0.5-3重量份,优选为0.5-2重量份;所述磷脂为5000-15000重量份,优选为5000-10000重量份;所述马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯为4000-8000重量份,优选为4000-6000重量份;所述聚己内酯为12000-24000重量份,优选为12000-18000重量份。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的纳米粒,其中,所述纳米粒通过下述方法制备得到:

将骨保护素、马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯和聚己内酯及有机溶剂形成的混合物作为油相,将水溶性聚合物的水溶液作为水相,进行超声处理得到。

6. 根据权利要求3或4所述的纳米粒,其中,所述纳米粒通过下述方法制备得到:

(1) 将骨保护素与磷脂混合得到骨保护素-磷脂复合物;

(2) 将骨保护素-磷脂复合物、马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯和聚己内酯及有机溶剂形成的混合物作为油相,将水溶性聚合物的水溶液作为水相,进行超声处理得到。

7. 根据权利要求1-6任一项所述的纳米粒,其中,所述聚己内酯的分子量为40000~50000。

8. 根据权利要求1-8任一项所述的纳米粒,其中,所述马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯的分子量为10000~20000,所述聚乙二醇链段的分子量为1000~2000。

9. 权利要求1-8任一项所述纳米粒的制备方法,其特征在于,其包含下述步骤:

将骨保护素、马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯和聚己内酯及有机溶剂形成的混合物作为油相,将水溶性聚合物的水溶液作为水相,进行超声处理得到。

10. 根据权利要求9所述的制备方法,其中,其包含下述步骤:

(1) 将骨保护素与磷脂混合得到骨保护素-磷脂复合物;

(2) 将骨保护素-磷脂复合物、马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯和聚己内酯及有机溶剂形成的混合物作为油相,将水溶性聚合物的水溶液作为水相,进行超声处理得到。

11. 根据权利要求9或10所述的制备方法,其中,所述油相与水相的体积比为1:2~6,优选为1:4~5。

12. 根据权利要求9-11任一项所述的制备方法,其中,所述水溶性聚合物选自于聚乙烯醇、聚山梨酯或脂肪酸山梨坦,优选为聚乙烯醇。

13. 根据权利要求9-12任一项所述的制备方法,其中,所述有机溶剂选自于二氯甲烷、三氯甲烷或丙酮,优选为二氯甲烷。

14. 权利要求1-8任一项所述的纳米粒或权利要求9-13任一项所述的方法制备得到的纳米粒在纳米载药材料中的应用。

载骨保护素的缓释纳米粒及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学领域,具体涉及一种载骨保护素的缓释纳米粒及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 钙化性主动脉瓣疾病(Calcific aortic valve disease,CAVD)的发病率在老年人口中呈现逐年上升趋势,目前主要的治疗方式是主动脉瓣膜置换手术,但现有的人工瓣膜置换后存在着出血、钙化衰退、耐久性差等问题。随着对CAVD发病机制研究的不断深入,有研究表明CAVD是一种涉及炎症、脂质代谢、细胞分化、基质重塑等病理变化的主动病变过程,同时也为CAVD的治疗提供了新的治疗靶点。

[0003] 骨保护素(Osteoprotegerin,OPG)是一种可溶性分泌型糖蛋白,是肿瘤坏死因子受体超家族成员之一。OPG可竞争性阻止细胞核因子Kb受体活化因子(RANK)与PANK配体(RANKL)结合,能够调节、保护血管内皮细胞,抑制血管及瓣膜间质细胞异常成骨样分化,其分泌的相对或绝对不足有可能是导致瓣膜钙化的重要原因。但由于游离的OPG在体内易被蛋白酶降解,稳定性差,半衰期较短,很难在局部达到治疗的浓度。

[0004] 纳米载药系统为一系列粒径在纳米级的新型微小给药系统的总称,是利用纳米技术将天然或合成的高分子材料作为载体,与药物一起制成的粒径为1~1000nm的药物输送系统,该载药系统具有靶向性、缓释性、载体材料可生物降解等显著优点。

发明内容

[0005] 为此,本发明所解决的技术的问题是:现有技术中蛋白类药物在体内易被蛋白酶降解,半衰期较短,在局部很难达到治疗的浓度。

[0006] 本发明提供了一种载骨保护素的缓释纳米粒,所述纳米粒通过含有骨保护素、马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯和聚己内酯的原料制备得到。

[0007] 本发明还提供了一种载骨保护素的缓释纳米粒的制备方法,其包含下述步骤:

[0008] 将骨保护素、马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯和聚己内酯及有机溶剂形成的混合物作为油相,将水溶性聚合物的水溶液作为水相,进行超声处理得到。

[0009] 具体来说,本发明提出了如下技术方案。

[0010] 本发明提供了一种载骨保护素的缓释纳米粒,所述纳米粒通过含有骨保护素、马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯和聚己内酯的原料制备得到。

[0011] 优选的,对于所述的载骨保护素的缓释纳米粒,其中,所述骨保护素为0.5-3重量份,优选为0.5-2重量份;所述马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯为4000-8000重量份,优选为4000-6000重量份;所述聚己内酯为12000-24000重量份,优选为12000-18000重量份。

[0012] 优选的,对于所述的载骨保护素的缓释纳米粒,其中,所述纳米粒通过含有骨保护素、磷脂、马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯和聚己内酯的原料制备得到。

[0013] 优选的,对于所述的载骨保护素的缓释纳米粒,其中,所述骨保护素为0.5-3重量

份,优选为0.5-2重量份;所述磷脂为5000-15000重量份,优选为5000-10000重量份;所述马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯为4000-8000重量份,优选为4000-6000重量份;所述聚己内酯为12000-24000重量份,优选为12000-18000重量份。

[0014] 优选的,对于所述的载骨保护素的缓释纳米粒,其中,所述纳米粒通过下述方法制备得到:

[0015] 将骨保护素、马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯和聚己内酯及有机溶剂形成的混合物作为油相,将水溶性聚合物的水溶液作为水相,进行超声处理得到。

[0016] 优选的,对于所述的载骨保护素的缓释纳米粒,其中,所述纳米粒通过下述方法制备得到:

[0017] (1) 将骨保护素与磷脂混合得到骨保护素-磷脂复合物;

[0018] (2) 将骨保护素-磷脂复合物、马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯和聚己内酯及有机溶剂形成的混合物作为油相,将水溶性聚合物的水溶液作为水相,进行超声处理得到。

[0019] 优选的,对于所述的载骨保护素的缓释纳米粒,其中,所述聚己内酯的分子量为40000~50000。

[0020] 优选的,对于所述的载骨保护素的缓释纳米粒,其中,所述马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯的分子量为10000~20000,所述聚乙二醇链段的分子量为1000~2000。

[0021] 本发明提供了一种所述载骨保护素的缓释纳米粒的制备方法,其包含下述步骤:

[0022] 将骨保护素、马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯和聚己内酯及有机溶剂形成的混合物作为油相,将水溶性聚合物的水溶液作为水相,进行超声处理得到。

[0023] 优选的,对于所述的载骨保护素的缓释纳米粒的制备方法,其中,其包含下述步骤:

[0024] (1) 将骨保护素与磷脂混合得到骨保护素-磷脂复合物;

[0025] (2) 将骨保护素-磷脂复合物、马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯和聚己内酯及有机溶剂形成的混合物作为油相,将水溶性聚合物的水溶液作为水相,进行超声处理得到。

[0026] 优选的,对于所述的载骨保护素的缓释纳米粒的制备方法,其中,所述油相与水相的体积比为1:2~6,优选为1:4~5。

[0027] 优选的,对于所述的载骨保护素的缓释纳米粒的制备方法,其中,所述水溶性聚合物选自于聚乙烯醇、聚山梨酯或脂肪酸山梨坦,优选为聚乙烯醇。

[0028] 优选的,对于所述的载骨保护素的缓释纳米粒的制备方法,其中,所述有机溶剂选自于二氯甲烷、三氯甲烷或丙酮,优选为二氯甲烷。

[0029] 本发明所述的载骨保护素的缓释纳米粒或上述方法所制备得到的纳米粒在纳米载药材料中的应用。

[0030] 本发明所取得的有益效果是:

[0031] 本发明采用生物可降解材料,将骨保护素封装于纳米粒中,使骨保护素能从纳米粒中以一定的速率在局部缓慢的释放,既能达到治疗的浓度,也可避免骨保护素在体内被蛋白酶水解,提高了药物的生物利用度。所得到的载OPG的缓释纳米粒在一定的程度上抑制了钙化进程,并表现出较强的抗钙化效果。

附图说明

- [0032] 图1为实施例一中载骨保护素的缓释纳米粒制备示意图；
- [0033] 图2为实施例一中载骨保护素的缓释纳米粒粒径分布示意图；
- [0034] 图3为实施例一中载骨保护素的缓释纳米粒Zeta示意图；
- [0035] 图4为实施例一中载骨保护素的缓释纳米粒透射电镜示意图；
- [0036] 图5为实施例一中载骨保护素的缓释纳米粒的体外释放曲线示意图；
- [0037] 图6-1为原代培养一天后大鼠骨髓间充质干细胞；
- [0038] 图6-2为原代培养三天后大鼠骨髓间充质干细胞；
- [0039] 图6-3为原代培养五天后大鼠骨髓间充质干细胞；
- [0040] 图6-4为原代培养七天后大鼠骨髓间充质干细胞；
- [0041] 图6-5为第二代培养的大鼠骨髓间充质干细胞；
- [0042] 图6-6为第三代培养的大鼠骨髓间充质干细胞；
- [0043] 图7-1为大鼠骨髓间充质干细胞表达CD29的示意图,其中,横坐标代表荧光信号相对强度,纵坐标代表细胞数；
- [0044] 图7-2为大鼠骨髓间充质干细胞表达CD90的示意图,其中,横坐标代表荧光信号相对强度,纵坐标代表细胞数；
- [0045] 图7-3为大鼠骨髓间充质干细胞表达CD34的示意图,其中,横坐标代表荧光信号相对强度,纵坐标代表细胞数；
- [0046] 图7-4为大鼠骨髓间充质干细胞表达CD45的示意图,其中,横坐标代表荧光信号相对强度,纵坐标代表细胞数；
- [0047] 图8为实施例一所得到的载骨保护素的纳米粒、对照组及空白纳米粒的细胞毒性结果示意图；
- [0048] 图9-1为钙化诱导液组(DAG)的钙结节茜素红染色结果示意图；
- [0049] 图9-2为空白纳米粒组的钙结节茜素红染色结果示意图；
- [0050] 图9-3为实施例一所制备的载保护素的纳米粒组的钙结节茜素红染色结果示意图；
- [0051] 图9-4为正常对照组的钙结节茜素红染色结果示意图；
- [0052] 图10是实施例一制备所得到的载骨保护素的纳米粒组、空白纳米粒组、对照组和DAG组对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化过程中钙沉积的示意图,其中,*代表 $P < 0.05$,***代表 $P < 0.001$ 。

具体实施方式

[0053] 图1为实施例一中载骨保护素的缓释纳米粒制备示意图,将包含骨保护素、马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯和聚己内酯的原料经过乳化溶剂挥发法得到载骨保护素的缓释纳米粒,本发明将骨保护素包封于纳米粒中,使骨保护素在纳米粒中以一定的速率下局部缓慢的释放,既能达到治疗的浓度,也可避免骨保护素在体内被蛋白酶水解,提高了药物的生物利用度。

[0054] 图2是实施例一中载骨保护素的缓释纳米粒粒径分布示意图,从图2可以看出,所制备的纳米粒的粒径为133nm,分散度指数(PDI)为0.131。

[0055] 图3为实施例一中载骨保护素的缓释纳米粒Zeta示意图,从图3可以看出,Zeta电

位为-27.8mV。

[0056] 图4为实施例一中载骨保护素的缓释纳米粒透射电镜示意图,从图中可以看出,纳米粒呈圆形,大小规则,分布均匀,未见互相粘附现象。

[0057] 图5为实施例一中载骨保护素的缓释纳米粒的体外释放曲线示意图,从释放曲线可以看出,在释放初期,OPG以较快的速度从纳米粒中释放出来,但未出现突释现象。24小时OPG累计释放量达到52%,之后缓慢释放,至第7天OPG累计释放达89%。

[0058] 图6-1为原代培养的大鼠骨髓间充质干细胞,从图中可以看出,刚接种的细胞呈圆形,悬浮在培养基中。

[0059] 图6-2为培养三天后大鼠骨髓间充质干细胞,从图中可以看出,在培养三天后,部分细胞开始贴壁生长,呈长梭形。

[0060] 图6-3为培养五天后大鼠骨髓间充质干细胞,从图中可以看出,在培养5天后,大部分细胞已经贴壁,形成细胞集落并逐渐向外延伸。

[0061] 图6-4为培养七天后大鼠骨髓间充质干细胞,从图中可以看出,在培养7天后,细胞以一定的方向排列,呈现出旋涡状。

[0062] 图6-5为第二代培养的大鼠骨髓间充质干细胞,进行第二次传代后,细胞生长旺盛,形态均一,呈长梭形贴壁生长。

[0063] 图6-6为第三代培养的大鼠骨髓间充质干细胞,进行第三次传代后,细胞呈长梭形贴壁生长。

[0064] 图7-1是大鼠骨髓间充质干细胞表达CD29的示意图,其中,横坐标代表荧光信号相对强度,纵坐标代表细胞数,其采用流式细胞检测仪进行测定,从图中可以看出,大鼠骨髓间充质干细胞能够高表达CD29。

