



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109602952 B

(45) 授权公告日 2021.05.18

(21) 申请号 201811611623.7

A61L 27/22 (2006.01)

(22) 申请日 2018.12.27

A61L 27/54 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

审查员 陈天奇

申请公布号 CN 109602952 A

(43) 申请公布日 2019.04.12

(73) 专利权人 上海北陆医药科技有限公司

地址 201400 上海市奉贤区正博路1881号  
19幢3117室

(72) 发明人 贾翠英

其他发明人请求不公开姓名

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 陆惠中 王永伟

(51) Int. Cl.

A61L 27/20 (2006.01)

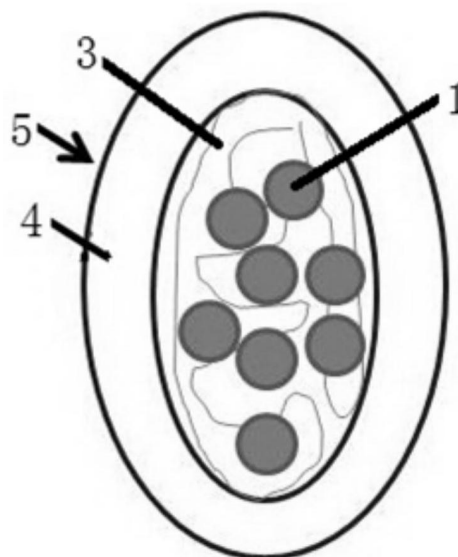
权利要求书2页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

一种长效缓释细胞支架及其制备方法、应用

(57) 摘要

本发明公开了一种长效缓释细胞支架,包括药物-细胞因子蛋白、丝素蛋白和复合蛋白,所述药物-细胞因子蛋白经所述丝素蛋白混合包被形成的细胞因子缓释微球,所述复合蛋白包被在所述细胞因子缓释微球的外层,所述丝素蛋白为通过钙盐调控自组装的丝素蛋白,所述复合蛋白包括可逃逸机体免疫攻击、可被细胞降解代谢的明胶;及其制备方法、应用,本发明先通过丝素蛋白包被形成细胞因子缓释微球,再包被可被细胞降解利用的复合蛋白,可实现药物的3-5个月的长期缓释;采用的复合蛋白形成水凝胶的杂合体比单纯的胶原蛋白和硫酸软骨素的机械耐受性强;且同源性好、药物缓释期长、在被转化为软骨基质过程中软骨组织的机械耐受性和代谢活力更好。



1. 一种长效缓释细胞支架,其特征在于:包括药物-细胞因子蛋白、丝素蛋白和复合蛋白,所述药物-细胞因子蛋白经所述丝素蛋白混合包被形成细胞因子缓释微球,所述复合蛋白包被在所述细胞因子缓释微球的外层,所述丝素蛋白为通过钙盐调控自组装的丝素蛋白,所述复合蛋白是以明胶或者胶原为主的复合物;

所述复合蛋白包括不同浓度的I型胶原、II型胶原、III型胶原、明胶、硫酸软骨素、透明质酸、聚乳酸及其衍生物中一种以上;

所述药物-细胞因子蛋白包括浓度为0-2mg/mL的碱性成纤维bFGF、浓度为0-2mg/mL的转化生长因子 $\beta$ 1、浓度为0-2mg/mL的转化生长因子 $\beta$ 2、浓度为0-2mg/mL的转化生长因子 $\beta$ 3和浓度为0-2mg/mL的BMP-2;

所述复合蛋白还加载所述药物-细胞因子蛋白。

2. 根据权利要求1所述的长效缓释细胞支架,其特征在于:所述药物-细胞因子蛋白在经所述丝素蛋白包被后或经所述复合蛋白包被后,可再经交联处理或者不经交联处理,用于所述交联处理的交联剂包括但不限于TG酶、戊二醛中的一种或两种。

3. 根据权利要求1所述的长效缓释细胞支架,其特征在于:所述丝素蛋白包括家蚕丝、柞蚕丝和野蚕丝中的一种或多种蚕丝经处理得到的再生丝素蛋白。

4. 一种长效缓释细胞支架的制备方法,其特征在于:权利要求1-3任一种所述长效缓释细胞支架通过下述方法制得,具体包括以下步骤:

S1:制备丝素蛋白混合溶液

将脱胶的蚕丝素纤维加入氯化钙/乙醇/水三元溶液中,所述蚕丝素纤维与所述氯化钙/乙醇/水三元溶液的浴比为1:5,氯化钙/乙醇/水三元溶液中三者的摩尔比为1:2:8,之后在70°C~74°C的条件下搅拌溶解1h,得到浓度为20mg/mL的丝素蛋白混合溶液备用;

