



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113350486 A

(43) 申请公布日 2021.09.07

(21) 申请号 202110761675.8

A61K 31/661 (2006.01)

(22) 申请日 2021.07.06

(71) 申请人 深圳市人民医院

地址 518000 广东省深圳市罗湖区东门北路1017号

(72) 发明人 彭松林 鲍志腾 陈欣 王尚

谭宝玉 王振民 唐榕泽

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司

11332

代理人 王艳斋

(51) Int. Cl.

A61K 38/18 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

A61L 27/22 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图9页

(54) 发明名称

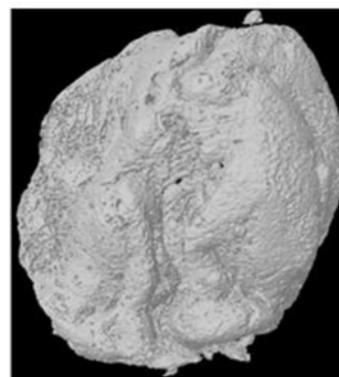
一种具有骨缺损修复功效的药物组合物及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种具有骨缺损修复功效的联合用药物组合物及其应用,所述联合用药物组合物包括重组蛋白rH-BMP2和 β -甘油磷酸钠。本发明创造性地将重组蛋白rH-BMP2和 β -甘油磷酸钠联合使用作为修复骨缺损的联合用药物组合物,能够在rH-BMP2较小剂量的前提下提高数十倍rH-BMP2的成骨效果,有效解决了rH-BMP2活性不足的问题。同时, β -甘油磷酸钠还可以作为静脉磷补充剂满足人体每天对磷的需要。再次, β -甘油磷酸钠作为碱性磷酸酶的底物,在体外补充的BMP2失效以后,仍然可以和自身的BMP2蛋白协同作用,使骨缺损部位得到更快的修复。另外, β -甘油磷酸钠可以作为原料参与合成连接于骨移植材料上,因此可以将rH-BMP2固定于骨移植材料上从而固定在缺损部位,更好地发挥成骨诱导效果。



重组BMP2



协同组

1. 一种具有骨缺损修复功效的联合用药物组合物,其特征在于,所述联合用药物组合物包括重组蛋白rH-BMP2和 β -甘油磷酸钠。

2. 如权利要求1所述的联合用药物组合物,其特征在于,所述联合用药物组合物的剂型包括混悬剂、颗粒剂、胶囊剂、散剂、片剂、乳剂、溶液剂、滴丸剂、注射剂、栓剂、灌肠剂、气雾剂、贴剂或滴剂中的任意一种。

3. 如权利要求1所述的联合用药物组合物,其特征在于,所述联合用药物组合物还包括药剂学上可接受药用辅料;

优选地,所述辅料包括载体、稀释剂、赋形剂、填充剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂、乳化剂、助溶剂、增溶剂、渗透压调节剂、表面活性剂、包衣材料、着色剂、pH调节剂、抗氧化剂、抑菌剂或缓冲剂中的任意一种或至少两种的组合。

4. 如权利要求1所述的联合用药物组合物,其特征在于,所述联合用药物的给药途径包括口服给药、舌下给药、直肠给药、皮肤黏膜给药、吸入给药或注射给药。

5. 如权利要求1所述的联合用药物组合物,其特征在于,所述联合用药物组合物为单一的复方制剂。

6. 如权利要求1所述的联合用药物组合物,其特征在于,所述联合用药物组合物为重组蛋白rH-BMP2制剂和 β -甘油磷酸钠制剂两种单独的制剂的组合;

优选地,所述两种单独的制剂同时施用;

优选地,所述两种单独的制剂依次施用。

7. 如权利要求1所述的联合用药物组合物,其特征在于,所述联合用药物组合物增强成肌细胞和成骨细胞前体细胞碱性磷酸酶的活性;

优选地,所述联合用药物组合物促进成肌细胞C2C12和成骨细胞前体细胞MC3T3E1-14的成骨分化。

8. 如权利要求1-7任一项所述的联合用药物组合物在制备修复骨缺损的药物中的应用。

9. 如权利要求1-7任一项所述的联合用药物组合物在制备骨移植材料中的应用。

10. 一种骨移植材料,其特征在于,所述骨移植材料包括基体材料和负载于基体材料上的如权利要求1-7任一项所述的联合用药物组合物。

一种具有骨缺损修复功效的药物组合物及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,涉及一种具有骨缺损修复功效的药物组合物及其应用。

背景技术

[0002] 骨缺损的修复及骨再生是临床医学的重要难题,目前临床上对于大段骨缺损的患者主要通过自体骨移植、异体骨移植和组织工程材料移植等手段来修复和愈合。自体骨移植是较好的选择但来源有限,且难以修复大于移植骨长度1.5倍的骨缺损。异体骨移植虽然来源较广但具有一定的免疫排斥反应,还容易导致交叉感染。因此人们寻求各种骨替代材料,来避免自体骨和异体骨的缺点,因此组织工程材料移植成为目前骨移植研究的热点。较好的组织工程材料不仅要能够起到骨传导的作用,还要具有骨诱导效果。

[0003] BMP2由于其较好的骨诱导活性,是目前唯一公认的较好的骨生长刺激因子。但CHO来源的BMP2由于生产周期长,成本高,产量低,手术应用还给患者造成很大的经济负担。重组蛋白rH-BMP2避免了上面的问题,所以被目前国内临床脊柱融合手术常常使用,但重组蛋白rH-BMP2一般是在细菌表达系统纯化的BMP2蛋白,由于原核细胞缺少翻译后修饰系统,其活性明显要低于中国仓鼠卵巢细胞CHO来源的BMP2,如果大剂量使用又容易导致异位骨化,骨囊肿和炎症等副反应。因此需要开发一种不需要加大剂量使用rH-BMP2就能使rH-BMP2效果放大数倍的策略。

[0004] 同时,BMP2直接应用的缺点是在体内容易降解,半衰期短且不固定在缺损部位,因此常常和组织工程材料复合用于减缓蛋白降解和流动。

发明内容

[0005] 针对现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种具有骨缺损修复功效的药物组合物及其应用。

[0006] 为达到此发明目的,本发明采用以下技术方案:

[0007] 第一方面,本发明提供一种具有骨缺损修复功效的联合用药物组合物,所述联合用药物组合物包括重组蛋白rH-BMP2和 β -甘油磷酸钠。

[0008] 本发明创造性地将重组蛋白rH-BMP2和 β -甘油磷酸钠联合使用作为修复骨缺损的联合用药物组合物, β -甘油磷酸钠是成骨诱导液的成分之一,常和抗坏血酸配伍体外诱导骨髓间充质干细胞向成骨分化,当其与rH-BMP2联用时能够在rH-BMP2较小剂量的前提下提高数十倍rH-BMP2基因水平和数倍蛋白水平的成骨效果,有效解决了rH-BMP2活性不足的问题。其中rH-BMP2作为一种常见的骨生长刺激因子,其能够诱导成肌细胞往成骨细胞分化,使成肌细胞的碱性磷酸酶ALP活性增强,而 β -甘油磷酸钠是ALP的底物,其在ALP催化下释放出更多的无机磷,无机磷的增加促进形成更多的羟基磷灰石参与骨质的形成,从而正反馈整个成骨通路。

[0009] 同时, β -甘油磷酸钠还可以作为静脉磷补充剂满足人体每天对磷的需要。再次, β -

甘油磷酸钠作为碱性磷酸酶的底物,在体外补充的BMP2失效以后,仍然可以和自身的BMP2蛋白协同作用,使骨缺损部位得到更快的修复。另外,BMP2直接应用的缺点是在体内容易降解,半衰期短且不固定在缺损部位,而 β -甘油磷酸钠可以作为原料参与合成连接于骨移植材料上,因此可以将rH-BMP2固定于骨移植材料上从而固定在缺损部位,更好地发挥成骨诱导效果。

