



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410015241. X

[43] 公开日 2004 年 12 月 29 日

[11] 公开号 CN 1557504A

[22] 申请日 2004. 1. 19

[21] 申请号 200410015241. X

[71] 申请人 肖应庆

地址 510515 广东省广州市第一军医大学 121
栋 703 室

[72] 发明人 肖应庆

[74] 专利代理机构 广州知友专利代理有限公司

代理人 宣国华

权利要求书 2 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 磷酸钙活性骨活化剂与制备方法及其用途

[57] 摘要

本发明公开了一种磷酸钙活性骨活化剂与制备方法及其用途，由 α 角蛋白经巯基试剂、酸、碱变性一系列处理后而成；在磷酸钙骨水泥 (CPC) 中加入其重量 1/10 ~ 3/10 的磷酸钙活性骨活化剂，使磷酸钙骨水泥成为一种既具有良好的骨传导作用，又具有高效骨诱导活性的磷酸钙活性骨。本发明活化剂能有效地提高磷酸钙骨水泥的骨诱导活性和成骨能力，加速磷酸钙骨水泥的降解吸收和自体新骨的形成；无毒副作用，安全可靠；剂型多样，性能稳定，易于保存，经压力蒸汽灭菌，无菌有效期长达 5 年；原料来源充足，生产工艺不复杂，成本也不高，易于形成规模化生产。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种磷酸钙活性骨活化剂，其特征在于：由 α 角蛋白经巯基试剂、酸、碱变性一系列处理后而成。

2、权利要求 1 所述的磷酸钙活性骨活化剂的制备方法，其特征在于包括以下步骤：

(1) 定量称取经清洗、干燥的 α 角蛋白，加 3~6 倍的 0.1~2.0mol/L 巯基试剂，在 20~40℃处理 1~8 小时；再用蒸馏水洗净试剂，并 60~80℃干燥；

(2) 在步骤 1 所得的产物中加 3~6 倍的 0.1~1.0mol/L 酸，在 20~50℃处理 1~10 小时；再用蒸馏水漂洗至中性，并 60~80℃干燥；

(3) 在步骤 2 所得的产物中加 3~6 倍的 0.1~4.0mol/L 碱，在 20~60℃处理 2~30 小时；调 pH 到 7.0~7.5；浓缩脱盐，调渗透压与体液相近，封装灭菌，即可得液相剂型磷酸钙活性骨活化剂。

3、权利要求 1 所述的磷酸钙活性骨活化剂的制备方法，其特征在于包括以下步骤：

(1) 定量称取经清洗、干燥的 α 角蛋白，加 3~6 倍的 0.1~1.0mol/L 巯基试剂，在 20~50℃处理 1~10 小时；再用蒸馏水洗净试剂，并 60~80℃干燥；

(2) 在步骤 1 所得的产物中加 3~6 倍的 0.05~1.0mol/L 酸，在 20~50℃处理 1~10 小时；再用蒸馏水漂洗至中性，并 60~80℃干燥；

(3) 在步骤 2 所得的产物中加 3~6 倍的 0.1~4.0mol/L 碱，在 20~60℃处理 2~30 小时；调 pH 到 7.0~7.5；浓缩脱盐，干燥研磨，封装灭菌，即可得固相剂型磷酸钙活性骨活化剂。

4、权利要求 1 所述的磷酸钙活性骨活化剂的制备方法，其特征在于包括以下步骤：

(1) 定量称取经清洗、干燥的 α 角蛋白，剪成长度约为 2~3mm/段，加 3~6 倍的 0.1~1.0mol/L 巯基试剂，在 20~50℃ 处理 1~8 小时；再用蒸馏水洗净试剂，并 60~80℃ 干燥；

(2) 在步骤 1 所得的产物中加 3~6 倍的 0.05~1.0mol/L 酸，在 20~50℃ 处理 1~10 小时；再用蒸馏水漂洗至中性，并 60~80℃ 干燥；

(3) 在步骤 2 所得的产物中加 3~6 倍的加 0.1~1.0mol/L 碱，在 20~50℃ 处理 1~20 小时；再用蒸馏水漂洗至中性，并 60~80℃ 干燥，封装灭菌，即可得固相剂型磷酸钙活性骨活化剂。

