

证书号第 1595015 号



发明专利证书

发明名称：角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶，其制备方法与应用

发明人：李翼；胡军岩；章瑜；刘璇

专利号：ZL 2011 1 0236254. X

专利申请日：2011 年 08 月 18 日

专利权人：香港理工大学

授权公告日：2015 年 02 月 25 日

本发明经过本局依照中华人民共和国专利法进行审查，决定授予专利权，颁发本证书并在专利登记簿上予以登记。专利权自授权公告之日起生效。

本专利的专利权期限为二十年，自申请日起算。专利权人应当依照专利法及其实施细则规定缴纳年费。本专利的年费应当在每年 08 月 18 日前缴纳。未按照规定缴纳年费的，专利权自应当缴纳年费期满之日起终止。

专利证书记载专利权登记时的法律状况。专利权的转移、质押、无效、终止、恢复和专利权人的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。



局长
申长雨

申长雨



2015 年 02 月 25 日



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102952246 B

(45) 授权公告日 2015.02.25

(21) 申请号 201110236254.X

(22) 申请日 2011.08.18

(73) 专利权人 香港理工大学
地址 中国香港九龙红磡

(72) 发明人 李翼 胡军岩 章瑜 刘璇

(74) 专利代理机构 深圳市顺天达专利商标代理有限公司 44217

代理人 郭伟刚

engineering. 《Biomaterials》.2010, 第4639-4656页.

Diane L. Hern, et al.. Incorporation of adhesion peptides into nonadhesive hydrogels useful for tissue resurfacing. 《Journal of biomedical materials research》. 1998, 第39卷(第2期), 第266-276页.

审查员 郑凯

(51) Int. Cl.

C08F 299/02(2006.01)

C08F 2/48(2006.01)

C08H 1/00(2006.01)

C08G 65/48(2006.01)

C12M 3/00(2006.01)

(56) 对比文件

US 2011/0070276 A1, 2011.03.24, 说明书第0001-0091段.

Zhu junmin. Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue

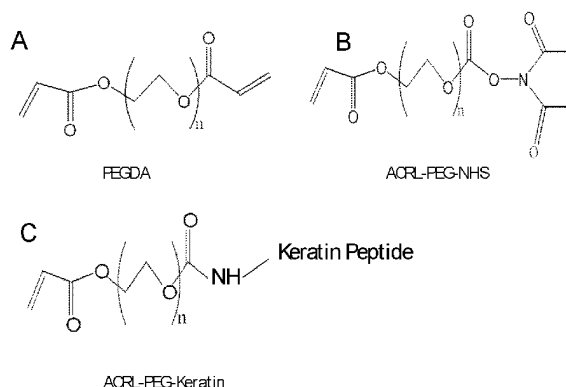
权利要求书1页 说明书10页 附图5页

(54) 发明名称

角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶, 其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶, 以及其制备方法与应用。所述角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶包括角蛋白肽修饰的聚乙二醇与聚乙二醇丙烯酸酯类单体共聚物。本发明公开的角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶利用天然角蛋白肽的良好生物性能和聚乙二醇水凝胶的可精细调控能力, 得到对细胞黏附和生长的有促进作用的生物功能材料水凝胶产品。



1. 一种角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶,包括角蛋白肽修饰的聚乙二醇与聚乙二醇丙烯酸酯类单体共聚形成的共聚物,其中

所述聚乙二醇丙烯酸酯类单体具有 400 ~ 40000Da 的分子量;

所述角蛋白肽修饰的聚乙二醇与聚乙二醇丙烯酸酯类单体的摩尔比为 0.00001 ~ 10:1;

所述角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶的交联密度 wt/vol% 为 1% ~ 50%,并且其中

所述角蛋白肽修饰的聚乙二醇由角蛋白肽与乙烯基聚乙二醇的琥珀酰亚胺活性酯类衍生物通过形成酰胺键生成,其中

所述角蛋白肽具有 200 ~ 5000Da 的分子量;

所述乙烯基聚乙二醇的琥珀酰亚胺活性酯类衍生物具有 1000 ~ 30000Da 的分子量;

所述乙烯基聚乙二醇的琥珀酰亚胺活性酯类衍生物与所述角蛋白肽的摩尔比为 0.01 ~ 1:1;

所述聚乙二醇丙烯酸酯类单体选自聚乙二醇二甲基丙烯酸酯和多臂聚乙二醇丙烯酸酯中的至少一种;

所述乙烯基聚乙二醇的琥珀酰亚胺活性酯类衍生物具有 2000 ~ 8000Da 的分子量,并且选自 Acrylate-PEG-SCM、Acrylate-PEG-SVA 中的至少一种。

2. 根据权利要求 1 所述的角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶,其特征在于,所述角蛋白肽修饰的聚乙二醇与聚乙二醇丙烯酸酯类单体的摩尔比为 0.00001 ~ 0.1:1。

3. 根据权利要求 1 所述的角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶,其特征在于,所述角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶具有 5 ~ 30wt/vol% 的交联密度。

4. 根据权利要求 1 所述的角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶,其特征在于,所述 PEG 为直链、支链、星形或树形结构的聚乙二醇。

5. 一种制备权利要求 1-4 任一所述的角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶的方法,包括:

(1) 将角蛋白肽粉溶于 pH 为 7 ~ 9 的缓冲溶液中,形成角蛋白肽溶液,所述角蛋白肽溶液中所述角蛋白肽的浓度为 0.1wt% ~ 饱和;

(2) 将乙烯基聚乙二醇的琥珀酰亚胺活性酯类衍生物添加到所述角蛋白肽溶液中,于 0 ~ 50°C 的反应温度避光反应 0.5 ~ 24 小时,其中所述乙烯基聚乙二醇的琥珀酰亚胺活性酯类衍生物与所述角蛋白肽的摩尔比为 0.001 ~ 100:1;

步骤 (2) 中所述乙烯基聚乙二醇的琥珀酰亚胺活性酯类衍生物与所述角蛋白肽的摩尔比为 0.01 ~ 1:1,所述反应温度为室温,并且反应时间为 2 ~ 8 小时;

(3) 从反应后的溶液中分离提纯乙烯基聚乙二醇化的角蛋白肽;

(4) 在可见光或紫外光照射下,使用光引发剂,使所述比例的乙烯基聚乙二醇化的角蛋白肽与聚乙二醇丙烯酸酯类单体共聚,形成角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶;其中,所述光引发剂在反应溶液中的浓度 wt/vol% 为 0.01% ~ 1%,所述光引发剂为 α 羟基酮类均裂型光引发剂。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其特征在于,步骤 (3) 的分离提纯方法选自透析法、超滤膜过滤法、凝胶过滤层析法、离子交换层析法、疏水层析法和反相色谱法中的至少一种。

7. 权利要求 1-4 任一所述的角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶在制备用于促进成纤维细胞黏附和生长的产品中的应用。

角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶,其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物功能性材料,具体地涉及一种角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶,以及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 可以大规模生产,结构和性能可调的人工合成生物材料相对于重现性较差的天然生物材料的缺点就是生物性能较差。为了开发和设计新的生物材料,采用生物活性肽对生物惰性的人工合成材料进行改性是改善合成材料生物活性的重要手段。经过适当的生物活性肽修饰,可以增强细胞黏附和促进细胞增殖,从而改善合成材料的生物性能。最常用的黏附肽 RGD(氨基酸序列 Arg-Gly-Asp) 可被细胞膜上的整合素识别参与细胞和基质间的黏附。除 RGD 肽外,KQAGDV、REDV、PHSRN、YIGSR、IKVAV 等多种短肽序列也可通过不同的整合素结合促进细胞的黏附和促进功能。然而,生产合成肽通常需要毒性很高的溶剂和试剂,造成生产成本和环境负担都非常高(Guzman,F.,S.Barberis,et al.“Peptide synthesis:chemical or enzymatic.”*Electronic Journal of Biotechnology* 2007,10(2):279-314.)。

