

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680006909.1

[43] 公开日 2008年5月21日

[11] 公开号 CN 101184995A

[22] 申请日 2006.3.6

[21] 申请号 200680006909.1

[30] 优先权

[32] 2005.3.4 [33] US [31] 60/658,503

[86] 国际申请 PCT/US2006/007864 2006.3.6

[87] 国际公布 WO2006/096614 英 2006.9.14

[85] 进入国家阶段日期 2007.9.3

[71] 申请人 西北大学

地址 美国伊利诺斯州

[72] 发明人 S·I·施图普 J·F·胡瓦特

K·拉亚加姆

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 赵蓉民 陆惠中

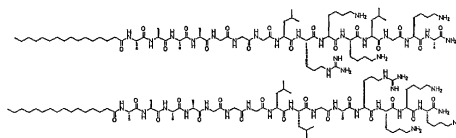
权利要求书4页 说明书21页 附图6页

[54] 发明名称

生血管肝素结合肽两亲物

[57] 摘要

肽两亲物及相关组合物，包括硫酸化多糖，例如，但不限于硫酸化糖胺聚糖，以及与生血管生长因子的包囊作用和/或受控释放相关的使用方法。



1. 一种两亲性肽化合物，其包括疏水性组分和肽组分，所述的疏水性组分被偶联到所述肽组分的 C-端和 N-端中的其中一个上，所述的肽组分包括能与硫酸化多糖产生非共价相互作用的残基。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物，其中所述的肽组分包括能与硫酸化糖胺聚糖相互作用的残基，此硫酸化糖胺聚糖选自硫酸肝素、硫酸乙酰肝素和其组合。

3. 根据权利要求 1 所述的化合物，其中所述的疏水性组分包括从大约 C6 到大约 C22 范围内的烷基部分。

4. 根据权利要求 1 所述的化合物，其中所述的可相互作用的残基包括至少一个疏水性残基 (X)，其选自丙氨酸、甘氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸及其组合，和至少一个碱性残基 (B)，其选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸。

5. 根据权利要求 4 所述的化合物，其中所述的可相互作用的残基包括选自 XBBBXXBX、XXXXBBBB、XXXXBBB、XXXXBB、和 XXXXB 的序列，其中 X 和 B 各自独立地选自所述的疏水性残基和所述的碱性残基。

6. 根据权利要求 5 所述的化合物，其中所述的可相互作用的残基包括选自 LRKCLGKA 和 LLGARKKK 的序列。

7. 根据权利要求 5 所述的化合物，其中所述的肽组分包括选自 C-末端酰胺、生物活性的表位序列和其组合的部分。

8. 根据权利要求 6 所述的化合物，在与硫酸化多糖的组合物中，所述的组合物包括胶束结构。

9. 根据权利要求 8 所述的化合物, 所述的组合物中的所述的多糖是硫酸化糖胺聚糖, 其选自硫酸肝素、硫酸乙酰肝素和其组合。

10. 根据权利要求 9 所述的化合物, 所述的组合物能与生血管生长因子相互作用。

11. 根据权利要求 10 所述的化合物, 所述的生长因子选自肝素结合生长因子、类肝素结合生长因子和其组合。

12. 一种组合物, 其包括硫酸化多糖和含有疏水性组分和肽组分的肽两亲物, 所述的疏水性组分被偶联到所述肽组分的 C-端和 N-端中的其中一个上, 所述的肽组分包括能与硫酸化多糖产生非共价相互作用的残基, 所述的组合物包括胶束结构。

13. 根据权利要求 12 所述的组合物, 其中所述的多糖是硫酸化糖胺聚糖, 其选自硫酸肝素、硫酸乙酰肝素和其组合。

14. 根据权利要求 12 所述的组合物, 其中所述的可相互作用的残基包括选自 XBBBXXBX、XXXXBBBB、XXXXBBB、XXXXBB、和 XXXXB 的序列, 其中 X 独立地选自丙氨酸、甘氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸和缬氨酸, B 独立地选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸。

15. 根据权利要求 14 所述的组合物, 其包括选自肝素结合生长因子、类肝素结合生长因子和其组合的生血管生长因子。

16. 根据权利要求 15 所述的组合物, 其中所述的因子选自 VEGF 和 FGF-2。

17. 根据权利要求 16 所述的组合物, 其与内皮细胞相接触。

18. 根据权利要求 17 所述的组合物，其中所述的可相互作用的残基包括选自 LRKCLGKA 和 LLGARKKK 的序列。

19. 根据权利要求 14 所述的组合物，其与哺乳动物的缺血性皮肤伤口相接触。

20. 根据权利要求 19 所述的组合物，其中所述的可相互作用的残基包括选自 LRKCLGKA 和 LLGARKKK 的序列。

21. 一种使用两亲性肽组合物来活化生血管生长因子的方法，所述的方法包括：

提供了两亲性肽化合物，其包括疏水性组分和肽组分，所述的疏水性组分被偶联到所述肽组分的 C-端和 N-端中的其中一个上，所述的肽组分包括能与硫酸化糖胺聚糖产生非共价相互作用的残基；

将硫酸化糖胺聚糖与所述的肽化合物相结合，所述的糖胺聚糖选自硫酸肝素、硫酸乙酰肝素和其组合；和

将所述的肽组合物与生血管生长因子相互作用。

22. 根据权利要求 21 所述的方法，其中所述的可相互作用的残基包括选自 XBBBXXBX、XXXXBBBB、XXXXBBB、XXXXBB、和 XXXXB 的序列，其中 X 独立地选自丙氨酸、甘氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸和缬氨酸，B 独立地选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸。

23. 根据权利要求 22 所述的方法，其中所述的相互作用是体内的。

24. 根据权利要求 23 所述的方法，其中所述的相互作用基本上不存在外源生长因子。

25. 根据权利要求 24 所述的方法，其中所述的可相互作用的残基包括选自 LRKCLGKA 和 LLGARKKK 的序列。

26. 根据权利要求 23 所述的方法，其接触的是哺乳动物的缺血性组织。

27. 一种诱导血管生成的方法，所述的方法包括：
提供根据权利要求 1 所述的两亲性肽化合物；
将硫酸化糖胺聚糖与所述的肽化合物相结合；和
将所述的组合物与细胞介质和生血管生长因子相接触，与所述介质的所述接触的时间、以及所述组合物和所述生长因子的至少一种的量至少部分地足以发生血管生成。

28. 根据权利要求 27 所述的方法，其中所述的可相互作用的残基包括选自 XBBBXXBX、XXXXBBBB、XXXXBBB、XXXXBB、和 XXXXB 的序列，其中 X 独立地选自丙氨酸、甘氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸和缬氨酸，B 独立地选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸；和所述的多糖是硫酸化糖胺聚糖，其选自硫酸肝素、硫酸乙酰肝素和其组合。

29. 根据权利要求 28 所述的方法，其中所述的生长因子相对于所述的介质是外源的。

30. 根据权利要求 28 所述的方法，在结合所述的糖胺聚糖之前，将所述的肽化合物与所述的介质相接触。

31. 根据权利要求 30 所述的方法，其中所述的接触是体内的。

32. 根据权利要求 31 所述的方法，其接触的是哺乳动物的缺血性组织。

生血管肝素结合肽两亲物

发明领域

【0001】本申请要求 2005 年 3 月 4 日提交的第 60/658,503 号临时申请的优先权，在此引入其全部作为参考。

【0002】依照美国国家健康协会（National Institute of Health）的授予号 R01 EB003806-01 和与美国陆军医疗研究与材料司令部（U.S. Army Medical Research and Material Command, USAMRMC）—远程医疗和高级技术研究中心（Telemedicine and Advanced Technology Research Center, TATRC）的合同，授予号为 W81XWH-05-1-0381（OSR 授予号为 32199）——授予西北大学，美国政府对本发明拥有某些权利。

发明背景

【0003】血管生成，即从现有血管形成新的血管的过程，对于正常的伤口愈合是必需的，而且这完全是由身体调节的。不充分的血管生成能够引起各种各样的疾病状况，包括慢性皮肤创伤和心肌梗塞。血管生成将会对组织工程变得越来越重要，因为植入的支架，不管它们是传递自身的细胞还是募集渗透过来的宿主细胞，都需要血液的供应以维持活性组织的形成。为了达到这个目标，生物相容性基质的开发已成为关注的对象，这种生物相容性基质能有效地地促进血管生成，它具有指定的化学和结构多功能性，这样，经过适当的修饰，它能被用作血管化支架以促进组织愈合和组织生长。此外，这种基质也将有助于促进心肌梗塞后和慢性皮肤伤口中所看到的缺血性伤口愈合。这种体系的研发和实施已经成为本领域眼下的热点。然而，以前所采取的各种方法表明需要进一步的改善，而且为进一步的努力和革新提供了动力。