[0065] 图7-2是大鼠骨髓间充质干细胞表达CD90的示意图,其中,横坐标代表荧光信号相对强度,纵坐标代表细胞数,其采用流式细胞检测仪进行测定,从图中可以看出,大鼠骨髓间充质干细胞能够高表达CD90。

[0066] 图7-3是大鼠骨髓间充质干细胞表达CD34的示意图,图7-4是大鼠骨髓间充质干细胞表达CD45的示意图,从上述两图可以看出,大鼠骨髓间充质干细胞不表达或极低表达CD34和CD45。

[0067] 图8是实施例一所得到的载骨保护素的纳米粒、对照组及空白纳米粒的细胞毒性结果示意图,从图中可以看出,在加入载骨保护素的纳米粒后,经过12h、24h和48h的培养,和对照组PBS相比,空白纳米粒和载骨保护素的纳米粒组的细胞生长并未受到纳米粒的影响,各组之间未见统计学差异($P>0.05$),说明纳米粒并不影响大鼠骨髓间充质干细胞的增殖,即纳米粒对大鼠骨髓间充质干细胞无毒性。

[0068] 图9-1和图9-2分别为DAG组和空白纳米粒组的钙结节茜素红染色结果示意图,从上述两图可以看出,出现了大量的钙结节,并聚集成团,其中,黑色部分代表茜素红染成红色的部分。

[0069] 图9-3为实施例一所制备的载保护素的纳米粒组的茜钙结节素红染色结果示意图,从图中可以看出,载骨保护素的纳米粒组存在散在的钙结节,但数量较少,说明载骨保护素的纳米粒在一定程度上抑制了钙化进程,其中,黑色部分为茜素红染成红色的部分。

[0070] 图9-4为正常对照组的钙结节茜素红染色结果示意图,从图中可以看出,未见钙结

节。

[0071] 图10是实施例一制备所得到的载骨保护素的纳米粒组、空白纳米粒组、对照组和DAG组对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化过程中钙沉积的示意图,其中,从图中可以看出,在成骨诱导第7天,DAG组的钙离子浓度与载骨保护素的纳米粒组相比有统计学差异($P < 0.05$),在培养第14天后,DAG组和空白纳米粒组的钙离子浓度与载骨保护素的纳米粒组相比有显著的统计学差异($P < 0.001$),在培养21天后,各组的钙离子浓度继续增加,但载骨保护素的纳米粒组的钙离子浓度明显低于DAG组和空白纳米粒组($P < 0.001$),说明载保护素的纳米粒组具有较强的抗钙化效果。

[0072] 如上所述,本发明提供了一种载骨保护素的缓释纳米粒,其通过含有骨保护素、马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯和聚己内酯的原料制备得到。

[0073] 在本发明优选的一种具体实施方式中,所述骨保护素为0.5-3重量份,优选为0.5-2重量份;所述马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯为4000-8000重量份,优选为4000-6000重量份;所述聚己内酯为12000-24000重量份,优选为12000-18000重量份。

[0074] 在本发明优选的具体实施方式中,本发明提供了一种载骨保护素的缓释纳米粒,其通过含有骨保护素、磷脂、马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯和聚己内酯的原料制备得到。

[0075] 在本发明优选的一种具体实施方式中,其中,所述骨保护素为0.5-3重量份,优选为0.5-2重量份;所述磷脂为5000-15000重量份,优选为5000-10000重量份;所述马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯为4000-8000重量份,优选为4000-6000重量份;所述聚己内酯为12000-24000重量份,优选为12000-18000重量份。

[0076] 优选的,所述聚己内酯的分子量为40000~50000,优选为45000。

[0077] 优选的,所述马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯的分子量为10000~20000,优选为12000,所述聚乙二醇链段的分子量为1000~2000,优选为2000。

[0078] 本发明提供了一种载骨保护素的制备方法,其包含下述步骤:将骨保护素、马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯和聚己内酯及有机溶剂形成的混合物作为油相,将水溶性聚合物的水溶液作为水相,进行超声处理得到。

[0079] 在本发明一种优选的具体实施方式中,本发明提供了一种载骨保护素的缓释纳米粒的制备方法,其包含下述步骤:

[0080] (1) 将骨保护素与磷脂混合得到骨保护素-磷脂复合物;

[0081] (2) 将骨保护素-磷脂复合物、马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯和聚己内酯及有机溶剂形成的混合物作为油相,将水溶性聚合物的水溶液作为水相,进行超声处理得到。

[0082] 优选的,所述有机溶剂选自于二氯甲烷、三氯甲烷或丙酮,优选为二氯甲烷,所述水溶性聚合物选自于聚乙烯醇、聚山梨酯或脂肪酸山梨坦,优选为聚乙烯醇。

[0083] 优选的,所述有机溶剂为0.75~2.5ml,优选为0.75-2ml。

[0084] 优选的,所述油相与水相的体积比为1:2~6,优选为1:4~5,更优选为1:4。

[0085] 在本发明优选的一种具体实施方式中,在步骤(1)中,将骨保护素与磷脂混合后,还包含将放在冷冻干燥机中进行干燥的步骤,其中,冷冻干燥机的冷冻温度为-55~-85℃,干燥时间为1~5小时。

[0086] 在本发明较优选的一种具体实施方式中,在步骤(1)中,在进行冷冻干燥后,还包含真空干燥的步骤,其中,真空干燥的时间为20-30h。

[0087] 本发明所制备得到的载骨保护素的纳米粒的平均粒径为133~148nm,所述纳米粒的分散度指数为0.117~0.210。

[0088] 优选的,所述纳米粒中骨保护素的包封率为65~75%,所述纳米粒中骨保护素的7天释放量为85~96%,优选为89~96%。

[0089] 本发明所制备得到的缓释纳米粒,在局部以一定的速率缓慢释放,在一定程度上能够防止钙化,并且将骨保护素包封在纳米粒中,可以避免骨保护素被体内的蛋白酶水解,提高了药物的生物利用度。

[0090] 本发明所用的磷脂的作用在于,与骨保护素进行结合,能够降低骨保护素的水溶性,使其具有疏水特性。

[0091] 下面对本实施例所用的原料及设备的生产厂家,以及产品分析使用的设备和分析方法进行说明如下,其中所述的化学物质没有标明的均为常规试剂的化学纯级别。

[0092] 其中,实施例所用到的原料的信息如下所示,

[0093] 大豆磷脂购于上海太伟药业有限公司

[0094] 聚乙烯醇(PVA)购于阿拉丁试剂(中国)有限公司,产品编号:P105128

[0095] 叔丁醇购于美国Sigma-Aldrich公司,产品编号:471712

[0096] 聚己内酯(PCL)购于美国Sigma-Aldrich公司,产品编号:704105

[0097] 马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯(MAL-PEG-PCL)购于西安瑞禧生物科技有限公司,产品编号:RP0160885

[0098] 曲拉通X-100(Triton X-100)购于美国SIAMA公司,产品编号:X-100

[0099] 重组人骨保护素(OPG)购于美国PEPROTECH公司,产品编号:450-14

[0100] 胎牛血清(FBS)购于美国Hyclone公司,产品编号:RB35935

[0101] 0.25%胰蛋白酶-EDTA购于美国Gibco公司,产品编号:1760553

[0102] TransDetect™ Cell Counting Kit(CCK)购于北京全式金生物技术有限公司,产品编号:FG701-01

[0103] 茜素红染液购于北京索莱宝公司,产品编号:G1452

[0104] 骨保护素(OPG)检测试剂盒购于美国Cloud-Clone公司

[0105] CD34抗体购于Abcam公司,产品编号:ab187284

[0106] CD45、CD29、CD90抗体购于Biologend公司

[0107] β-甘油磷酸,维生素C和地塞米松购于美国Sigma公司

[0108] QuantiChrom™ Calcium Assay Kit购于美国BioAssy Systems公司

[0109] 二氯甲烷、二甲基亚砷(DMSO)等其他试剂购于西陇化工股份有限公司

[0110] 实施例所用到的实验设备如下:

[0111] 恒温振荡器:SHA-BA,常州朗越仪器制造有限公司

[0112] 冷冻干燥机:FD-1A-50,北京博医康实验仪器有限公司

[0113] 透射电子显微镜:JEM-2100,日本

[0114] 电子天平:BSA124S,赛多利斯科学仪器有限公司

[0115] 多功能酶标仪:VARIOSKAN,美国赛默飞世尔科技公司

[0116] 磁力搅拌器:DF-101S,金坛市科析仪器有限公司

[0117] 超速离心机:Optima™ L-100K Ultracentrifuge,美国贝克曼库尔特商贸公司

- [0118] 激光粒度测定仪:PSA NANO2590,英国马尔文公司
- [0119] CO₂细胞培养箱:HERACELL 150i,美国赛默飞世尔科技公司
- [0120] 紫外分光光度计:UV-9600,北京北分瑞利分析仪器有限公司
- [0121] 超声波细胞粉碎机:SCIENTZ-II D,宁波新芝生物科技股份有限公司
- [0122] 流式细胞仪:FACS Calibur,美国BD公司
- [0123] 倒置显微镜:AE2000,Motic中国有限公司
- [0124] 实施例一
- [0125] 1. 载OPG纳米粒的制备
- [0126] (1) 骨保护素(OPG)-磷脂复合物的制备
- [0127] 将1 μ gOPG溶解于无菌三蒸水中并调整浓度为1 μ g/ml,精确称取10mg大豆磷脂溶于1ml叔丁醇中,然后将1ml 1 μ g/ml OPG水溶液和1ml 10mg/ml大豆磷脂/叔丁醇溶液用移液器充分吹打均匀,于冷冻干燥机中在-60 $^{\circ}$ C先预冻2小时后抽空干燥22小时,得到OPG-磷脂复合物。
- [0128] (2) 载OPG纳米粒的制备
- [0129] 采用乳化溶剂挥发法制备载OPG纳米粒。精确称取4mg马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯(MAL-PEG-PCL)和12mg聚己内酯(PCL)溶于1.5ml二氯甲烷中,然后再将步骤(1)所制备的OPG-磷脂复合物溶于其中形成油相(O),6ml 2%PVA水溶液作为水相(W),将油相(O)缓慢滴加至水相(W)中,在磁力搅拌器上以500转/min搅拌1min后置于超声杯中,冰浴条件下60W超声2min形成初乳(O/W),然后将初乳置于磁力搅拌器上搅拌4.5h充分挥干二氯甲烷,再加入100 μ l Triton X-100继续搅拌30min即得到载OPG的纳米粒。
- [0130] 空白纳米粒是采用空白磷脂复合物制备而成,不含有OPG,其他操作步骤如上。
- [0131] 2. 载OPG纳米粒的表征
- [0132] 2.1 Zeta电位和粒径
- [0133] 取1ml纳米粒悬浮液和4ml三蒸水充分混匀,用激光粒度测定仪对纳米粒的粒径、Zeta电位和分散度指数(PDI)进行考察。
- [0134] 检测结果如图2和图3所示,从图2可以看出,制备的纳米粒径为133nm,PDI为0.131,从图3可以看出,Zeta电位为-27.8mV。
- [0135] 2.2 透射电子显微镜观察纳米粒表面形貌
- [0136] 吸取10 μ l稀释的纳米粒悬液滴加至铜网上,自然晾干,用2%磷钨酸负染后置于透射电子显微镜下观察纳米粒表面形貌。
- [0137] 纳米粒表面形貌如图4所示,从图4可以看出:纳米粒呈圆形,大小规则,分布均匀,未见互相粘附现象。
- [0138] 2.3 包封率的测定
- [0139] 取制备的纳米粒悬液适量,低温高速离心(32000rpm,20min,4 $^{\circ}$ C)后取上清液,测定上清液中游离OPG含量记为W_游,将二甲基亚砜(DMSO)和纳米粒悬液混匀,使纳米粒完全溶解后测定总OPG含量记为W_总,上述OPG含量通过酶联免疫吸附试验测定,纳米粒包封率(entrapment efficiency,EE)计算公式为:EE = (W_总-W_游)/W_总 × 100%
- [0140] 将实施例一所得到的纳米粒使用酶联免疫吸附试验测定,得到纳米粒的包封率为75%。

[0141] 2.4载OPG纳米粒体外释放特性

[0142] 取适量的纳米粒悬液,低温高速离心(32000rpm,20min,4℃),弃去上清液,沉淀用5mlPBS重新分散后置于恒温震荡器上以37℃,60rpm持续震荡,在规定的的时间点(6h,12h,24h,2d,3d,5d,7d)再次离心(32000rpm,20min,4℃),取上清,用酶联免疫吸附法测定规定时间点上清液中OPG含量,计算OPG累积释放量。

[0143] 在上述规定的的时间点检测上清中OPG含量,绘制OPG累计释放曲线,如图5所示。从释放曲线可以看出,在释放初期,OPG以较快的速度从纳米粒中释放出来,但未出现突释现象。24小时OPG累计释放量达到52%,之后缓慢释放,至第7天OPG累计释放达89%。

