(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118949135 A
(43)申请公布日 2024.11.15

(21)申请号 202411036836.7
(22)申请日 2024.07.31
(71)申请人 杭州贤石生物科技有限公司
地址 310000 浙江省杭州市萧山区经济技术开发区金一路79号D座112室
(72)发明人 俞小华 徐小栋 王铭祥 马金霞 李芮 陈新 周馥敏
(74)专利代理机构 成都帝鹏知识产权代理事务所(普通合伙) 51265
专利代理师 李华
(51)Int.Cl.
A61L 27/36(2006.01)
A61L 27/50(2006.01)
A61L 27/54(2006.01)
A61L 27/32(2006.01)
A61L 27/56(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54)发明名称

一种原位仿生矿化的骨填充材料及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明提供了一种原位仿生矿化的骨填充材料及其制备方法与应用,属于骨植入材料的制备技术领域。本发明方法通过原位矿化的工艺,以脱钙松质骨为载体,在矿化液中发生原位矿化,经过冷冻干燥、灭菌得到骨填充材料。该方法解决了常见异种煅烧骨缺乏骨诱导性以及生物陶瓷的降解极慢等问题。经原位矿化后的脱钙松质骨具有天然骨的孔隙结构和纳米级羟基磷灰石,同时可生物降解、具有生物相容性及骨诱导性,更有利于血管和细胞的生长增殖。在临床上实现修复速度更快的优势。



CN 118949135 A

1.一种原位仿生矿化的骨填充材料的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)将松质骨粉碎成粒径为0.3～0.8mm的骨粉,然后按照料液比1:5～1:30w/v加入到EDTA溶液中,室温振荡脱钙4～16小时;

(2)将步骤(1)处理后的松质骨按照料液比1:4w/v加入到过氧乙酸溶液中,室温振荡2小时;

(3)将步骤(2)处理后的松质骨按照料液比1:5～1:10w/v加入到异丙醇中,室温振荡脱脂24小时;

(4)将步骤(3)处理后的松质骨按照料液比1:5～1:10w/v加入到1～4wt%脱氧胆酸钠溶液中,室温振荡脱细胞8～24小时,制备得到脱钙松质骨;

(5)将脱钙松质骨按照料液比1:5～1:10w/v加入到2～3wt%的三偏磷酸钠溶液中,室温振荡1小时,进行磷酸化处理;

(6)将磷酸化处理后的脱钙松质骨按照料液比1:200～1:500浸入到矿化液中,于37℃振荡仿生矿化1-5天,所述矿化液的组成为:氯化钠100-160mM、磷酸氢二钾2-4mM,氯化镁3-5mM,4羟乙基哌嗪乙磺酸35-40mM,碳酸氢钠15-22mM,氯化钙6-9mM,pH值为6.5-7.0;

(7)对仿生矿化后的脱钙松质骨进行冷冻干燥和灭菌,即得所得原位仿生矿化的骨填充材料。

2.根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中所述EDTA溶液的浓度为10wt%;优选的,所述EDTA溶液的pH值为7.4。

3.根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)中所述过氧乙酸溶液的浓度为0.3wt%。

4.根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(4)中所述脱氧胆酸钠溶液的pH为8;优选的,步骤(5)中所述三偏磷酸钠溶液的pH为10。

5.根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(6)中在振荡仿生矿化过程中,每24小时更换一次矿化液;优选的,步骤(7)中所述灭菌采用电子束进行灭菌,灭菌的剂量为20～25kGy。

6.根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)至步骤(6)中,对处理后的松质骨均进行清洗,所述清洗的步骤为:将处理后的松质骨以料液比1:10～1:20w/v倒入纯化水中,室温振荡清洗1小时,每5分钟换液一次。