附图简述

【0004】图 1. 根据本发明的某些实施方式, HBPA-1 (上图) 和 HBPA-2 (下图) 两亲性肽化合物的结构。

【0005】图 2A-C. 肝素触发的 HBPA-2 (2A, 刻度尺 50 nm) 和 HBPA-1 (2B, 刻度尺 40 nm) 纳米纤维束的透射电子镜显微照片。2B 也显示了标记至 (连接至, tagged to) 金纳米颗粒 (黑点) 的肝素, 金纳米颗粒修饰了纳米纤维。2C 显示了荧光素肝素染色的 HBPA-1 纤维束 (刻度尺 100 μ m) 的共焦荧光显微照片。

【0006】图 3A-G. HBPA-1 和 2 与肝素的相互作用。3A 和 3B 显示的是肝素和碱触发的 HBPA-1 凝胶 (3A) 和 HBPA-2 凝胶 (3B) 的振荡流变测定值。这两张图里的黑色曲线描述的是肝素触发的凝胶, 灰色曲线描述的是碱触发的凝胶, 其中方块代表的是弹性模量, 三角代表的是粘性模量。所有凝胶的弹性模量统计学上比粘性模量高, 另外, 两种情况下肝素触发的凝胶统计学上比碱触发的凝胶的要高 ($p < 0.05$, 这些值代表的是平均和标准偏差)。3C 和 3D 显示的是 HBPA-1 溶液 (3C) 和 HBPA-2 溶液 (3D) 的圆二色光谱图, 这表明在两种情况下加入肝素后, 占主导地位的 α 螺旋构象 (灰色) 变成了占主导地位的 β 折叠构象 (黑色)。3E 和 3F 显示了热量变化的积分值 (integrated value) (黑点) 以及拟合线 (fit line), 该拟合线是当将增量的肝素加入到 HBPA-1 (3E) 和 HBPA-2 (3F) 溶液时, 相对于肝素与 HBPA 的摩尔比绘制的, 以便得到各自的 K_a 。表 3G 比较了 HBPA-1 和 HBPA-2 与肝素相互作用的热动力学指标。虽然两种情况下的 ΔG 是类似的, 但是 ΔH 在 SPA 与肝素的相互作用中占主导地位, 表明是一个熵驱动的反应, 而 $-T\Delta S$ 在 HBPA 与肝素的相互作用中占主导地位, 表明是一个焓驱动的反应。

【0007】图 4. 若丹明-FGF-2 从 HBPA-1-肝素凝胶网络中慢速释放曲线 (灰白色曲线), 相对于从 HBPA-1- Na_2HPO_4 凝胶的更快的释放 (黑色曲线) (尺度条是标准偏差)。

【0008】图 5A-H. 体外血管生成实验。是在存在 (A) 但不存在 (B) 生长因子下, 在肝素-有核 HBPA-1 凝胶中, 用 Vybrant CFDA 染色的 bPAEC 的荧光共聚焦显微照片。黑色的通道是在三维图中延伸的连续内腔 (尺度格的每个边长, 在 (A) 中为 $75\ \mu\text{m}$ 和在 (B) 中为 $37\ \mu\text{m}$)。与存在 (C) 但不存在 (D) 生长因子时的 HBPA-2-肝素凝胶相对应的样品 (刻度尺 = $80\ \mu\text{m}$) 显示出偶然的类似裂缝的内腔 (箭头所指)。胶原(质)对照凝胶, 生长因子被混入到胶原凝胶(E)里, 表明生长着的细胞没有特定的方向; 相反, 含有补加肝素 (F)、含有补加生长因子 (G) 以及含有补加肝素和生长因子 (H) 的胶原凝胶, 都显示出带有偶然的类似裂缝的内腔 (箭头所指) 的接合网络 (对于 C-F, 刻尺度 = $40\ \mu\text{m}$)。

【0009】图 6. 体内缺血性伤口愈合实验。在一只缺血性兔子耳朵上产生一个 $6\ \text{mm}$ 的伤口 12 天之后测得的上皮裂口。与所有的其它对照相比, 存在和不存在生长因子的 HBPA-1-肝素凝胶都诱发了统计学上显著的伤口愈合 ($p < 0.05$, 图表示的是平均值而且为 95% 的置信度)。

发明概述

【0010】鉴于前述, 本发明的目的是提供一系列的两亲性的肽化合物, 相关的肝素结合的组合物和/或其一种或更多种血管生成方法里的应用, 因此克服了现有技术的各种缺陷和短处, 包括上面概述的那些。本领域的普通技术人员应当理解的是: 本发明的一个或多个方面能满足某些目的, 而一个或多个其它方面能满足其他的某些目的。在所有的方面里, 对于本发明的每一个方面, 每个目的可以不均等的应用。同样, 关于本发明的任何一个方面, 能以另外的方式看待下面的目的。

【0011】本发明的一个目的是提供了一系列的结构多样性的两亲性肽化合物 (amphiphilic peptide compound), 这些化合物与一个或多个硫酸化的糖胺聚糖组分相互作用, 与现有技术相比较, 这种相互作用

用在这些组分与血管生长因子的亲和力方面，显示出优势。

【0012】本发明的另外一个目的是，结合一个或多个上述的组合物，提供了一个或多个生血管生长因子（angiogenic growth factors）的活化、结合、传递和/或释放。

【0013】本发明的另外一个目的是提供诱导血管生成的一种或多种方法，以及与所述方法一起使用的组合物，以促进组织愈合和/或生长。

【0014】通过本概述以及随后的某些实施方案的描述，本发明的其它目的、特征、利益和优点将是显而易见的，而且对于本领域的普通技术人员来说也是容易理解的，他们具备各种肽两亲物、硫酸化多糖结合的组合物和/或其在促进血管生成方面的应用的知识。结合伴随的实施例、数据、图和由此得到的所有合理的推论，单独或考虑并入本文的参考文献，通过上面的描述，这样的目的、特征、利益和优点将是显而易见的。

【0015】部分地，本发明涉及由疏水组分和肽组分组成的两亲性肽化合物。疏水组分能在肽组分的 C-端或 N-端处或其附近或周围被偶联到肽组分上。肽组分能包括至少一个残基，这个残基能与硫酸化多糖非共价相互作用或结合。不受限制地，这些残基能与硫酸化糖胺聚糖组分相互作用或与硫酸化糖胺聚糖组分具有非共价结合亲和力，所述硫酸化糖胺聚糖包括但不限于硫酸肝素、硫酸乙酰肝素及其组合。正如本文其他地方所阐述的和在并入本文的一个或多个参考文献中更充分描述的那样，此化合物的疏水组分能包括范围从大约 C₄ 或大约 C₆ 到大约 C₂₂ 或更高碳原子数的部分。

【0016】不管怎样，可相互作用的残基能包括至少一个疏水性残基，可将其指定为 X，例如可从丙氨酸、甘氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸及其组合中选出的残基。同样，关于残基 X

的同一性没有限制，肽组分能包括至少一个碱性残基，可指定为 B，包括但不限于精氨酸、组氨酸和赖氨酸。在某些实施方案中，这些可相互作用的残基能包括一个序列，选自但不限于 XBBBXXBX、XXXXBBBB、XXXXBBB、XXXXBB 和 XXXXB，其中 X 和 B 能够分别从任何上述的疏水性和碱性残基中选择。例如，这样的化合物的肽组分能包括残基，此残基包括选自 LRKKLGKA 和 LLGARKKK 的序列。不管怎样，肽组分也能包括一个或多个生物活性的表位序列，这种序列在下面有所描述或在一个或多个并入本文的参考文献中被充分论述。在某些其它的实施方案中，有或没有这样的生物活性表位，并且对于可相互作用的残基序列没有限制的情况下，肽组分的 C-端能包括酰胺或羧基部分。

【0017】部分地，本发明也可以涉及组合物，包括硫酸化多糖和上面所描述种类的一种或多种两亲性肽化合物。这种硫酸化多糖组分与两亲性肽化合物的非共价键相互作用，在适当的介质中能诱发胶束结构。例如，在水介质中，通过与硫酸化糖胺聚糖接触或通过结合硫酸化糖胺聚糖，可以诱导一个或多个上述肽组分的水凝胶的形成。在某些其它的实施方案中，正如下面阐述的，此组合物也可以包括生血管生长因子。这些生长因子包括那些将被本领域的普通技术人员所理解和测定的生长因子，其代表性的非限制性的例子可选自目前已知的那些或后来可能被确定为肝素结合或类肝素结合生长因子的那些，包括但不限于被称为 VEGF 和 FGF-2 及其组合的那些。