[0003] 角蛋白是广泛存在于生物体组织中的结构蛋白,是构成毛发,羽毛,爪,角,鳞片等的主要成分。角蛋白原料通常被纺织业和屠宰业作为废物丢弃,这种现状已经引起了环境和经济方面的双重关注(Aluigi, A., M. Zoccola, et al. “Study on the structure and properties of wool keratin regenerated from formic acid.”*International Journal of Biological Macromolecules* 2007,41(3):266-27)。作为天生拥有生物相容性的可再生天然资源,角蛋白材料已经越来越多地得到包括美容、纺织、医药及医疗等行业的关注。通过对中国、美国及欧洲专利数据库的搜索,关于角蛋白肽的提取方法和功能研究,以及角蛋白材料的应用已经有了许多报道。

[0004] 角蛋白肽的提取和其生物功能的相关专利有欧洲专利 NZ534919,美国专利 US2001047082 和日本专利 JP1113998 等。关于角蛋白材料的应用,美国专利 US 6544548B1、US 6165496 和 US 5932552 等报道了角蛋白膜或水凝胶在生物医学方面的应用;中国专利 CN 1634568 报道了角蛋白在制药领域中的新用途包括在促创面修复,促组织生长,促生发护发和养肤美容的药物中的应用;关于伤口愈合的专利还包括中国专利 CN 1997408、中国专利 CN 101730540 和美国专利 US7732574 等;其他的应用还包括中国专利 CN 1274567 报道了使用人发角蛋白制作人工腱方法和工艺;欧洲专利 NZ 534919 报道了如何从角蛋白生物材料形成涂料和生物医学植入物;及中国专利 CN101838466 报道了羽毛角蛋白膜在药物释放中的功能。由以上众多专利可以看出角蛋白是一种很好的生物材料。从羊毛和人发提取的角蛋白材料已经证明含有细胞黏附肽序列例如 RGD 和 LDV(Tachibana, A., Y.Furuta 等,“Fabrication of wool keratin sponge scaffolds for long-term cell cultivation.”,*Journal of Biotechnology* 2002,93(2):165-170;Verma, V., P.Verma 等,“Preparation of scaffolds from human hair proteins for tissue-engineering applications.”,*Biomedical Materials* 2008,3(2):12.)。

[0005] 角蛋白作为一种天然的生物材料,虽然有很好的生物功能,但是其材料本身的化学和物理性能有限,且重现性较差。

[0006] 聚乙二醇是一种 pH 中性的无毒两亲性高分子,其免疫原性低,生物相容性也通过美国 FDA 认可。而且聚乙二醇分子量范围很宽,加上其多种衍生物和共聚物,性能可精细调控,已经被广泛应用于生物医学和药学材料。生物惰性的聚乙二醇水凝胶需要经过适当的生物活性肽修饰来增强细胞黏附和促进细胞增殖以实现其在美容,伤口愈合和组织工程的方面的应用。

[0007] 目前尚没有关于使用天然的角蛋白肽代替合成肽对聚乙二醇水凝胶进行修饰的产品及其应用的相关报道。

发明内容

[0008] 本发明要解决的技术问题在于,针对现有技术中生产合成肽成本高、环境负担重;天然生物材料重现性差的缺点,提供一种角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶生物功能性材料。

[0009] 本发明进一步要解决的技术问题在于,提供一种制备角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶的制备方法,以及该角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶的应用。

[0010] 为此,本发明一方面提供一种角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶,包括角蛋白肽修饰的聚乙二醇与聚乙二醇丙烯酸酯类单体共聚形成的共聚物,其中所述聚乙二醇丙烯酸酯类单体具有 400 ~ 40000Da 的分子量;所述角蛋白肽修饰的聚乙二醇与聚乙二醇丙烯酸酯类单体的摩尔比为 0.00001 ~ 10 : 1;所述角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶的交联密度为 1% ~ 50% (wt/vol%),并且其中所述角蛋白肽修饰的聚乙二醇由角蛋白肽与乙烯基聚乙二醇的琥珀酰亚胺活性酯类衍生物通过形成酰胺键生成,其中所述角蛋白肽具有 200 ~ 5000Da 的分子量;所述乙烯基聚乙二醇的琥珀酰亚胺活性酯类衍生物具有 1000 ~ 30000Da 的分子量。

[0011] 优选实施方案中,所述角蛋白肽修饰的聚乙二醇与聚乙二醇丙烯酸酯类单体的摩尔比为 0.00001 ~ 0.1 : 1。

[0012] 优选实施方案中,所述聚乙二醇丙烯酸酯类单体选自聚乙二醇双丙烯酸酯、聚乙二醇二甲基丙烯酸酯和多臂聚乙二醇丙烯酸酯中的至少一种。

[0013] 优选实施方案中,所述角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶具有 5 ~ 30wt/vol% 的交联密度。

[0014] 优选实施方案中,所述乙烯基聚乙二醇的琥珀酰亚胺活性酯类衍生物具有 2000 ~ 8000Da 的分子量,并且选自 Acrylate-PEG-NHS、Acrylate-PEG-SCM、Acrylate-PEG-SVA 中的至少一种。优选地,所述 PEG 为直链、支链、星形或树形结构的聚乙二醇。

[0015] 本发明另一方面提供一种制备角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶的方法,包括:

[0016] (1) 将角蛋白肽粉溶于 pH 为 7 ~ 9 的缓冲溶液中,形成角蛋白肽溶液;

[0017] (2) 将乙烯基聚乙二醇的琥珀酰亚胺活性酯类衍生物添加到所述角蛋白肽溶液中,于 0 ~ 50℃ 的反应温度避光反应 0.5 ~ 24 小时,其中所述乙烯基聚乙二醇的琥珀酰亚胺活性酯类衍生物与所述角蛋白肽的摩尔比为 0.001 ~ 100 : 1;

[0018] (3) 从反应后的溶液中分离提纯乙烯基聚乙二醇化的角蛋白肽;

[0019] (4) 在可见光或紫外光照射下,使用光引发剂,使所述比例的乙烯基聚乙二醇化的角蛋白肽与聚乙二醇丙烯酸酯类单体共聚,形成角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶。

[0020] 优选实施方案中,步骤(1)中的所述角蛋白肽溶液中所述角蛋白肽的浓度为 0.1wt%~饱和。

[0021] 优选实施方案中,步骤(2)中所述乙烯基聚乙二醇的琥珀酰亚胺活性酯类衍生物与所述角蛋白肽的摩尔比为 0.01~1:1,所述反应温度为室温,并且反应时间为 2~8 小时。

[0022] 优选实施方案中,步骤(3)的分离提纯方法选自透析法、超滤膜过滤法、凝胶过滤层析法、离子交换层析法、疏水层析法和反相色谱法中的至少一种。

[0023] 优选实施方案中,步骤(4)中所述光引发剂选自夺氢型、裂解型、光敏和阳离子型引发剂,并且所述光引发剂在反应溶液中的浓度为 0.01%~1% (wt/vol%)。优选地,所述光引发剂为 α 羟基酮类均裂型光引发剂。

[0024] 本发明再一方面提供角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶在制备用于促进成纤维细胞黏附和生长的产品中的应用。

[0025] 本发明的角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶,既能充分利用角蛋白肽这种广泛存在的可再生天然生物资源的良好生物性能,变废为宝降低生物功能性材料的生产成本;又能利用聚乙二醇水凝胶可以大规模生产,结构和性能可精细调控能力,实现对细胞黏附和生长的有效促进作用。

附图说明

[0026] 下面将结合附图及实施例对本发明作进一步说明,附图中:

[0027] 图 1 是本发明优选实施方案中化合物的结构式:(A) 聚乙二醇双丙烯酸酯单体(PEGDA)、(B) 乙烯基聚乙二醇-羟基琥珀酰亚胺酯(Acr1-PEG-NHS)和(C) 乙烯基聚乙二醇化角蛋白肽(Acr1-PEG-Keratin);

[0028] 图 2 是本发明优选实施方案中化合物的 FTIR 图谱,从上到下依次为:角蛋白肽(Keratin)、乙烯基聚乙二醇-羟基琥珀酰亚胺酯(Acr1-PEG-NHS)和乙烯基聚乙二醇-角蛋白肽(Acr1-PEG-Keratin);

[0029] 图 3 是成纤维细胞在含有不同浓度角蛋白肽的 10% w/v PEGDA 水凝胶上种植 6 小时后的光学显微镜图片;

[0030] 图 4 是成纤维细胞在含有不同浓度角蛋白肽的 10% w/v PEGDA 水凝胶上种植 24 小时后的光学显微镜图片;

[0031] 图 5 是成纤维细胞在含有不同浓度角蛋白肽的 10% w/v PEGDA 水凝胶上种植 6 小时后经染色的荧光显微镜图片;

[0032] 图 6 是成纤维细胞在含有不同浓度角蛋白肽的 10% w/v PEGDA 水凝胶上种植 24 小时后经染色的荧光显微镜图片;

[0033] 图 7 是成纤维细胞在含有不同浓度角蛋白肽的 10% w/v PEGDA 水凝胶上种植 6 小时后统计的细胞密度;

[0034] 图 8 是成纤维细胞在含有不同浓度角蛋白肽的 10% w/v PEGDA 水凝胶上种植 24 小时后统计的细胞密度;

[0035] 图 9 是成纤维细胞在含有不同浓度角蛋白肽的 10% w/v PEGDA 水凝胶上种植 6 小时后统计的单细胞铺展面积百分比图；

[0036] 图 10 是成纤维细胞在含有不同浓度角蛋白肽的 10% w/v PEGDA 水凝胶上种植 24 小时后统计的单细胞铺展面积百分比图。

具体实施方式

[0037] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，以下结合附图及实施例，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅仅用于解释本发明，并不用于限定本发明。

[0038] 本发明使用天然角蛋白肽，从人或动物的毛发、羽毛、蹄、壳、爪、角、鳞等通过化学或物理方法降解得到。由于这些物质通常被纺织业和屠宰业作为废物丢弃，利用这样的天然角蛋白肽，既能充分地利用资源，又大大降低了生产成本，并且对废物的再利用还能减小环境污染的压力。

[0039] 优选实施方案中，本发明的角蛋白肽来自人发或羊毛。在用于非抗原性的伤口愈合或组织工程产品中，病人或捐献者的头发是更佳的选择。

[0040] 角蛋白肽的提取在本领域已有成熟的方法和技术。本发明的优选实施方案中，采用盐酸水解羊毛提取角蛋白肽，具体地，本发明采用 0.1 ~ 10mol/L 浓度的盐酸，在 20 ~ 150℃ 的温度范围，水解羊毛 0.5 ~ 72 小时；过滤得到的角蛋白水解物，用碱中和；然后喷雾干燥成粉或冻干保存，得到角蛋白肽粉。角蛋白肽的分子量在 200 ~ 5000Da 之间。

[0041] 然而，应理解，实践中角蛋白肽的提取并不局限于该方法，而可以由本领域技术人员根据需要选择恰当的提取方法。

[0042] 本发明的角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶包括一种角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶，包括角蛋白肽修饰的聚乙二醇与聚乙二醇丙烯酸酯类单体共聚形成的共聚物，其中所述角蛋白肽修饰的聚乙二醇与聚乙二醇丙烯酸酯类单体的摩尔比为 0.00001 ~ 10 : 1。

[0043] 其制备则采用两个主要步骤完成：首先，使角蛋白肽与聚乙二醇琥珀酰亚胺活性酯类衍生物反应生成聚乙二醇化的角蛋白肽，角蛋白肽的自由氨基与聚乙二醇琥珀酰亚胺活性酯类衍生物之间通过形成稳定的酰胺键共价结合；然后通过光聚合，使得到的聚乙二醇化的角蛋白肽与聚乙二醇丙烯酸酯类单体共聚，形成天然角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶。

[0044] 本发明的乙烯基聚乙二醇的琥珀酰亚胺活性酯类衍生物是指同时带有乙烯基 (Vinyl) 和 N-羟基琥珀酰亚胺酯 (NHS ester) 两种反应基团的聚乙二醇，其分子量范围在 1000 ~ 30000Da 之间，优选在 2000 ~ 8000Da 之间。

[0045] 具体地，将提取的天然角蛋白肽粉加入 pH 缓冲液中，调节其 pH 值在 7.0 ~ 9.0 之间；添加乙烯基聚乙二醇的琥珀酰亚胺活性酯类衍生物到角蛋白肽溶液中，乙烯基聚乙二醇的琥珀酰亚胺活性酯类衍生物与角蛋白肽的摩尔比为 0.001-100 : 1，并于 0℃ 到 50℃ 的反应温度，避光反应 0.5 到 24 小时；将反应混合液分离提纯，得到的乙烯基聚乙二醇化的角蛋白肽可以冻干进行长期保存，以备后用。使用光引发剂在可见光或紫外光照射下光聚合乙烯基聚乙二醇化的角蛋白肽与聚乙二醇丙烯酸酯类单体，使其共聚形成角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶。乙烯基聚乙二醇化的角蛋白肽与聚乙二醇丙烯酸酯类单体的摩尔比为

0.00001 ~ 10 : 1, 水凝胶的交联密度可以是 1% 到 50% (wt/vol%)。

[0046] 此外, 本发明提供的角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶中还可以添加有其他化学或生物添加剂, 或其他天然或合成分子到聚乙二醇水凝胶中, 以提高其所需功能。

[0047] 本发明人已发现用天然角蛋白肽修饰聚乙二醇水凝胶显著改善了聚乙二醇水凝胶的细胞亲和性, 同时大大降低了生物改性聚乙二醇水凝胶的生产成本。天然角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶在美容, 伤口愈合和组织工程方面的应用相当有潜力。

[0048] 本发明的优选实施方案中, 角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶通过以下步骤制备:

[0049] 将角蛋白肽粉以 0.1wt% 到饱和浓度溶解于 50mM 到 100mM 的碳酸氢钠缓冲液中, 滴加 1M 的氢氧化钠溶液, 调节 pH 值为 7.0 到 9.0 之间, 除此之外, pH 缓冲液还可以是 10mM 到 200mM 的碳酸氢钠溶液、磷酸盐溶液、Tris 溶液, 或 HEPES 溶液;

[0050] 添加乙烯基聚乙二醇-羟基-琥珀酰亚胺酯 (Acr1-PEG-NHS) 粉 (分子量为 2000 到 8000Da) 到上述角蛋白肽溶液中, 其中 Acr1-PEG-NHS 与角蛋白肽的摩尔比为 0.01 ~ 1 : 1, 并于室温避光反应 2 小时到 8 小时, 除此之外, 乙烯基聚乙二醇琥珀酰亚胺活性酯类衍生物还可以选自 Acrylate-PEG-SCM, Acrylate-PEG-SVA 等, 其分子量优选在 2000 ~ 8000 之间;

[0051] 将反应后的溶液用小于所选乙烯基聚乙二醇-羟基-琥珀酰亚胺酯分子量的透析袋透析 24 小时以上, 例如, 当所选的 Acr1-PEG-NHS 分子量为 3400Da 时, 可以选用 2000MWCO 的透析袋, 透析过后纯化的乙烯基聚乙二醇化的角蛋白肽 (Acr1-PEG-Keratin) 溶液可以冻干后保存, 实践中, 还可以采用超滤膜过滤法、凝胶过滤层析法、离子交换层析法、疏水层析法, 以及反相色谱法来分离提纯乙烯基聚乙二醇化的角蛋白肽;