[0144] 3.载OPG纳米粒对大鼠骨髓间充质干细胞(Bone Mesenchymal Stem Cells, BMSCs)的影响

[0145] 3.1BMSCs的分离、培养

[0146] 采用颈椎脱臼法处死3周大小雄性SD大鼠(来自于南昌大学医学院动物中心),75%乙醇浸泡10min,无菌条件下分离大鼠股骨及胫骨,用眼科剪去除多余的肌肉,剪掉股骨和胫骨的骨髓端,用5ml注射器抽取含10%胎牛血清(FBS)、100U/ml青霉素、100ug/ml链霉素的培养基冲洗骨髓腔,将冲出的骨髓吹打混匀,静置5min,收集除沉淀外的细胞悬液,离心(1000rpm,5min),弃去上清,用完全培养基重新分散细胞,充分吹打混匀后置于新的培养瓶中,于37℃,5%CO₂培养箱中培养,第4天全量换液,以后每隔2天换液1次。

[0147] 使用倒置显微镜进行观察,如图6-1所示,刚接种的细胞呈圆形,悬浮在培养基中。培养至第3天,部分细胞开始贴壁生长,呈长梭形,见图6-2。第5天,大部分细胞已经贴壁,形成细胞集落并逐渐向外延伸,见图6-3。第7天,细胞汇合至70%以上,细胞以一定的方向排列,呈现出旋涡状,见图6-4。传代后细胞生长旺盛,形态均一,呈长梭形贴壁生长,见图6-5和6-6。

[0148] 3.2流式细胞术检测BMSCs表面抗原表达情况

[0149] 取生长旺盛的第3代BMSCs用无菌PBS分散细胞并调整细胞密度为 1×10^6 /ml,吸取500ul至EP管中,向各EP管中加入10ul异硫氰酸荧光素(FITC)标记的CD29、CD90、CD45和10ulPE标记的CD34抗体,以同型IgG抗体为同型对照,4℃避光孵育30min,用500ul无菌PBS清洗3遍后于流式细胞仪上检测。

[0150] 流式细胞检测结果图7-1至7-4所示,从图7-1和图7-2中可以看出,BMSCs高表达CD29和CD90,而从图7-3和图7-4可以看出,BMSCs不表达或极低表达CD34和CD45。

[0151] 3.3载OPG纳米粒对细胞毒性的检测

[0152] 用CCK法检测载OPG纳米粒对BMSCs增殖的影响,取制备好的纳米粒悬液适量,低温高速离心(32000rpm,20min,4℃)后弃去上清,用2ml无菌PBS重新分散,然后用0.22um无菌滤膜过滤后备用。实验设置空白纳米粒组(NL-OPG-NPs)、载OPG纳米粒组(OPG-NPs)、单纯PBS对照组、空白对照组。取生长旺盛的第3代BMSCs以 1×10^4 /ml的密度接种在96孔培养板上,每孔接种100ul细胞悬浮液,置于37℃,5%CO₂培养箱中培养24h后,在相应的孔中加入10ulNL-OPG-NPs、OPG-NPs、PBS,空白孔只加入100ulPBS,分别于12h、24h、48h后更换新的培养液并加入10ulCCK检测液,继续孵育2h后置于酶标检测仪上测定450nm处各孔的吸光度值。

[0153] CCK是一种基于水溶性四唑盐的细胞增殖和细胞毒性检测试剂,四唑盐可以被线

粒体内的脱氢酶还原为可溶性的橙黄色甲臌,甲臌的数量和活细胞的数量呈正比,即颜色越深表明细胞增殖越快,细胞毒性越小,细胞数量越多。从图8可以看出,加入纳米粒经过12h、24h、48h的培养,和对照组相比,NL-OPG-NPs和OPG-NPs组细胞生长并未受到纳米粒的影响,各组间无统计学差异($P>0.05$),且随着时间的推移,各组的吸光度也随之增加,说明纳米粒并不影响BMSCs的增殖,纳米粒对BMSCs无毒性。

[0154] 3.4载OPG纳米粒体外抗钙化检测

[0155] 骨髓间充质干细胞(BMSCs)是存在骨髓中具有高度自我更新能力和多向分化潜能的干细胞,能够定向分化为骨、软骨、肌肉、韧带等组织,用钙化诱导液(含DMEM高糖培养基,10%FBS、100U/ml青霉素、100ug/ml链霉素,10mmol/L β -甘油磷酸、50 μ g/ml维生素C,100nM地塞米松,以下简称为DAG)可诱导BMSCs向成骨细胞分化。取制备好的载OPG纳米粒(OPG-NPs)和空白纳米粒(NL-OPG-NPs)悬液适量,低温高速离心(32000rpm,20min,4 $^{\circ}$ C)后弃去上清,用2ml无菌PBS重新分散,然后用0.22 μ m无菌滤膜过滤后备用。实验设置DAG组、OPG-NPs组、NL-OPG-NPs组、正常对照组,前3组分别为40u1 PBS、OPG-NPs、NL-OPG-NPs和500u1钙化诱导液的混匀液,正常对照组只加入540u1完全培养基。将生长旺盛的第3代BMSCs以 2×10^4 /ml的密度接种在24孔培养板中,置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱中培养。当细胞融合达到60%-70%时,小心将培养板孔内培养基吸走,用无菌PBS充分漂洗后向各孔加入上述各组混匀液。培养基每周更换1次。分别于成骨诱导分化后的第7d、14d、21d评价钙化情况。

[0156] 3.4.1茜素红染色

[0157] 首先用PBS清洗培养板,然后向各孔加入500u1 4%多聚甲醛,室温下固定30min,PBS充分漂洗干净,每孔加入500u1茜素红染液,染色5min,PBS漂洗干净后于倒置显微镜下观察钙结节染色效果。

[0158] 钙结节染色情况如图9-1至图9-4所示,DAG组和NL-OPG-NPs组出现大量的钙结节(见图9-1和9-2),并聚集成团,而OPG-NPs组可见散在的钙结节,数量较少(见图9-3),正常对照组未见钙结节(见图9-4),说明OPG-NPs在一定程度上抑制了钙化进程,其中,黑色部分为被茜素红染成红色的部分。

[0159] 3.4.2钙沉积检测

[0160] 为定量检测各组钙浓度,向各孔加入500u1 0.6N HCL,37 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日收集各组浸提液,离心(2500rpm,5min),收集上清液。参照钙定量检测试剂盒(QuantiChromTM Calcium Assay Kit)说明书,向96孔培养板孔底部滴加5u1上清液,然后再向每孔中加入200u1检测工作液,室温下放置5min后于酶标检测仪上测定630nm处各孔吸光度值。

[0161] 各组钙沉积情况通过萃取出来的钙离子浓度来表示,如图10所示。成骨诱导第7天,DAG组的钙离子浓度与OPG-NPs组相比有统计学差异($P<0.05$)。至第14天,DAG组和NL-OPG-NPs组的钙离子浓度明显增加,与OPG-NPs组相比有显著的统计学差异($P<0.001$)。至第21天,各组的钙离子浓度继续增加,其中DAG组、NL-OPG-NPs组和OPG-NPs组钙离子浓度均明显增加,但OPG-NPs组钙离子浓度仍显著低于DAG组和NL-OPG-NPs组($P<0.001$)。1-14天,OPG-NPs组钙离子浓度和正常对照组之间无统计学差异($P>0.05$),在第21天,OPG-NPs组和正常对照组钙离子浓度差异较大($P<0.001$),但和DAG组及NL-OPG-NPs组相比,OPG-NPs组还是显示出较强的抗钙化效果。

[0162] 实施例二

[0163] 1. 载OPG纳米粒的制备

[0164] (1) 骨保护素 (OPG)-磷脂复合物的制备

[0165] 将0.5ugOPG溶解于无菌三蒸水中并调整浓度为1ug/ml,精确称取5mg大豆磷脂溶于0.5ml叔丁醇中,然后将1ml 1ug/mlOPG水溶液和1ml 10mg/ml大豆磷脂/叔丁醇溶液用移液器充分吹打均匀,于冷冻干燥机中在-55℃先预冻1小时后抽空干燥20小时,得到OPG-磷脂复合物。

[0166] (2) 载OPG纳米粒的制备

[0167] 采用乳化溶剂挥发法制备载OPG纳米粒。精确称取6mg马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯 (MAL-PEG-PCL) 和15mg聚己内酯 (PCL) 溶于1ml二氯甲烷中,然后再将步骤(1)所制备的OPG-磷脂复合物溶于其中形成油相(O),5ml 2%PVA水溶液作为水相(W),将油相(O)缓慢滴加至水相(W)中,在磁力搅拌器上以500转/min搅拌0.5min后置于超声杯中,冰浴条件下60W超声2min形成初乳(O/W),然后将初乳置于磁力搅拌器上搅拌4h充分挥干二氯甲烷,再加入50ul Triton X-100继续搅拌30min即得到载OPG的纳米粒。

[0168] 空白纳米粒是采用空白磷脂复合物制备而成,不含有OPG,其他操作步骤如上。

[0169] 实施例二所制备得到的纳米粒按照实施例一的方法使用激光粒度测定仪进行粒径、Zeta电位及分散度指数(PDI)的测定,测定结果为:Zeta电位为-21.7mV,分散度指数(PDI)为0.117,粒径为131.5nm。

[0170] 将实施例二所制备得到的纳米粒按照实施例一所述的方法进行包封率的测试,其结果:包封率为65%。

[0171] 将实施例二所制备得到的纳米粒按照实施例一所述的方法进行体外释试验,结果为:第7天骨保护素的释放量累积达到96%左右。

[0172] 实施例三

[0173] 1. 载OPG纳米粒的制备

[0174] (1) 骨保护素 (OPG)-磷脂复合物的制备

[0175] 将2ugOPG溶解于无菌三蒸水中并调整浓度为1ug/ml,精确称取8mg大豆磷脂溶于0.8ml叔丁醇中,然后将1ml 1ug/mlOPG水溶液和1ml 10mg/ml大豆磷脂/叔丁醇溶液用移液器充分吹打均匀,于冷冻干燥机中在-70℃先预冻3小时后抽空干燥25小时,得到OPG-磷脂复合物。

[0176] (2) 载OPG纳米粒的制备

[0177] 采用乳化溶剂挥发法制备载OPG纳米粒。精确称取5mg马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯 (MAL-PEG-PCL) 和18mg聚己内酯 (PCL) 溶于1.75ml二氯甲烷中,然后再将步骤(1)所制备的OPG-磷脂复合物溶于其中形成油相(O),8ml 2%PVA水溶液作为水相(W),将油相(O)缓慢滴加至水相(W)中,在磁力搅拌器上以500转/min搅拌1.5min后置于超声杯中,冰浴条件下60W超声2min形成初乳(O/W),然后将初乳置于磁力搅拌器上搅拌6h充分挥干二氯甲烷,再加入200ul Triton X-100继续搅拌30min即得到载OPG的纳米粒。

[0178] 空白纳米粒是采用空白磷脂复合物制备而成,不含有OPG,其他操作步骤如上。

[0179] 实施例三所制备得到的纳米粒按照实施例一的方法使用激光粒度测定仪进行粒径、Zeta电位及分散度指数(PDI)的测定,测定结果为:Zeta电位为-19.2mV,分散度指数(PDI)为0.203,粒径为123.9nm。

[0180] 将实施例三所制备得到的纳米粒按照实施例一所述的方法进行包封率的测试,其结果:包封率为69%。

[0181] 将实施例三所制备得到的纳米粒按照实施例一所述的方法进行体外释试验,结果为:第7天骨保护素的释放量累积达到92%左右。

[0182] 实施例四

[0183] 1. 载OPG纳米粒的制备

[0184] (1) 骨保护素(OPG)-磷脂复合物的制备

[0185] 将3 μ gOPG溶解于无菌三蒸水中并调整浓度为1 μ g/ml,精确称取15mg大豆磷脂溶于1.5ml叔丁醇中,然后将1ml 1 μ g/mlOPG水溶液和1ml 10mg/ml大豆磷脂/叔丁醇溶液用移液器充分吹打均匀,于冷冻干燥机中在-80 $^{\circ}$ C先预冻5小时后抽空干燥30小时,得到OPG-磷脂复合物。

[0186] (2) 载OPG纳米粒的制备

[0187] 采用乳化溶剂挥发法制备载OPG纳米粒。精确称取8mg马来酰亚胺-聚乙二醇-聚己内酯(MAL-PEG-PCL)和24mg聚己内酯(PCL)溶于2ml二氯甲烷中,然后再将步骤(1)所制备的OPG-磷脂复合物溶于其中形成油相(O),10ml 2%PVA水溶液作为水相(W),将油相(O)缓慢滴加至水相(W)中,在磁力搅拌器上以500转/min搅拌3min后置于超声杯中,冰浴条件下60W超声2min形成初乳(O/W),然后将初乳置于磁力搅拌器上搅拌8h充分挥干二氯甲烷,再加入300 μ l Triton X-100继续搅拌30min即得到载OPG的纳米粒。

[0188] 空白纳米粒是采用空白磷脂复合物制备而成,不含有OPG,其他操作步骤如上。

[0189] 实施例四所制备得到的纳米粒按照实施例一的方法使用激光粒度测定仪进行粒径、Zeta电位及分散度指数(PDI)的测定,测定结果为:Zeta电位为-12.9mV,分散度指数(PDI)为0.150,粒径为147.6nm。