7.由权利要求1-6任一项所述的制备方法得到的原位仿生矿化的骨填充材料。

8.根据权利要求7所述的原位仿生矿化的骨填充材料,其特征在于,所述骨填充材料中有机相的占比为20-40wt%,无机相的占比为50-70wt%。

9.权利要求8所述的原位仿生矿化的骨填充材料,其特征在于,所述无机相为团簇状或球状的羟基磷灰石,其直径为1μm,单个团簇状羟基磷灰石由纳米级片状羟基磷灰石构成。

10.权利要求7-9任一项所述的原位仿生矿化的骨填充材料作为口腔颌面部骨缺损填充材料方面的应用。

一种原位仿生矿化的骨填充材料及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于骨植入材料的制备技术领域,具体涉及一种原位仿生矿化的骨填充材料及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 据估计,目前全球骨移植市场的规模每年超过25亿美元,每年进行的骨移植手术超过200万例。此外,由于人口老龄化,每年因骨质疏松症、关节炎、肿瘤和创伤等疾病进行的骨移植手术数量增加,对骨填充材料的需求也日益增加。理想的骨填充材料应具有以下性能:1)骨传导性,允许细胞和血管长入的支架结构;2)骨诱导性,可招募和诱导间充质细胞分化为成熟的成骨细胞;3)理想的降解周期,应与骨形成周期相适应;4)生物安全性。然而,目前市售产品各有利弊,如同种异体骨虽然具有骨传导性和骨诱导性,但存在病毒感染风险和伦理问题,且原料有限,无法产业化;异种锻烧骨,虽通过高温煅烧去除了有机相,避免了免疫原性风险,但同时失去了骨诱导性且降解周期较长,甚至不降解;人工合成骨,虽然免疫原性风险低,但无骨诱导性,且降解产物多为酸性不利于局部成骨。

[0003] 现有用于骨填充材料的生物材料类多经过较为彻底的人工处理方式如煅烧、烧结得到,这种处理方式获得的骨填充材料无活性成分,缺乏骨诱导性,而生物陶瓷类一般具有脆性大、降解缓慢等问题。为增强骨填充材料的生物活性、骨填充支架能力及适宜的降解速率,科研人员进行了相应研究。

[0004] 现有的研究主要关注如何通过较为温和的方式处理松质骨,使其既无免疫原性又能保留骨诱导性,并可原位矿化与人体骨骼结构组分较为一致的羟基磷灰石涂层,使骨填充材料的降解及钙磷释放变得可控。现有产品将骨形态发生蛋白-2与羟基磷灰石等材料复合而成,但价格高昂,且其释放速度较难实现可控,易引起过度修复或修复不全的风险。

[0005] 例如,中国专利文献CN116712613A提供了一种骨填充材料,由原料A(透明质酸或者壳聚糖)与原料A之间通过交联剂交联,胶原蛋白与胶原蛋白之间共价交联;羟基磷灰石以物理沉积的方式沉积在胶原蛋白上制备得到骨填充材料的方式。具有与天然骨膜一致的物质组成和微观及宏观结构,并具备良好的力学性能和生物降解特性。但由于是单纯物理混合,无法做到无机相与有机相的均匀分布。

[0006] 中国专利文献CN105169482A提供一种牙科骨替代材料,其是采用化学处理及煅烧工艺制备胎牛松质骨多孔支架,表面处理形成磷酸钙矿化结晶。较其他种类动物来源的骨替代材料具有更短的体内代谢时间,更符合临床植骨的需要。但由于以煅烧骨作为载体,缺乏天然骨组织的有机成分,无骨诱导性。

[0007] 中国专利文献CN1106861C提供了一种纳米相钙磷盐/胶原/聚乳酸骨复合多孔材料,涉及一种原位矿化胶原的方法,其成分与人骨相近。但其载体为提纯胶原,无骨诱导性,并且难以随意调控矿化程度。

[0008] 中国专利文献CN109276761B提供了一含rh-BMP2和磷酸盐的骨修复材料,是以壳聚糖为缓释载体,实现了BMP-2持续有效的工作浓度。但缺乏骨组织胶原支架结构,无法再

现原位仿生矿化,无机成分释放速度不可控。

[0009] 因此,如何解决现有常见异种煅烧骨缺乏骨诱导性以及生物陶瓷的降解极慢等问题,以及如何实现骨填充材料保留充足的活性物质,具有高效的骨诱导性,同时还能实现更好的矿化效果,实现骨缺损部位的更快速修复,成为亟待解决的技术问题。

发明内容

[0010] 本发明就是为了解决上述技术问题,从而提供一种原位仿生矿化的骨填充材料及其制备方法与应用。本发明的技术目的在于,提供一种脱钙效率高、活性成分含量高、可原位矿化、且矿化效果好的骨填充材料,以解决现有的骨填充材料活性成分含量低、缺乏骨诱导性、以及矿化效果不佳的问题。

[0011] 为了实现上述技术目的,本发明采用的技术方案如下:

[0012] 本发明首先提供了一种原位仿生矿化的骨填充材料的制备方法,包括以下步骤:

[0013] (1)将松质骨粉碎成粒径为0.3~0.8mm的骨粉,然后按照料液比1:5~1:30w/v加入到EDTA溶液中,室温振荡脱钙4~16小时;