[0052] 将乙烯基聚乙二醇化的角蛋白肽和聚乙二醇丙烯酸酯类单体 (例如, 聚乙二醇双丙烯酸酯单体 (PEGDA)、聚乙二醇二甲基丙烯酸酯单体 (PEGDMA) 或多臂聚乙二醇丙烯酸酯单体 (n-PEG-Acr) 中的一种或更多种) 按照一定比例混合在溶液中, 其中, 乙烯基聚乙二醇化的角蛋白肽和聚乙二醇丙烯酸酯类单体的摩尔比为 0.00001 ~ 0.1 : 1, 使用光引发剂在紫外光照射下在模具中通过光聚合形成角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶, 其中聚合时间可以为 10 秒到 0.5 小时。

[0053] 聚乙二醇丙烯酸酯类单体的分子量可以在 400 ~ 40000Da 之间。

[0054] 光引发剂可以包括夺氢型, 裂解型, 光敏和阳离子型引发剂, 并且其在混合的反应溶液中的浓度为 0.01% - 1% (wt/vol%), 优选的光引发剂为 α 羟基酮类均裂性光引发剂。

[0055] 制备的角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶的交联密度可以是 5% 到 30% (wt/vol%)。

[0056] 图 1 示出本发明优选实施方案中化合物的结构式: (A) 聚乙二醇双丙烯酸酯单体 (PEGDA)、(B) 乙烯基聚乙二醇-羟基琥珀酰亚胺酯 (Acr1-PEG-NHS) 和 (C) 乙烯基聚乙二醇化角蛋白肽 (Acr1-PEG-Keratin)。角蛋白肽通过末端的自由氨基, 与乙烯基聚乙二醇琥珀酰亚胺活性酯类衍生物 (例如 Acr1-PEG-NHS) 形成酰胺键, 而以共价方式相结合, 得到乙烯基聚乙二醇化的角蛋白肽 (例如 Acr1-PEG-Keratin), 然后通过光聚合与聚乙二醇丙烯酸酯类单体 (例如 PEGDA) 共聚形成天然角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶。

[0057] 图 2 示出了角蛋白肽、乙烯基聚乙二醇-羟基琥珀酰亚胺酯 (Acr1-PEG-NHS) 以

及乙烯基聚乙二醇-角蛋白肽的 FTIR 图谱。从图中可见,角蛋白肽 (Keratin) 在 1640cm^{-1} 处有明显的 $\text{C}=\text{O}$ 特征峰;乙烯基聚乙二醇-角蛋白肽 (ACRL-PEG-Keratin) 在 1640cm^{-1} 处也有很明显的 $\text{C}=\text{O}$ 特征峰。乙烯基聚乙二醇-羟基琥珀酰亚胺酯 (ACRL-PEG-NHS) 在 1735cm^{-1} 处有一个 $-(\text{C}=\text{O})-\text{NHS}$ 特征峰。在与角蛋白肽反应后,由于 $-\text{NHS}$ 被反应成了 $-\text{NH}-$, 1735cm^{-1} 处的特征峰在聚乙二醇丙烯酸酯-角蛋白肽中变得非常不明显。红外光谱分析证明了角蛋白肽被成功 PEG 化。

[0058] 以下通过具体实施例详细描述本发明的优选实施方案。

[0059] 实施例 1- 乙烯基聚乙二醇化的角蛋白肽的制备

[0060] 角蛋白肽的提取:

[0061] 取 60 克洗净烘干的羊毛,并将其加入到 4mol/L 的 400ml 盐酸溶液中。于 95°C 的恒温水浴锅中反应 24 小时。对得到的羊毛水解物进行过滤,在所得滤液中边搅拌边滴氢氧化钠溶液调节角蛋白肽溶液至中性,然后喷雾干燥成角蛋白肽粉。

[0062] 乙烯基聚乙二醇化的角蛋白肽的制备:

[0063] 将角蛋白肽粉溶于 100mM 碳酸氢钠溶液直到饱和,通过滴加 1M 的氢氧化钠溶液调节得到的溶液的 pH 值至 8.2,形成角蛋白肽溶液。使用孔径为 0.2 微米的过滤网过滤。将 100mg/ml 的 Acrl-PEG-NHS (MW3400) 粉末添加到 pH 值调节后的角蛋白肽溶液,并于室温避光反应 6 小时。反应后所得的 Acrl-PEG-Keratin 溶液用透析袋 (Sigma Aldrich, 2000MWC0) 在磁搅拌下透析 24 小时后,将保留在透析袋中的经纯化的 Acrl-PEG-Keratin 冻干保存,以备后用。Acrl-PEG-Keratin 的分子量通过 SDS-PAGE 电泳测定为约 4000Da 。

[0064] 实施例 2- 乙烯基聚乙二醇化的角蛋白肽的制备

[0065] 角蛋白肽的提取:

[0066] 取 50 克洗净烘干的人发,并将其加入 3mol/L 的 400ml 盐酸溶液中。于 95°C 的恒温水浴锅中反应 12 小时。对得到的人发水解物进行过滤,然后冷冻干燥成角蛋白肽粉。

[0067] 乙烯基聚乙二醇化的角蛋白肽的制备:

[0068] 将 2g 角蛋白肽粉溶于 5ml 的 50mM 磷酸盐溶液,调节得到的溶液的 pH 值至 8.5,形成角蛋白肽溶液。用孔径为 0.2 微米的过滤网过滤。将 50mg/ml 的 Acrl-PEG-SCM (MW2000) 粉末添加到 pH 值调节后的角蛋白肽溶液后,于 4°C 避光反应 3 小时。反应后所得的 Acrl-PEG-Keratin 溶液用凝胶色谱柱进行分离。Acrl-PEG-Keratin 的分子量通过 SDS-PAGE 电泳测定为大约 3000Da 。

[0069] 实施例 3- 乙烯基聚乙二醇化的角蛋白肽的制备

[0070] 角蛋白肽的提取:

[0071] 取 60 克洗净烘干的羊毛,并将其加入 0.5mol/L 的 400ml 氢氧化钠溶液中。于 100°C 的恒温水浴锅中反应 24 小时。对得到的羊毛水解物进行过滤,在所得滤液中边搅拌边滴盐酸溶液调节角蛋白肽溶液至中性,然后喷雾干燥成角蛋白肽粉。

[0072] 乙烯基聚乙二醇化的角蛋白肽的制备:

[0073] 将角蛋白肽粉溶于 100mM HEPES 溶液直到饱和。通过滴加 1M 的氢氧化钠溶液将得到的溶液的 pH 值调至 7.5。使用孔径为 0.2 微米的过滤网过滤。将 100mg/ml 的 Acrl-PEG-SVA (MW5000) 粉末添加到 pH 值调节后的角蛋白肽溶液后,于室温避光反应 2 小时。反应后所得的 Acrl-PEG-Keratin 溶液用离子交换层析法纯化。Acrl-PEG-Keratin 的

分子量通过 SDS-PAGE 电泳测定为大约 6000Da。

[0074] 实施例 4- 角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶的制备 (0.05mM 角蛋白肽) 及其细胞实验

[0075] 角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶的制备:

[0076] 将聚乙二醇双丙烯酸酯单体 (PEGDA 700Da)、乙烯基聚乙二醇-角蛋白肽 (Acrl-PEG-Keratin, 约 4000Da) 和 α 羟基酮类均裂性光引发剂 1-[4-(2-羟乙氧基)-苯基]-2-羟基-2-甲基丙酮 (Irgacure2959, Ciba Specialty Chemicals Inc.) 均匀混合, 并在 PDMS 模具中经紫外光照射发生聚合反应, 生成角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶。其中 Acrl-PEG-Keratin 的添加量为 0.05mM, PEGDA 的交联度为 10% w/v, 光引发剂的添加浓度为 0.1% w/v。