[0190] 将实施例四所制备得到的纳米粒按照实施例一所述的方法进行包封率的测试,其结果:包封率为66%。

[0191] 将实施例四所制备得到的纳米粒按照实施例一所述的方法进行体外释试验,结果为:第7天骨保护素的释放量累积达到93%左右。

[0192] 实施例二至实施例四所制备得到的缓释纳米粒均具有较强的抗钙化效果。

[0193] 综上所述,本发明利用生物可降解材料,将骨保护素包封于纳米粒中,使骨保护素能从纳米粒中以一定的速率在局部缓慢的释放,本发明所得到的载骨保护素的缓释纳米粒,7天内骨保护素的体外释放率达85~96%,所得到的载OPG的缓释纳米粒在一定的程度上抑制了钙化进程,并表现出较强的抗钙化效果。

[0194] 以上所述,仅是本发明实施的较佳实施例,并非对本发明做任何形式上的限制,凡在本发明的精神和原则之内所做的修改、等同替换和改进等,均需要包含在本发明的保护范围之内。

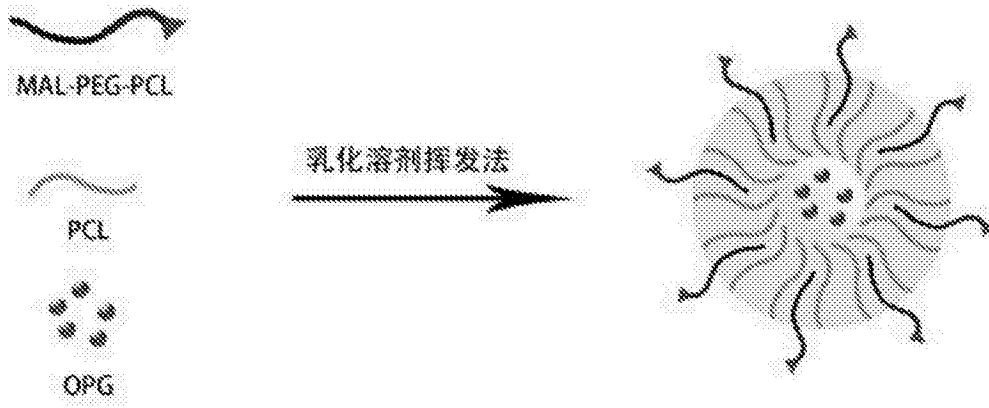


图1

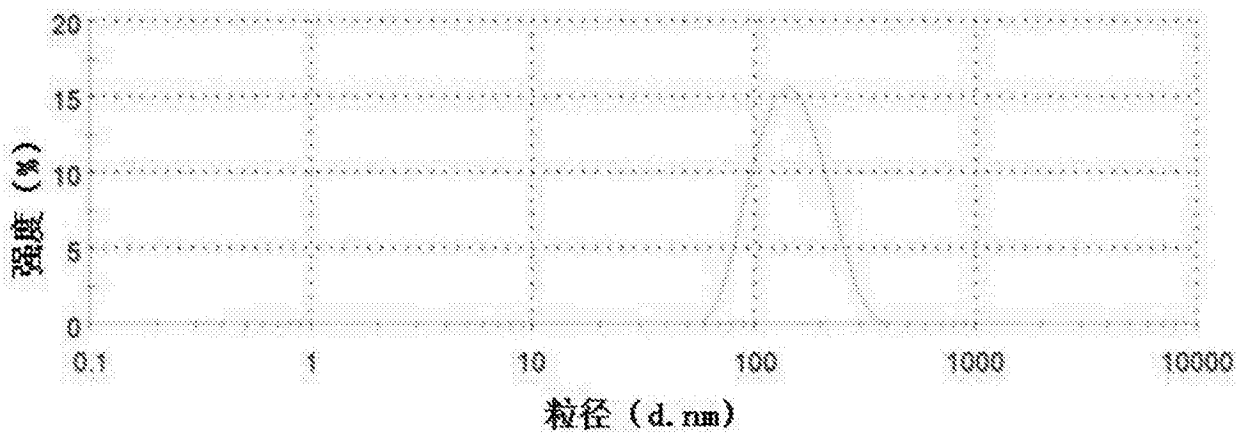


图2

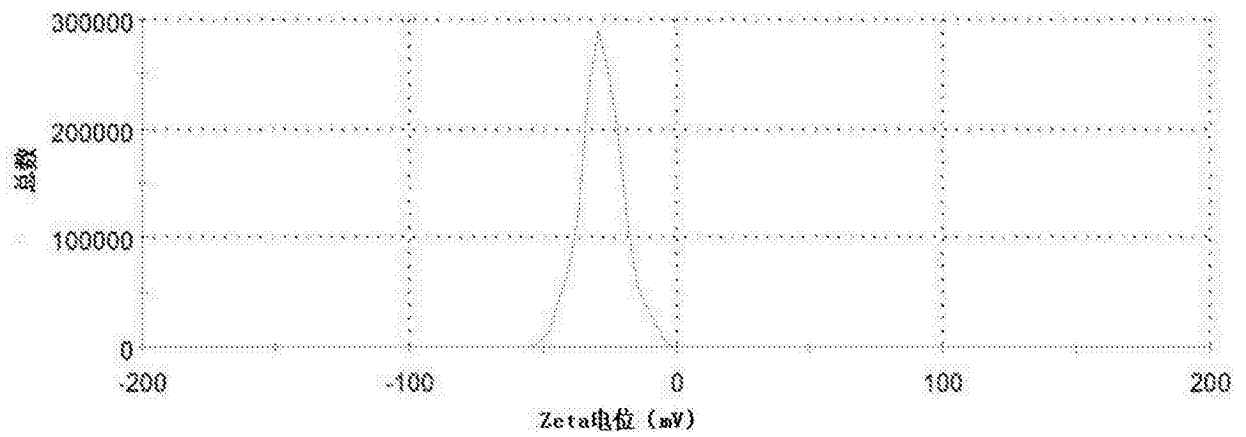


图3

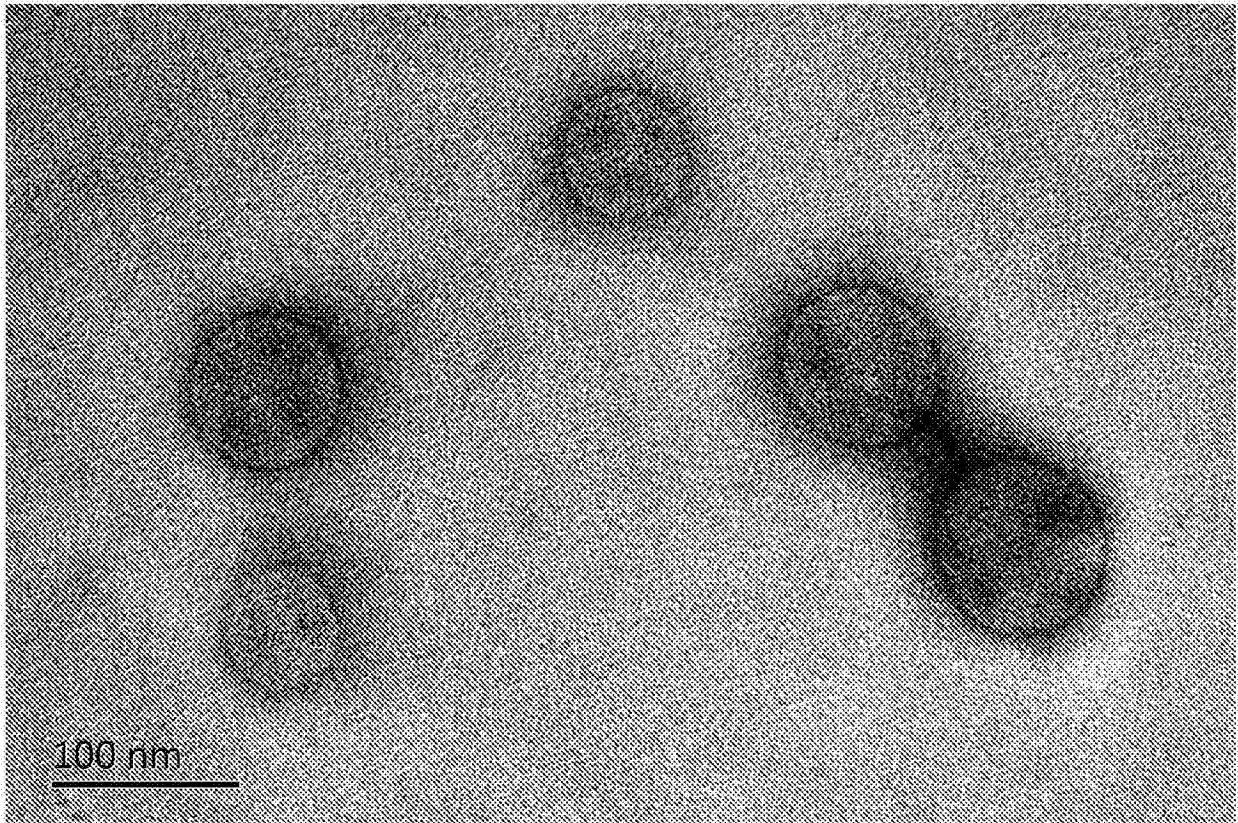