[0014] (2)将步骤(1)处理后的松质骨按照料液比1:4w/v加入到过氧乙酸溶液中,室温振荡2小时;

[0015] (3)将步骤(2)处理后的松质骨按照料液比1:5~1:10w/v加入到异丙醇中,室温振荡脱脂24小时;

[0016] (4)将步骤(3)处理后的松质骨按照料液比1:5~1:10w/v加入到1~4wt%脱氧胆酸钠溶液中,室温振荡脱细胞8~24小时,制备得到脱钙松质骨;

[0017] (5)将脱钙松质骨按照料液比1:5~1:10w/v加入到2~3wt%的三偏磷酸钠溶液中,室温振荡1小时,进行磷酸化处理;

[0018] (6)将磷酸化处理后的脱钙松质骨按照料液比1:200~1:500浸入到矿化液中,于37℃振荡仿生矿化1-5天,所述矿化液的组成为:氯化钠100-160mM、磷酸氢二钾2-4mM,氯化镁3-5mM,4羟乙基哌嗪乙磺酸35-40mM,碳酸氢钠15-22mM,氯化钙6-9mM,pH值为6.5-7.0;

[0019] (7)对仿生矿化后的脱钙松质骨进行冷冻干燥和灭菌,即得所得原位仿生矿化的骨填充材料。

[0020] 本发明提供的上述制备方法,采用仿生矿化技术,制备与自体骨有相似结构、成分及微观形貌的骨填充材料。通过磷酸化处理,增加了脱钙松质骨材料的成核位点,一方面缩短了矿化总时长,另一方面使得矿化过程更加稳定。模拟自然骨矿化,在脱钙松质骨上原位矿化形成无机盐涂层,具有更好地促进新骨的形成作用和引导骨再生的作用。

[0021] 本发明的制备方法解决了骨填充材料通常活性成分含量低、降解周期长的问题。该方法首次在天然脱钙松质骨支架上矿化形成纳米级羟基磷灰石,去除免疫原性,保留活性成分,并且可调控细胞信号传导,使之可被机体自调节释放钙磷并成骨。

[0022] 本发明方法制备的骨填充材料通过对动物股骨取松质骨、前处理、脱钙、病毒灭活、脱脂、脱细胞、仿生矿化、干燥、灭菌获得,以天然骨骼多孔三维立体的胶原蛋白支架为基础,矿化为有纳米级羟基磷灰石为主要成分的材料,很好保留了骨诱导性。不仅能为再生的组织细胞提供三维支架结构,还具有调控再生细胞行为(包括细胞形态、黏附、增殖、迁移、分化及凋亡)等作用,具备良好的生物相容性和生物降解性能。此外,其制备工艺流程简

单、成本低、时间短,并且可调控终产品矿化程度。

[0023] 本发明方法通过原位矿化的工艺,以脱钙松质骨为载体,在矿化液中发生原位矿化,经过冷冻干燥、灭菌得到骨填充材料。该方法解决了常见异种煅烧骨缺乏骨诱导性以及生物陶瓷的降解极慢等问题。经原位矿化后的脱钙松质骨具有天然骨的孔隙结构和纳米级羟基磷灰石,同时可生物降解、具有生物相容性及骨诱导性,更有利于血管和细胞的生长增殖。在临床上实现修复速度更快的优势。

[0024] 本发明创造性地采用具有天然骨骼多孔三维立体的胶原蛋白支架为有机成分,且维持了松质骨天然孔隙率,其孔洞大小适合骨组织及血管组织长入。因此不仅能为再生的组织细胞提供三维支架结构,还含有丰富的非胶原蛋白类其他信号大分子及骨诱导蛋白成分,使得该骨填充材料具有优秀的成骨性能。表面纳米级的羟基磷灰石涂层随人体自调节释放钙磷及活性物质,诱导缺损部位成骨后,裸露的胶原蛋白支架可较为快速的降解并为成骨部位提供所需物质。因此该骨填充材料还具备优异的可根据人体所需调节的降解性能。