[0077] 具体反应条件如下, 在 1ml 的 1XPBS 缓冲液中加入 100mg 的 PEGDA、200 μ g 的 Acrl-PEG-Keratin、1mg 的 Irgacure 2959 (需事先配成溶于酒精的原液), 所得混合液以每 50 μ L 注入内孔径为 5mm、厚度为 1mm 的 PDMS 模具环中, 模具环下面是疏水硅烷 TPM 表面处理过的载玻片, 然后上面覆盖盖玻片, 紫外光照射 80 秒, 光强大约为 200mW/cm², 紫外光波长 365nm。

[0078] 聚合完成后, 揭去盖玻片和 PDMS 模具环, 聚合的水凝胶圆片附着在载玻片上, 然后一起转移到有 1XPBS 缓冲液的细胞培养皿中。

[0079] 细胞实验:

[0080] 水凝胶圆片用无菌 1XPBS 缓冲液冲洗后, 浸在缓冲液中放在紫外灯下消毒 3 个小时, 然后将缓冲液换成细胞培养液。HFF-1 成纤维细胞以 6×10^4 cells/cm² 密度种到水凝胶圆片上, 然后放入 37°C 细胞培养箱 (含 5% CO₂) 中培养。培养 6 个小时和 24 小时后, 用 PBS 缓冲液冲洗后使用倒置相差光学显微镜 (Nikon, Eclipse TS100) 观察成纤维细胞粘附的水凝胶圆片。

[0081] 分析时每个水凝胶圆片至少取三个随机区域 (1.3mm²), 同一个浓度 Acrl-PEG-Keratin 至少要有三个水凝胶圆片。粘附细胞的计数和单细胞铺展面积由 Metamorph 成像系统 (Nikon) 的综合形态分析模块软件计算。在水凝胶上粘附的成纤维细胞也通过染色观察, 染色前用 PBS 缓冲液冲洗水凝胶, 用 4% 的多聚甲醛固定细胞 30 分钟, 然后用 0.1% 的 TritonX-100 打孔 15 分钟。细胞的丝状肌动蛋白使用罗丹明标记的鬼笔环肽染成红色, 细胞核用 DAPI 染成蓝色。染色后的细胞通过荧光显微镜 (Nikon, Eclipse 80i) 观察。

[0082] 图 3 显示了培养 6 小时后成纤维细胞在不同浓度角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶表面的形态。6 小时后, 在没有角蛋白肽修饰的对照水凝胶表面, 细胞数量少且大多数呈圆形。在含有 0.05mM 角蛋白肽的水凝胶表面, 贴壁的细胞明显比对照组多, 且已开始铺展。

[0083] 图 4 显示了培养 24 小时后成纤维细胞在不同浓度角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶表面的形态。24 小时后, 没有角蛋白肽修饰的对照水凝胶表面, 贴壁细胞仍然数量稀少且大多呈圆形, 而在含有 0.05mM 角蛋白肽的水凝胶表面, 大多数贴壁细胞已伸展成典型的长梭型。

[0084] 图 5 和图 6 的荧光照片可以观察到与细胞粘附, 铺展和形态密切相关的丝状肌动蛋白的分布和构型。由图 5 所示, 6 个小时后, 在无角蛋白肽的聚乙二醇水凝胶表面的细胞

其微丝仍处于无序状态,而在含有 0.05mM 角蛋白肽的水凝胶表面的细胞微丝已经成束。由图 6 观察到,24 小时后,在含有 0.05mM 角蛋白肽的水凝胶表面的细胞的微丝相对于对照组长度更长,分布更广。从贴壁的细胞密度和单细胞铺展面积来看,含有 0.05mM 角蛋白肽的水凝胶相比于无角蛋白肽的水凝胶都有大幅提高。

[0085] 图 7 和图 8 分别是细胞培养 6 小时和 24 小时后在含有不同浓度角蛋白肽的水凝胶表面的细胞密度柱状图。在无角蛋白肽的水凝胶表面,6 小时后的细胞密度为每平方厘米~2700 个细胞,24 小时后更减少为每平方厘米~1500 个细胞。而在含有 0.05mM 角蛋白肽的水凝胶表面,贴壁的细胞密度大幅提高到 6 小时和 24 小时后每平方厘米~9000 个细胞,粘附细胞密度相对于对照组提高 3 倍多。

[0086] 图 9 和图 10 则分别是细胞培养 6 小时和 24 小时后在不同浓度角蛋白肽的水凝胶表面单细胞铺展面积的柱状图。细胞铺展程度以单细胞铺展面积分为四类,四类分别是 0-1000 μm^2 (最少铺展)、1000-2000 μm^2 、2000-3000 μm^2 和 > 3000 μm^2 (最多铺展),柱状图显示的是细胞在每一类的百分比。如图 9 所示,6 小时后在无角蛋白肽修饰的水凝胶表面有大约 80% 的细胞属于最少铺展类的,而在含有 0.05mM 角蛋白肽的水凝胶表面最少铺展类细胞降为大约 60%。24 小时后,无角蛋白肽修饰的水凝胶仍有大约 40% 的细胞属于最少铺展类的,而含有 0.05mM 角蛋白肽的水凝胶则大幅降为大约 20%。

[0087] 由上述细胞实验结果可看出,含有 0.05mM 角蛋白肽的水凝胶相对于无角蛋白肽修饰的水凝胶明显提高了其细胞亲和性,促进了成纤维细胞的粘附和铺展。

[0088] 实施例 5-角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶的制备(0.125mM 角蛋白肽)及其细胞实验

[0089] 角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶的制备:

[0090] 本实施例中使用含有 0.125mM ACRL-PEG-Keratin(约 4000Da)的水凝胶,除此之外,制备方法与实施例 4 相同,此处不再累述。

[0091] 细胞实验:

[0092] HFF-1 成纤维细胞以 6×10^4 cells/cm² 密度种到水凝胶圆片上,然后置于 37°C 细胞培养箱(含 5% CO₂)中培养。培养 6 个小时和 24 小时后,进行光学和染色观察,具体方法见实施例 4。

[0093] 由图 3 所示,培养 6 小时后在含有 0.125mM 角蛋白肽的水凝胶表面,粘附的成纤维细胞在数量和铺展程度都明显高于含有 0.05mM 角蛋白肽的水凝胶。细胞已多数成长梭型。

[0094] 由图 4 所示,24 小时后,含有 0.125mM 角蛋白肽的水凝胶表面上的细胞更加铺展,且数量明显高于较低浓度和无角蛋白肽修饰的水凝胶。

[0095] 图 5 和图 6 的荧光照片也可以观察到在含有 0.125M 角蛋白肽的水凝胶表面上的细胞其微丝在 6 个小时后已经成束且长度比在含有 0.05M 角蛋白肽的水凝胶表面的细胞长。24 小时后,由图 6 所示,在含有 0.125M 角蛋白肽的水凝胶表面的细胞微丝相对于对照组和低浓度组长度更长,分布更广。

[0096] 从贴壁的细胞密度(图 7 和图 8)来看,含有 0.125mM 角蛋白肽的水凝胶相比于低浓度角蛋白肽的水凝胶仍有明显提高。在含有 0.125mM 角蛋白肽的水凝胶表面,6 小时后的细胞密度为每平方厘米~11000 个细胞,24 小时后增长为每平方厘米~13000 个细胞。