图4

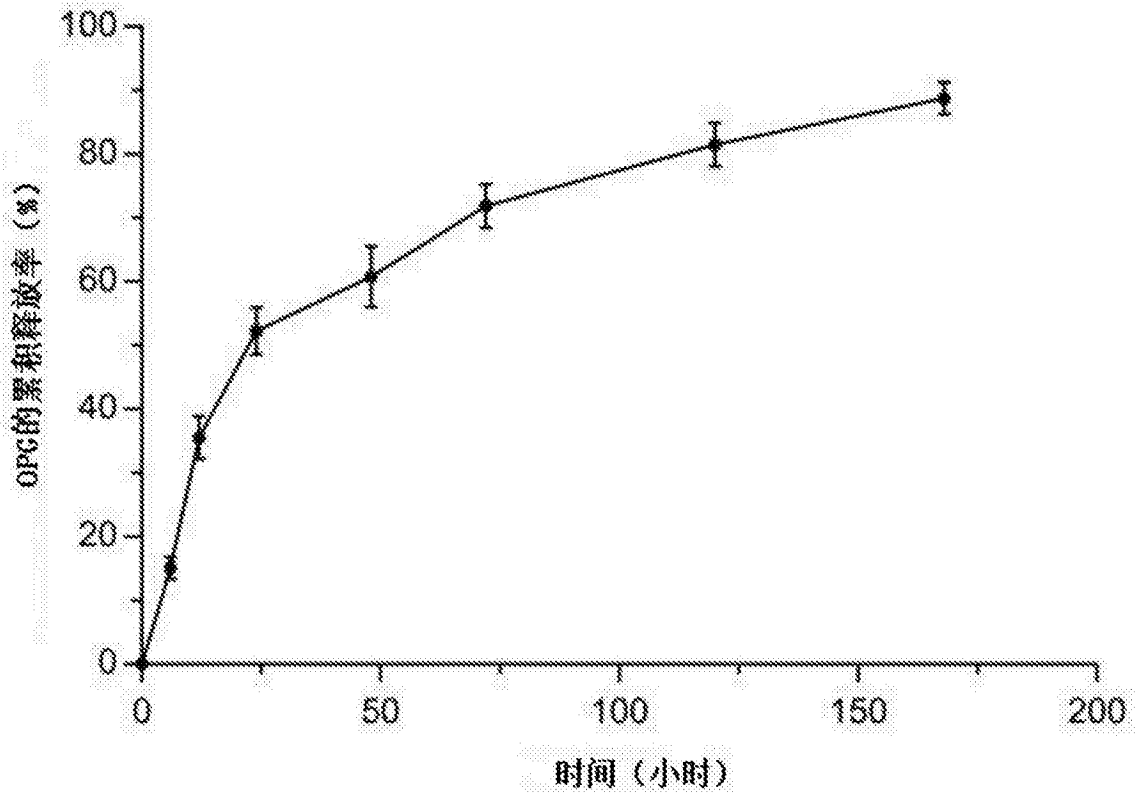


图5

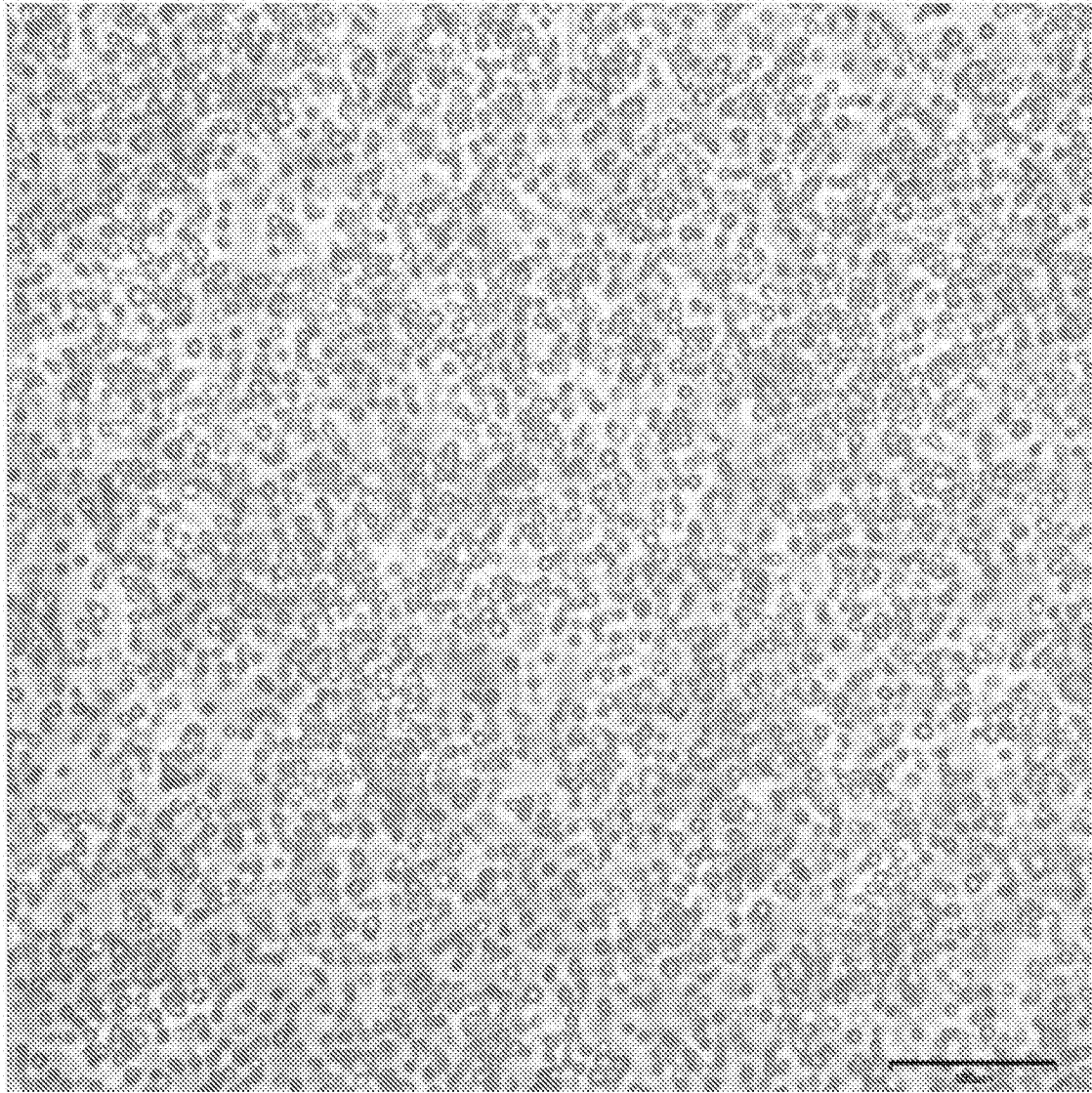


图6-1

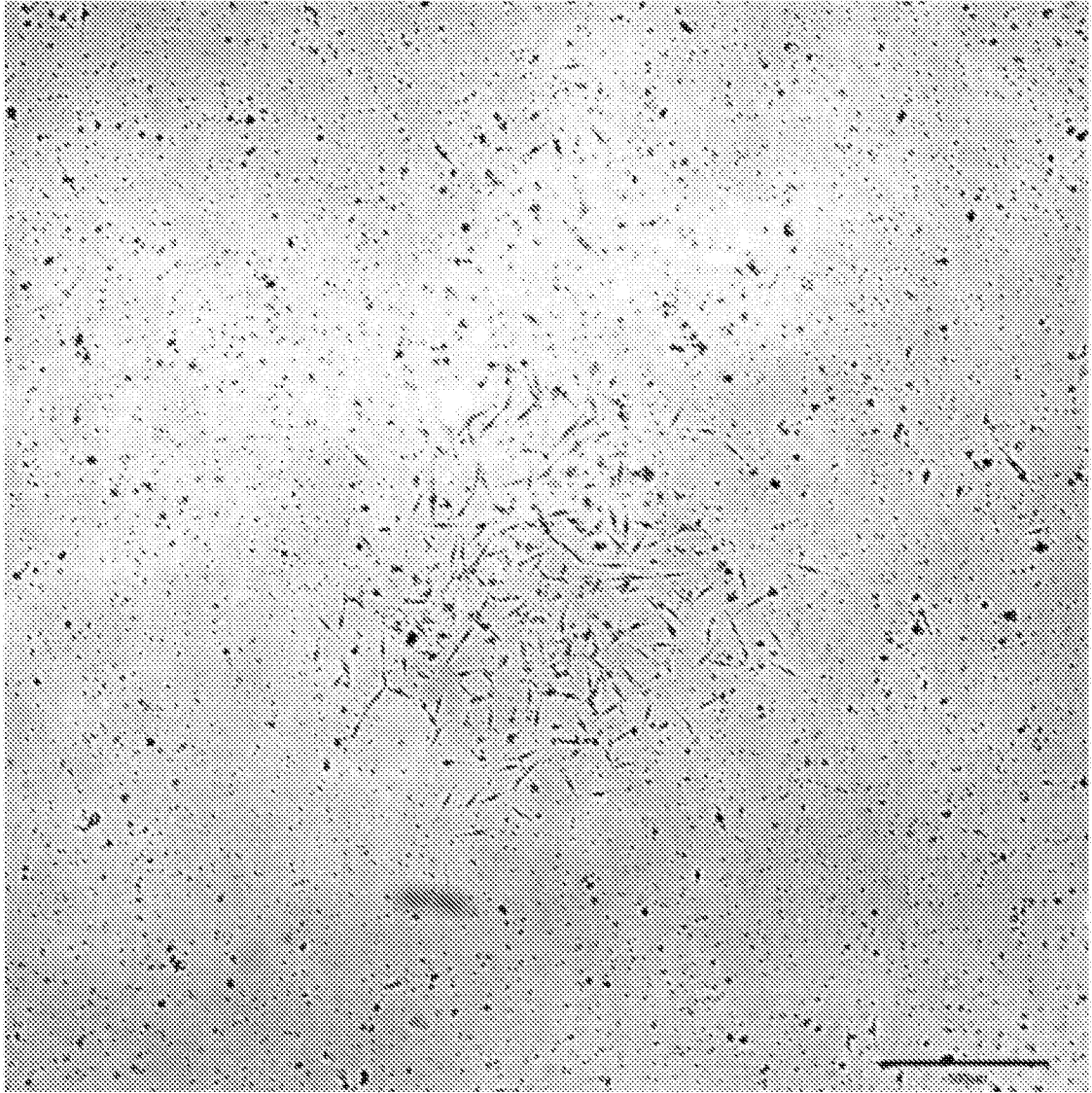


图6-2

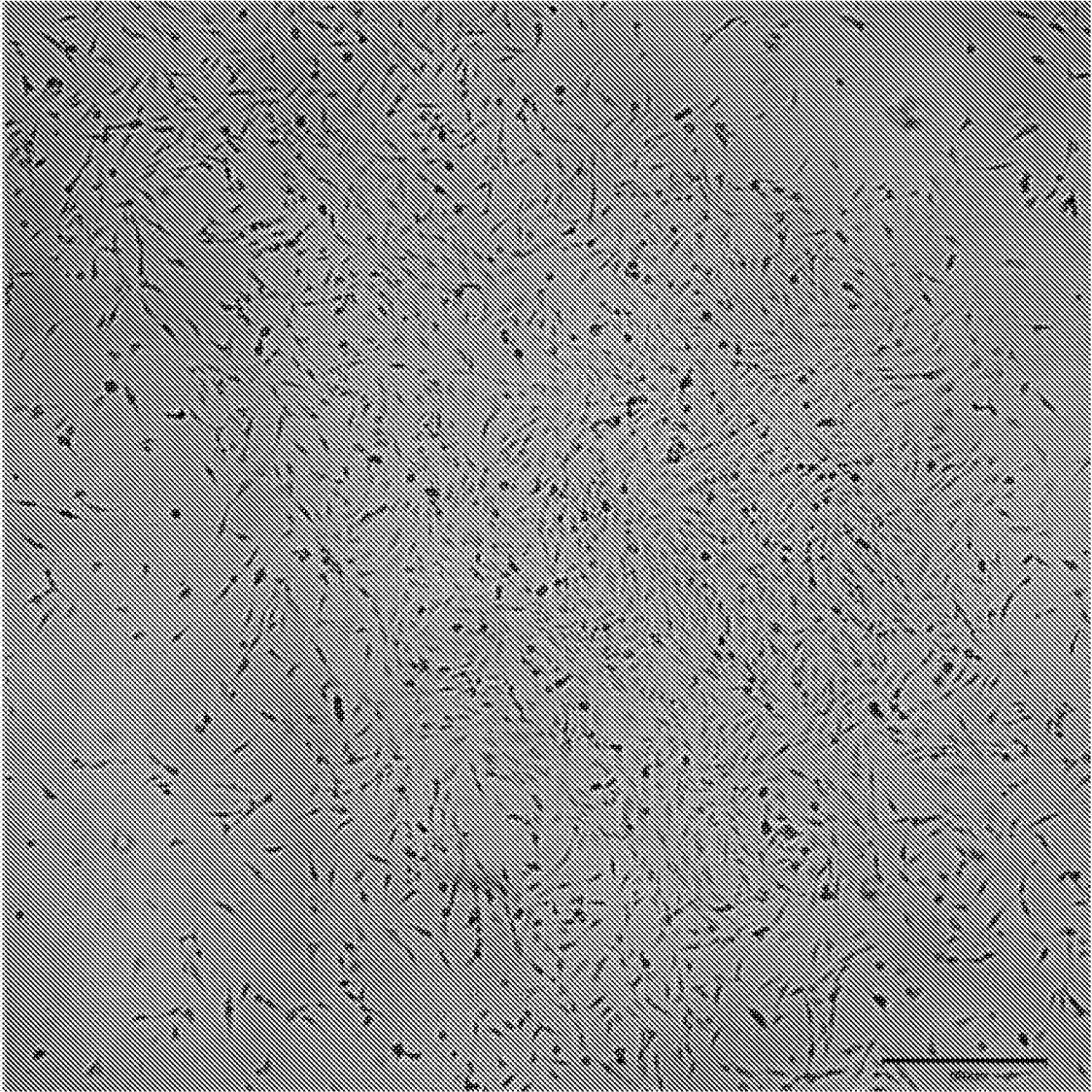


图6-3

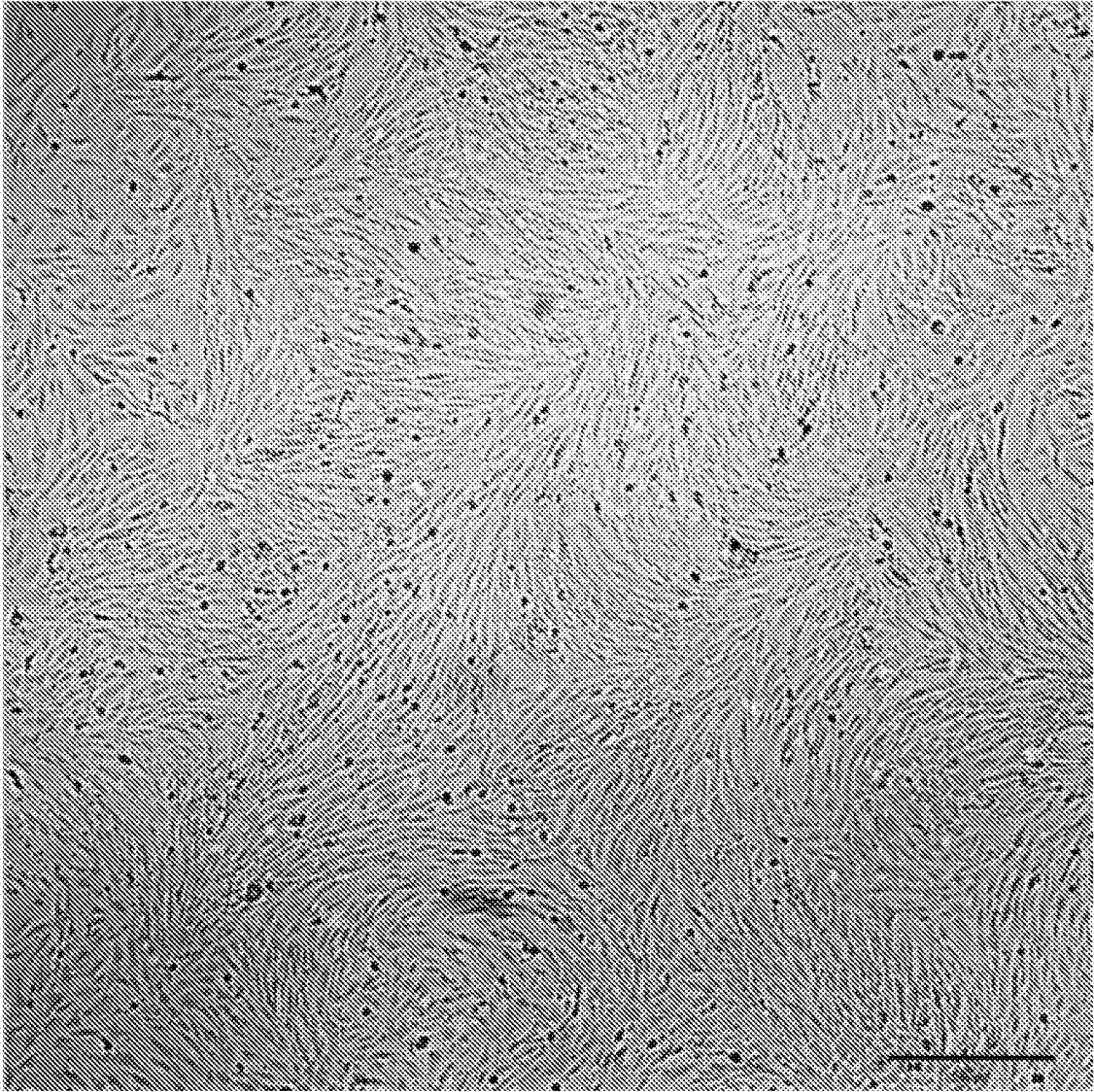


图6-4