S2:制备细胞因子缓释微球

将药物-细胞因子蛋白溶解于Tris-HCl缓冲液中制得药物-细胞因子蛋白混合液A,将步骤S1制得的浓度为20mg/mL的丝素蛋白混合溶液与浓度为4mM的葡萄糖酸钙溶液或浓度为4mM的CaCl<sub>2</sub>溶液按照体积比为1:1的比例混合制得混合液B,将1mL混合液A加入到40ml混合液B中后置于37°C水浴环境中处理40min得到细胞因子缓释微球溶液,再将得到的细胞因子缓释微球溶液在12000r/min下离心处理10分钟后,取沉淀用去离子水反复洗涤除去未被包被的药物-细胞因子蛋白和葡萄糖酸钙或CaCl<sub>2</sub>,再冷冻干燥并于4°C保存即得固体微粒状态的纳米级细胞因子缓释微球;

S3:在细胞因子缓释微球外包被复合蛋白

在步骤S2制得的细胞因子缓释微球外再包被一层可被细胞利用、具有软骨诱导作用的复合蛋白,所述复合蛋白是以明胶或者胶原为主的复合物;

S3.1:先取2.5g的明胶粉剂、0.5g的硫酸软骨素粉剂和25mg的透明质酸钠加入40mL双蒸水中于30°C条件下搅拌至完全溶解制得混合液C,之后用0.2 $\mu$ m针式滤器进行过滤除菌处理,得到复合蛋白溶液;

步骤S3.1中,将2ml浓度为10 $\mu$ g/ml的bFGF溶液加入40ml混合液C中后,再用0.2 $\mu$ m针式滤器进行过滤除菌处理,得到复合蛋白溶液;S3.2:将60mL的无菌植物油和1mL的Span80混合并预热至60°C,然后缓慢滴入预热至60°C的所述复合蛋白溶液,并采用电动搅拌机以500-900r/min的转速搅拌均匀,乳化时间10-15min,形成复合蛋白的稳定乳液;

S3.3:将步骤S2中制得的细胞因子缓释微球与制得的复合蛋白的稳定乳液按照混合比1:3v/v的比例混合,得到混合乳液;

S3.4:将步骤S3.3得到混合乳液冰浴冷却至5℃以下,此过程持续电动搅拌机以500-900r/min的转速搅拌,然后加入30mL预冷丙酮搅拌40min后电动搅拌机停止搅拌,再经高速离心机分离处理出微球后用蒸馏水反复清洗微球,最后将微球冻干处理,即完成明胶-硫酸软骨素-透明质酸钠包被药物-细胞因子蛋白的长效缓释细胞支架的制备。

5.根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于:在步骤S3.2之后,还进行以下操作步骤:

S3.2.1:将mTG溶解于PBS中,制得酶浓度达10% (W/V) 的mTG溶液,将mTG溶液经过滤除菌处理后备用;

S3.2.2:将步骤S3.2制得的复合蛋白的稳定乳液与步骤S3.2.1制得的mTG溶液按照1克:10个酶活力单位的比例混合。

6.根据权利要求4所述的长效缓释细胞支架的制备方法,其特征在于:

步骤S3.4中,在混合乳液冰浴冷却至5℃以下5min后,在混合乳液加入1mL 25%的戊二醛溶液进行交联固化处理60min。

## 一种长效缓释细胞支架及其制备方法、应用

### 技术领域

[0001] 本发明是涉及一种负载药物-细胞因子蛋白的长效缓释细胞支架及其制备方法、应用。

### 背景技术

[0002] 细胞支架,也称为组织工程支架材料,是指能与组织活体细胞结合并能植入生物体的不同组织,并根据具体替代组织具备的功能的材料。为了使种子细胞增殖和分化,需要提供一个由生物可溶性材料所构成的细胞支架,细胞支架材料相当于人工细胞外基质。组织工程支架材料包括:骨、软骨、血管、神经、皮肤和人工器官,如肝、脾、肾、膀胱等的组织支架材料,是治疗各种慢性软组织疾病的有效手段,其应用前景广阔。

[0003] 关节软骨能减少相邻两骨间的摩擦,减少组织损伤,使运动系统耐久性不可缺失的部分。一方面随着动物年龄的增长,软骨细胞衰退,软骨的组织更新跟不上磨损,发生软骨组织的损伤与缺损,是关节炎发生的主要机制。另一方面有些运动损伤软骨组织或者外伤引起的软骨损伤也是关节炎发生的重要机制。关节腔清创术,微骨折术等只能暂时减轻或者缓解症状,不能有效地促进软骨组织的修复再生。而现在软骨细胞移植形成的水凝胶结构不稳定,随着时间的推移,容易被机械力破坏或者发生生物降解。因此形成稳定长期的类软骨结构,在过渡形成新的成熟软骨组织对软骨再生技术革新具有重要的临床意义。

[0004] 近年来,组织工程学不断发展,细胞治疗技术日新月异,用于软骨再生的细胞因子的研究已经很成熟,细胞的体外实验也都有了很好的实验成果。但是,在临床上对于关节炎的治疗却遇到了很多瓶颈的问题。比如,细胞支架的不稳定、细胞支架中残留物对人体的危害、治疗后易复发等种种问题。这主要是由于现有方法所制的软骨细胞支架的机械性和生物可利用性较差,致使细胞因子类的药物的包裹层易被破坏、药物释放时间短和释放量不稳定,较短的药效致使治疗后易复发等问题的出现,而且药物的包裹层不能够被人体完全吸收,残留于人体内会造成二次伤害,以上多种原因致使目前的载药细胞支架技术在临床应用上效果并不理想。