[0010] 在本发明中,所述联合用药物组合物的剂型包括混悬剂、颗粒剂、胶囊剂、散剂、片剂、乳剂、溶液剂、滴丸剂、注射剂、栓剂、灌肠剂、气雾剂、贴剂或滴剂中的任意一种。

[0011] 优选地,所述联合用药物组合物还包括药剂学上可接受药用辅料。

[0012] 本发明所述联合用药物组合物可单独给药也可以与辅料搭配做成适当的剂型进行给药。

[0013] 优选地,所述辅料包括载体、稀释剂、赋形剂、填充剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂、乳化剂、助溶剂、增溶剂、渗透压调节剂、表面活性剂、包衣材料、着色剂、pH调节剂、抗氧剂、抑菌剂或缓冲剂中的任意一种或至少两种的组合。

[0014] 所述至少两种的组合例如稀释剂和赋形剂的组合、粘合剂和润湿剂的组合、乳化剂和助溶剂的组合等,其他任意的组合方式均可选择,在此便不再一一赘述。

[0015] 在本发明中,所述联合用药物的给药途径包括口服给药、舌下给药、直肠给药、皮肤黏膜给药、吸入给药或注射给药。

[0016] 优选地,所述联合用药物组合物为单一的复方制剂。

[0017] 优选地,所述联合用药物组合物为重组蛋白rH-BMP2制剂和 β -甘油磷酸钠制剂两种单独的制剂的组合。

[0018] 优选地,所述两种单独的制剂同时施用。

[0019] 优选地,所述两种单独的制剂依次施用。

[0020] 所述联合用药物组合物可以为单一的复方制剂形式,也可以为两种单独的制剂的组合;当为两种单独的制剂的组合时,其用药方式可以为同时施用,也可以为依次施用,例如可以先施用重组蛋白rH-BMP2,间隔一段时间再施用 β -甘油磷酸钠,也可以先施用 β -甘油磷酸钠,间隔一段时间再施用重组蛋白rH-BMP2,或者两种交替施用。

[0021] 在本发明中,所述联合用药物组合物增强成肌细胞(例如C2C12)和成骨细胞前体细胞(例如MC3T3E1-14)的碱性磷酸酶的活性。

[0022] 在本发明中,所述联合用药物组合物促进成肌细胞(例如C2C12)和成骨细胞前体细胞(例如MC3T3E1-14)的成骨分化。

[0023] 第二方面,本发明提供一种如第一方面所述的联合用药物组合物在制备修复骨缺损的药物中的应用。

[0024] 第三方面,本发明提供一种如第一方面所述的联合用药物组合物在制备骨移植材料中的应用。

[0025] 第四方面,本发明提供一种骨移植材料,所述骨移植材料包括基体材料和负载于基体材料上的如第一方面所述的联合用药物组合物。

[0026] 相对于现有技术,本发明具有以下有益效果:

[0027] 本发明创造性地将重组蛋白rH-BMP2和 β -甘油磷酸钠联合使用作为修复骨缺损的联合用药物组合物, β -甘油磷酸钠是成骨诱导液的成分之一,常和抗坏血酸配伍体外诱导

骨髓间充质干细胞向成骨分化,当其与rH-BMP2联用时能够在rH-BMP2较小剂量的前提下提高数十倍rH-BMP2基因水平和数倍蛋白水平的成骨效果,有效解决了rH-BMP2活性不足的问题。其中rH-BMP2作为一种常见的骨生长刺激因子,其能够诱导成肌细胞和成骨细胞前体细胞往成骨细胞分化,使成肌细胞和成骨细胞前体细胞的碱性磷酸酶ALP活性增强,而 β -甘油磷酸钠是ALP的底物,其在ALP催化下释放出更多的无机磷,无机磷的增加促进形成更多的羟基磷灰石参与骨质的形成,从而正反馈整个成骨通路。

[0028] 同时, β -甘油磷酸钠还可以作为静脉磷补充剂满足人体每天对磷的需要。再次, β -甘油磷酸钠作为碱性磷酸酶的底物,在体外补充的BMP2失效以后,仍然可以和自身的BMP2蛋白协同作用,使骨缺损部位得到更快的修复。另外,BMP2直接应用的缺点是在体内容易降解,半衰期短且不固定在缺损部位,而 β -甘油磷酸钠可以作为原料参与合成连接于骨移植材料上,因此可以将rH-BMP2固定于骨移植材料上从而固定在缺损部位,更好地发挥成骨诱导效果。

附图说明

[0029] 图1是本发明实施例1中所提供的C2C12细胞3天的ALP染色图;

[0030] 图2是本发明实施例1中所提供的C2C12细胞7天的ALP染色图;

[0031] 图3是本发明实施例1中所提供的MC3T3E1-14细胞3天的ALP染色图;

[0032] 图4是本发明实施例2中所提供的C2C12细胞7天的实时荧光定量PCR结果统计图(ALP);

[0033] 图5是本发明实施例2中所提供的C2C12细胞7天的实时荧光定量PCR结果统计图(RUNX2);

[0034] 图6是本发明实施例2中所提供的C2C12细胞7天的实时荧光定量PCR结果统计图(COL1);

[0035] 图7是本发明实施例2中所提供的C2C12细胞7天的实时荧光定量PCR结果统计图(OCN);

[0036] 图8是本发明实施例2中所提供的MC3T3E1-14细胞7天的实时荧光定量PCR结果统计图(ALP);

[0037] 图9是本发明实施例2中所提供的MC3T3E1-14细胞7天的实时荧光定量PCR结果统计图(OCN);

[0038] 图10是本发明实施例3中所提供的C2C12细胞14天的茜素红染色图;

[0039] 图11是本发明实施例3中所提供的MC3T3E1-14细胞14天的茜素红染色图;

[0040] 图12是各组C57小鼠异位骨micro CT结果图;

[0041] 图13是各组C57小鼠组织体积统计结果图;

[0042] 图14是各组C57小鼠骨体积统计结果图;

[0043] 图15是各组SD大鼠颅骨缺损micro CT结果图;

[0044] 图16是各组SD大鼠骨密度统计结果图;

[0045] 图17是各组SD大鼠相对骨体积统计结果图。

具体实施方式

[0046] 下面通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案。本领域技术人员应该明了,所述实施例仅仅是帮助理解本发明,不应视为对本发明的具体限制。

[0047] 下述实施例所涉及的rH-BMP2来源于R&D systems,型号为355-BM-050/CF; β -甘油磷酸钠购自于sigma-aldrich,型号为35675-250GM;C2C12细胞来源于普诺赛,型号为CL-0044;C57BL/6J小鼠来源于广东省医学实验动物中心;SD大鼠来源广东省医学实验动物中心;医用明胶海绵购自于广州快康医疗器械有限公司,型号为A型。

[0048] 实施例1

[0049] 探究联合用药物组合物对C2C12和MC3T3E1-14细胞中ALP活性的影响:

[0050] 将C2C12细胞以每孔 5×10^5 细胞数铺板24板,待细胞贴壁后,对照组换成高糖DMEM+10%FBS+1%青霉素和链霉素培养基; β -甘油磷酸钠组在培养基中加入 β -甘油磷酸钠,培养基中终浓度为10mM;rH-BMP2组加入重组BMP2,终浓度为100ng/mL;协同组含有 β -甘油磷酸钠和rH-BMP2,终浓度与单纯组一致。以后隔1天换液,诱导3或7天后弃去培养基,PBS洗3遍,4%多聚甲醛固定10min,ddH₂O洗3遍。用BCIP/NBT碱性磷酸酶显色试剂盒染色1h。弃掉染色液,用ddH₂O洗3遍。置于显微镜下拍照,结果分别如图1和图2所示(图片标尺为500 μ m)。