【0018】部分地，本发明也可以涉及一种诱导血管生长的方法。对顺序和进展毫无限制地，这种方法可以包括下述步骤：提供上面所描述的一种或多种两亲性肽化合物；将硫酸化糖胺聚糖与其结合；将所得的组合物与细胞介质和/或血管生长因子相接触。与细胞介质的接触能够持续一段时间，组合物和/或生长因子的量至少部分足以发生血管生成。

【0019】这种两亲性化合物或所得的组合物肽组分可以包括含

有选自 XBBBXXBX、XXXXBBBB、XXXXBBB、XXXXBB 和 XXXXB 的序列的残基，其中 X 可以独立地选自丙氨酸、甘氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸和缬氨酸。同样，对于残基 X 的同一性没有限制，残基 B 可以独立地选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸。不管是什么序列，这种残基能与一系列已知的硫酸化糖胺聚糖组分的任何一种或多种相互作用，例如但并不限于硫酸肝素、硫酸乙酰肝素及其组合。正如本文其它地方所阐明的，这种糖胺聚糖组合的结合 (incorporation) 能用来诱导肽化合物的凝胶化，从而为所得的组合物提供胶束结构。因而，在与细胞介质接触之前，可实现这种结合和产生凝胶化作用。可选择地，两亲性肽化合物能够被引入细胞介质或与细胞介质接触。此后，与糖胺聚糖组合的结合能诱导原位凝胶化作用——这发生在细胞介质处、细胞介质上或细胞介质内。

【0020】部分地，本发明也可以涉及一种使用两亲性肽组合物来活化生血管生长因子的方法。这种方法可以包括：提供上面所描述的那种两亲性肽-硫酸化多糖组合物；和将这种组合物与生血管生长因子发生相互作用，正如本文其它地方所阐明的，以诱导体外、体内的血管生成，亦或正如本领域的普通技术人员另外认识到的、表示这些生长因子的活化作用的血管生成。

【0021】

在某些实施方案中，这种相互作用可以包括在组合物和细胞介质接触之前或之后将一个或多个生长因子引入到这种组合物中。在这种方法的某些其它的体内实施方案中，关于细胞介质，这种相互作用基本上不存在外源的生长因子。正如下面所阐明的，这种实施方案具有代表性的是，在细胞接触之后，在没有引入或加入生血管生长因子之下，能观察到体内的血管生成。因而，这种方法的各种实施方案能被用来活化生血管生长因子，诱导或促进血管生成和治疗哺乳动物的缺血性组织。

某些实施方式详述

【0022】为了阐明本发明的某些实施方案，一个或多个肽两亲性（PA）化合物能被用作化学平台来产生自组装的血管生成支架。这种肽两亲物可以包括亲水性的肽头部基团和疏水性的脂肪酸尾，以诱导在水溶液中自组装成纳米纤维。例如，凝胶或水凝胶网络，其能被应用于某些实施方案，能通过适当地改变 pH 或离子强度来形成。参见 Hartgerink, J. D., E. Beniash and S. I. Stupp; "Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers." *Science* 294, (2001) 1684-1688, 在此引入其全部以作为参考。

【0023】肽序列的变更能被用来赋予产生的纳米纤维独特的生物学功能。例如，可以使用带有结合肝素头部基团的肽两亲物，因为肝素——一组称为硫酸乙酰肝素样糖胺聚糖（heparan sulfate like glycosaminoglycans）HSPGs）的相关糖胺聚糖的一部分——被认为在血管生成中起重要作用，硫酸乙酰肝素样糖胺聚糖（HSPGs）通常在细胞外基质中被发现。HSPGs 含有硫酸化糖胺聚糖，其包括硫酸肝素和其结构类似物硫酸乙酰肝素。HSPGs 结合并活化许多血管生长因子，尤其是血管内皮生长因子（VEGF）和成纤维细胞生长因子-2（FGF-2）。参见，例如下面这些文献，其中每一篇在此引入其全部，Keyt, B. A., L. T. Berleau, H. V. Nguyen, H. Chen, H. Heinsohn, R. Vandlen and N. Ferrara; "The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency." *Journal of Biological Chemistry* 271, (1996) 7788-7795. Herr, A. B., D. M. Ornitz, R. Sasisekharan, G. Venkataraman and G. Waksman; "Heparin-induced self-association of fibroblast growth factor-alpha - evidence for two oligomerization processes." *Journal of Biological Chemistry* 272, (1997) 16382-16389. Schlessinger, J., A. N. Plotnikov, O. A. Ibrahim, A. V. Eliseenkova, B. K. Yeh, A. Yayon, R. J. Linhardt and M. Mohammadi; "Crystal structure of a ternary fgf-fgfr-heparin complex reveals a dual role for heparin in fgfr binding and dimerization." *Molecular Cell* 6, (2000) 743-750。这种方法将多功能性赋予此所得的基质，因为 HSPGs 能结合并活化不同体系里的许多器官发生生长因子。各种其它的硫酸化多糖可以与有用的肽序列设计一起被考虑。例如，同此相一

致，与角叉藻聚糖相作用的残基被结合到肽组分中。

【0024】肽两亲物本身提供了另一水平的多功能性，因为一个宽范围的肽表位能被结合到纳米纤维的外周，而且这种分子的明智设计能使多个肽两亲物(PA)与不同的表位共组装成水凝胶。(Niece, K. L., J. D. Hartgerink, J. Donners and S. I. Stupp; "Self-assembly combining two bioactive peptide-amphiphile molecules into nanofibers by electrostatic attraction." *Journal of the American Chemical Society* 125, (2003) 7146-7147, 在此引入其全部以作为参考。)

【0025】联合上面所描述的，可以合成独特的肝素结合序列，包括但不限于-XBBBXXBX-，其中X可独立地选自疏水性氨基酸残基，B可独立地选自碱性氨基酸残基。从一组天然产生的肝素结合蛋白质中能测定出此基序中最常见的氨基酸。(Cardin, A. D. and H. J. R. Weintraub; "Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions." *Arteriosclerosis* 9, (1989) 21-32.)。本发明中的结合肝素的肽两亲物(heparin binding peptide amphiphile (HBPA))当加入肝素或类肝素时，在此显示出自组装行为，这就导致凝胶的形成。此外，所得的组合基质能在其内部诱导产生内皮细胞夹心，从而形成具有三维连续内腔的高度组织化的毛细管状结构；而且，所得的含有类肝素的基质甚至在不存在生长因子的情况下已经显示出能显著提高缺血性伤口愈合——这是在任何其它类型的基质的文献中没有观察到的情况。

【0026】在一个方面，本发明的化合物能够包括并入这种结合序列的肽两亲物；也就是，下列形式的任何结合肝素的肽两亲物：

(疏水物(hydrophobe)) - (间隔区) - XBBBXXBX- (末端)

其中，疏水物组分是任何饱和或不饱和的链烷或其它疏水性部分，(间隔区)是包含任意氨基酸序列的任选组分，X可以独立地选自丙氨酸、甘氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸和缬氨酸，B可以独立地选自精氨酸、组氨酸和赖氨酸，和(末端)是以酰胺或羧基为末端的氨基酸残基或序列或其它的表位，它们已知或已测定具有生物活

性，例如但不限于 RGD、IKVAV 和生物素。各种其它的表位在本领域是已知的，和/或者在一个或多个引入的参考文献中有所描述。

【0027】不受限制地，本发明的其中一种 HBPA 化合物能够包括脂肪酸，例如，棕榈酸、其部分或另外的疏水性组分，其以共价键连接或偶联到肽序列上，例如 AAAAGGGLRKKLGKA，带有任选地以酰胺为终端的末端丙氨酸残基。当用合适的刺激物，如加入肝素引发时，疏水基的存在就诱导其在水溶液中自组装成纳米纤维。此外，由于纳米纤维胶束的缠结作用，适当浓度的 HBPA，以及肝素、类肝素或类似的高带电荷的聚合物的加入，引起自组装水凝胶的形成。这种 HBPA-肝素间的相互作用是非共价的，这是对现有的共价键结合的肝素基质的改进，因为非共价相互作用能促进肝素与胞外基质的生物学相互作用。非共价相互作用也允许肝素结合并活化血管生成的肝素结合生长因子，比如血管内皮生长因子（VEGF）和成纤维细胞生长因子-2（FGF-2），和控制这些生长因子从基质中的释放。