[0005] 细胞支架对构成材料的要求很高,主要有两大类,一类是人工合成材料,一类是天然生物材料,与人工合成材料相比,天然生物材料的优势在于其直接取自生物体内,有良好的生物相容性和生物可降解性;此外,天然生物材料本身类似于细胞外基质的结构,可促进细胞粘附、增殖和分化;现有技术中,用于载药细胞支架的药物包裹层的天然生物材料较多,包括丝素蛋白、胶原蛋白、蜗牛粘蛋白、甾醇、卵磷脂等;为了解决载药细胞支架在临床应用上面临的问题,有中国专利201510062801.5公开了一种负载BMP丝素蛋白胶原蛋白支架材料,通过将丝素蛋白水溶液和胶原蛋白水溶液混合、交联处理后水润平铺,在其表面滴加药物的方式形成微球形式的载药丝素蛋白/胶原蛋白支架材料,尽管其药物包裹层采用生物可利用性较好的丝素蛋白和胶原蛋白制得,解决了细胞支架残留物对人体的危害问题,但其对延长药物缓释期限的作用有限;另外,肝、肾、胰等组织再生也处于起步阶段,研发一种长效缓释功能稳定的细胞支架将对其他器官的细胞治疗起到关键的技术支

持作用,也是目前本领域技术人员亟待解决的瓶颈技术问题。

## 发明内容

[0006] 针对现有技术存在的上述问题和需求,本发明的目的是提供一种长效缓释细胞支架及其制备方法、应用,以增强细胞支架的机械耐受性和生物可利用性,实现所载药物的长期缓释性。

[0007] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案如下:

[0008] 一种长效缓释细胞支架,其特征在于:包括药物-细胞因子蛋白、丝素蛋白和复合蛋白,所述药物-细胞因子蛋白经所述丝素蛋白混合包被形成的细胞因子缓释微球,所述复合蛋白包被在所述细胞因子缓释微球的外层,所述丝素蛋白为通过钙盐调控自组装的丝素蛋白,所述复合蛋白包括可逃逸机体免疫攻击、可被细胞降解代谢的明胶。

[0009] 作为优选方案,所述药物-细胞因子蛋白包括但不限于浓度为0-2mg/ml的碱性成纤维bFGF、浓度为0-2mg/ml的转化生长因子 $\beta$ 1、浓度为0-2mg/ml的转化生长因子 $\beta$ 2、浓度为0-2mg/ml的转化生长因子 $\beta$ 3和浓度为0-2mg/ml的BMP-2。

[0010] 作为进一步优选方案,所述药物-细胞因子蛋白为碱性成纤维bFGF和BMP-2的混合物。

[0011] 作为进一步优选方案,所述复合蛋白还加载所述药物-细胞因子蛋白;通过在内层的丝素蛋白和外层的复合蛋白中分别包被药物-细胞因子蛋白,使得细胞支架具有双重缓释效果、药效分层缓释,增强缓释药效、延长药物缓释期。

[0012] 作为优选方案,所述复合蛋白包括不同浓度的I型胶原、II型胶原、III型胶原、明胶、硫酸软骨素、透明质酸、聚乳酸及其衍生物中一种或多种;所述复合蛋白是以明胶或者胶原为主的复合物,在人体内具有同源性和免疫原性低的特点。

[0013] 作为优选方案,所述药物-细胞因子蛋白在经所述丝素蛋白包被后或经所述复合蛋白包被后,可再经交联处理或者不经交联处理,用于所述交联处理的交联剂包括但不限于TG酶、聚乳酸、聚乙酸、环氧化合物和戊二醛中的一种或多种。

[0014] 作为优选方案,所述丝素蛋白包括家蚕丝、柞蚕丝和野蚕丝中的一种或多种蚕丝经处理得到的再生丝素蛋白。

[0015] 本发明还提供上述任意一种长效缓释细胞支架的制备方法,其特征在于,具体包括以下步骤:

[0016] S1:制备丝素蛋白混合溶液

[0017] 将脱胶的蚕丝素纤维加入氯化钙/乙醇/水三元溶液中,所述蚕丝素纤维与所述氯化钙/乙醇/水三元溶液的浴比为1:5,氯化钙/乙醇/水三元溶液中三者的摩尔比为1:2:8,之后在70℃~74℃的条件下搅拌溶解1h,得到浓度为20mg/ml的丝素蛋白混合溶液备用;

[0018] S2:制备细胞因子缓释微球

[0019] 将药物-细胞因子蛋白溶解于Tris-HCl缓冲液中制得药物-细胞因子蛋白混合液A,将步骤S1制得的浓度为20mg/ml的丝素蛋白混合溶液与浓度为4mM的葡萄糖酸钙溶液或浓度为4mM的CaCl<sub>2</sub>溶液按照体积比为1:1的比例混合制得混合液B,将1ml混合液A加入到40ml混合液B中后置于37℃水浴环境中处理40min后取出,得到细胞因子缓释微球溶液,再将得到的细胞因子缓释微球溶液在12000r/min下离心处理10分钟后,取沉淀用去离子水反