[0051] 将MC3T3E1-14细胞以每孔 2.5×10^5 细胞数铺板24板,待细胞贴壁后,对照组成 α -MEM+10%FBS+1%青霉素和链霉素培养基; β -甘油磷酸钠组在培养基中加入 β -甘油磷酸钠,培养基中终浓度为10mM;rH-BMP2组加入重组BMP2,终浓度为100ng/mL;协同组含有 β -甘油磷酸钠和rH-BMP2,终浓度与单纯组一致。以后隔1天换液,诱导3天后弃去培养基,PBS洗3遍,4%多聚甲醛固定10min,ddH₂O洗3遍。用BCIP/NBT碱性磷酸酶显色试剂盒染色1h。弃掉染色液,用ddH₂O洗3遍。置于显微镜下拍照,结果如图3所示(图片标尺为500 μ m)。

[0052] 由图1-3可知:3天时, β -甘油磷酸钠组和空白对照组ALP染色结果一样, β -甘油磷酸钠3天并不显示对C2C12细胞的成骨效果,7天时才显示出微弱的增强效果;rH-BMP2具有诱导C2C12细胞往成骨细胞分化表现为ALP染色加深;而协同组rH-BMP2+ β -甘油磷酸钠明显比rH-BMP2组ALP染色加深很多,表现出强大的增强C2C12细胞ALP活性的能力。所以rH-BMP2协同 β -甘油磷酸钠能够加强C2C12细胞往成骨分化的能力。在成骨前体细胞MC3T3E1-14细胞上显示出和C2C12细胞趋势相同的诱导效果,所以重组BMP2和 β -甘油磷酸钠能够协同促进不同细胞的成骨ALP活性能力。

[0053] 实施例2

[0054] 探究联合用药物组合物对成骨相关基因表达水平的影响:

[0055] 将C2C12细胞以每孔 5×10^5 细胞数铺板24板,待细胞贴壁后,对照组换成高糖DMEM+10%FBS+1%青霉素和链霉素; β -甘油磷酸钠组在培养基中加入 β -甘油磷酸钠,终浓度为10mM;rH-BMP2组加入重组BMP2,终浓度为100ng/mL;协同组含有 β -甘油磷酸钠和rH-BMP2,终浓度和单纯组一致。以后隔1天换液,诱导7天后弃去培养基,PBS洗3遍,每孔加入1mL TRIZOL裂解细胞,在裂解液中加入200 μ L氯仿充分震荡后放置10min,12000rpm离心15min;取上清加入同体积异丙醇,混匀后放置10min,12000rpm离心10min;弃去上清,沉淀用DEPC水配的75%酒精洗1遍,12000rpm离心5min;弃掉上清,晾干10min后加入20 μ L DEPC水溶解RNA,于NanoDrop 2000测定RNA浓度。按照每个样品500ng RNA/10 μ L反应体系逆转录后,加入5倍DEPC水稀释cDNA,进行实时荧光定量PCR,结果如图4-7所示。

[0056] 将MC3T3E1-14细胞以每孔 2.5×10^5 细胞数铺板24板,待细胞贴壁后,对照组换成 α -MEM+10%FBS+1%青霉素和链霉素培养基; β -甘油磷酸钠组在培养基中加入 β -甘油磷酸钠,终浓度为10mM;rH-BMP2组加入重组BMP2,终浓度为100ng/mL;协同组含有 β -甘油磷酸钠和rH-BMP2,终浓度和单纯组一致。以后隔1天换液,诱导7天后弃去培养基,PBS洗3遍,每孔加入1mL TRIZOL裂解细胞,在裂解液中加入200 μ L氯仿充分震荡后放置10min,12000rpm离心15min;取上清加入同体积异丙醇,混匀后放置10min,12000rpm离心10min;弃去上清,沉淀用DEPC水配的75%酒精洗1遍,12000rpm离心5min;弃掉上清,晾干10min后加入20 μ L DEPC水溶解RNA,于NanoDrop 2000测定RNA浓度。按照每个样品500ng RNA/10 μ L反应体系逆转录后,加入5倍DEPC水稀释cDNA,进行实时荧光定量PCR,结果如图8-9所示。

[0057] 由图4-9可知:从ALP的基因表达我们可以看出, β -甘油磷酸钠具有微弱的促进C2C12细胞ALP活性,协同组比单独rH-BMP2组增强ALP活性20倍,比单独 β -甘油磷酸钠组增强数百倍。协同组对C2C12细胞具有成骨诱导效果,表现为增强ALP、RUNX2、COL1、OPN等成骨相关基因的表达水平。而在成骨细胞前体细胞MC3T3E1-14细胞表现为,协同组能够增强重组BMP2的ALP和OCN的基因表达3倍。因此证明重组BMP2和 β -甘油磷酸钠能够协同促进不同细胞的成骨分化。图中的显著性差异用a、b、c表示,p值小于0.05,分别表示对对照组、 β -甘油磷酸钠、重组BMP2具有显著性差异。显著性分析采用的方法是单因素方差分析。

[0058] 实施例3

[0059] 探究联合用药物组合物对C2C12和MC3T3E1-14细胞矿化的能力:

[0060] 将C2C12细胞以每孔 5×10^5 细胞数或MC3T3E1-14细胞以每孔 2.5×10^5 细胞数铺板24板,待细胞贴壁后,对照组换成高糖DMEM+10%FBS+1%青霉素和链霉素培养基; β -甘油磷酸钠组在培养基中加入 β -甘油磷酸钠,培养基中终浓度为10mM;rH-BMP2组加入重组BMP2,终浓度为100ng/mL;协同组含有 β -甘油磷酸钠和rH-BMP2,终浓度与单纯组一致。以后隔1天换液,诱导14天后弃去培养基,PBS洗3遍,4%多聚甲醛固定10min,ddH₂O洗3遍。用40mM茜素红染色15min。弃掉染色液,用PBS洗3遍,每变放置2min。然后置于显微镜下拍照,结果分别如图10-11所示。

[0061] 实施例4

[0062] 探究联合用药物组合物促进小鼠小腿肌肉异位成骨:

[0063] 材料准备,我们植入小腿肌肉的材料用的医用明胶海绵,将明胶海绵块切成均匀正方形小块,正好置于96孔板中,对照组为明胶海绵; β 甘油磷酸钠组每小块滴入0.2mM物质的量;重组BMP2组每小块滴入2.5 μ g的蛋白;协同组滴入0.2mM BGP和2.5 μ g rH-BMP2,等吸入明胶海绵后,置于-80 $^{\circ}$ C冰冻2h,然后冻干。

[0064] 术前准备,将24只C57BL/6J小鼠按照上速分组分成4组,每组6只。手术时,将小鼠用1%戊巴比妥钠麻醉后,剃掉小鼠双侧小腿肌肉侧腿毛,剪开肌肉将材料塞入肌肉缝隙中,缝合。手术两周后,取出小鼠小腿中成型的异位骨,用4%多聚甲醛固定。将固定的组织用布鲁克micro CT SkyScan1272拍摄(如图12所示)后,用对应SkyScan1272软件重建和分析,计算各组的组织体积和骨体积,统计结果分别如图13和图14所示。

[0065] 由12-14图可知:对照组单纯明胶海绵没有形成异位骨所以数值为0;单独 β -甘油磷酸钠也不能形成异位骨;单独蛋白组和协同组都形成了异位骨,而且协同组比rH-BMP2组生成骨量具有显著性差异,表明 β -甘油磷酸钠促进了rH-BMP2的骨再生效果。图中的显著性

差异用a、b、c表示,p值小于0.05,分别表示对对照组、 β -甘油磷酸钠、重组BMP2具有显著性差异。显著性分析采用的方法是单因素方差分析。

[0066] 实施例5

[0067] 探究联合用药物组合物对大鼠颅骨缺损的修复效果:

[0068] 材料准备,将医用明胶海绵块切成所需大小,空白材料组为明胶海绵; β 甘油磷酸钠组每小块滴入0.2mM物质的量;重组BMP2组每小块滴入2.5 μ g的蛋白;协同组滴入0.2mM BGP和2.5 μ g rH-BMP2,等吸入明胶海绵后,置于-80 $^{\circ}$ C冰冻2h,然后冻干。