[0025] 进一步的是,步骤(1)中所述EDTA溶液的浓度为10wt%。

[0026] 进一步的是,步骤(1)中所述EDTA溶液的pH值为7.4。

[0027] 进一步的是,步骤(2)中所述过氧乙酸溶液的浓度为0.3wt%。

[0028] 进一步的是,步骤(4)中所述脱氧胆酸钠溶液的pH为8。

[0029] 进一步的是,步骤(5)中所述三偏磷酸钠溶液的pH为10。

[0030] 进一步的是,步骤(6)中在振荡仿生矿化过程中,每24小时更换一次矿化液。

[0031] 进一步的是,步骤(7)中所述灭菌采用电子束进行灭菌,灭菌的剂量为20~25kGy。

[0032] 进一步的是,步骤(1)至步骤(6)中,对处理后的松质骨均进行清洗,所述清洗的步骤为:将处理后的松质骨以料液比1:10~1:20w/v倒入水中,室温振荡清洗1小时,每5分钟换液一次。

[0033] 本发明的目的之二是提供由如上所述的制备方法得到的原位仿生矿化的骨填充材料。

[0034] 具体而言,本发明提供的原位仿生矿化的骨填充材料,其中有机相的占比为20-40wt%,无机相的占比为50-70wt%。

[0035] 进一步的是,本发明的原位仿生矿化的骨填充材料,其中无机相为团簇状或球状羟基磷灰石,直径约1μm,单个团簇状羟基磷灰石由纳米级片状羟基磷灰石构成。

[0036] 本发明的目的之三是提供如上所述的原位仿生矿化的骨填充材料作为口腔颌面部骨缺损填充材料方面的应用。

[0037] 本发明的有益效果如下:

[0038] (1)本发明方法制备获得的骨填充材料中有机相的比例为20%-40wt%,无机相的组成为50%-70wt%,与天然骨组成和结构相似;

[0039] (2)本发明的脱钙松质骨质来源于动物骨(部位包括但不限于股骨、肩胛骨、角等,种属来源包括但不限于猪、牛、鹿、马、羊等),具有天然骨骼多孔三维立体结构,内部保留有活性成分,包括胶原蛋白及骨形态发生蛋白等;

[0040] (3)本发明制备的骨填充材料含有丰富的骨形态发生蛋白BMP-2等成骨相关活性因子,具有很好的骨诱导性;

[0041] (4)本发明骨填充材料中无机相为团簇状或球状羟基磷灰石,直径约1μm,单个团簇状羟基磷灰石由纳米级片状羟基磷灰石构成,具有更大的比表面积和更高的生物利用度;

[0042] (5)本发明的骨填充材料可用于口腔颌面部骨缺损的快速修复,并且可在3个月内完成生物降解,与骨形成时间协调一致。

附图说明

[0043] 图1为本发明实施例制备的骨填充材料样品实物图;

[0044] 图2为本发明实施例制备的骨填充材料扫描电镜图片(左:矿化前;右:矿化后);

[0045] 图3为本发明实施例制备的骨填充材料无机相放大后情况;

[0046] 图4为本发明实施例制备的骨填充材料无机相XRD结果(表面涂层物相成分为羟基磷灰石);

[0047] 图5为造模8w后取材兔下颌骨(左:Bio-Oss;右:实施例样品);

[0048] 图6为造模8w后取材兔下颌骨X线拍照(左:Bio-Oss;右:实施例样品);

[0049] 图7为造模12w后取材兔下颌骨(左:Bio-Oss;右:实施例样品)。

具体实施方式

[0050] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例对本发明进行具体描述,有必要指出的是,以下实施例仅用于对本发明进行解释和说明,并不用于限定本发明。本领域技术人员根据上述发明内容所做出的一些非本质的改进和调整,仍属于本发明的保护范围。

[0051] 实施例1

[0052] 本实施例提供了一种原位仿生矿化的骨填充材料的制备方法,具体制备步骤如下:

[0053] (一)脱钙松质骨的制备

[0054] (1)前处理:取整根股骨,用切骨机切取股骨两端的松质骨部分,弃去中间的皮质骨部分。并用切骨机将骨块外圈的皮质骨全部去除,只保留松质骨部分。最后用切骨机将松质骨切为骨粒。取骨粒粉碎,以1:10(w/v)料液比倒入纯化水,室温振荡清洗1小时,每5分钟换液一次,过筛取粒径0.3mm骨粉。

[0055] (2)脱钙:取步骤(1)制备的样品,按照1:5(w/v)料液比加入10wt%EDTA溶液(pH~7.4),室温振荡脱钙4小时。结束后,以1:10(w/v)液比倒入纯化水,室温振荡清洗1小时,每5分钟换液一次。

[0056] (3)病毒灭活:取步骤(2)制备的样品,按照1:4(w/v)料液比加入0.3wt%过氧乙酸溶液,室温振荡2小时。结束后,以1:10(w/v)料液比倒入纯化水,室温振荡清洗1小时,每5分钟换液一次。