【0028】特别地，本发明的某些实施方案可以包括肝素结合肽，它含有氨基酸序列，-LRKKLGKA-，其对于与宽范围的需要结合肝素或肝素样聚合物的生物活性聚合物、支架和组织或细胞培养基质的共价或非共价附着(attachment)来说，既是新颖的又是有潜在用途的。另外，既然肝素和结合肝素的肽两亲物之间的大量的非共价相互作用能至少部分地由静电吸引力来解释，其他相关的序列也已经以肽两亲物的形式制备出来，遵循如下总的形式：（疏水物）-（间隔区）-XXXXBBB-（末端）；（几种疏水物）-（间隔区）-XXXXBBB-（末端）；（疏水物）-（间隔区）-XXXXBB-（末端）和（疏水物）-（间隔区）-XXXXB-（末端），其中疏水物组分、可选的（间隔区）组分、X、B 和（末端）与上述所定义的一样。

【0029】特别地，一个这样的肽两亲物包括但不限于如下结构：带有酰胺末端的棕榈酰基-AAAAGGGLLGARKKK。不管怎样，对本发明有用的两亲性化合物的肽组分仅仅由结合和/或利用肝素、和/或其

功能上等同的肝素衍生物或类似物的能力限定，这是根据本文的描述或与之相一致或将由本领域中理解本发明的技术人员所推断。

【0030】 不管结合肝素的能力怎样，本发明的肽两亲物能够包括不同链长或序列的肽组分，这取决于在纤维形成途中分子间相互作用或结合所期望的灵活性(适应性, flexibility)、电荷和/或能力。这种化合物的疏水性组分也能够被改变(例如, 从大约 C₄ 或大约 C₆ 到大于大约 C₂₂ 或更高级的烷基或取代烷基, 饱和的或未饱和的, 等等), 这样的组分仅由所得的两亲性特点和对这种化合物的组合或组装的影响所限定。

【0031】 连同本发明所使用的各种肽两亲性化合物, 考虑到任何一个或多个上述考虑的方面, 能采用本领域技术人员所熟知的制备方法来合成, 这些方法包括那些在共同未决的申请案中所公开的方法, 即在 2002 年 11 月 14 日申请的序号为 10/294,114 (国际公布号 WO 03/054146), 和在 2003 年 2 月 18 日申请的序号为 10/368,517 (国际公布号 WO 03/070749) 的申请, 其中每一项申请在此引入其全部以作为参考, 以及对文献中已知的和在本文其它地方作为参考的那些技术的改进。在这些参考和共同未决申请中提到的合成方案可以被应用到本发明。肽两亲物可以被完全质子化、部分质子化、或作为酸性或碱性的添加盐。一般来说, 这种肽两亲物能采用标准的固相肽化学法来制备, 此方法包括在或靠近肽组分的 N-端加入疏水性的尾基或组分。可以对这种合成技术进行改进, 如本领域技术人员和理解本发明的技术人员所知道的, 例如, 通过利用共同待决申请描述中的步骤和对应的两亲性肽部分、化合物、相关组合物、和构型或组装物进行, 所述共同待决申请即在 2004 年 12 月 6 日申请的申请号 11/005,314 和 11/005,552 (国际公布号分别为 WO 05/056576 和 WO 05/056039), 其中的每一篇申请在此引入以作为参考。

【0032】 HBPA 化合物可以包括, 例如从棕榈酸衍生的脂肪酸尾基, 含有四个丙氨酸和三个甘氨酸的接头肽, 和新型结合肝素的肽头部基

团, 其含有以酰胺为末端的序列 LRKKLGKA (以后被称为 HBPA-1) 或者以酰胺为末端的序列 LLGARKKK (以后被称为 HBPA-2) (参见图 1)。HBPA-1 和 HBPA -2 两者均在水中是易溶的, 并在溶液中自组装形成纳米纤维束。在这两种 HBPA 的浓度大于 6 mmol 时, 肝素或类肝素的加入引发了凝胶的形成。图 2A 所示的这些纳米纤维束通过透射电镜 (TEM) 被观察到, 含有所看到的肝素标记的金颗粒, 装饰 HBPA-1 纳米纤维 (图 2B)。另外, 荧光共聚焦显微镜显示出 HBPA-1 纤维束, 其被标记到荧光素上的肝素染色, 如图 2C 中所示。频率扫描振荡流变学揭示出这些材料的黏弹性凝胶状的行为, 储能模量 (G') 和损耗模量 (G'') 两者很大程度上不依赖于角频率 (angular frequency), 而且 G' 始终大于 G'' (参见图 3A 和 3B)。HBPA 也在增大的 pH 值 (碱引发的) 和加入磷酸氢二钠时发生胶凝。另外, 与各个碱引发的凝胶相比, 肝素引发的凝胶的弹性模量在两种情况下在统计上要更高, 这表明硬度增加 (图 3A 和 3B)。

【0033】HBPA 的圆二色 (CD) 光谱图显示出 CD 特征, 即主要含有 α 螺旋。随着肝素的加入, 这将会变成一个表明 β 折叠形成的特征, 其在 218 nm 和 192 nm 处分别有一个典型的负的和正的最大值 (参见图 3C 和 3D)。等温滴定量热法被用来滴定独立的加入到这两种 HBPA 中的肝素的增量, 以及测量在结合的过程中释放的热量, 作为摩尔比的函数。对所得数据进行积分 (integrate) 并拟合成以前所描述的非线性函数 (Fromm, J. R., et al, "Differences in the Interaction of Heparin with Arginine and Lysine and the Importance of These Basic- Amino-Acids in the Binding of Heparin to Acidic Fibroblast Growth-Factor" *Arch. Biochem. Biophys.* 323 (1997) 279), 以得到两种情况下的 10^7 级的缔合常数 (参见图 3E 和 3F)。尽管它们的结合常数具有相似性, HBPA-1 和 HBPA-2 的结合相互作用在能量上是非常不同的。HBPA-1 和肝素的相互作用似乎主要是由熵变驱动的, 相反 HBPA-2-肝素的相互作用主要是焓变驱动的 (表 3G)。这种结果可以参考它们各自的结构进行解释。HBPA-1 在其肽链的外围上含有疏水性残基, 熵的增加可能由于是在肝素发生作用时溶剂水分子被这些残基取代的缘故。另一方面,

HBPA-2 在外围具有带电荷的碱性残基, 这导致与带负电的肝素之间强的静电作用力, 因此在它们的相互作用中焓因素占主导地位。

【0034】从 HBPA-1-肝素凝胶中释放成纤维细胞生长因子-2 (FGF-2) 的分布图被测定, 这阐明了本发明的另一方面。以共价键与若丹明相连的 FGF-2 (在 544/576 nm 的 ex/em 最大值) 被结合到 HBPA-1 水凝胶里, 该水凝胶是通过加入肝素或磷酸氢二钠制备的。释放介质在一系列时间点上被调换并储存起来。FGF-2 若丹明的被动累积释放图 (passive cumulative release profile) 揭示了, 在没有肝素的情况下, 在前五分钟里从凝胶中释放出 34.1% 的 FGF-2, 10 天的时候释放出了 98.3% 的 FGF-2。肝素的存在降低了 FGF-2 的释放速度和绝对的释放量, 10 天的时候总释放量为 57.1% (参见图 4)。

【0035】为了证明体外血管生成, 使牛的肺动脉内皮细胞(bPAEC) 在两类 HBPA-肝素凝胶层的顶部生长到汇合, 然后通过施加到盛在一个 8 孔分室盖玻片 (8-well chambered coverslip) 上的另一层同样的凝胶上, 将其夹入中间。一些凝胶具有并入其内部的 VEGF 和 FGF-2 的组合。使用四种对照: 夹在两层 I 型胶原凝胶中间的 bPAEC, 在每次更换介质时, 向其中没有加入补加的肝素或生长因子; 仅加入补加的肝素; 仅加入生长因子; 或者加入了肝素和生长因子。bPAEC 长成薄片, 而且早在含有生长因子的 HBPA-1-肝素凝胶中加入第二层后的第一天便呈现出枝状汇合网络。此组织继续生长, 到七天时显示形成了带有连续内腔的组织化的管状结构, 穿透凝胶厚度 (参见图 5A)。不含生长因子的 HBPA-1-肝素凝胶在三天以后开始显示出一些分枝。在七天时, 这些凝胶似乎比在含生长因子的 HBPA-1-肝素凝胶中所看到的细管要少, 但是这两种类型的凝胶中的单个细管表现出明显的相似性 (图 5B)。在 HBPA-2-肝素的情况下, 在 10 天结束时, 在含或不含生长因子的凝胶中, 细胞长成三维结构的薄片, 其含有能被观察到的偶然的像裂缝一样的内腔和很少的管状结构 (图 5C 和 D)。不含补充的肝素和生长因子的胶原凝胶显示在整个凝胶中存在生长的 bPAEC, 其没有特别的组织结构。含有补充的肝素、生长因子或者两者的三类