[0069] 术前准备,将35只SD大鼠分成5组,每组7只,分别为空白对照组、空白材料组、 β -甘油磷酸钠组、重组BMP2组和协同组,空白对照组不加材料。

[0070] 手术时,将大鼠用2%戊巴比妥钠麻醉后,剪开头骨皮肤,在颅骨双侧分别用颅骨钻钻开2mm直径圆孔,用准备好的材料正好填补颅骨,缝合。手术4周后取出SD大鼠颅骨缺损附近头骨,置于4%多聚甲醛中固定。用SkyScan1272仪器拍摄micro CT(如图15所示)后,对应软件重建和分析,计算骨密度和相对骨体积,分别如图16和图17所示。

[0071] 由15-17图可知:骨缺损修复效果为协同组 $>$ β -甘油磷酸钠组 $>$ rH-BMP2组 $>$ 空白组。各自单独使用都具有明显效果, β -甘油磷酸钠组效果优于单独rH-BMP2组,而协同效果最好。所以本发明如果用于骨缺损修复将对临床具有重大意义。图中的显著性差异用*、a、b、c表示,p值小于0.05,分别表示对空白对照组、材料对照组、 β -甘油磷酸钠、重组BMP2具有显著性差异。显著性分析采用的方法是单因素方差分析。

[0072] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的一种具有骨缺损修复功效的药物组合物及其应用,但本发明并不局限于上述实施例,即不意味着本发明必须依赖上述实施例才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

[0073] 以上详细描述了本发明的优选实施方式,但是,本发明并不限于上述实施方式中的具体细节,在本发明的技术构思范围内,可以对本发明的技术方案进行多种简单变型,这些简单变型均属于本发明的保护范围。

[0074] 另外需要说明的是,在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征,在不矛盾的情况下,可以通过任何合适的方式进行组合,为了避免不必要的重复,本发明对各种可能的组合方式不再另行说明。