[0057] (4)脱脂:取步骤(3)制备的样品,按照1:5(w/v)料液比加入异丙醇,室温振荡脱脂24小时,每8小时换液一次。结束后,以1:10(w/v)料液比倒入纯化水,室温振荡清洗1小时,每5分钟换液一次。

[0058] (5)脱细胞:取步骤(4)制备的样品,按照1:5(w/v)料液比加入1wt%脱氧胆酸钠溶

液(pH～8),室温振荡脱细胞8小时。结束后,以1:10(w/v)料液比倒入生理盐水,室温振荡清洗30分钟,每5分钟换液一次。再以1:10(w/v)料液比倒入纯化水,室温振荡清洗30分钟,每5分钟换液一次,制得脱钙松质骨。

[0059] (二)矿化脱钙松质骨的制备

[0060] S1、磷酸化处理:取方法(一)制备的脱钙松质骨,按照1:5(w/v)料液比加入2wt%三偏磷酸钠(pH～10),室温振荡1小时。结束后,以1:10(w/v)料液比倒入纯化水,室温振荡清洗1小时,每5分钟换液一次。

[0061] S2、仿生矿化溶液的配制:依次称取氯化钠、磷酸氢二钾、氯化镁加入纯化水中,待完全溶解后,继续加入适量的4羟乙基哌嗪乙磺酸和碳酸氢钠维持体系酸碱度,再加入氯化钙搅拌至溶液澄清。溶液终浓度为氯化钠100mM、磷酸氢二钾2mM,氯化镁3mM,4羟乙基哌嗪乙磺酸35mM,碳酸氢钠15mM,氯化钙6mM,pH值为6.5。

[0062] S3、仿生矿化:取步骤S1磷酸化后的样品,按照1:200(w/v)料液比加入步骤S2配置的矿化溶液,37℃振荡仿生矿化,每24小时换液一次。结束后,以1:10(w/v)料液比倒入纯化水,室温振荡清洗1小时,每5分钟换液一次。

[0063] S4、干燥与灭菌:取步骤S3制备的样品,进行冷冻干燥、包装,最终电子束灭菌,剂量为20kGy。

[0064] 实施例2

[0065] 参照实施例1的方法,不同之处在于:

[0066] 步骤(1)中料液比1:12(w/v),取粒径范围0.4～0.6mm的骨粉;

[0067] 步骤(2)中以料液比1:10(w/v)加入10wt%EDTA溶液,室温振荡脱钙10小时;

[0068] 步骤(4)中以料液比1:8(w/v)加入异丙醇;

[0069] 步骤(5)中以料液比1:8(w/v)加入2wt%脱氧胆酸钠溶液,室温振荡脱细胞12小时;以1:15(w/v)的料液比倒入生理盐水;

[0070] 步骤S1中以料液比1:8(w/v)加入2.5wt%三偏磷酸钠;

[0071] 步骤S2中矿化溶液的终浓度为氯化钠120mM、磷酸氢二钾3mM,氯化镁4mM,4羟乙基哌嗪乙磺酸38mM,碳酸氢钠18mM,氯化钙8mM,pH值为6.8;

[0072] 步骤S3中以料液比1:300(w/v)加入矿化溶液;

[0073] 步骤S4中,灭菌剂量为22kGy。

[0074] 上述步骤除S4外,其它所有步骤在对骨料进行清洗时,均以1:20(w/v)料液比倒入纯化水,室温振荡清洗1小时,每5分钟换液一次。

[0075] 实施例3

[0076] 参照实施例1的方法,不同之处在于:

[0077] 步骤(1)中料液比1:18(w/v),取粒径0.8mm的骨粉;

[0078] 步骤(2)中以料液比1:30(w/v)加入10wt%EDTA溶液,室温振荡脱钙16小时;

[0079] 步骤(4)中以料液比1:10(w/v)加入异丙醇;

[0080] 步骤(5)中以料液比1:10(w/v)加入4wt%脱氧胆酸钠溶液,室温振荡脱细胞24小时;以1:20(w/v)的料液比倒入生理盐水;

[0081] 步骤S1中以料液比1:10(w/v)加入3wt%三偏磷酸钠;

[0082] 步骤S2中矿化溶液的终浓度为氯化钠160mM、磷酸氢二钾4mM,氯化镁5mM,4羟乙基

哌嗪乙磺酸40mM,碳酸氢钠22mM,氯化钙9mM,pH值为7.0;