凝胶，在某些区域显示存在枝状的汇合网络。没有任何一种显示出形成带有连续内腔的组织化的管状结构（图 5E-H）。

【0036】最后，为了证实在体内这种组合物和基质构造的功效，选择了兔耳伤口愈合模型。（参见，例如，Ahn ST, Mustoe TA. “Effects of ischemia on ulcer wound healing: a new model in the rabbit ear.” *Ann Plast Surg.* 24 (1990) 17-23，在此引入其全部以作为参考）。这是一个充分确立的模型，其中，通过结扎住三条供应正常兔耳朵的动脉中的两条，以及打断耳朵根部周围的皮肤血液循环，通过外科手术诱发局部缺血。然后，用一个环形的 6 mm 活体检查用的打孔机，在耳朵的腹侧面，向软骨膜上部及包括软骨膜，产生四个伤口。在有或没有生长因子（VEGF 和 FGF-2）的 HBPA-1 类肝素凝胶的情况中，可以应用期望的材料，而且此伤口包裹上聚氨酯薄膜绷带，维持 12 天。在 12 天结束的时候，这些动物被安乐死，利用在伤口周围进行彻底的 7 mm 的生物活体检查，得到这些伤口。分析此样品以得到伤口愈合的组织学证据。通过测量截开的伤口中的愈合边之间的上皮缝隙，这个愈合过程能够被量化。也使用了四种对照材料，即含生长因子的 HBPA-1、含生长因子的类肝素、仅生长因子和仅缓冲溶液（上述材料的溶剂）。

【0037】通过分析伤口边缘的结果，发现 HBPA-1-类肝素凝胶比任何一种对照能诱发统计上明显更高的伤口愈合。外源的或引入的生长因子的存在对于影响基质诱导伤口愈合的能力似乎不是必须的（参见图 6）。以前还没有报道在不使用生长因子情况下的缺血性伤口处诱导的伤口愈合。不限于任何一种理论或操作方式，这种观察现象可能是由于组合物和所得的基质结构中的类肝素能够募集和活化位于细胞介质中的内源性生长因子。

【0038】肝素和类肝素是很重要的血管生成促进物，这是由于它们能结合并活化血管生长因子。其它的研究已经使用肝素来释放血管生长因子，这是通过将其共价结合到基质上，以物理方式将其捕获到基质里而进行，或者用肝素包被（涂敷）基质表面而进行。与现

有技术相比，通过在肽两亲物（HBPA）上使用共有的肝素结合序列，本发明以非共价键形式结合肝素和/或类肝素，形成水凝胶，该水凝胶具有以模拟胞外基质中的肝素的功能的方式来募集、活化和/或传送生长因子给细胞的潜力。

【0039】之前已经描述了其它肽两亲性分子自组装成纳米纤维，其相互缠结形成凝胶。参见，例如，Hartgerink, J. D., E. Beniash and S. I. Stupp; "Peptide-amphiphile nanofibers: A versatile scaffold for the preparation of self-assembling materials." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, (2002) 5133-5138。简单地说，不限于任何一种理论或操作方式，据认为当溶液的 pH 值是酸性时，HBPA 带有净的正电荷，其通过静电斥力抑制自组装。随着溶液 pH 值升高，正电荷被中和，从而促进疏水性显著减小引起的积聚和氢键结合的肽二级结构的形成。由于纳米纤维的缠绕，发生凝胶形成，而且凝胶的形成需要合适的 HBPA 浓度。简单的无机反离子也已经显示出能促进此自组装过程和凝胶的形成，这大概是由于类似的电荷屏蔽作用的缘故。这里，通过加入来自 Na_2HPO_4 的无机阴离子，或加入复杂聚合物阴离子——糖胺聚糖、硫酸肝素和硫酸乙酰肝素，观察到自组装。肝素触发的自组装和凝胶形成引起人们的关注，因为（1）这是第一次描述聚物质触发的超分子自组装的例子，而且（2）因为肽组分被特定地设计以与这样的糖胺聚糖相结合。肝素被认为不仅起到了简单的电荷屏蔽作用，而且参与纳米纤维之间形成非共价交联。正因为这样，肝素能结合到多个 HBPA 分子上，这些分子含有不同的疏水性组分或残基序列，因此可作为混合的超分子自组装的模板。

【0040】HBPA 与肝素的相互作用进一步由圆二色光谱法和等温量热法所证实。由 100 nM 的等温滴定量热法（ITC）所得到的结合常数表明具有很强的结合力，这可与其他合成的肝素结合肽与肝素之间所得到的结合常数相媲美。同时，这个结合常数同肝素与肝素结合生长因子如 FGF-2 之间的结合常数相比，弱两个数量级，因此含有肝素的

水凝胶，比单独 HBPA，能更长时间地保留 FGF-2，而且减慢了其从水凝胶中的释放。

【0041】细胞夹层的体外试验表明存在高度组织化的管状结构，其含有穿透整个 HBPA-1-肝素凝胶的连续内腔。所观察到的结构最类似于体内具有一定组织的毛细管网络，这在以前没有报道过的。该行为仅在 HBPA-1-肝素凝胶中被观察到。观察到含有生长因子的 HBPA-1-肝素凝胶比不含生长因子的凝胶能更快速且更大面积上形成组织。尽管添加的生长因子的存在诱导更早期的接合，不含生长因子的凝胶也会呈现相似的组织，可能是由于凝胶中非共价结合的肝素能募集并活化来自血清的生长因子和那些由细胞本身合成的生长因子。这点将解释含与不含生长因子的 HBPA-1-肝素凝胶中成管过程中的定性相似性，以及解释了不含生长因子的 HBPA-1-肝素凝胶中细胞组织化的延迟。可以假定，在其表面上以非共价形式展示肝素的纳米纤维束的形成优化了肝素对这一特定用途的生物活性。相反，HBPA-2-肝素凝胶呈现出与对照胶原凝胶相类似的偶然的不连续缝隙状内腔。这可能是因为在第一种情况中共有形式的存在优化了肝素的这种特殊的生物活性。天然肝素结合蛋白质的共有肝素结合序列被认为能沿着肝素带负电的重复单元周围形成 20A 的带正电的 α 转角。(Margalit, H., N. Fischer and S. A. Bensasson; "Comparative-analysis of structurally defined heparin-binding sequences reveals a distinct spatial-distribution of basic residues." *Journal of Biological Chemistry* 268, (1993) 19228-19231.)

【0042】最后，兔子耳朵上的缺血性伤口愈合的体内模型显示出甚至不含生长因子的 HBPA-1 类肝素凝胶能显著地诱导伤口愈合，这将是由于局部改进的血管生成所致。需引起显著注意的是这样的事实，这种伤口愈合甚至能在没有血管生长因子的情况下完成。这可能是由于在伤口处存在内源性生长因子，其由 HBPA-1 类肝素基质所募集并活化的。这是一个全新的结果，并且事实上仅仅借助生长因子的显微照片，以前的研究也已经显示出此模型中伤口愈合的部分改进(Corral CJ, Siddiqui A, Wu L, Farrell CL, Lyons D, Mustoe TA. "Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblastic growth

factor during ischemic wound healing." *Arch Surg.* 134 (1999), 200-205)。

【0043】因此，本发明提供了一种新型的肽两亲性生物分子，其能自组装并以非共价键的形式结合到肝素、类肝素和其他的硫酸化糖胺聚糖上，从而产生生血管水凝胶，其在体外和体内被表征。这种化合物能被例如 HSGAG 的聚合物所触发，以从溶液进行自组装形成凝胶。在生物学上，HBPA-肝素/类肝素凝胶——其代表本发明的其它组合物和构型基质，在培养液中具有独特的能力，能诱导内皮细胞形成带有连续内腔的三维结构上高度组织化的毛细管状的细管，而且最重要的是在不存在外源生长因子下诱导缺血性伤口愈合。