复洗涤除去未被包被的药物-细胞因子蛋白和葡萄糖酸钙,再冷冻干燥并于4℃保存即得固体微粒状态的纳米级细胞因子缓释微球;

[0020] S3:在细胞因子缓释微球外包被复合蛋白

[0021] 在步骤S2制得的细胞因子缓释微球外再包被一层可被细胞利用、具有软骨诱导作用的胶原物质制成的复合蛋白;

[0022] S3.1:先取2.5g的明胶粉剂、0.5g的硫酸软骨素粉剂和25mg的透明质酸钠加入40ml双蒸水中于30℃条件下搅拌至完全溶解制得混合液C,之后用0.2μm针式滤器进行过滤除菌处理,得到复合蛋白溶液;

[0023] S3.2:将60ml的无菌植物油和1ml的Span80混合并预热至60℃,然后缓慢滴入预热至60℃的所述复合蛋白溶液,并采用电动搅拌机以500-900r/min的转速搅拌均匀,乳化时间10-15min,形成复合蛋白的稳定乳液;

[0024] S3.3:将步骤S2中制得的细胞因子缓释微球与制得的复合蛋白的稳定乳液按照混合比1:3v/v的比例混合,得到混合乳液;

[0025] S3.4:将步骤S3.3得到混合乳液冰浴冷却至5℃以下,此过程持续电动搅拌机以500-900r/min的转速搅拌,然后加入30ml预冷丙酮搅拌至40min后电动搅拌机停止搅拌,再经高速离心机分离处理出微球后用蒸馏水反复清洗微球,最后将微球冻干处理,即完成明胶-硫酸软骨素-透明质酸钠包被药物-细胞因子蛋白的长效缓释细胞支架的制备。

[0026] 作为优选方案,步骤S1中所述蚕丝素纤维包括家蚕蚕丝素纤维、柞蚕蚕丝素纤维和野蚕蚕丝素纤维中的一种或多种。

[0027] 作为优选方案,在步骤S3.2之后,还进行以下操作步骤:

[0028] S3.2.1:将mTG溶解于PBS中,制得酶浓度达10%(W/V)的mTG溶液,将mTG溶液经过滤除菌处理后备用;

[0029] S3.2.2:将步骤S3.2制得的复合蛋白的稳定乳液与步骤S3.2.1制得的mTG溶液按照1克:10个酶活力单位的比例混合。

[0030] 作为优选方案,步骤S3.1中,将2ml浓度为10ug/ml的bFGF溶液加入40ml混合液C中,再用0.2μm针式滤器进行过滤除菌处理,得到复合蛋白溶液。

[0031] 作为优选方案,步骤S3.4中,在混合乳液冰浴冷却至5℃以下5min后,在混合乳液加入1ml 25%的戊二醛溶液进行交联固化处理60min。

[0032] 上述任一种长效缓释细胞支架的应用,其特征在于:所述细胞支架在拥有组织器官的皮下注射以及包括胰脏、肝脏、肾脏、肌肉、心脏在内的人体器官的细胞修复中的应用。

[0033] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0034] 本发明先通过丝素蛋白包被药物-细胞因子蛋白形成细胞因子缓释微球,再在其外层用可被细胞降解利用的含有明胶的复合蛋白进行包被,制得的长效缓释细胞支架可实现药物1年以上的长期缓释;在应用时,复合蛋白形成水凝胶的杂合体比单纯的胶原蛋白和硫酸软骨素具有更强的机械耐受性;采用的复合蛋白中的胶原蛋白具有软骨基质的同源性可以保护细胞因子缓释微球避免机体免疫系统和酶系统的更多攻击,在长效缓释细胞支架被软骨细胞消化转化为软骨基质的过程中不断释放出诱导软骨的细胞因子进而加速形成机体自身的软骨基质,从而延长了药物缓释期;在长效缓释细胞支架被软骨细胞转化为软

骨基质过程中成熟的软骨组织具备更好的机械耐受性和代谢活力。

### 附图说明

[0035] 图1为本发明实施例提供的一种长效缓释细胞支架结构示意图；

[0036] 图2为本发明实施例提供的细胞因子缓释微球的结构示意图；

[0037] 图3为本发明实施例提供的将长效缓释细胞支架注射进入关节腔初始时期形成凝胶状类软骨组织的原理示意图；

[0038] 图4为本发明实施例提供的将长效缓释细胞支架注射进入关节腔3个月后被消化并缓释药物-细胞因子蛋白促软骨组织成熟的原理示意图；

[0039] 图5为本发明实施例提供的将长效缓释细胞支架注射进入关节腔12个月后被代谢并持续缓释药物-细胞因子蛋白促软骨组织成熟的原理示意图；

[0040] 图6为本发明实施例提供的长效缓释细胞支架的电镜图。

[0041] 图中标号示意如下：1、药物-细胞因子蛋白；2、细胞因子缓释微球；3、丝素蛋白；4、复合蛋白；5、长效缓释细胞支架；6、成软骨细胞；7、初生软骨组织；8、消化中的细胞支架；9、形成中的软骨组织；10、成熟的软骨组织。