5、权利要求 1 所述的磷酸钙活性骨活化剂的用途，其特征在于在磷酸钙骨水泥 (CPC) 中加入其重量为 1/10~3/10 的磷酸钙活性骨活化剂液相剂型和固相剂型的混合物或两种固相剂型的混合物，使磷酸钙骨水泥成为一种既具有良好的骨传导作用，又具有高效骨诱导活性的磷酸钙活性骨。

磷酸钙活性骨活化剂与制备方法及其用途

技术领域

本发明涉及一种促进组织生长的活化剂，尤其是涉及一种磷酸钙活性骨活化剂；本发明还涉及该磷酸钙活性骨活化剂的制备方法及其用途。

背景技术

现有技术中的磷酸钙骨水泥（CPC）具有良好的生物相容性、可降解性，固化时不发热，可随意塑形，与硬组织可紧密连接等优点。但目前 CPC 与其它骨修复材料相比，固化体强度较低，不适于承重骨修复，临床应用受到一定限制。因此，有学者将提高固化体强度作为最重要的研究目标之一；但西安交通大学学报（医学版），2002，23（6）：605-608“水泥型羟基磷灰石人工骨的制备及性能分析”一文提出除着眼于提高强度外，同时应重视如何促进骨的生长替代方面的论点；中华骨科杂志，2003，23（2）：114-120“磷酸钙骨水泥作为骨形成蛋白载体修复节段性骨缺损及相关研究”一文中公开了从提高 CPC 的骨诱导活性出发，将具有高效骨诱导活性的骨形态发生蛋白（BMP）加入到 CPC 中，制成具有生物活性的 CPC/BMP 复合物，以加速新骨的形成，从而使其突破在临床应用的限制。但 BMP 尚存在如下问题：（1）抗原性还有待进一步研究；（2）组织中含量甚微，提纯过程复杂，质量难以保证，很难形成规模化生产；（3）生产成本甚高，价格昂贵，不利推广应用；（4）为了保持 BMP 的活性，CPC/BMP 复合物不能采用压力蒸汽灭菌，而只能用烷氧乙烷灭菌，烷氧乙烷的残留给受用者带来潜在危害。

发明内容

本发明的目的在于提供一种磷酸钙活性骨活化剂；本发明另一目的在于提供该磷酸钙活性骨活化剂的制备方法及其用途；该活化剂能有效地提高 CPC 的骨诱导活性和成骨能力，加速 CPC 的降解吸收和自体新骨的形成，同时避免了应用 BMP 所存在的问题和缺陷。

为实现上述目的，本发明磷酸钙活性骨活化剂由 α 角蛋白经巯基试剂、酸、碱变性一系列处理后而成。

本发明磷酸钙活性骨活化剂的制备方法，包括以下步骤：

(1) 定量称取经清洗、干燥的 α 角蛋白，加3~6倍的0.1~2.0mol/L巯基试剂，在20~40℃处理1~8小时；再用蒸馏水洗净试剂，并60~80℃干燥；

(2) 在步骤1所得的产物中加3~6倍的0.1~1.0mol/L酸，在20~50℃处理1~10小时；再用蒸馏水漂洗至中性，并60~80℃干燥；

(3) 在步骤2所得的产物中加3~6倍的0.1~4.0mol/L碱，在20~60℃处理2~30小时；调pH到7.0~7.5；浓缩脱盐，调渗透压与体液相近，封装灭菌，即可得液相剂型磷酸钙活性骨活化剂。

本发明磷酸钙活性骨活化剂还可以用以下步骤的制备方法：

(1) 定量称取经清洗、干燥的 α 角蛋白，加3~6倍的0.1~1.0mol/L巯基试剂，在20~50℃处理1~10小时；再用蒸馏水洗净试剂，并60~80℃干燥；

(2) 在步骤1所得的产物中加3~6倍的0.05~1.0mol/L酸，在20~50℃处理1~10小时；再用蒸馏水漂洗至中性，并60~80℃干燥；

(3) 在步骤2所得的产物中加3~6倍的0.1~4.0mol/L碱，在20~60℃处理2~30小时；调pH到7.0~7.5；浓缩脱盐，干燥研磨，封装灭菌，即可得固相剂型磷酸钙活性骨活化剂。