本发明的实施例

【0044】下面非限定性的实施例和资料阐明了与本发明的两亲性化合物、纳米纤维、凝胶、组合物和/或方法相关的各个方面和特征，包括结合肝素的肽两亲物的自组装和相应的肝素、类肝素和/或相关的生长因子的传递，这可以通过本文所描述的方法得到。与现有技术相比，本方法、化合物和组合物提供了令人惊奇的、意想不到的或者与以前相反的结果和数据。虽然本发明的效用通过几种两亲性化合物及其组分的使用进行了阐述，本领域的技术人员将会理解的是，运用各种其它两亲性化合物和/或组分能够得到相似的结果，与本发明的范围相当。

实施例 1

【0045】HBPA 凝胶的形成 所有的试剂都从 Fisher 购买，而且除非特别说明，所有试剂均是直接使用（即买即用）。HBPA 是采用前述引入本文的参考文献中所描述的方法合成的。根据本发明，包含其它残基和/或疏水性组分的各种其它的两亲性肽组合物，能也如本文描述的方法制备。简单地说，利用固相肽自动合成仪（Applied Biosystems-733A），借助用于标准苄甲基羰酰（Fmoc）化学的适当保护的氨基酸(Novabiochem)，在 Rink 酰胺树脂上构建这种肽。采用烷基化反应，用棕榈酸将肽的 N-端封端，接着使用三氟乙酸（TFA）、水和

三硅烷丙酯将 HBPA 从树脂中去保护并切割下来。TFA 通过旋转蒸发去除，使用冷的二乙醚研磨 HBPA 产物，然后将此 HBPA 产物过滤并真空干燥。HBPA 的分子量采用电喷雾离子化质谱 (electrospray ionization mass spectrometry) 进行表征。在室温下将 HBPA 溶解在 1M 的盐酸中溶解 1h，然后被冷冻干燥以减少残留的 TFA 反离子而且用氯离子取代它们。根据需要，使用 1M 的氢氧化钠溶液，将 HBPA 再次溶解在去离子水里，配成 30 mg/ml、pH 值为 7.4（如果没有另外特别的说明）的溶液。HBPA 凝胶是这样制成的：将上面所制得的 HBPA 溶液和凝胶触发剂以等体积混合，以得到最终产品 1.5 w/v % 的 HBPA 凝胶，其中凝胶触发剂为浓度为 20 mg/mL 的肝素钠或类肝素钠 (Sigma)（以得到计量比为 1:1.84 的 HBPA:肝素/类肝素），或者为浓度 11 mg/ml 的磷酸氢二钠溶液。无论何时制备更低重量百分比的凝胶，肝素、类肝素和磷酸盐都被适当的按比例减量，以保持此计量比。

实施例 2

【0046】自组装机物的表征。按照以前所描述的方法制备肝素-金染色的 HBPA 样品，用于透射电子显微术 (TEM) (Sanantonio, J. D., A. D. Lander, M. J. Karnovsky and H. S. Slayter; "Mapping the heparin-binding sites on type-I collagen monomers and fibrils." *Journal of Cell Biology* 125, (1994) 1179-1188.)。简单地说，多孔碳涂覆的铜网 (holey carbon coated copper grid) 被两次浸在 HBPA-1 溶液 (在水中 0.1 w/v %) 中 20 s，在 4 °C 下用以 1:20 被稀释在推荐的缓冲液 (Sigma) 中的胶体状的 10 nm 金标记的肝素-清蛋白溶液染色 30 min，在室温下在含 4 v/v % 甲醛 (Sigma) 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS-Gibco) 中固定 20 min，然后在室温下用 2 w/v % 的乙酸双氧铀复染 45 min，其中在每个步骤之间，用含有 0.5 w/v % 的牛血清白蛋白和 0.05 w/v % 的吐温 (Tween) 20 的 0.1M 甲次砷酸盐缓冲溶液洗涤两次。就 HBPA-2 来说，多孔碳涂覆的铜网被两次浸在 1 % 的 HBPA-2-肝素凝胶悬浮液中 20 s，然后室温下在磷钨酸 (Sigma) 中染色。TEM 是在 Hitachi 800 显微镜上，加速电压为 200 kV 下进行的。共焦荧光显微术是这样进行的：将各 10 μ l 的 0.04 w/v % 的 HBPA-1 水溶液和 0.03 w/v % 的荧光素-肝素 (Sigma) 水溶液混合，

然后在 Leica 激光共焦扫描显微镜 (DM IRE2) 上成像。图像采用 Leica LCS 成像软件进行分析。借助带有 20 mm 的不锈钢平行板的 Paar Physica MCR300 流变仪对原位制得的、并保持温度在 22°C 的凝胶进行震荡流变实验, 此凝胶如下制备而成: 将 80 μ l 的 2 w/v % 的 HBPA 水溶液与溶解在 80 μ l 水中的 1 mg 肝素或 0.5 mg 磷酸氢二钠混合, 或加入 80 μ l 的 0.25 M 的 NaOH。频率扫描实验 (frequency sweep experiment) 是在 3 % 的应变 (strain), 10 分钟的等待时间 (两者通过独立地进行振幅扫描实验 (amplitude sweep) 和时间应变实验 (time strain experiment) 而测得的) 下进行的, 得到了在角频率 0.1~10 rad/s 范围之间的 17 个数据点。CD 光谱是使用路径长为 0.1 cm 的石英管, 在 Jasco J-715 CD 分光光度计上从四个样品中采集得到的: 空白对照, 0.105 mg 的 HBPA-1 或 HBPA-2, 0.07 mg 的肝素以及 0.105 mg 单用的两种 HBPA 和 0.07 mg 的肝素的混合物, 其中每个样品均配制在 350 μ l 的水中, 其 pH 为 7。等量热实验 (Microcal ITC) 是将取自 101.5 μ g/ml 储备液中的 4 μ l 等体积的肝素滴加到 40.1 μ g/ml 的 HBPA-1 或-2 溶液中来进行的 (所有溶液均为水溶液)。相同数量的肝素被滴加到空白液中以得到背景值。原始数据是根据两者之间结合所释放的热量相对于它们之间的摩尔比得到的, 该数据被积分并拟合成单一类型结合位点的曲线, 以得到结合常数, 这在前面有所描述, 可参考上面所述的内容。

实施例 3

【0047】 FGF-2 从 HBPA-1-肝素凝胶中释放的曲线图。 FGF-2 (Peprotech) 通过酯键共价连接到 *N*-羟基琥珀酰亚胺-若丹明, 其中使用了商业可利用的若丹明蛋白质标记试剂盒 (Pierce Biotechnology), 接着将 12.5 ng 的这种 FGF-2 若丹明加入到 100 μ l 的 20 mg/ml 肝素或 11 mg/ml 磷酸氢二钠的水溶液。这些溶液被加入到 100 μ l 的 3 w/v % 的 HBPA 水溶液中, 分别得到含有 FGF-2 若丹明的 HBPA-1-肝素或 HBPA-1-磷酸盐凝胶。这种凝胶表面覆盖上 100 μ l 的水, 并在一个恒温箱 (5 % CO₂) 内 37°C 下被温育, 在 5 min 时初次更换水, 然后每天都进行更换, 持续 10 天。更换的水被收集起来, 并用 Gemini EM 荧光板读数器进行分析 (ex/em maxima 544/576nm)。在肝素或磷酸盐溶液