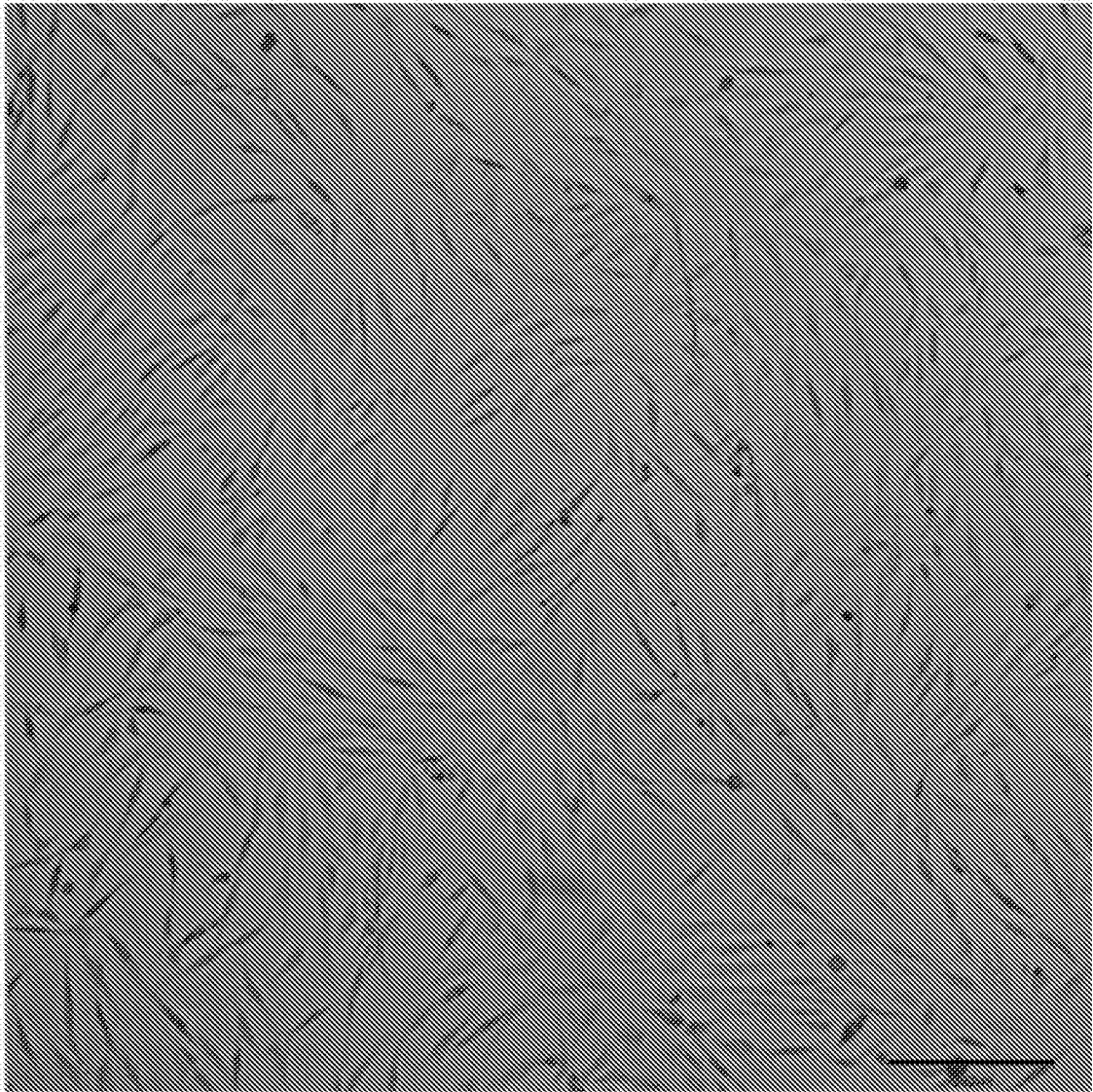


图6-5

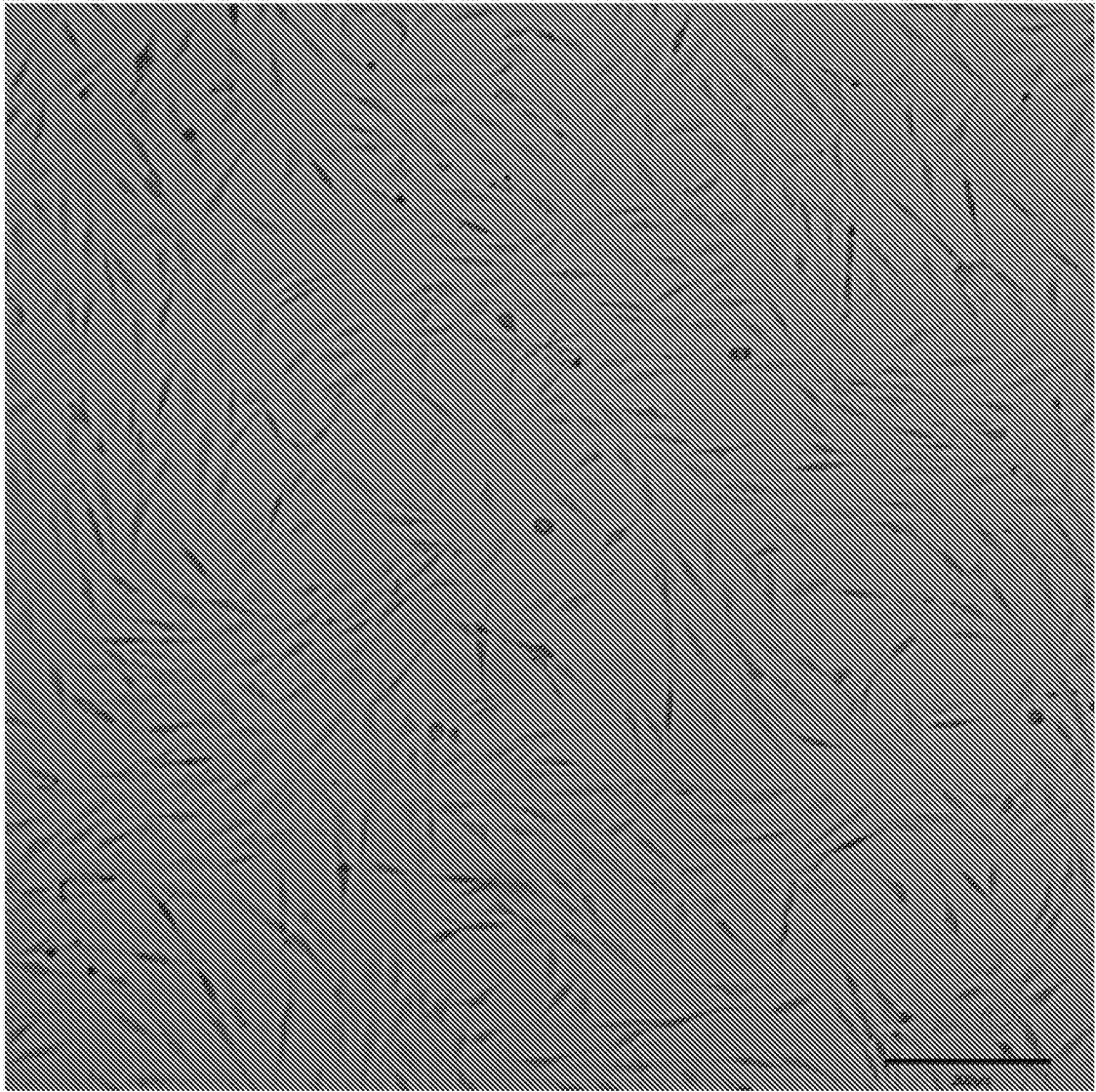


图6-6

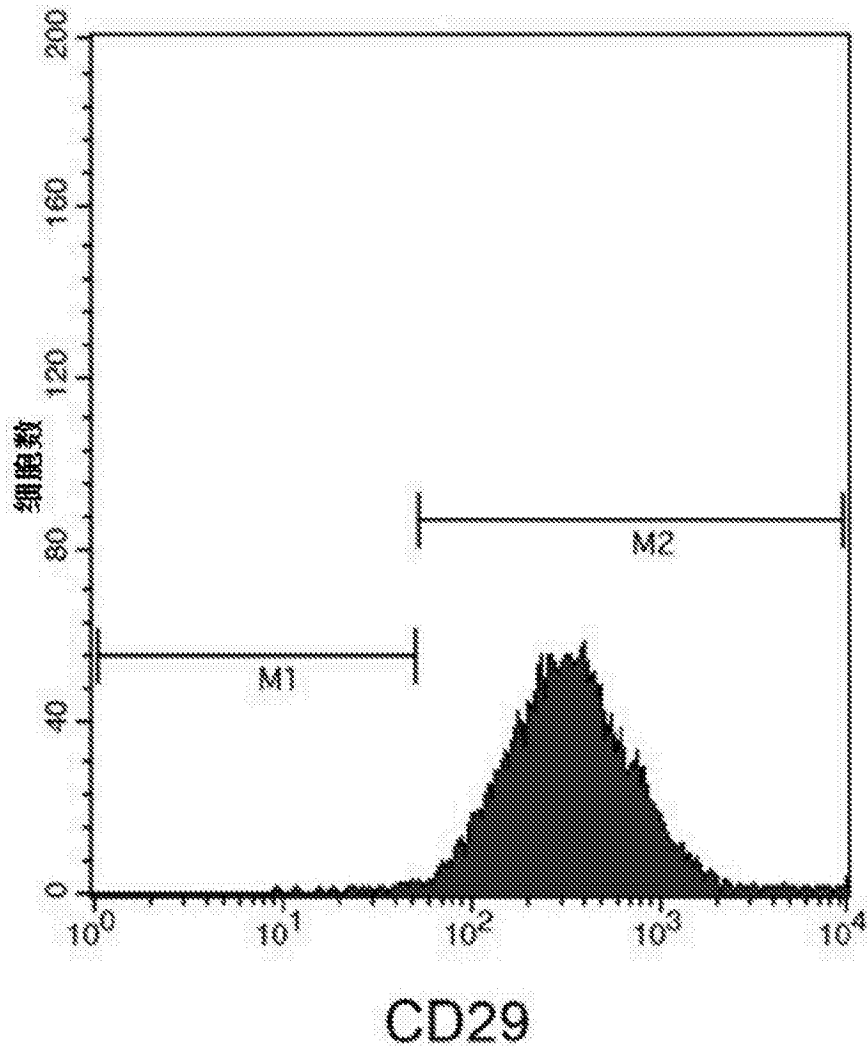


图7-1

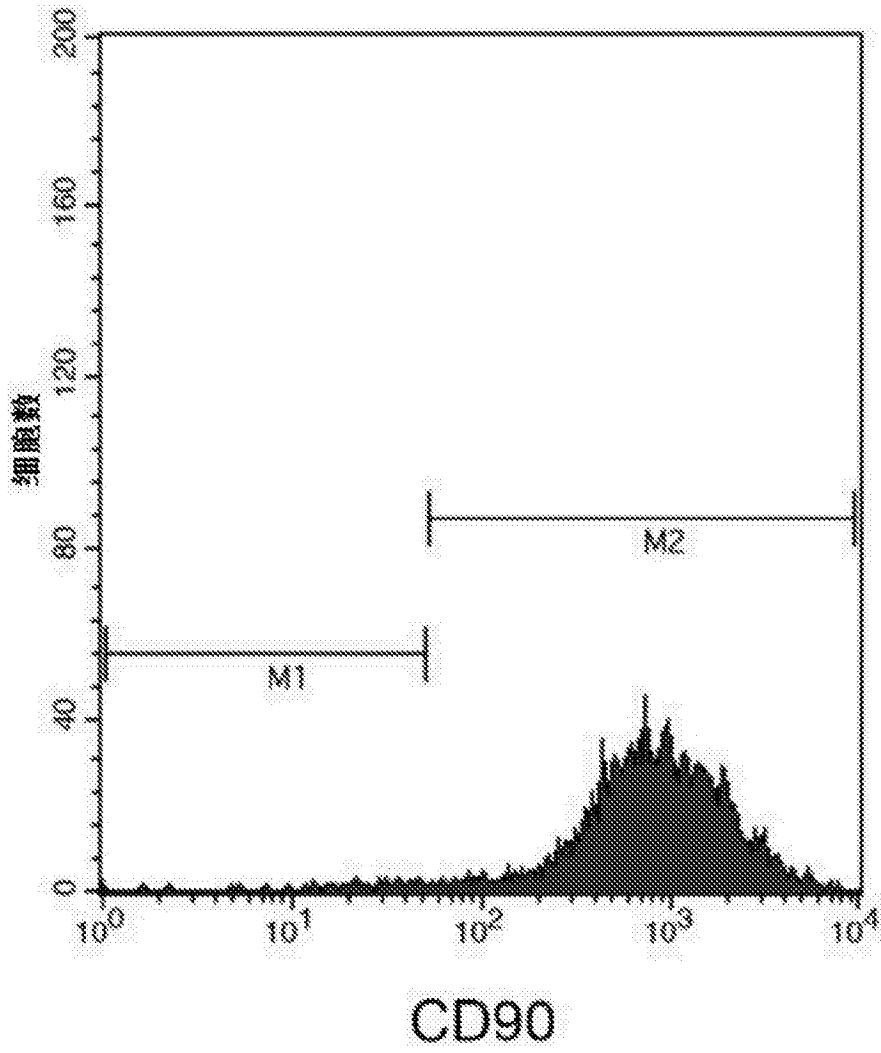


图7-2

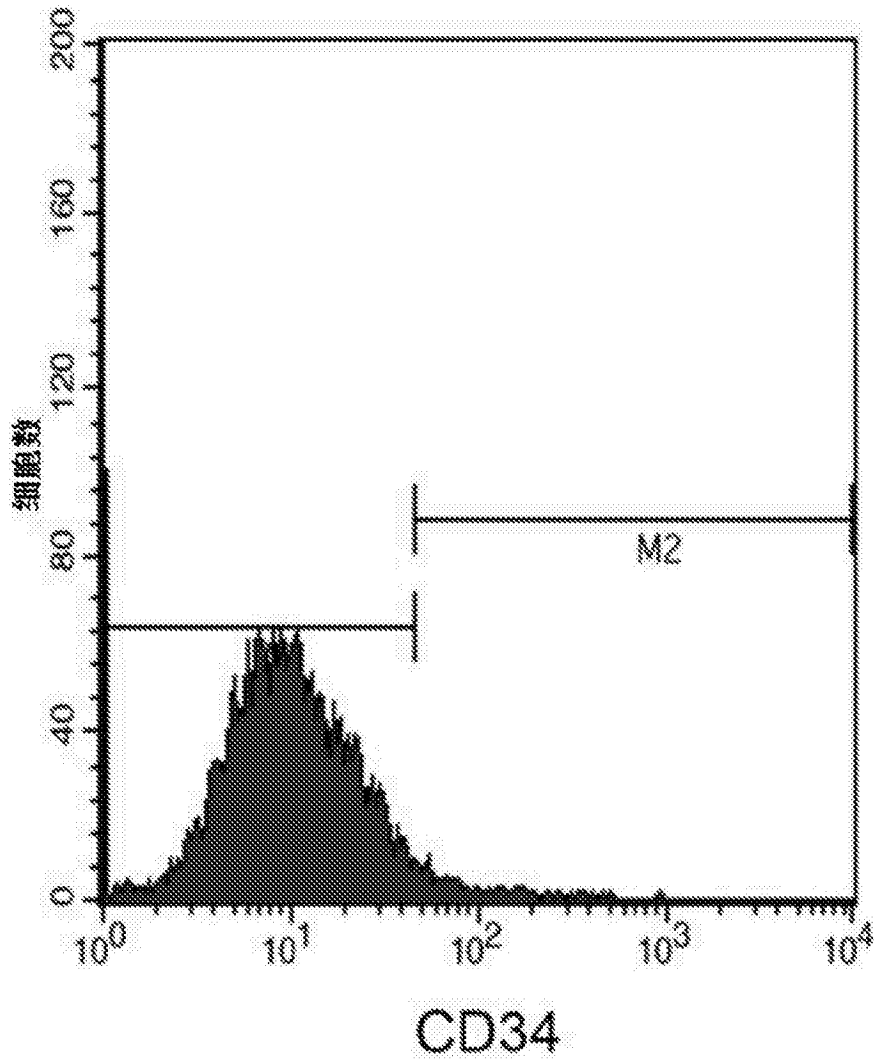


图7-3

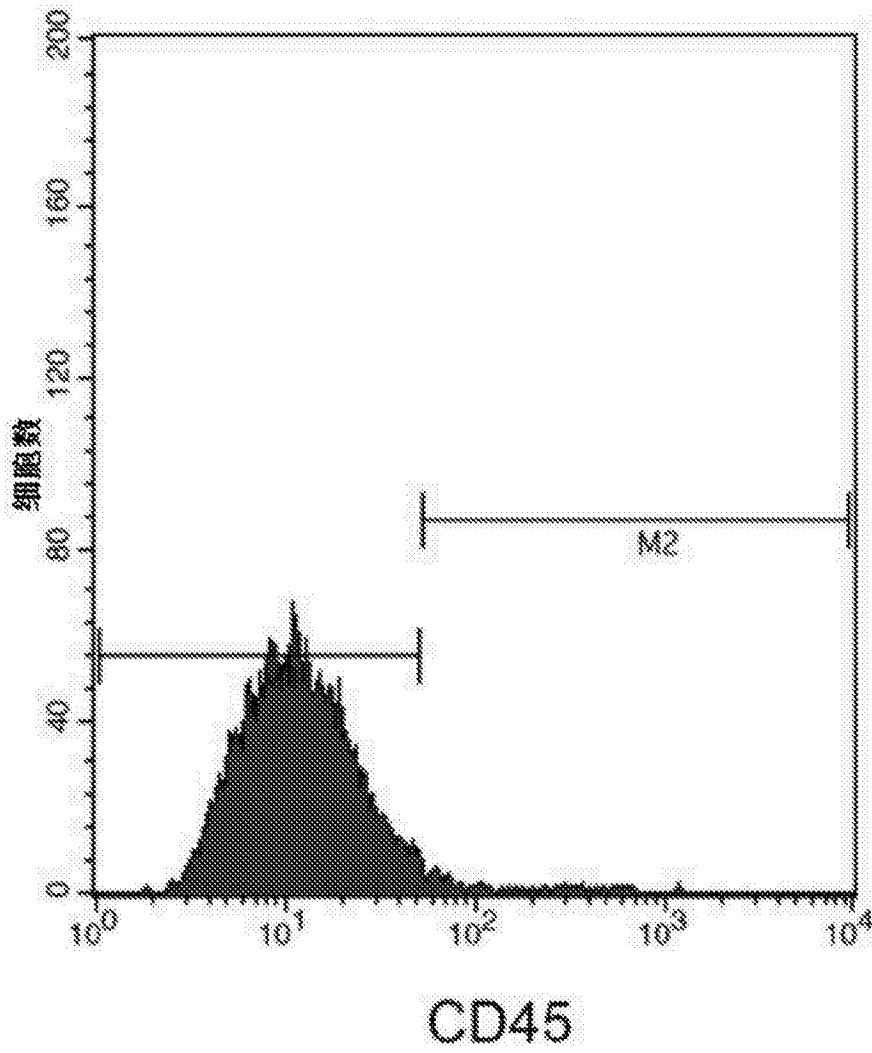


图7-4