本发明磷酸钙活性骨活化剂还可以用以下步骤的制备方法：

(1) 定量称取经清洗、干燥的 α 角蛋白，剪成长度约为2~3mm/段，加3~6倍的0.1~1.0mol/L巯基试剂，在20~50℃处理1~8小时；再用蒸馏水洗净试剂，并60~80℃干燥；

(2) 在步骤 1 所得的产物中加 3~6 倍的 0.05~1.0mol/L 酸，在 20~50℃ 处理 1~10 小时；再用蒸馏水漂洗至中性，并 60~80℃ 干燥；

(3) 在步骤 2 所得的产物中加 3~6 倍的加 0.1~1.0mol/L 碱，在 20~50℃ 处理 1~20 小时；再用蒸馏水漂洗至中性，并 60~80℃ 干燥，封装灭菌，即可得固相剂型磷酸钙活性骨活化剂。

本发明磷酸钙活性骨活化剂的用途，在磷酸钙骨水泥（CPC）中加入其重量为 1/10~3/10 的磷酸钙活性骨活化剂液相剂型和固相剂型的混合体或两种固相剂型的混合体，使磷酸钙骨水泥成为一种既具有良好的骨传导作用，又具有高效骨诱导活性的磷酸钙活性骨。

经动物实验，本发明磷酸钙活性骨对机体无刺激性，具有良好的生物相容性和组织相容性，不产生免疫排斥反应；可被机体降解吸收，同时诱导形成新的自体骨组织；以替代骨移植修复骨缺损；无毒副作用，安全可靠。其化学本质主要为蛋白质和肽类及各种氨基酸的复合物。活化剂及其降解产物激活骨祖细胞、成骨细胞、破骨细胞和骨髓间充质干细胞等分化、增殖、活化并合成、分泌某些重要的细胞因子，如碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）、转化生长因子（TGF）- β 1、类胰岛素生长因子（IGFs）、血小板衍生生长因子（PDGF）、表皮生长因子（EGF）、肿瘤坏死因子（TNF）、金属基质蛋白酶（MMP）-1 与金属基质蛋白酶组织抑制物（TIMP）-1 和骨形态发生蛋白（bone morphogenic protein, BMP）等。这些细胞因子和 BMP 可诱导骨细胞增殖、分化，促进胶原蛋白的合成和分泌，并调控血管增殖，加速形成与自体骨结构和功能相同的新生骨组织。本发明剂型多样，性能稳定，易于保存，经压力蒸汽灭菌，无菌有效期长达 5 年；原料来源充足，生产工艺简单，成本低，易于形成规模化生产。

具体实施方式

实施例一：

猪毛用洗发精洗净， $70\pm 10^{\circ}\text{C}$ 干燥。 $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ 脱脂，蒸馏水清洗， $70\pm 10^{\circ}\text{C}$ 干燥。称取 50g，加 $2.0\text{mol/L C}_2\text{H}_6\text{OS}$ 150mL，在 20°C 处理 1 小时。蒸馏水洗净试剂， $70\pm 10^{\circ}\text{C}$ 干燥。加 0.5 mol/L HClO_4 300mL，在 25°C 处理 2 小时。蒸馏水漂洗至 $\text{pH}5.0\sim 7.0$ ， $70\pm 10^{\circ}\text{C}$ 干燥。加 4 mol/L KOH 和 0.2mol/L Ca(OH)_2 等体积混合液 150mL，在 60°C 处理 10 小时。调 pH 到 $7.0\sim 7.5$ 。脱盐，浓缩至用缩二脲法测吸光度 2A/mL 以上，调渗透压 $260\sim 300\text{mmol/L}$ ，封装，压力蒸汽灭菌。即得液相剂型活化剂。

实施例二

人发用洗发精洗净， $70\pm 10^{\circ}\text{C}$ 干燥。 $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ 脱脂，蒸馏水清洗， $70\pm 10^{\circ}\text{C}$ 干燥。称取 50g，加 $0.2\text{mol/L C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ 200mL，在 30°C 处理 5 小时。蒸馏水洗净试剂， $70\pm 10^{\circ}\text{C}$ 干燥。加 0.1 mol/L HCl 250mL，在 30°C 处理 10 小时。蒸馏水漂洗至 $\text{pH}5.0\sim 7.0$ ， $70\pm 10^{\circ}\text{C}$ 干燥。加 2.0 mol/L NaOH 150mL，在 30°C 处理 30 小时。调 pH 到 $7.0\sim 7.5$ 。脱盐，浓缩至用缩二脲法测吸光度 2A/mL 以上，调渗透压 $260\sim 300\text{mmol/L}$ ，封装，压力蒸汽灭菌。即得液相剂型活化剂。