中等量的原始 FGF-2 的荧光强度被测量，而且此值被用来得到释放的百分数。

实施例 4

【0048】体外血管生成试验。 PAEC 在无苯酚红的 Dulbecco 的改性 Eagle 培养基中生长到传代 14 或 15 代，这种培养基（介质，media）含有 20 % v/v 的胎牛血清、1 % v/v 的青霉素-链霉素、2% v/v 的 L-谷氨酸盐和各为 1 mM 的丙酮酸钠和改性 Eagle 培养基氨基酸（所述血清来自 Hyclone，而所述培养基和其他的添加剂来自 Gibco）。向上述培养基中加入 5 v/v % 的二甲基亚砷（Sigma），制得了冷冻培养基。在 37°C 下，含 5 % CO₂ 的细胞培养恒温箱内生长细胞。这种夹层凝胶（sandwich gel）是在 8 孔分室盖玻片（Nalge Nunc）的容器内制得的。HBPA-肝素凝胶的第一层是通过将 100 μ l 的 pH 为 7 的 30 mg/ml 的 HBPA-1 或-2 水溶液与 100 μ l 的含 20 mg/ml 肝素的上述细胞培养基混合制得的，这种培养基含有或不含各 12.5 ng（以得到在孔中 31.25 ng/ml 的总浓度）的 FGF-2 和 VEGF（两者均来自 Peprotech）。200 μ l 的 3 w/v % 的胶原凝胶是用 I 型鼠尾胶原（Roche）制得的，其在一个碱性槽室（chamber）里凝胶，然后用上述介质将其平衡，得到 pH 值为 7.4。通过在室温下放置过夜，使此凝胶凝固。随后，在培养基中，以每孔 750,000 bPAEC 铺板，接着在恒温箱中每隔一天更换培养基，直到细胞生长汇合穿过凝胶的厚度（通常到 5 天的时候）。将多余的培养基去除，并且严格按照前面所述的方法在这层细胞层上方添加上第二层凝胶。这种胶原凝胶在分开的 8 孔室载玻片上制备，如前所述进行 pH 平衡后，放置到细胞层上方。在室温下等待 1h 后，添加培养基，并将这些孔在 37°C 下温育，然后每隔一天更换培养基。然后将含有或不含生长因子的补加肝素加入，其浓度与上面特别规定的胶原凝胶对照相同。我们没有在培养基中补充任何一种含肝素或生长因子的 HBPA-肝素凝胶。因此，对于这两种含有生长因子的 HBPA-肝素凝胶中补加生长因子的唯一来源是来自这两个凝胶层。借助光谱法每天对细胞培养物进行观察。在 7 天的时候，这些细胞用浓度为 20 μ M 的基于荧光素的细胞示踪物（Vybrant CFDA SE 细胞示踪物-分子探针（Vybrant CFDA SE cell

tracer- Molecular Probes)) 染色, 使用 Leica 激光共焦扫描显微镜(DM IRE2)将它们成像, 得到穿过凝胶的 z-系列图像。Volocity 和 NIH ImageJ 软件被用于 z-系列图像的三维 (3-D) 绘制(rendering)。

实施例 5

【0049】兔耳的缺血性伤口愈合试验。利用一个试验来测定基质诱导缺血性区域的伤口愈合的能力(Ahn ST, Mustoe TA. "Effects of ischemia on ulcer wound healing: a new model in the rabbit ear." *Ann Plast Surg*. 24 (1990) 17-23)。该实验方案得到西北动物保护和利用委员会 (Northwestern's Animal Care and Usage Committee) 的批准。动物用克他命和甲苯噻嗪进行麻醉, 并且在耳朵根部的末端产生 1 cm 长的无菌手术切口。鉴别出中央动脉和嘴部动脉 (rostral artery), 将它们用 4-0 爱惜良尼龙线(ethilon)结扎而且使其不通, 注意使各自的静脉未被触及。切口沿着耳朵根部外周延伸, 这打断了皮肤的循环, 只留下细小的尾部动脉作为耳部血液供应的唯一来源, 然后被缝合关闭。在腹侧表面, 用 6 mm 的活体检查用的打孔机, 向软骨膜上部及包括软骨膜, 产生四个伤口, 保留裸露的软骨作为伤口的基底。必需的材料被应用于在指定地方原位胶凝的 HBPA-类肝素。这些伤口用薄的聚氨酯伤用绷带 (Tegaderm™) 包裹, 而且对这些动物给予了适当的手术后的镇痛处理。这些动物在适当的设备里被关养 12 天。在 12 天结束的时候, 这些动物被麻痹然后用心内 Euthasol™将其安乐死, 接着进行气胸感应手术 (surgical induction of pneumothorax), 以确定安乐死。然后用一个 7 mm 的生物活体检查用的打孔器, 穿透背部皮肤得到了这些带有 1mm 正常组织边缘的伤口。这些伤口被切成两分后, 放到缓冲福尔马林液中, 固定, 植入石蜡, 并用马森三色剂 (Masson's trichrome) 将其染色。测量每个伤口的上皮细胞主边缘之间的缝隙, 以量化伤口愈合过程, 测量值为零表明完全愈合。收集这些结果, 并利用假定不等方差的双样本 t 检验(a two sample t test), 进行统计学分析。

【0050】尽管本发明的原理已经依据特定的实施方式进行了描述, 应当清楚理解的是, 这些描述仅是以例子的方式加入的, 并没有意图

以任何方式限定本发明的范围。举例来说，某些实施方式已经描述为，提供了一种组成基质，其能够结合某些血管生长因子并控制其传递，以促进形成具有一定内皮细胞组织程度的毛细管状的结构，这在以前没有报道。然而，这种血管化基质也能被用于各种其他生长因子的受控传递和释放。另外，通过向细胞介质中引入或注入液态的前体化合物或组分，能原位形成这种组合物或基质。