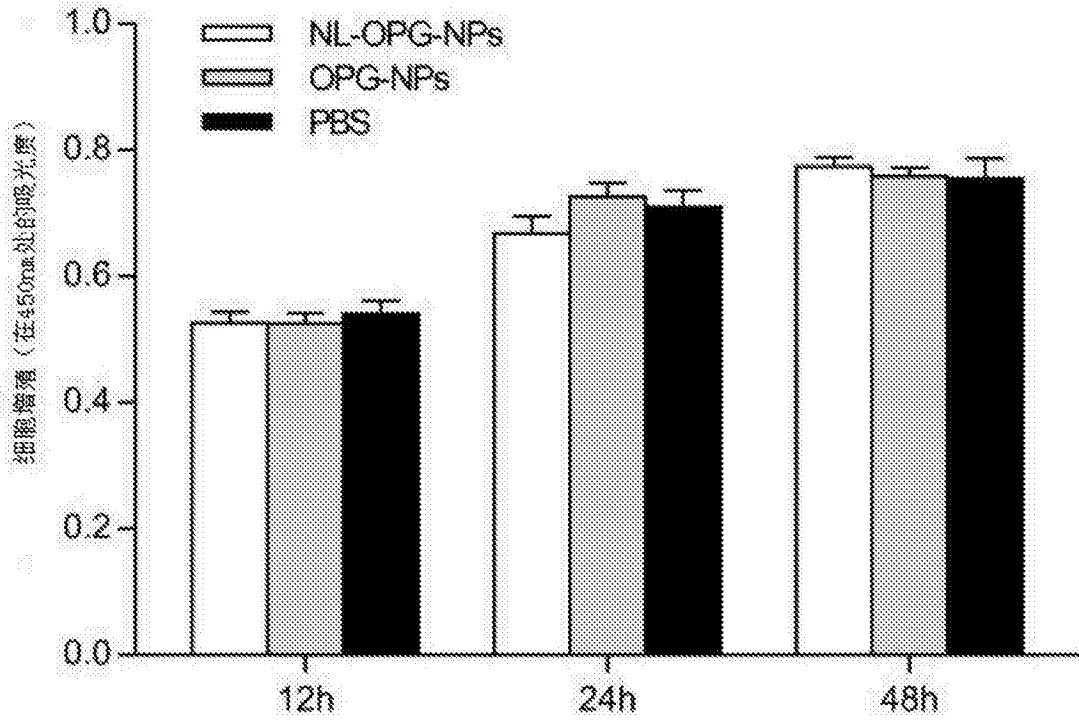


图8

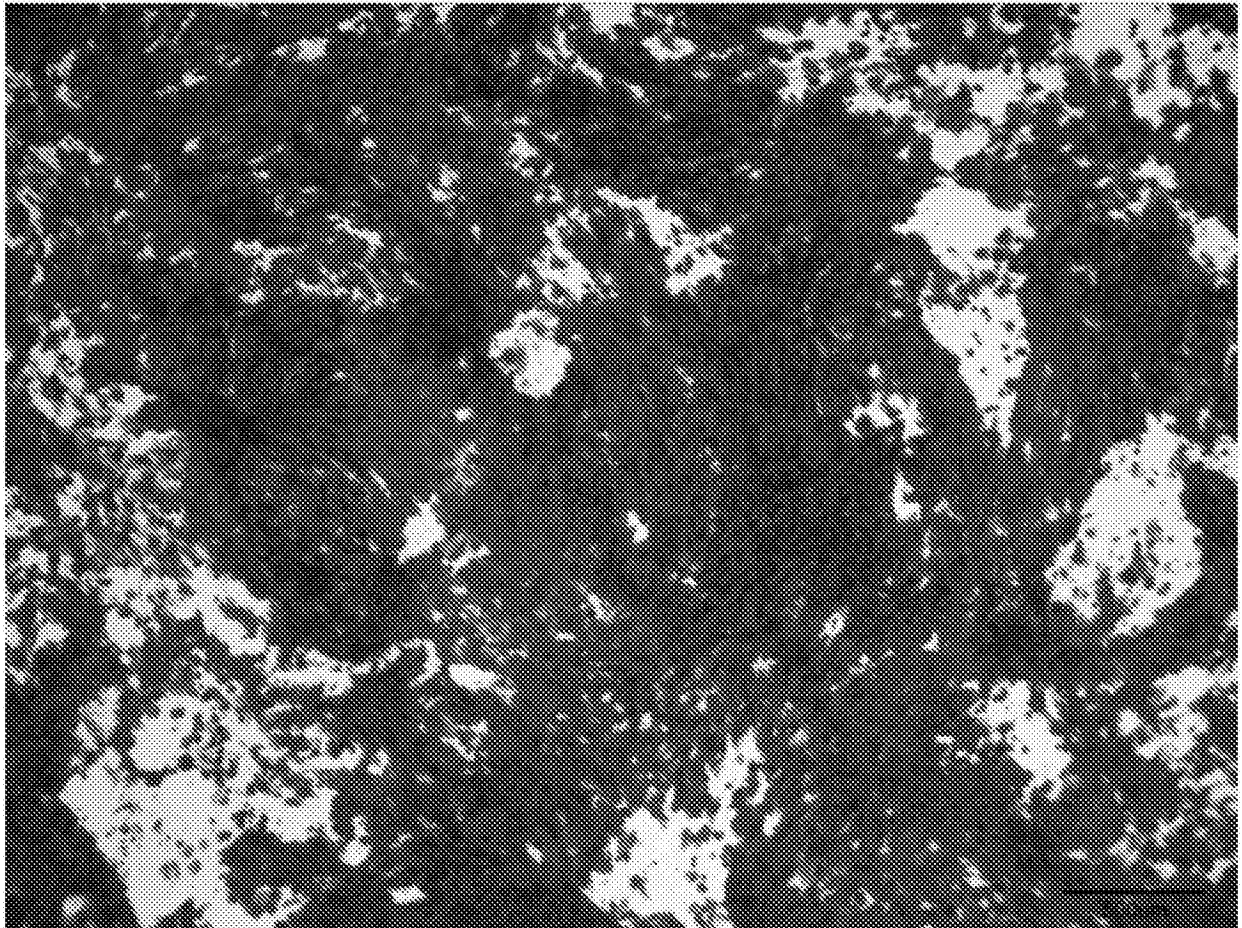


图9-1

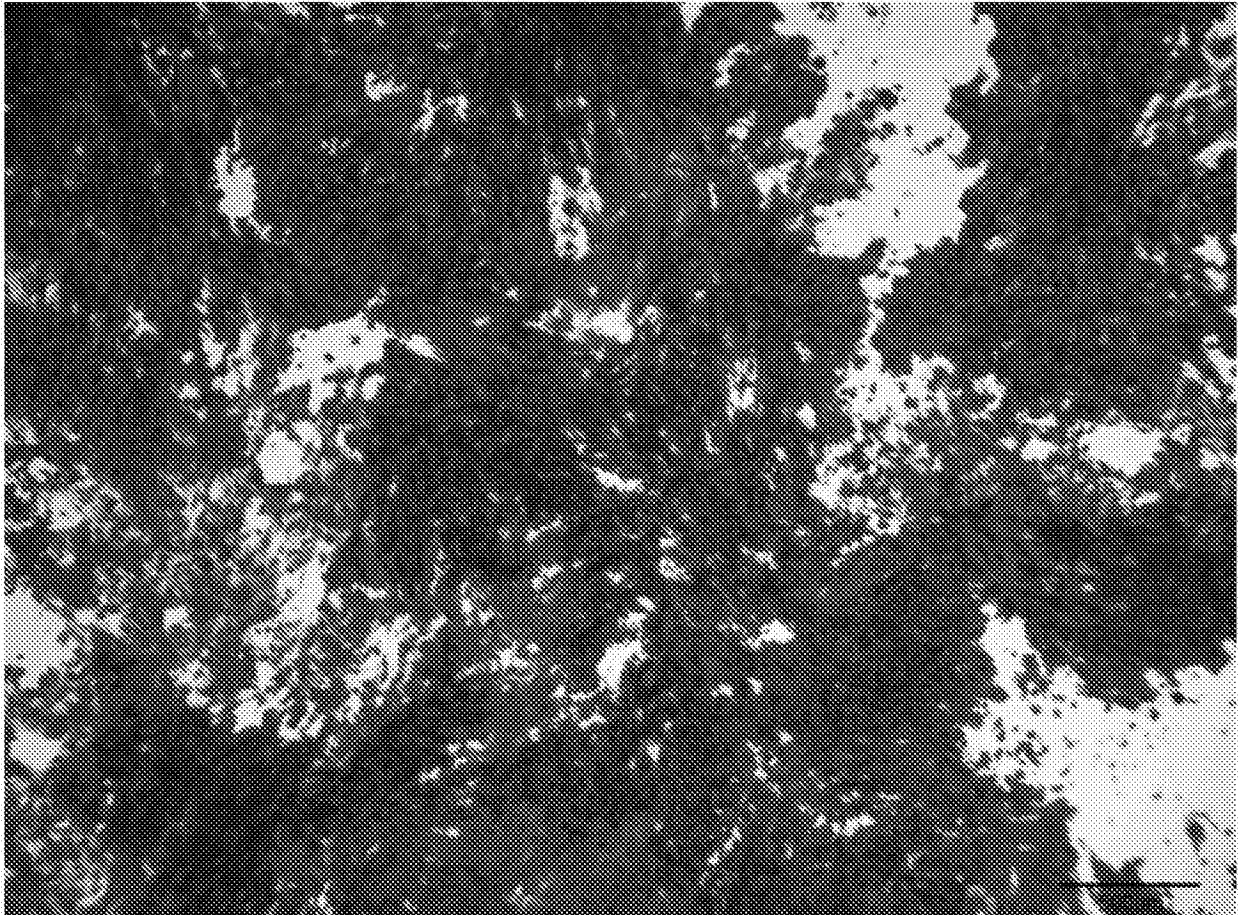


图9-2

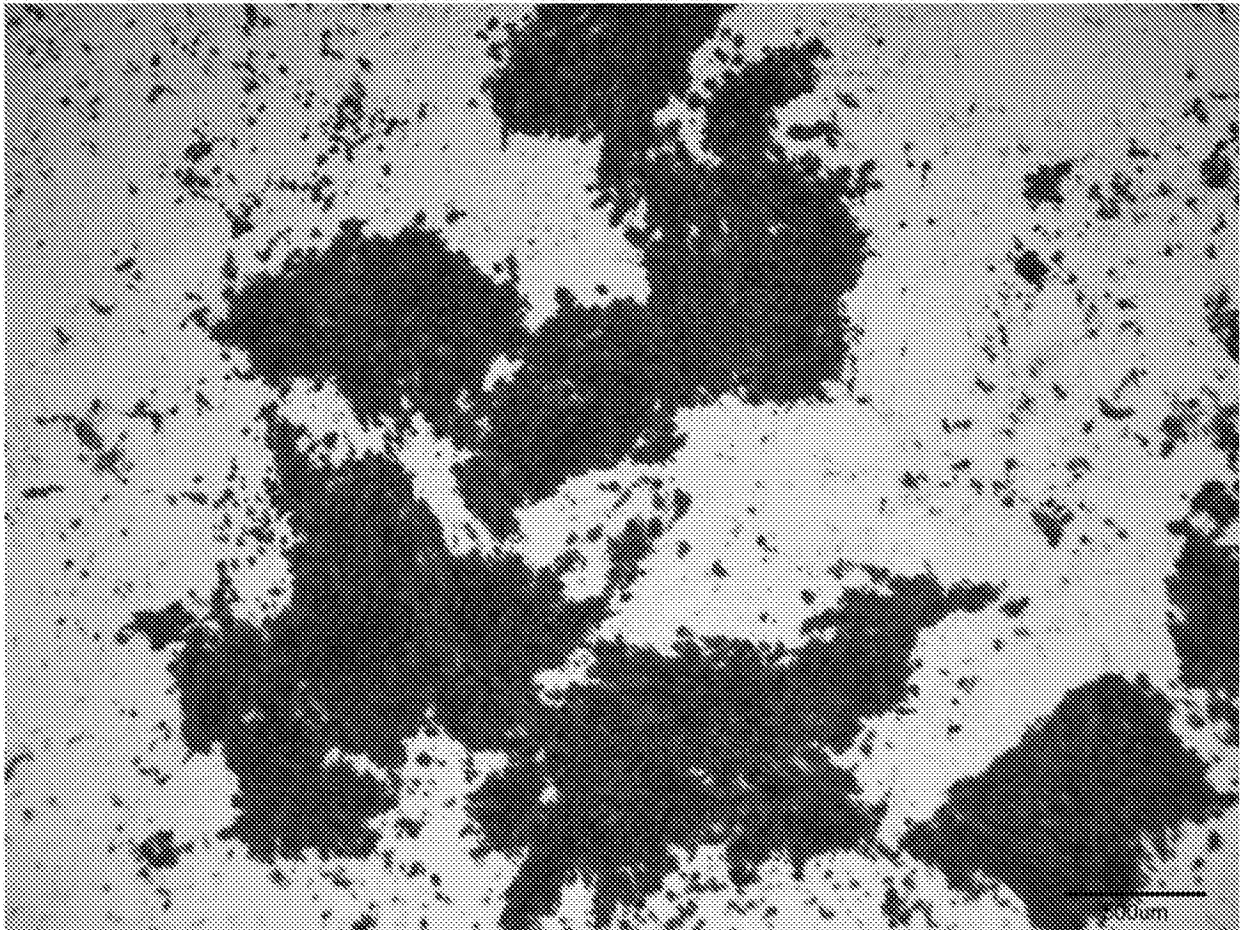


图9-3

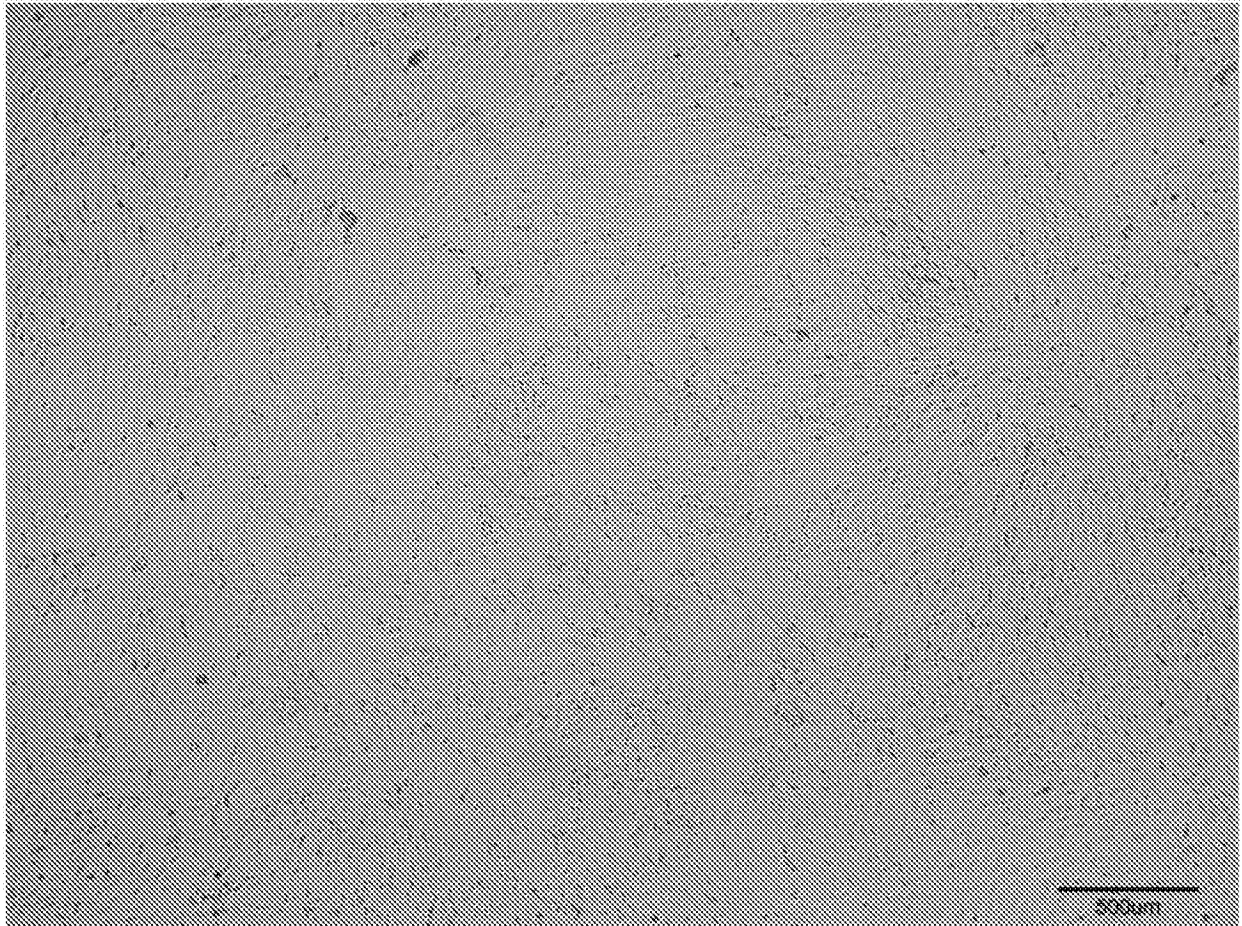


图9-4

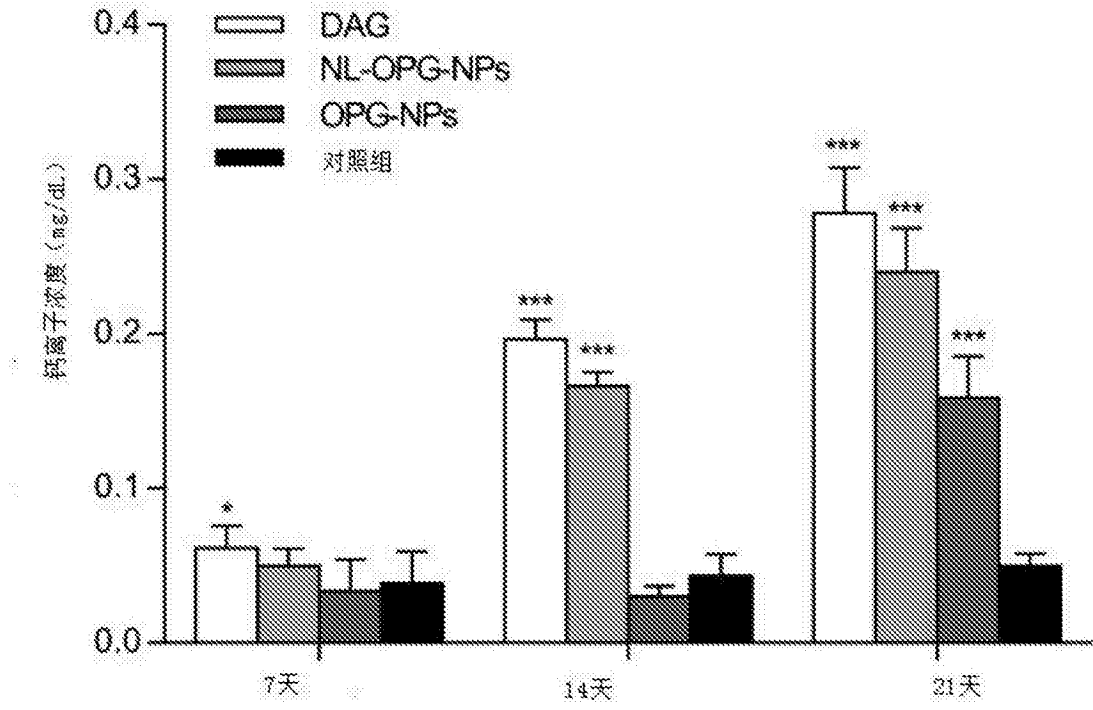


图10