实施例三

猪毛用洗发精洗净， $70\pm 10^{\circ}\text{C}$ 干燥。 $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ 脱脂，蒸馏水清洗， $70\pm 10^{\circ}\text{C}$ 干燥。称取 50g，用 $0.5\text{mol/L C}_2\text{H}_6\text{OS}$ 200mL，在 40°C 处理 2 小时。蒸馏水洗净试剂， $70\pm 10^{\circ}\text{C}$ 干燥。加 $0.05\text{ mol/L CCl}_3\text{COOH}$ 250mL，在 30°C 处理 10 小时。蒸馏水漂洗至 $\text{pH}5.0\sim 7.0$ ， $70\pm 10^{\circ}\text{C}$ 干燥。加 4 mol/L NaOH 和 0.2mol/L Mg(OH)_2 等体积混合液 150mL，在 40°C 处理 20 小时。调 pH 到 $7.0\sim 7.5$ 。浓缩脱盐，干燥研磨，封装，压力蒸汽灭菌。即得固相剂型活化剂。

实施例四

人发用洗发精洗净, $70 \pm 10^\circ\text{C}$ 干燥。 $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ 脱脂, 蒸馏水清洗, $70 \pm 10^\circ\text{C}$ 干燥。称取 50g, 用 0.6mol/L $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ 200mL, 在 25°C 处理 3 小时。蒸馏水洗净试剂, $70 \pm 10^\circ\text{C}$ 干燥。加 0.2mol/L HCl 250mL, 在 25°C 下处理 5 小时。蒸馏水漂洗至 $\text{pH}5.0 \sim 7.0$, $70 \pm 10^\circ\text{C}$ 干燥。加 2.0mol/L NaOH 150mL, 在 60°C 水浴中处理 8 小时。调 pH 到 $7.0 \sim 7.5$ 。浓缩脱盐, 干燥研磨, 封装, 压力蒸汽灭菌。即得固相剂型活化剂。

实施例五

人发用洗发精洗净, $70 \pm 10^\circ\text{C}$ 干燥。 $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ 脱脂, 蒸馏水清洗, $70 \pm 10^\circ\text{C}$ 干燥, 称取 50g, 剪成长度约为 2mm/段。加 0.5mol/L $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ 200mL, 在 25°C 处理 6 小时。蒸馏水洗净试剂, $60 \sim 70^\circ\text{C}$ 干燥。加 0.1mol/L HClO_4 250mL, 在 20°C 处理 10 小时。蒸馏水漂洗至 $\text{pH}5.0 \sim 7.0$, $70 \pm 10^\circ\text{C}$ 干燥。加 0.6mol/L NaOH 和 0.4mol/L KOH 等体积混合液 250mL, 在 25°C 处理 8 小时。蒸馏水漂洗至 $\text{pH}5.0 \sim 7.0$, $70 \pm 10^\circ\text{C}$ 干燥。封装, 压力蒸汽灭菌。即得固相剂型活化剂。

具体的使用方法如下:

以重量计, 取 9 份无菌磷酸钙骨水泥 (CPC)、0.5~2 份实施例五中制得的固相活化剂和 1~2 份实施例一中制得的液相活化剂或 1~2 份实施例二中制得的液相活化剂、2~4 份无菌 $\text{pH}7.4$ 的 0.25mol/L $\text{HPO}_4^{2-} - \text{H}_2\text{PO}_4^-$ 缓冲液, 按无菌操作要求调和均匀, 用无菌注入器注入患者骨缺损处, 体温下固化。

以重量计, 取 9 份无菌磷酸钙骨水泥 (CPC)、0.5~2 份实施例五中制得的固相活化剂和 0.5~2 份实施例三中制得的液相活化剂或 0.5~2 份实施例四中制得的液相活化剂、3~5 份无菌 $\text{pH}7.4$ 的 0.25mol/L $\text{HPO}_4^{2-} - \text{H}_2\text{PO}_4^-$ 缓冲液, 按无菌操作要求调和均匀, 用无菌注入器注入患者骨缺损处, 体温下固化。