### 具体实施方式

[0042] 以下结合附图和实施例对本发明的技术方案做进一步详细描述。

[0043] 实施例

[0044] 结合图1至图6所示，本实施例提供的一种长效缓释细胞支架，包括药物-细胞因子蛋白1、丝素蛋白3和复合蛋白4，所述药物-细胞因子蛋白1经所述丝素蛋白3混合包被形成的细胞因子缓释微球2，所述复合蛋白4包被在所述细胞因子缓释微球2的外层，所述丝素蛋白3为通过钙盐调控自组装的丝素蛋白，所述复合蛋白4包括可逃逸机体免疫攻击、可被细胞降解代谢的明胶；所述药物-细胞因子蛋白1包括但不限于浓度为0-2mg/ml的碱性成纤维bFGF、浓度为0-2mg/ml的转化生长因子 $\beta$ 1、浓度为0-2mg/ml的转化生长因子 $\beta$ 2、浓度为0-2mg/ml的转化生长因子 $\beta$ 3和浓度为0-2mg/ml的BMP-2；所述复合蛋白4还加载所述药物-细胞因子蛋白1，通过在内层的丝素蛋白3和外层的复合蛋白4中分别包被药物-细胞因子蛋白1，使得细胞支架具有双重缓释效果、药效分层缓释，增强缓释药效、延长药物缓释期。

[0045] 在本实施例中，作为优选，所述药物-细胞因子蛋白1为碱性成纤维bFGF和BMP-2的混合物。

[0046] 在本实施例中，所述复合蛋白4包括不同浓度的I型胶原、II型胶原、III型胶原、明胶、硫酸软骨素、透明质酸、聚乳酸及其衍生物中一种或多种；所述复合蛋白4是以明胶或者胶原为主的复合物，在人体内具有同源性和免疫原性低的特点。

[0047] 在本实施例中，所述药物-细胞因子蛋白1在经所述丝素蛋白3包被后或经所述复合蛋白4包被后，可再经交联处理或者不经交联处理，用于所述交联处理的交联剂包括但不限于TG酶、聚乳酸、聚乙酸、环氧化合物和戊二醛中的一种或多种。

[0048] 在本实施例中，所述丝素蛋白3包括家蚕丝、柞蚕丝和野蚕丝中的一种或多种蚕丝经处理得到的再生丝素蛋白。

[0049] 在本实施例中，上述细胞支架在拥有组织器官的皮下注射以及包括胰脏、肝脏、肾

脏、肌肉、心脏在内的人体器官的细胞修复中的应用；由于所制备的细胞支架为微粒型，因此所制备表达系统可通过注射加载细胞进行组织修复。

[0050] 本实施例还提供一种上述的长效缓释细胞支架的制备方法，具体包括以下步骤：

[0051] S1：制备丝素蛋白混合溶液

[0052] 将脱胶的蚕丝素纤维加入氯化钙/乙醇/水三元溶液中，所述蚕丝素纤维与所述氯化钙/乙醇/水三元溶液的浴比为1:5，氯化钙/乙醇/水三元溶液中三者的摩尔比为1:2:8，之后在70℃~74℃的条件下搅拌溶解1h，得到浓度为20mg/ml的丝素蛋白混合溶液备用；

[0053] S2：制备细胞因子缓释微球

[0054] 将药物-细胞因子蛋白1溶解于Tris-HCl缓冲液中制得药物-细胞因子蛋白混合液A，将步骤S1制得的浓度为20mg/ml的丝素蛋白混合溶液与浓度为4mM的葡萄糖酸钙溶液或浓度为4mM的CaCl<sub>2</sub>溶液按照体积比为1:1的比例混合制得混合液B，将1ml混合液A加入到40ml混合液B中后置于37℃水浴环境中处理40min后取出，得到细胞因子缓释微球溶液，再将得到的细胞因子缓释微球溶液在12000r/min下离心处理10分钟后，取沉淀用去离子水反复洗涤除去未被包被的药物-细胞因子蛋白1和葡萄糖酸钙，再冷冻干燥并于4℃保存即得固体微粒状态的纳米级细胞因子缓释微球2；

[0055] S3：在细胞因子缓释微球外包被复合蛋白

[0056] 在步骤S2制得的细胞因子缓释微球2外再包被一层可被细胞利用、具有软骨诱导作用的胶原物质制成的复合蛋白4；

[0057] S3.1：先取2.5g的明胶粉剂、0.5g的硫酸软骨素粉剂和25mg的透明质酸钠加入40ml双蒸水中于30℃条件下搅拌至完全溶解制得混合液C，再将2ml浓度为10ug/ml的bFGF溶液加入40ml混合液C中，之后用0.2μm针式滤器进行过滤除菌处理，得到复合蛋白溶液；在本实施例中，所述明胶粉剂和所述硫酸软骨素粉剂采用美国Sigma-Aldrich公司(美国西格玛奥德里奇公司)生产的明胶粉剂和硫酸软骨素粉剂；