C2C12

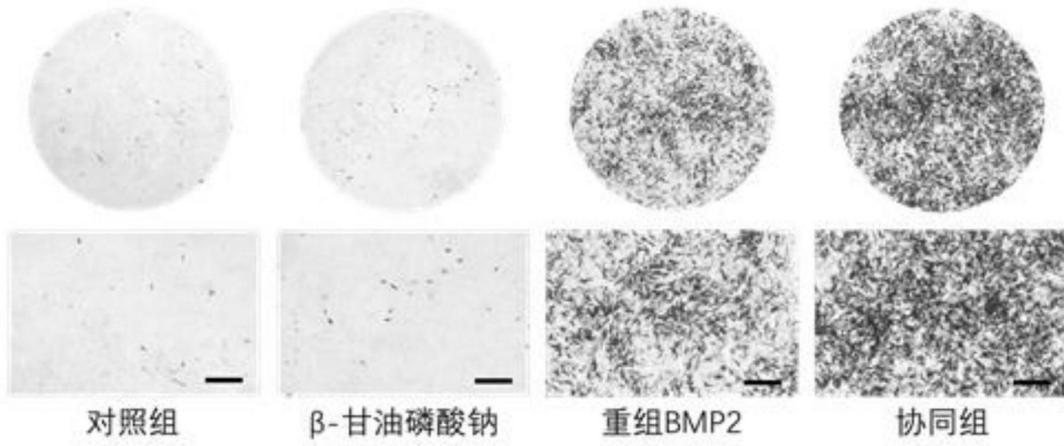


图1

C2C12

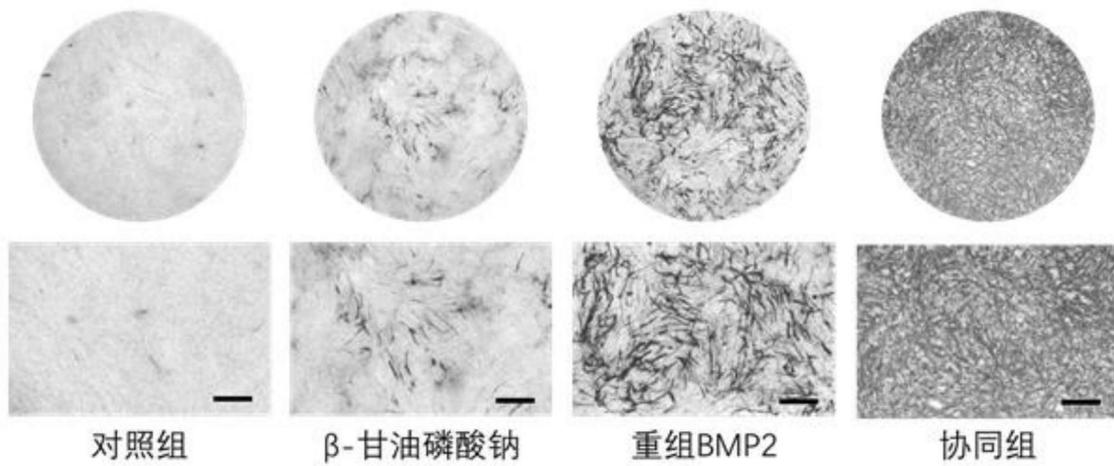


图2

MC3T3E1-14

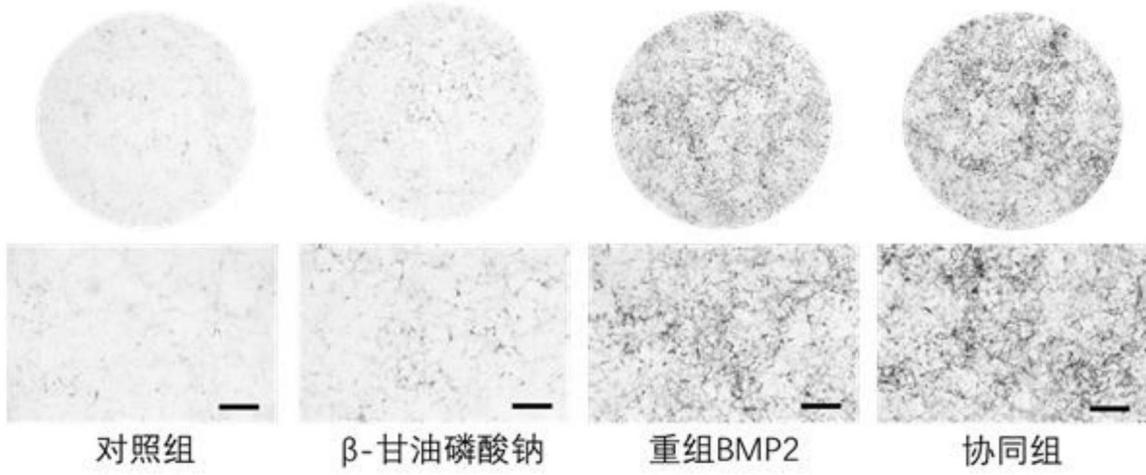


图3

C2C12

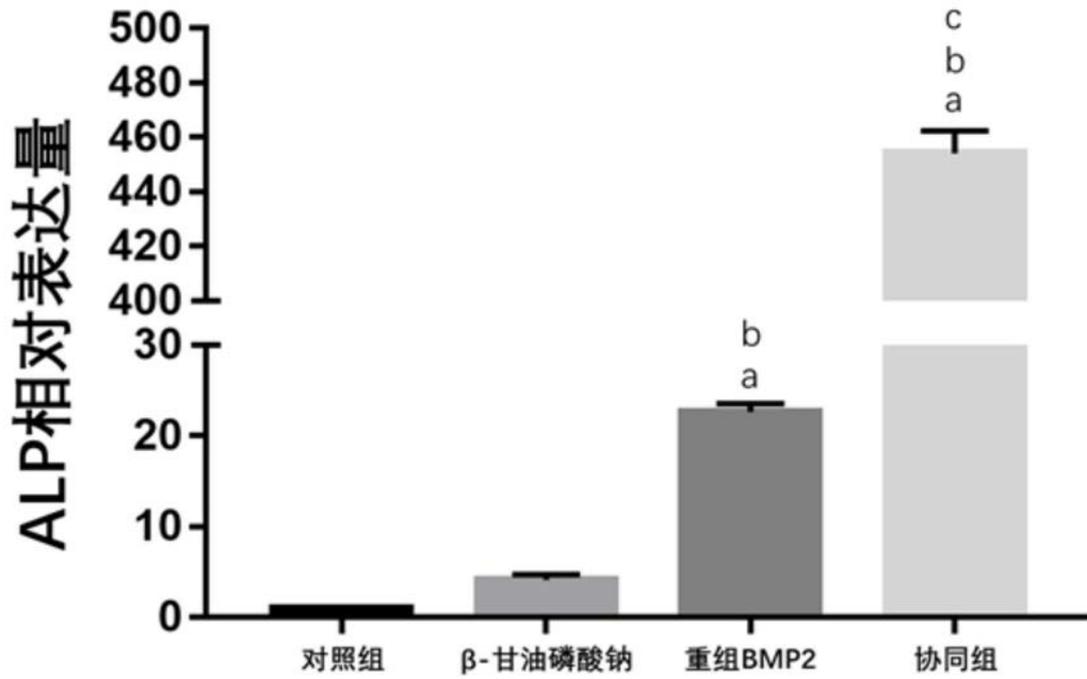