[0097] 由图 9 和图 10 所示的单细胞铺展面积来看,6 小时后含有 0.125mM 角蛋白肽的

水凝胶表面最少铺展类细胞只有 24%，24 小时后更降为 5%，而属于 1000-2000 μm^2 和 2000-3000 μm^2 各有大约 40%。

[0098] 由上述细胞实验结果可看出，含有 0.125mM 角蛋白肽的水凝胶比无角蛋白肽修饰和低浓度 0.05mM 角蛋白肽修饰的水凝胶都继续大幅提高了细胞亲和性，明显增强了成纤维细胞的粘附，铺展和生长。

[0099] 实施例 6- 角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶的制备 (0.25mM 角蛋白肽) 及其细胞实验

[0100] 角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶的制备：

[0101] 本实施例中使用含有 0.25mM ACRL-PEG-Keratin (约 4000Da) 的水凝胶，除此之外，制备方法与实施例 4 相同，此处不再累述。

[0102] 细胞实验：

[0103] HFF-1 成纤维细胞以 6×10^4 cells/cm² 密度种到水凝胶圆片上，然后放入 37℃ 细胞培养箱 (含 5% CO₂) 中培养。培养 6 个小时和 24 小时后，进行光学和染色观察，具体方法见实施例 4。

[0104] 由图 3 和图 4 所示，培养 6 小时后在含有 0.25mM 角蛋白肽的水凝胶表面，粘附的成纤维细胞多数已成典型的长梭型，24 小时后，细胞更加铺展，且细胞密度明显高于低浓度和无角蛋白肽修饰的水凝胶。

[0105] 图 5 和图 6 的荧光照片也可以观察到在含有 0.25mM 角蛋白肽的水凝胶表面上的细胞在 6 个小时后已经成长束，24 小时后，相对于对照和低浓度组长度更长，分布更广。

[0106] 由图 7 和图 8 所示，在含有 0.25mM 角蛋白肽的水凝胶表面，6 小时后的细胞密度为每平方厘米 ~ 11000 个细胞，24 小时后增长为每平方厘米 ~ 12000 个细胞，其粘附细胞的密度与含有 0.125mM 角蛋白肽的水凝胶相当，但明显优于对照组和低浓度组。

[0107] 由图 9 和图 10 所示的单细胞铺展面积来看，6 小时后含有 0.25mM 角蛋白肽的水凝胶表面最少铺展类细胞只有 18%，24 小时后更降为 1%，而属于 1000-2000 μm^2 和 2000-3000 μm^2 也各有大约 40%。

[0108] 由上述细胞实验结果可看出，含有 0.25mM 角蛋白肽的水凝胶比无角蛋白肽修饰和 0.05mM 角蛋白肽修饰的水凝胶明显增强了成纤维细胞的粘附，铺展和生长，与 0.125mM 角蛋白肽修饰的水凝胶相比在细胞铺展方面有小幅增强。

[0109] 实施例 7- 角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶的制备 (0.5mM 角蛋白肽) 及其细胞实验

[0110] 本实施例于实施例 4 在水凝胶制备方法和细胞实验上基本相同，相同之处不重述。

[0111] 不同之处为角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶由混合均匀的聚乙二醇二甲基丙烯酸酯 (PEGDMA 1000Da, Sigma Aldrich)、Acr1-PEG-Keratin (约 3000Da) 和自由基型光引发剂 2,2-二乙氧基苯乙酮 (1% w/v)，在 PDMS 模具中经紫外光照射下聚合形成，紫外光照射 20 分钟，光强大约为 10mW/cm²，紫外光波长 365nm；PEGDMA 水凝胶交联度为 20% w/v；水凝胶含有 0.5mM ACRL-PEG-Keratin。

[0112] 细胞实验结果证明含有 0.5mM 角蛋白肽的水凝胶相对于无角蛋白肽修饰的水凝胶明显提高了其细胞亲和性，促进了成纤维细胞的粘附和铺展。

[0113] 实施例 8- 角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶的制备 (0.5mM 角蛋白肽) 及其细胞实验

[0114] 本实施例于实施例 4 在水凝胶制备方法和细胞实验上基本相同, 相同之处不重述。

[0115] 不同之处为角蛋白肽修饰的聚乙二醇水凝胶由混合均匀的四臂聚乙二醇甲基丙烯酸酯 (4 臂 -PEG-Acrylate 10000Da, laysan Bio)、Acrl-PEG-Keratin(约 6000Da) 和 1-羟基环己基苯基甲酮 (1% w/v), 在 PDMS 模具中经紫外光照射下聚合形成, 紫外光照射 3 分钟, 光强大约为 100mW/cm², 紫外光波长 365nm ; PEGDMA 水凝胶交联度为 10% w/v ; 水凝胶含有 0.5mM ACRL-PEG-Keratin。细胞实验结果证明含有 0.5mM 角蛋白肽的水凝胶相对于无角蛋白肽修饰的水凝胶明显提高了其细胞亲和性, 促进了成纤维细胞的粘附和铺展。