[0058] S3.2：将60ml的无菌植物油和1ml的Span80混合并预热至60℃，然后缓慢滴入预热至60℃的所述复合蛋白溶液，并采用电动搅拌机以500-900r/min的转速搅拌均匀，乳化时间10-15min，形成复合蛋白的稳定乳液；

[0059] S3.2.1：将mTG溶解于PBS中，制得酶浓度达10% (W/V) 的mTG溶液，将mTG溶液经过滤除菌处理后备用；

[0060] S3.2.2：将步骤S3.2制得的复合蛋白的稳定乳液与步骤S3.2.1制得的mTG溶液按照1克:10个酶活力单位的比例混合，即每毫升4%复合蛋白的稳定乳液添加40μL 10%的mTG溶液；

[0061] S3.3：将步骤S2中制得的细胞因子缓释微球2与混合有mTG的复合蛋白的稳定乳液按照混合比1:3v/v的比例混合，得到混合乳液；

[0062] S3.4：将步骤S3.3得到混合乳液冰浴冷却至5℃以下，此过程持续电动搅拌机以500-900r/min的转速搅拌，然后加入30ml预冷丙酮搅拌至40min后电动搅拌机停止搅拌，再经高速离心机分离处理出微球后用蒸馏水反复清洗微球，最后将微球冻干处理，即完成明胶-硫酸软骨素-透明质酸钠包被药物-细胞因子蛋白1的长效缓释细胞支架5的制备。

[0063] 作为优选方案，在本实施例中，步骤S1中所述蚕丝素纤维包括家蚕蚕丝素纤维、柞蚕蚕丝素纤维和野蚕蚕丝素纤维中的一种或多种。



[0064] 作为优选方案,在本实施例中,步骤S3.4中,在混合乳液冰浴冷却至5℃以下5min后,在混合乳液加入1ml 25%的戊二醛溶液进行交联固化处理60min,然后再加入30ml过冷丙酮及后续处理;本步骤进行交联固化处理采用的戊二醛溶液还可以替换成其他交联剂,其他交联剂包括TG酶,聚乳酸,聚乙酸,环氧类化合物,戊二醛等;不经过交联固化的长效缓释细胞支架5同样能够增强机械耐受性和生物可利用性,实现所载药物的长期缓释性,同时具有简化流程、节约成本的优点;经过交联固化的长效缓释细胞支架5,可使长效缓释细胞支架5的微粒体相对于不经过交联固化的体积会减小15%左右,其微粒体更结实,不易分解,具有更好的长期缓释性。

[0065] 本实施例所述长效缓释细胞支架的使用方法如下:

[0066] 1、制备胎盘干细胞:

[0067] 先用IV型胶原酶消化分离人胎盘间充质干细胞,再将消化分离得到的胎盘间充质干细胞用含体积分数为10%胎牛血清、体积分数为1%双抗的低糖DMEM培养液,以 $3 \times 10^8 L^{-1}$ 的细胞浓度接种至细胞培养瓶中进行培养传代,得到胎盘来源间充质干细胞;

[0068] 用胰酶对得到的胎盘来源间充质干细胞进行处理后,采用生理盐水离心洗涤2次,之后,用MSC Attachment medium重悬细胞,调整细胞密度至 $1.6 \times 10^{10} L^{-1}$ ,形成微团后,加入1.0mL~2.0mL的软骨诱导培养基并每两至三天进行换液一次,进行诱导培养14天,制得胎盘干细胞溶液。

[0069] 2、将上述制得的长效缓释细胞支架注入患处:

[0070] 将0.025g的6-硫酸软骨素和0.125g的明胶溶解于2ml的PBS缓冲液中,然后加入0.05g的上述制得的包被有药物-细胞因子蛋白1的长效缓释细胞支架5、1ml的1%的玻璃酸钠与40U的mTG酶的混合液,再加入1ml的诱导过的细胞浓度为 $2 \times 10^7 L^{-1}$ 成软骨细胞6、1ml的细胞浓度为 $2 \times 10^7 L^{-1}$ 的上述制得的胎盘干细胞溶液,混合均匀后注射入相应关节炎模型实验动物或者人体的关节炎的关节腔内。

[0071] 如图3-图5所示,采用药物-细胞因子蛋白1作为载药的长效缓释细胞支架5在注入动物或者人体内后,分布于初生软骨组织7周围,随着明胶被细胞不断降解代谢形成不具有完整复合蛋白层的消化中的细胞支架8,期间药物-细胞因子蛋白1不断缓释促进软骨形成(如图4中形成中的软骨组织9);本发明长效缓释细胞支架5消耗更少的能量即可达到治疗效果,利于患处的快速恢复。