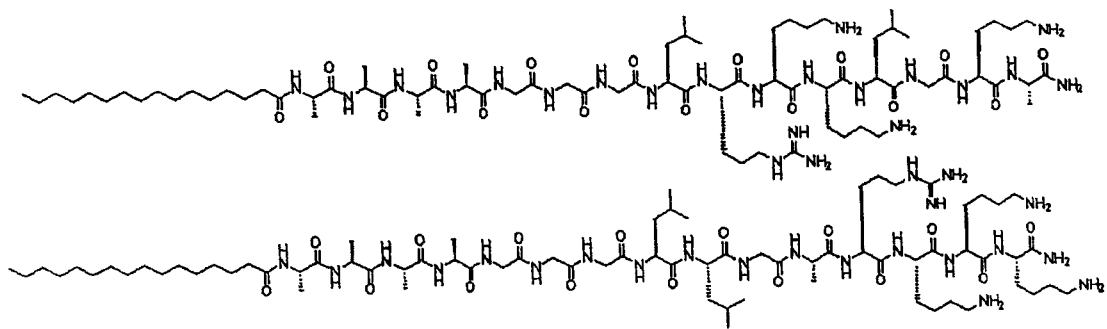


图1

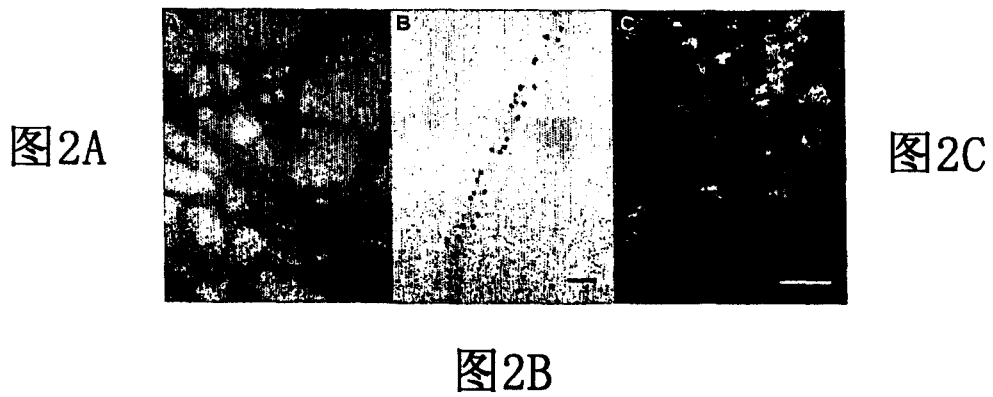


图3A

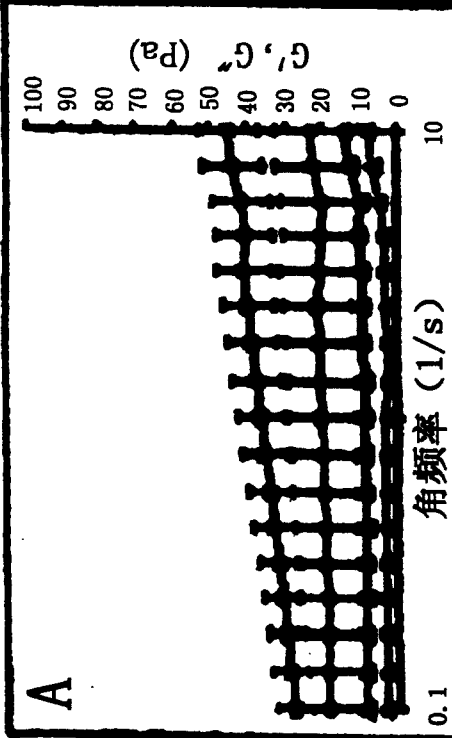


图3B

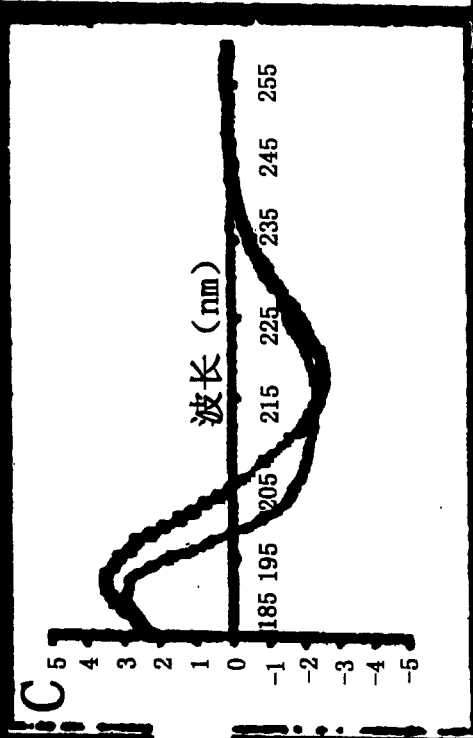
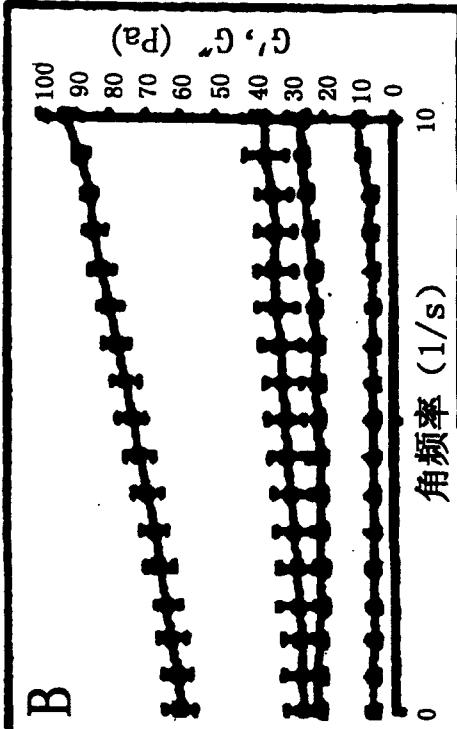


图3C

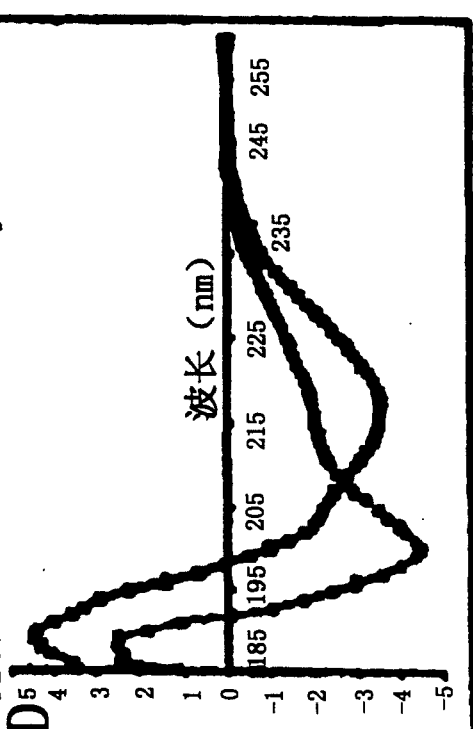


图3D

图3E

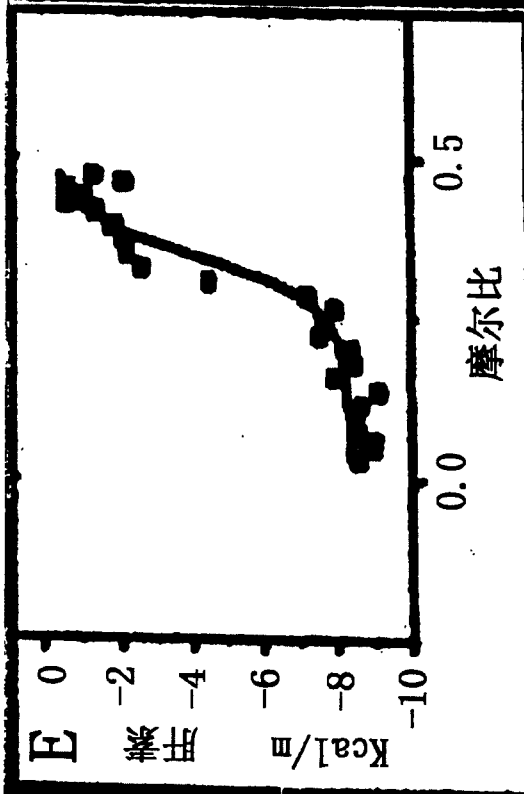
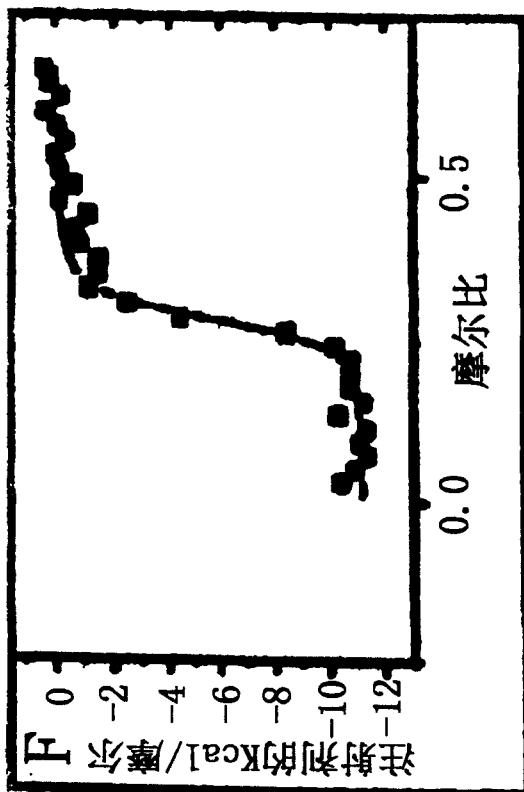


图3F



G	HBPA-1- 肝素	HBPA-2- 肝素
ΔG	-9616.74+/-29.18	-10164.948+/-233.49
ΔH	-6.24+/-0.01	-9218.5+/-3864.06
$-T\Delta S$	-9610.5+/-29.20	-946.448+/-3630.57

图3G

图4

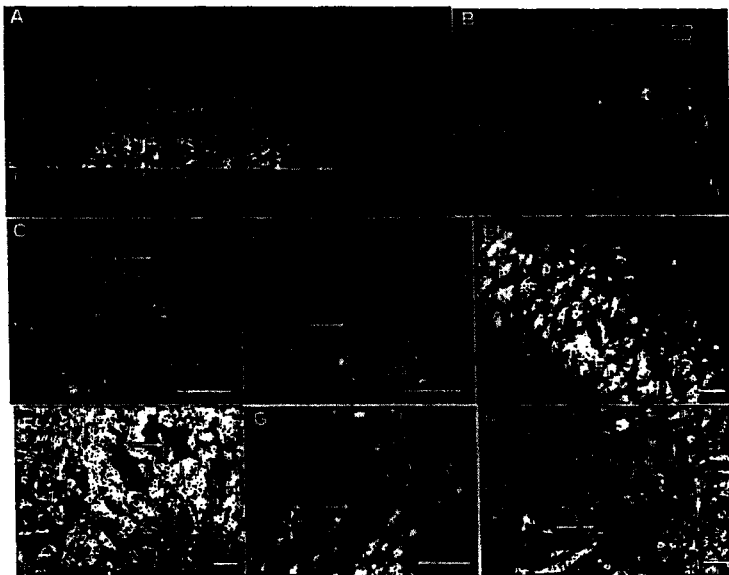
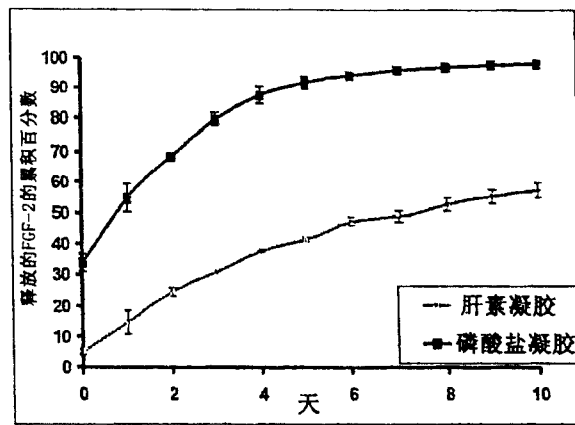


图5A-H

图6