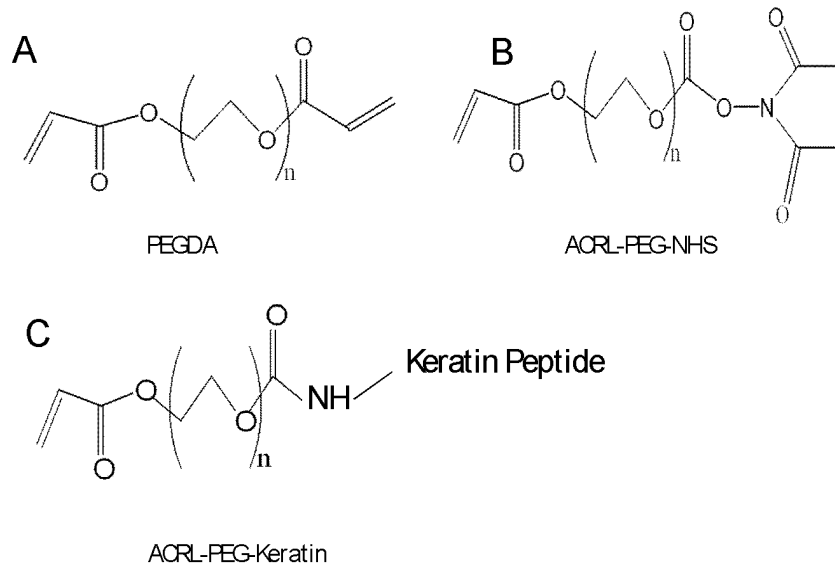


图 1

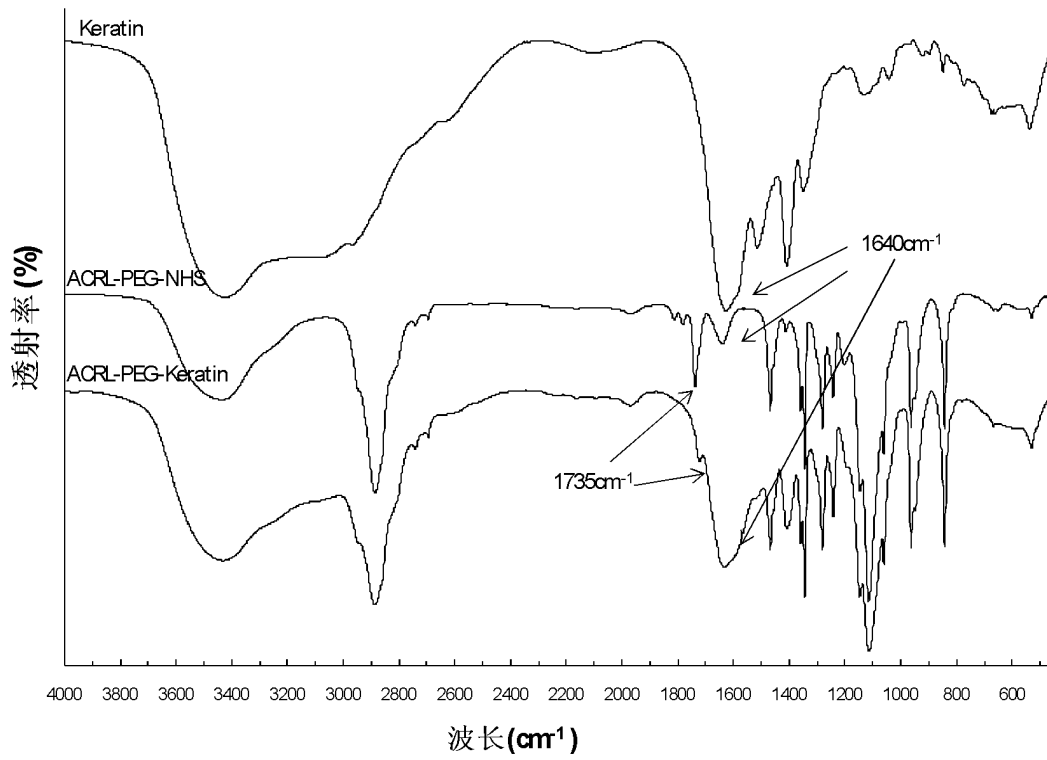


图 2

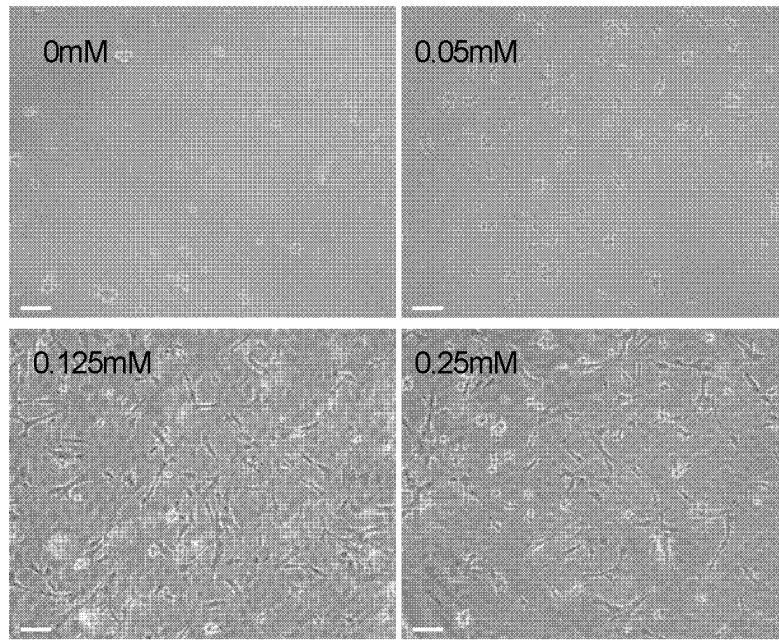


图 3

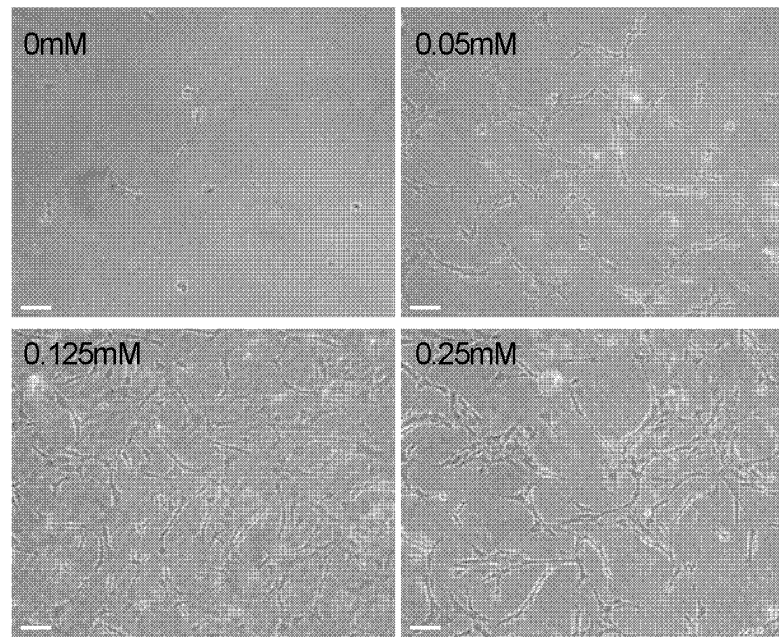


图 4

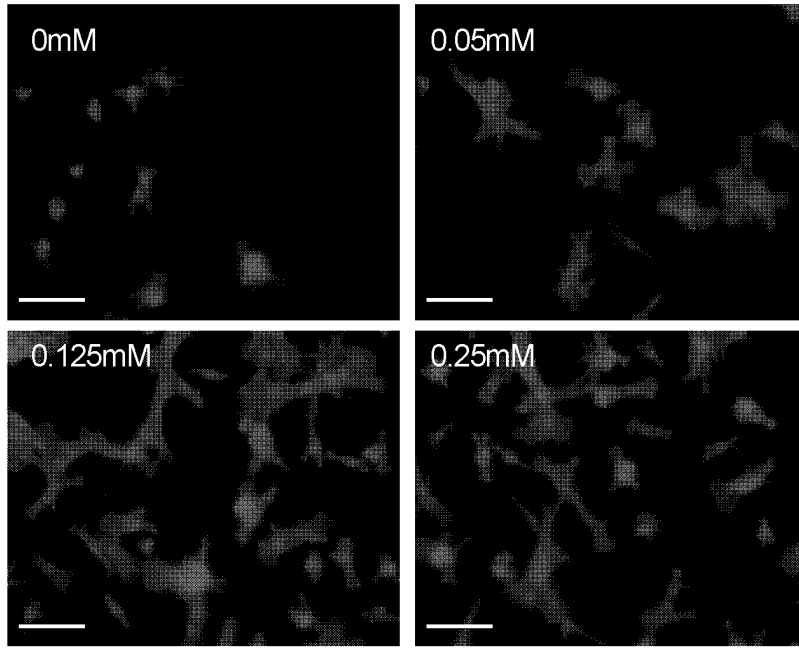


图 5