[0083] 步骤S3中以料液比1:500(w/v)加入矿化溶液;

[0084] 步骤S4中,灭菌剂量为25kGy。

[0085] 上述步骤除S4外,其它所有步骤在对骨料进行清洗时,均以1:20(w/v)料液比倒入纯化水,室温振荡清洗1小时,每5分钟换液一次。

[0086] 经检测,本发明实施例1-3的上述方法制备的骨填充材料具有以下特性:

[0087] (1)所述的骨填充材料中有机相的比例为20%-40wt%,无机相的组成为50%-70wt%;

[0088] (2)所述的脱钙松质骨质来源于动物骨(部位包括但不限于股骨、肩胛骨、角等,种属来源包括但不限于猪、牛、鹿、马、羊等),具有天然骨骼多孔三维立体结构,内部保留有活性成分,包括胶原蛋白及骨形态发生蛋白等;

[0089] (3)所述的骨填充材料含有骨形态发生蛋白BMP-2等成骨相关活性因子,具有骨诱导性;

[0090] (4)所述的骨填充材料无机相为团簇状或球状羟基磷灰石,直径约1μm,单个团簇状羟基磷灰石由纳米级片状羟基磷灰石构成,具有更大的比表面积和更高的生物利用度;

[0091] (5)所述的骨填充材料可用于口腔颌面部骨缺损的快速修复,并且可在3个月内完成生物降解,与骨形成时间协调一致。本发明制备的骨填充材料产品示意图如图1所示。

[0092] 实验例1:比较不同前处理方式对松质骨脱钙效率的影响

[0093] 按照实施例1的制备方法,以10wt%EDTA溶液进行脱钙,按下表时间点取样,纯化水清洗后,根据《GB/T 9695.13-2009肉与肉制品钙含量测定》方法测定钙含量,结果如下表1:

[0094] 表1前处理方式对松质骨脱钙效率(钙含量%)的影响

[0095]

脱钙时间 / 前处理方式	0 h	4 h	16 h	24 h
骨粒 (直径 1~2 cm)	26.34 ± 2.96	23.66 ± 1.89	21.34 ± 2.10	19.47 ± 1.00
骨粒 (直径 0.5~1 cm)		20.72 ± 3.89	18.11 ± 0.34	16.98 ± 1.56
骨粉 (粒径 0.3~0.8 mm)		0.59 ± 0.22	/	/

[0096]

[0097] 由表1可知,不同粒径的松质骨对脱钙效率造成相应影响,特别是本发明采用制备成骨粉的前处理方式,使得松质骨的脱钙时间仅需4h,大大降低了时间成本和微生物污染风险。

[0098] 实验例2:比较不同脱钙方式对骨填充材料生物活性的影响。

[0099] 传统脱钙方式多为0.6M盐酸处理24~72h,对松质骨活性成分影响较大。参照实施例1的制备方法,按照表2中的条件制备不同脱钙方式下的松质骨粉样品,使用4M盐酸胍/Tris-HCl溶液浸提各组样品,通过透析去除盐酸胍使其浓度低于0.06M,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒定量检测样品中BMP-2含量;采用差示扫描量热法(DSC)定量检测样品

变性温度,结果如下表2:

[0100] 表2脱钙方式对松质骨生物活性和结构的影响

[0101]

检测指标 / 脱钙方式	BMP-2 含量 (pg/g)	变性温度 (℃)
10%EDTA 处理 1 h	1130	66.3
10%EDTA 处理 2 h	1859	62.1
10%EDTA 处理 4 h	3031	58.6
10%EDTA 处理 16 h	1501	57.6
10%EDTA 处理 24 h	1388	55.2
10%EDTA 处理 48 h	967	52.1
10%EDTA 处理 72 h	603	50.3
10%EDTA 处理 144 h	289	48.6
0.6 M 盐酸处理 1 h	306	49.6

[0102] 由表2可知,随着脱钙初期钙磷盐溶解,BMP-2因子得以释放,测得含量增加,但是当钙完全脱除后,随EDTA处理时间延长,BMP-2含量逐渐下降,而盐酸脱钙仅1h,BMP-2因子含量已明显降低,说明本发明脱钙松质骨脱钙温和且时间短,可有效保留骨形成所需BMPs蛋白。同时,材料变性温度随处理时长增加逐渐下降,说明处理时间越长,材料结构破坏越严重,进一步证明本发明脱钙工艺处理时间短有利于维持材料生物活性和结构。