图4

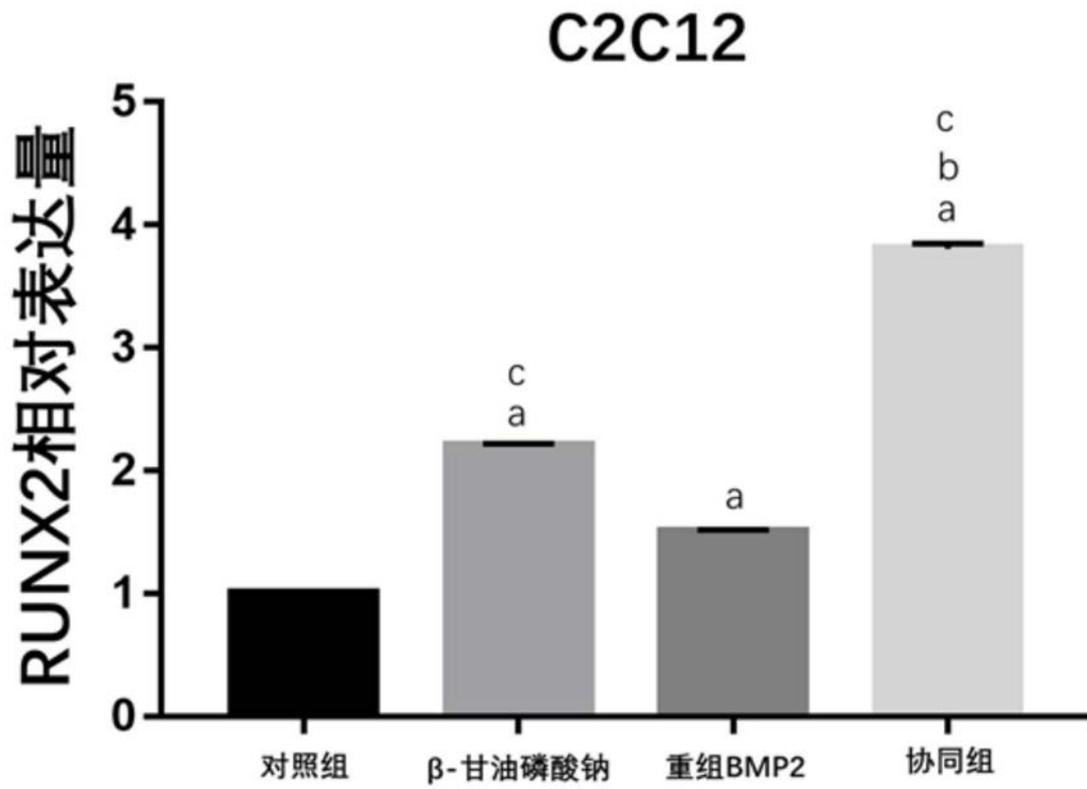


图5

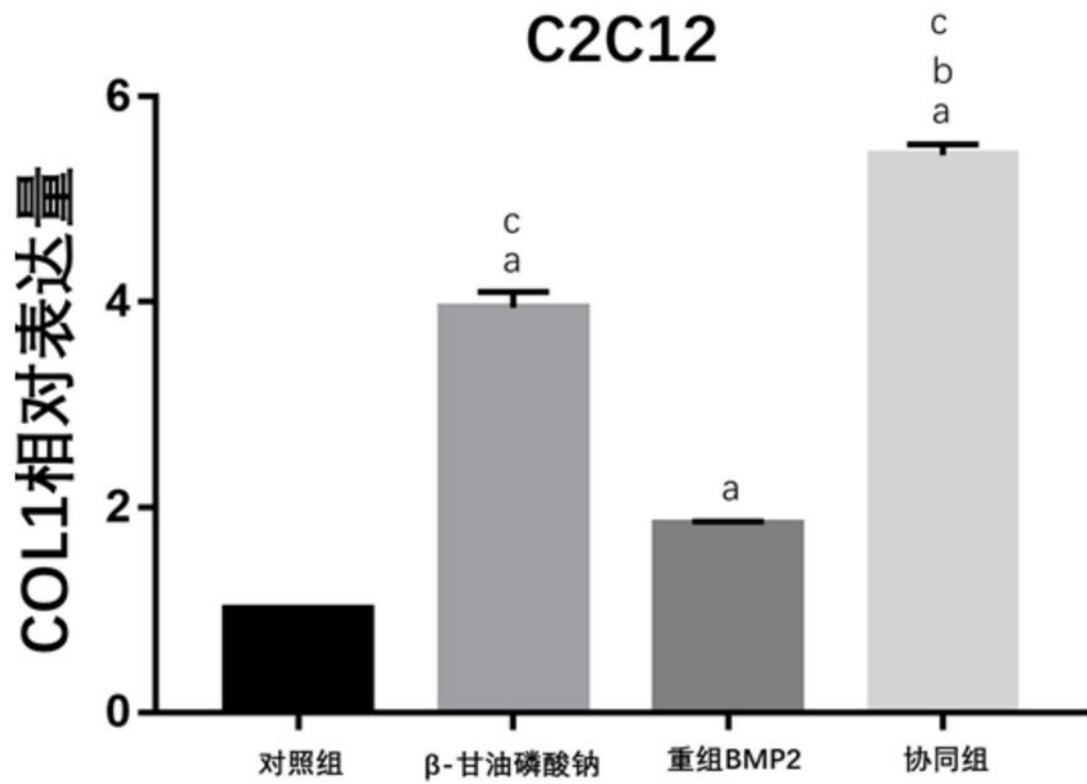


图6

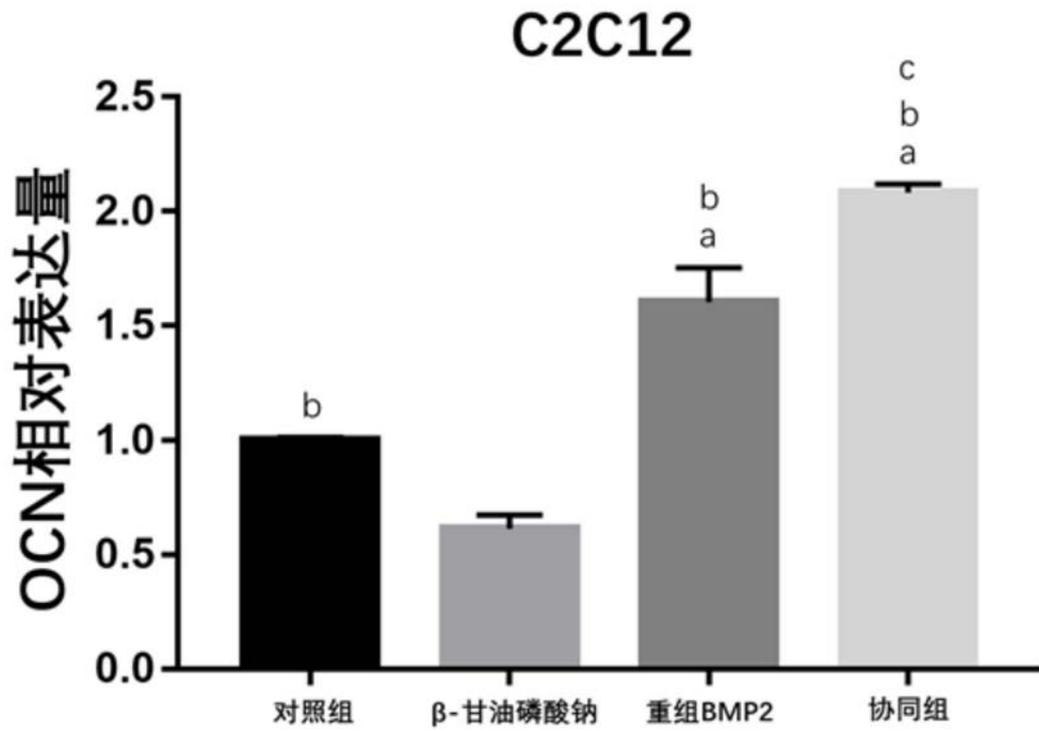


图7

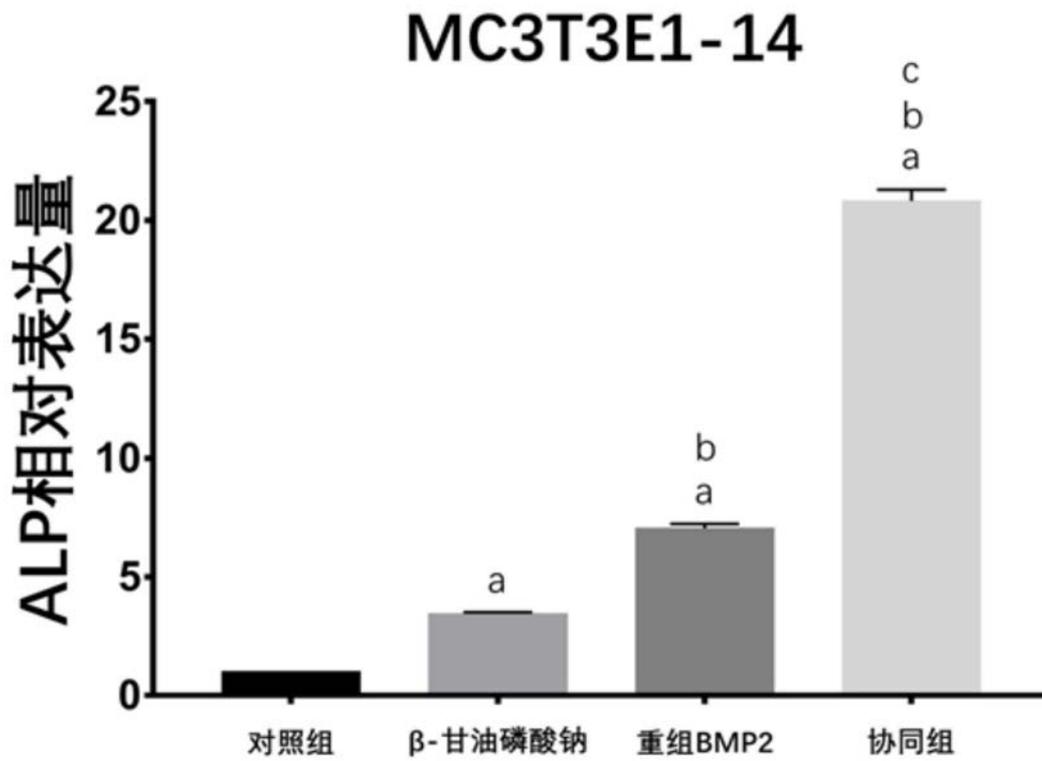


图8