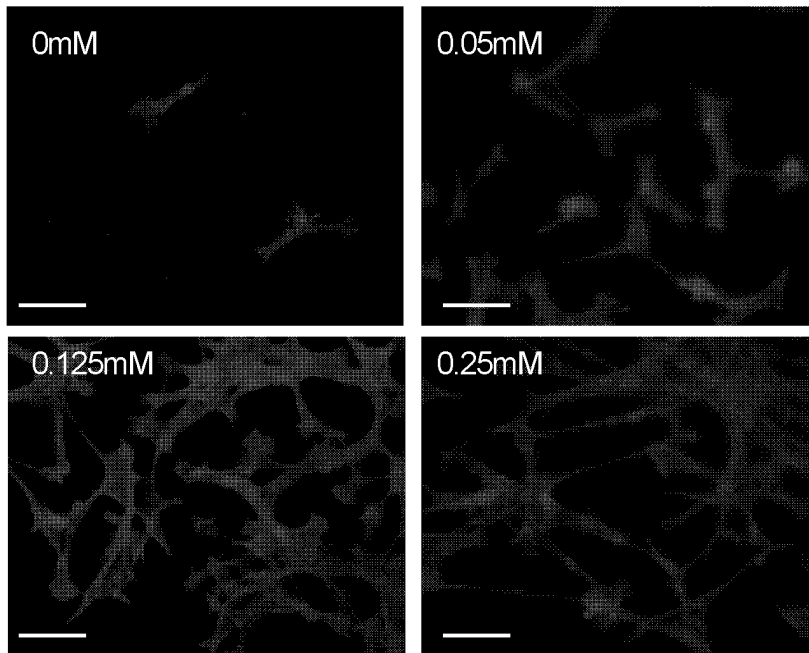


图 6

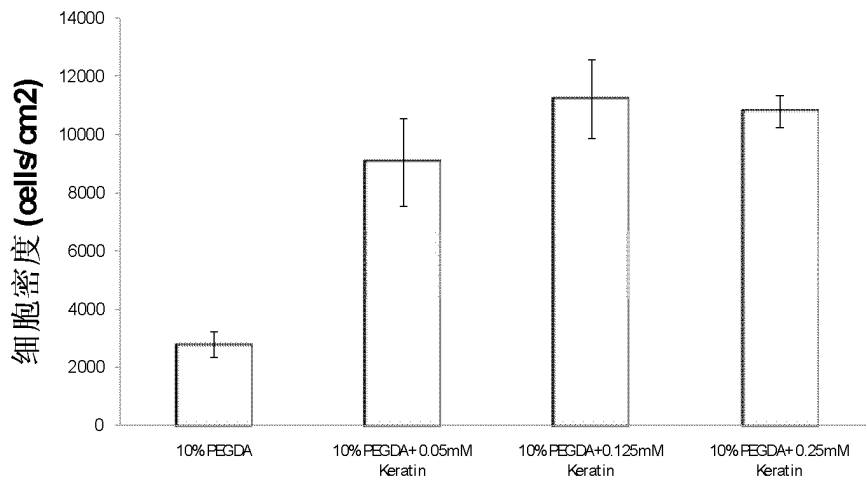


图 7

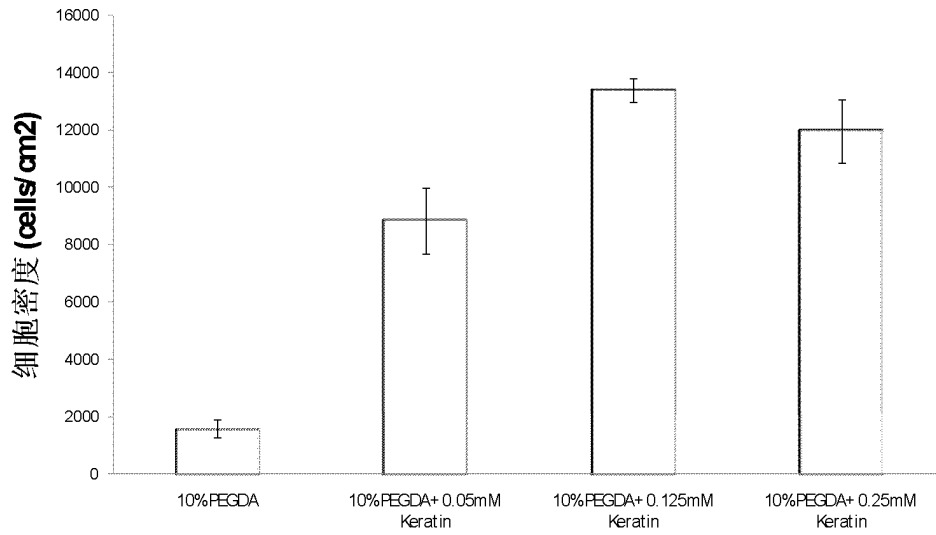


图 8

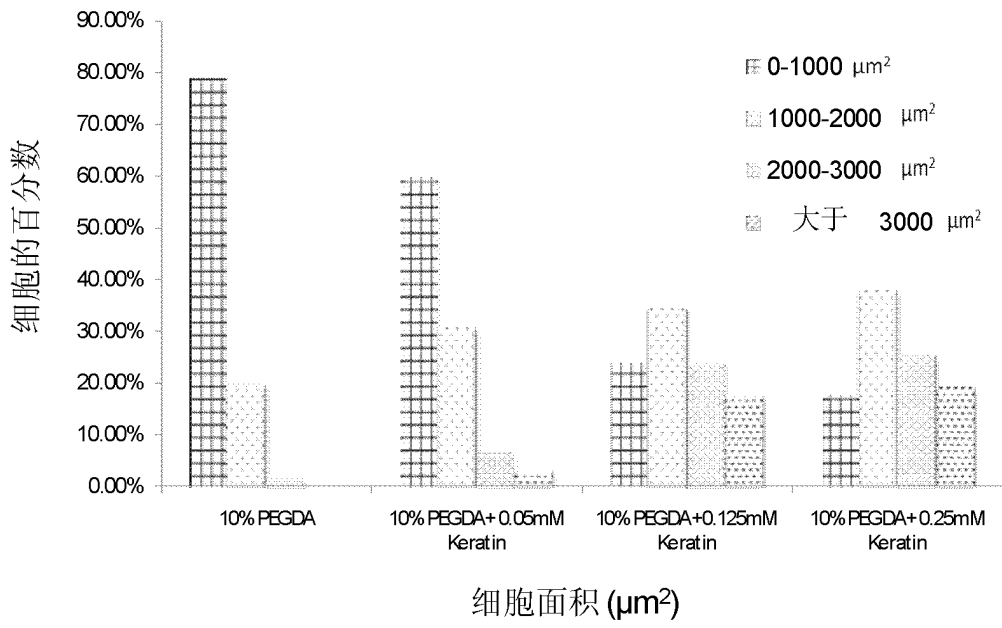


图 9

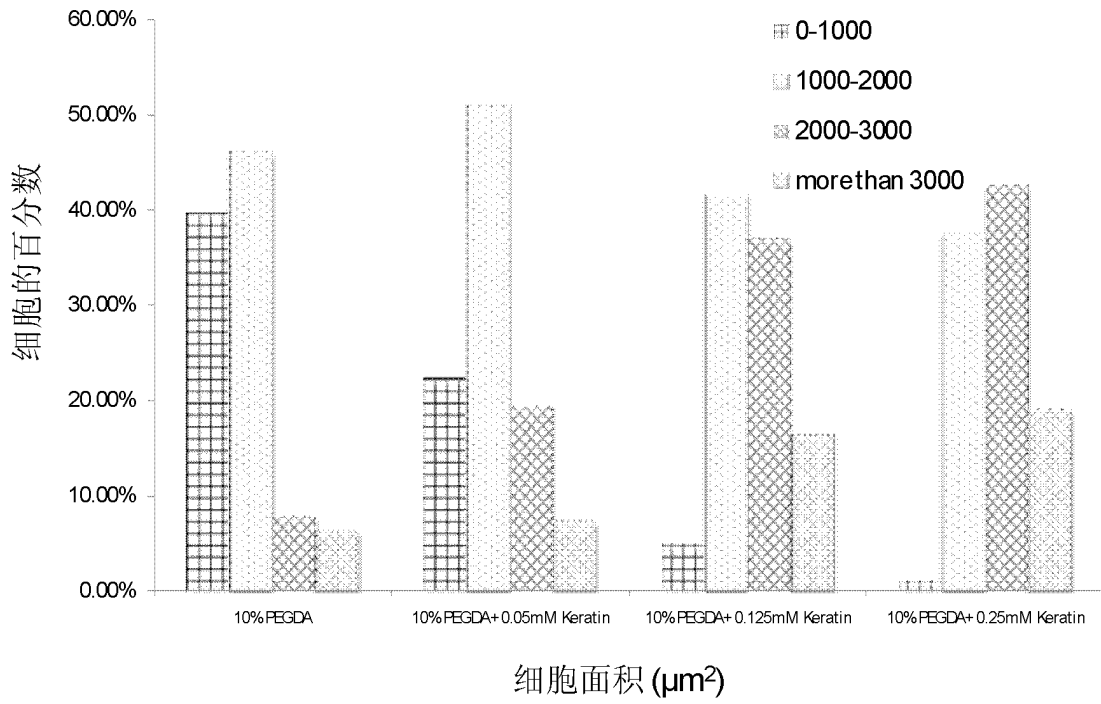


图 10