[0072] 综上所述可见:本发明先通过丝素蛋白3包被药物-细胞因子蛋白1形成细胞因子缓释微球2,再在其外层用可被细胞降解利用的含有明胶的复合蛋白4进行包被,制得的长效缓释细胞支架5可实现药物3-5个月的长期缓释,相较于现有载药细胞支架1-2个月的缓释期,其药效更持久稳定;在应用时,复合蛋白4形成水凝胶的杂合体比单纯的胶原蛋白和硫酸软骨素具有更强的机械耐受性;采用的复合蛋白4中的胶原蛋白具有软骨基质的同源性可以保护细胞因子缓释微球2避免机体免疫系统和酶系统的更多攻击,在长效缓释细胞支架5被软骨细胞消化转化为软骨基质的过程中不断释放出诱导软骨的细胞因子进而加速形成机体自身的软骨基质,从而延长了药物缓释期;在长效缓释细胞支架5被软骨细胞转化为软骨基质过程中成熟的软骨组织10具备更好的机械耐受性和代谢活力。

[0073] 最后有必要在此指出的是:以上所述仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,

可轻易想到的变化或替换,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

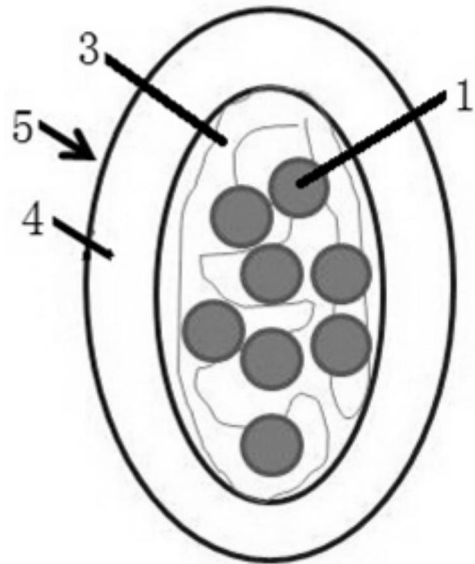


图1

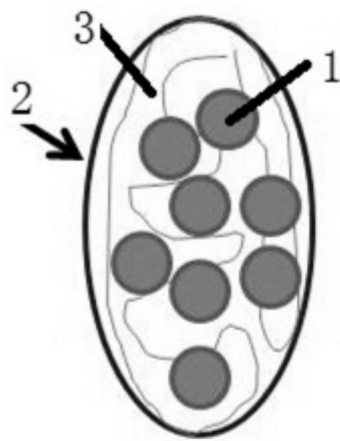


图2

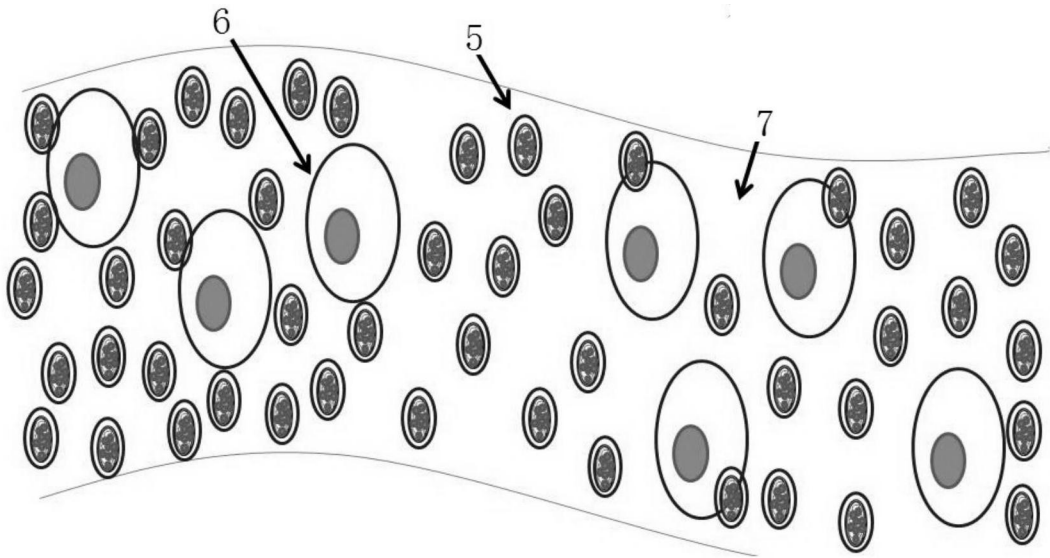


图3

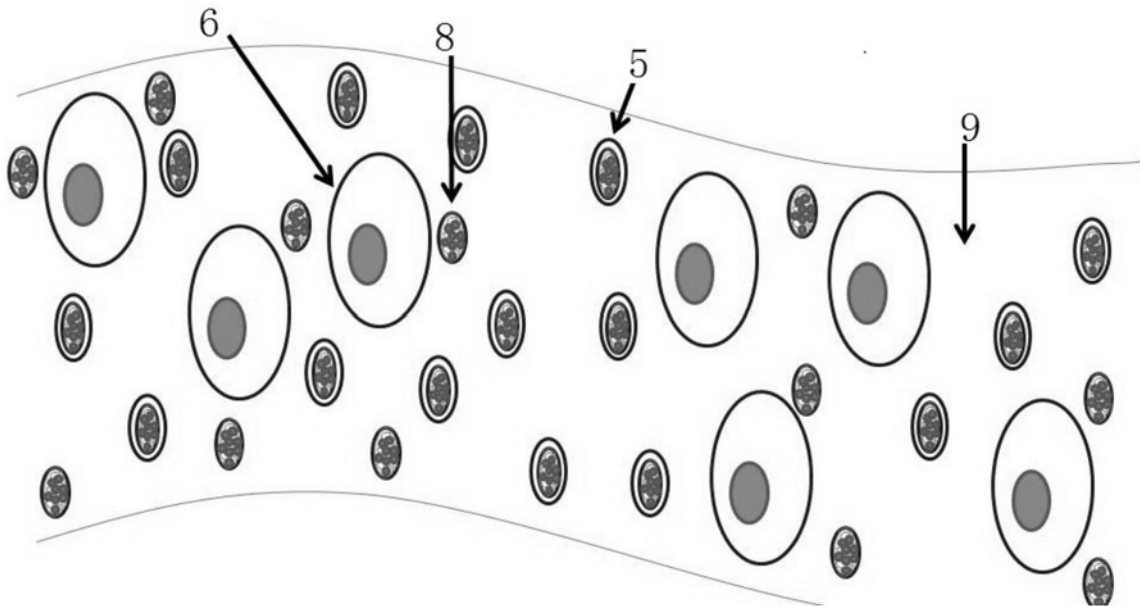


图4

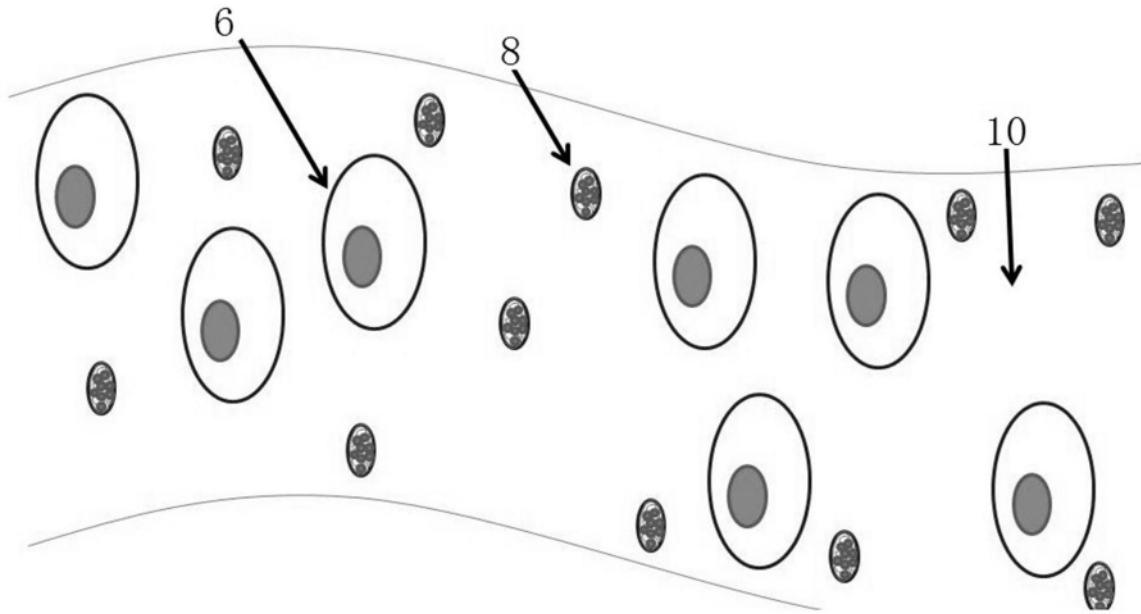


图5

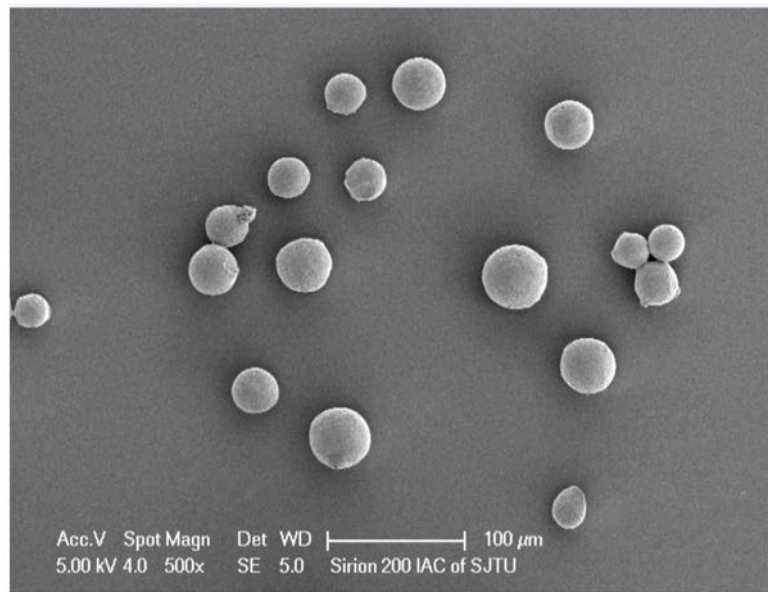


图6