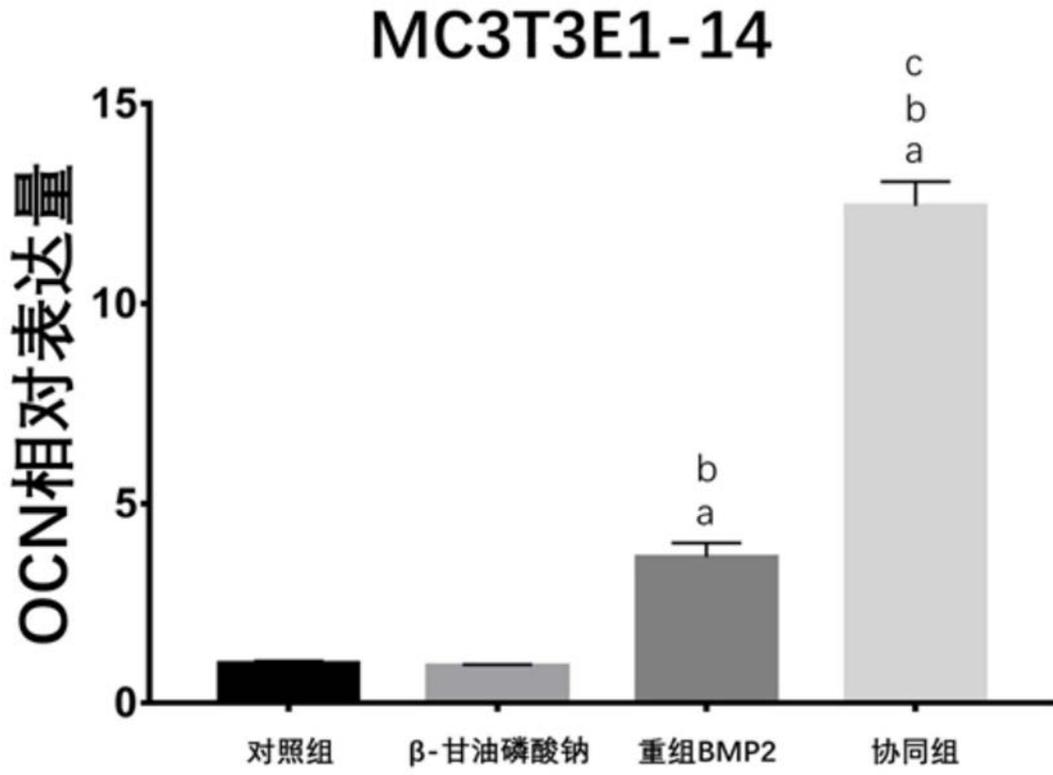


图9

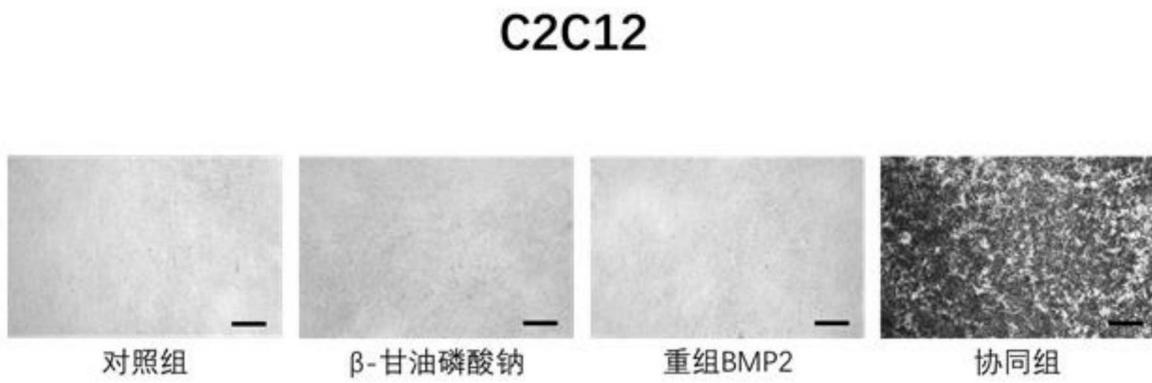


图10

MC3T3E1-14

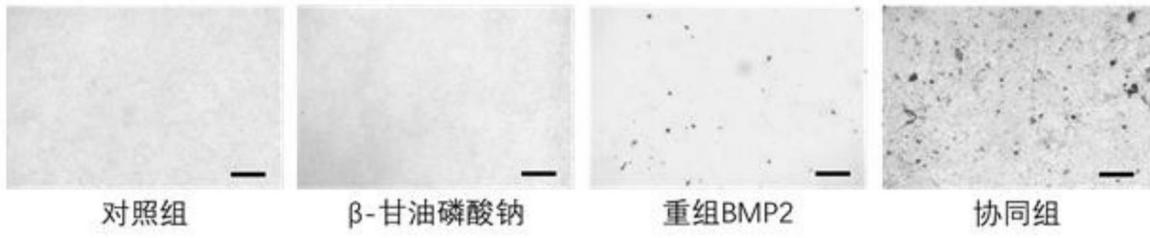


图11

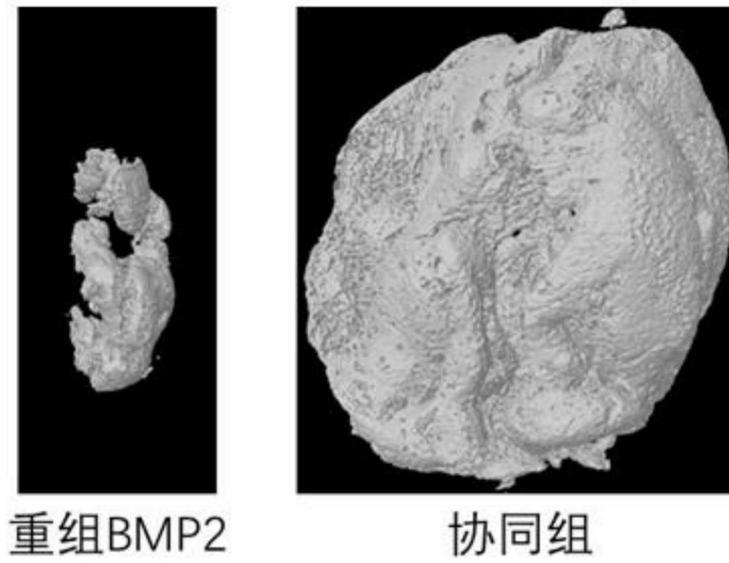


图12

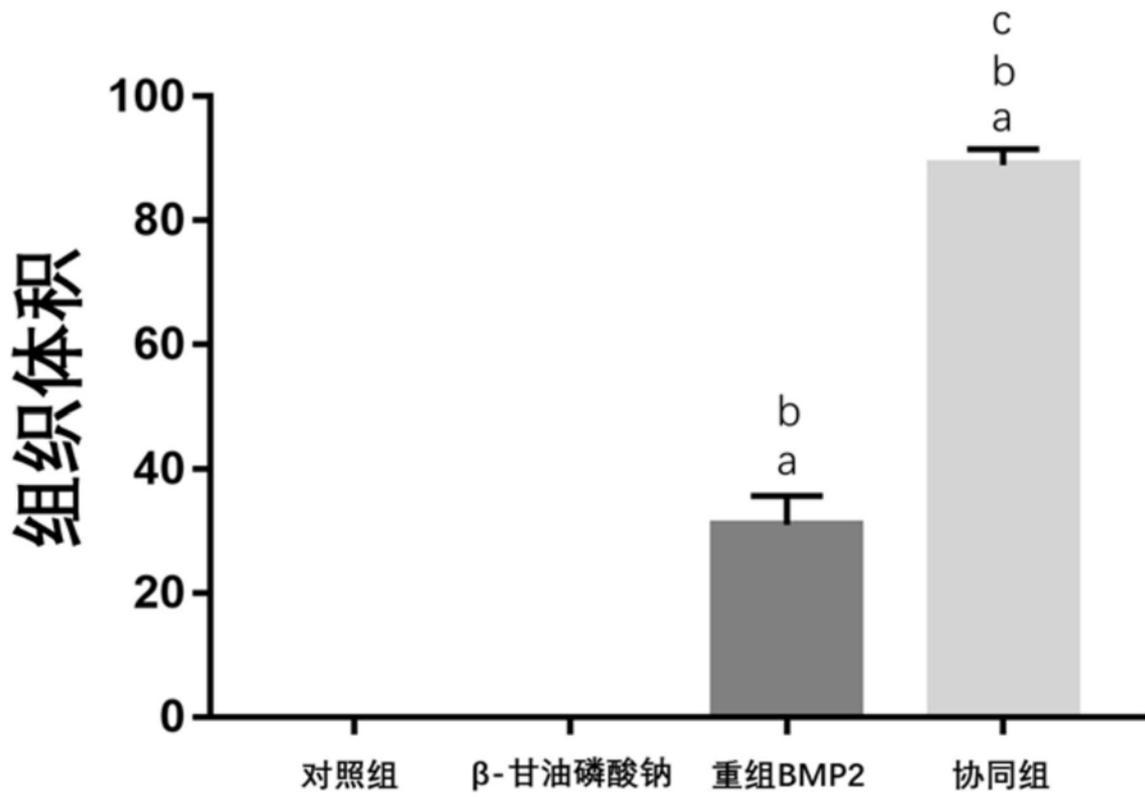