[0103] 实验例3:不同矿化工艺对无机相形成的影响。

[0104] 传统方式矿化方式为浸泡于模拟体液SBF中,而胶原缺乏矿化成核位点,矿化时间较长且不稳定。参照实施例1的制备方法,以表3中列举的不同矿化工艺对脱钙松质骨进行处理,按下表时间点取样,纯化水清洗后,根据中国药典(2020年版)四部通则0841炽灼残渣检查法测定无机相含量,结果如下表3,同时外观检查三组样品矿化3天后各平行样矿化情况,结果如下表4。

[0105] 表3矿化方式对松质骨矿化程度(无机相含量%)的影响

[0106]

矿化时间 / 矿化方式	矿化 1 天	矿化 2 天	矿化 3 天	矿化 4 天	矿化 5 天
SBF 浸泡	0.68±0.22	0.76±0.21	0.88±0.18	1.02±0.12	1.44±0.19
本专利矿化液浸泡	10.56±6.51	23.77±8.87	35.41±11.98	43.98±9.57	52.09±15.37
磷酸化+本专利矿化液浸泡	36.10±1.81	42.57±1.09	50.43±1.51	59.68±1.98	66.87±1.32

[0107] 表4矿化3天各矿化方式组平行样矿化情况(×:未矿化;√:已矿化)

[0108]

矿化时间 / 矿化方式	平行 1	平行 2	平行 3	平行 4	平行 5	平行 6
SBF 浸泡	×	×	×	×	×	×
本专利矿化液浸泡	×	×	√	√	√	×
磷酸化+本专利矿化液浸泡	√	√	√	√	√	√

[0109] 由表3、4可知,传统SBF浸泡不适用于脱钙骨材料,矿化效率极低;单纯使用本专利矿化液浸泡,部分样品可顺利矿化形成羟基磷灰石涂层,但部分样品则无法矿化,矿化成功率较低,工艺不稳定;而采用磷酸化+本专利矿化液浸泡的联合处理方式,所有样品均可顺利矿化,同时矿化处理的稳定性好且效率较高,满足工业生产的需求。

[0110] 实验例4

[0111] 对本发明实施例制备的骨填充材料进行性能测试,以实施例1的样品为例(其余实施例样品相差不大),扫描电镜(SEM)显示矿化前脱钙松质骨表面较光滑,缺少无机相涂层,矿化后脱钙松质骨表面形成纳米级无机相涂层,呈团簇状(图2),直径约为1μm,放大后可见单个团簇状羟基磷灰石由多个纳米级片状羟基磷灰石构成(图3),具有更大的比表面积和更高的生物利用度。X射线衍射分析结果显示该无机相涂层成分为羟基磷灰石(图4)。

[0112] 实验例5

[0113] 选用兔下颌骨缺损模型,尺寸为直径10mm*深度4mm,以Bio-Oss为对照品,术后8w后取材发现本品(以实施例1获得的样品为例,其余实施例样品类似)和对照品Bio-Oss均有材料残留(图5),X光拍照显示,两组造模区域边缘模糊,新骨形成明显,连接成片,无明显差异(图6),说明本品具有良好的成骨性能。术后12w后取材发现对照品仍有明显材料残留,本品已无残留,说明本品具有良好的生物降解性能(图7)。



图1

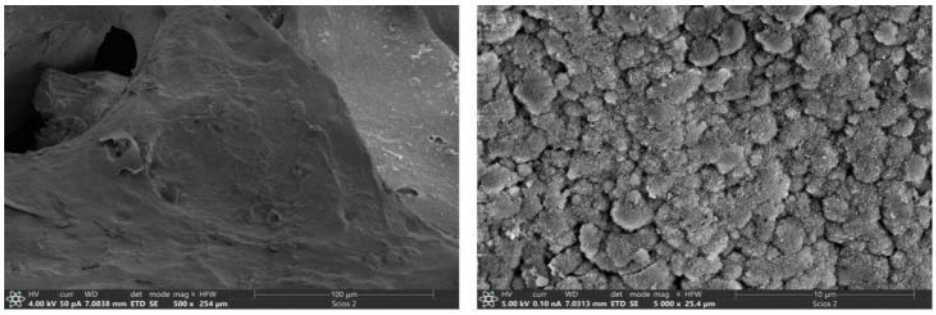

图2

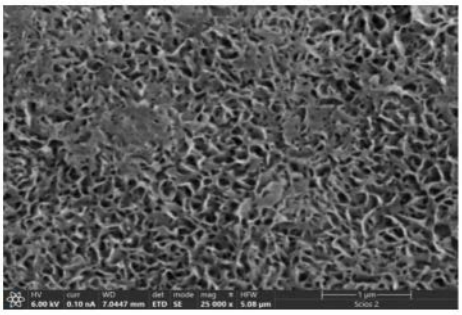

图3

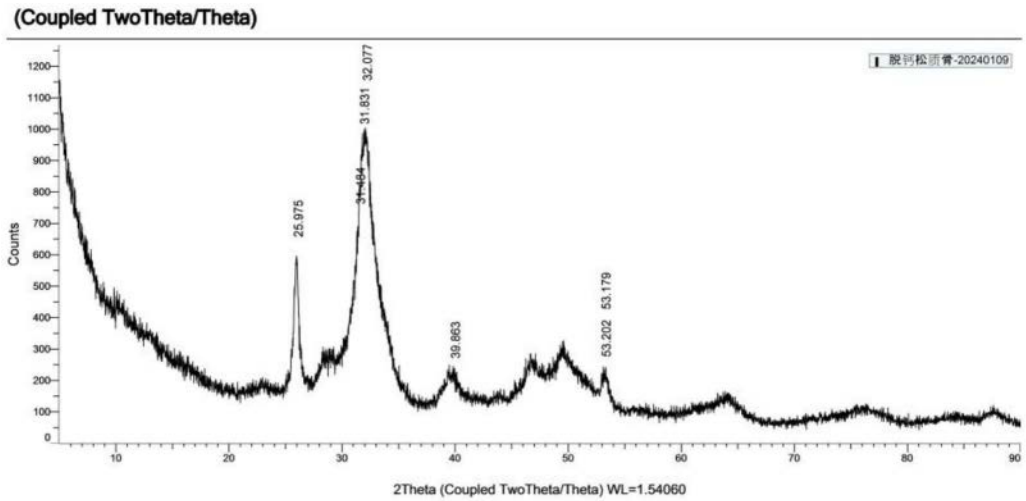
(Coupled TwoTheta/Theta)
脱钙松质骨-20240109
Counts
25.975
31.684
31.831
32.077
39.663
53.202
53.179
2Theta (Coupled TwoTheta/Theta) WL=1.54060

图4

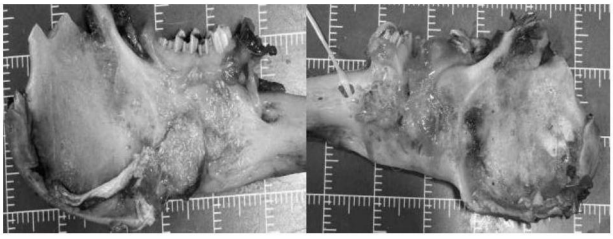

图5

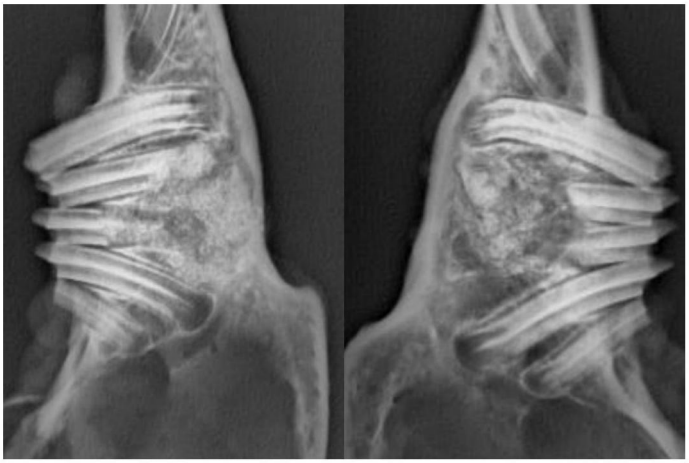

图6

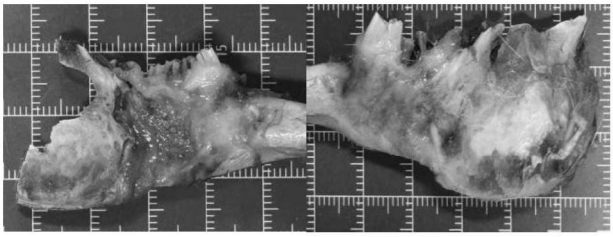

图7