图13

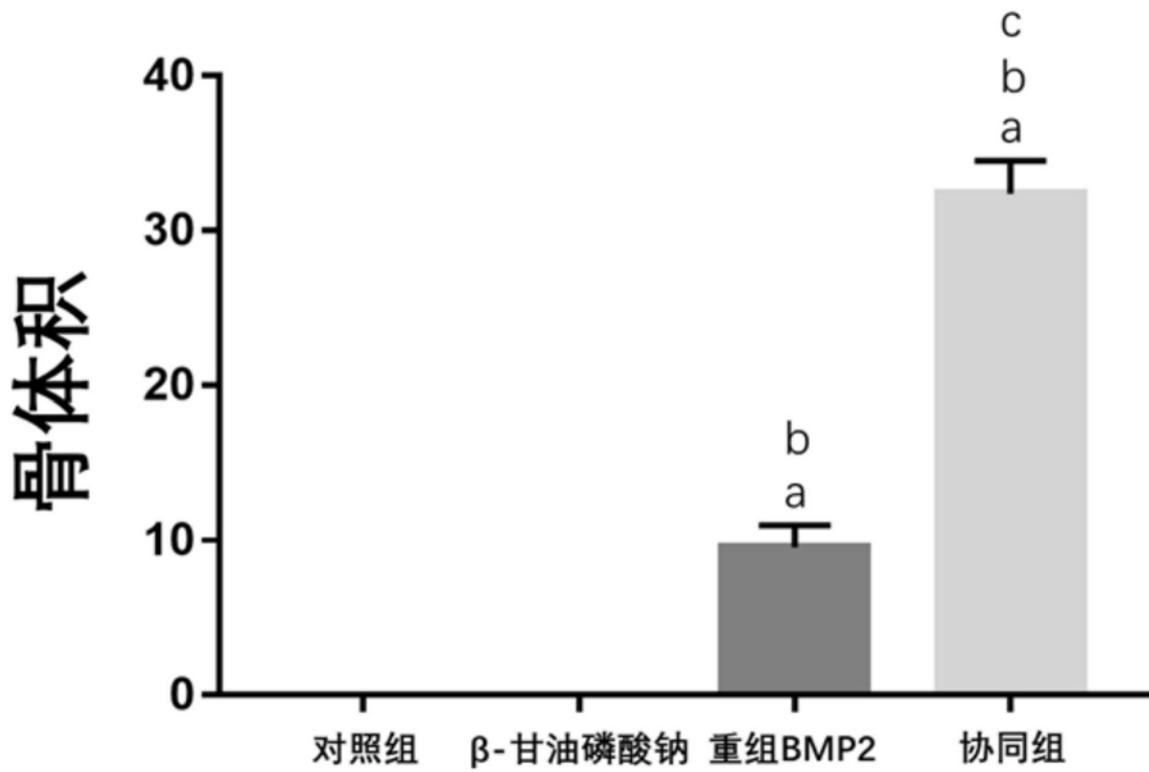


图14

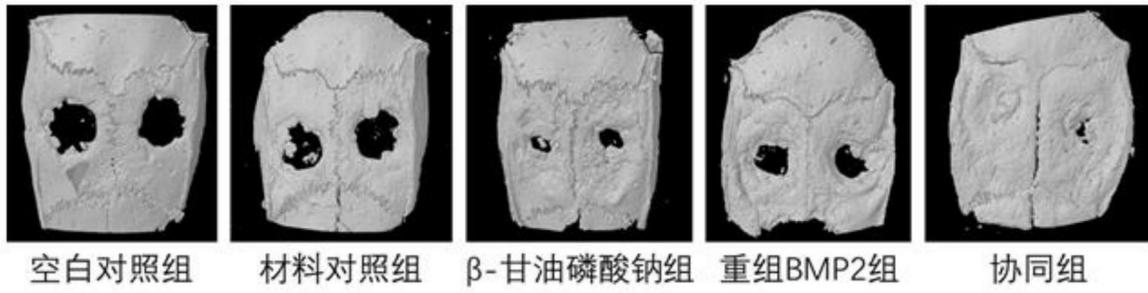


图15

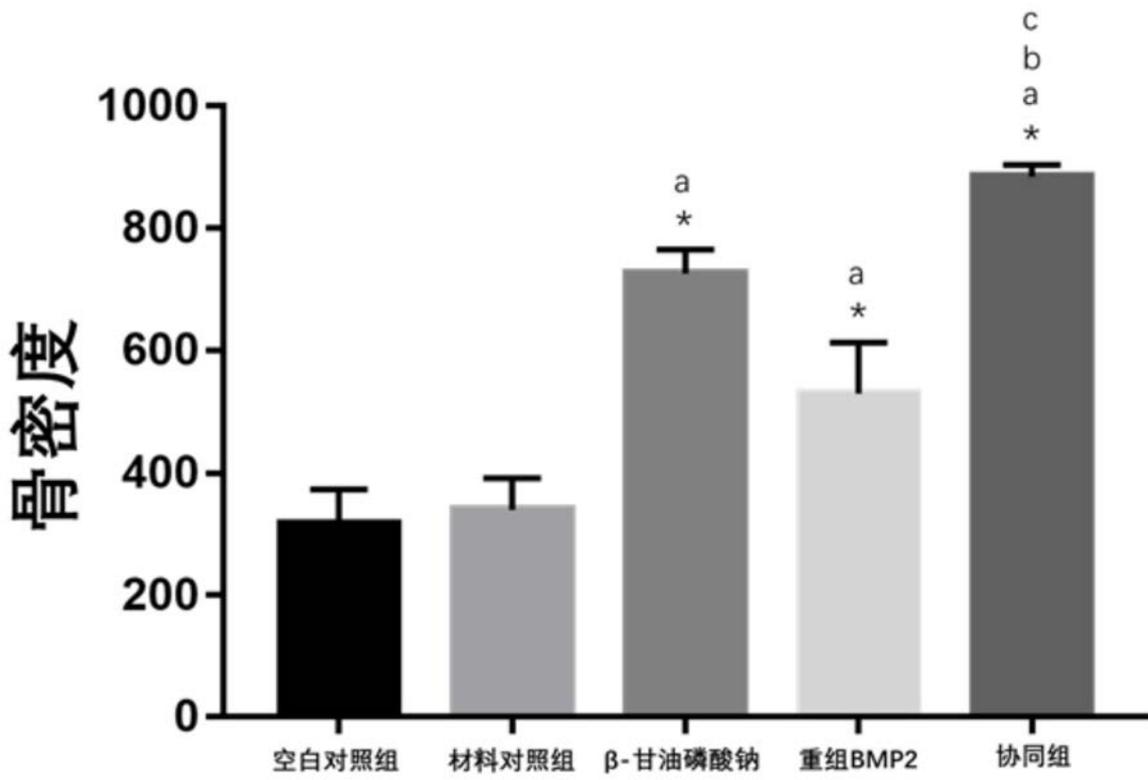


图16

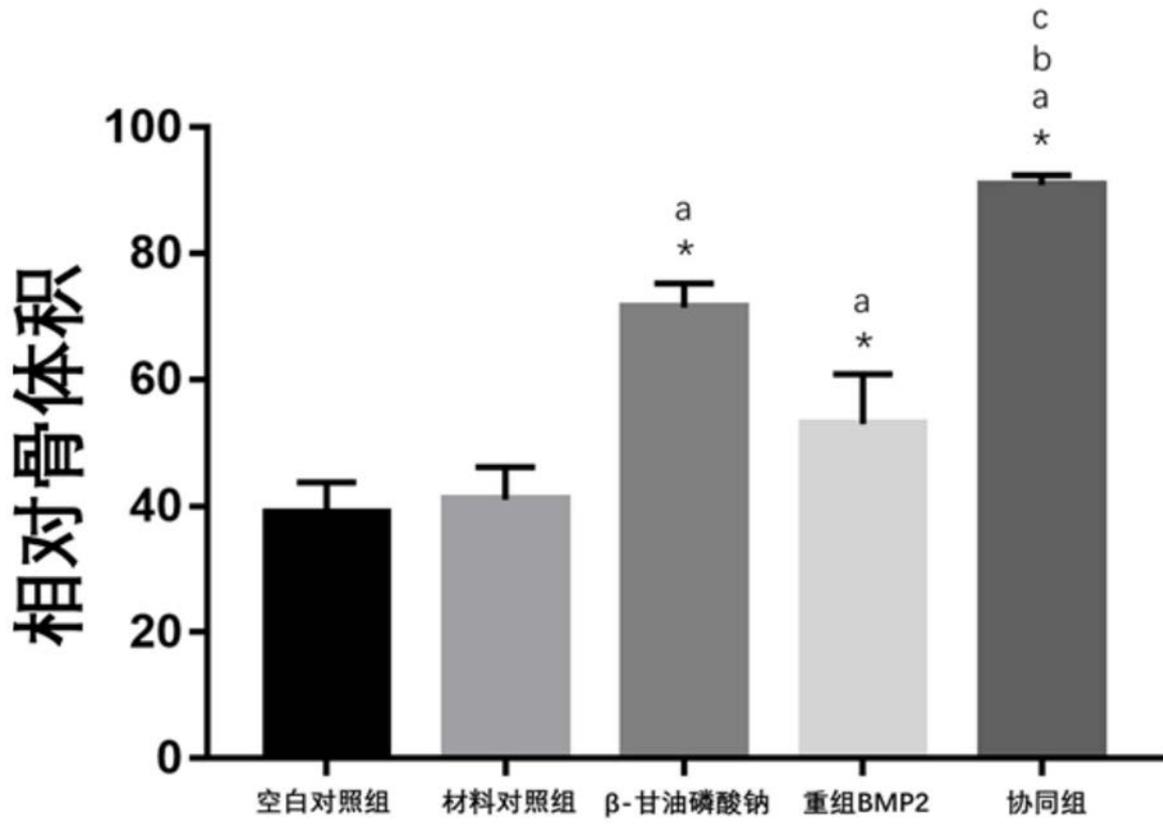


图17