



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102811740 A

(43) 申请公布日 2012. 12. 05

(21) 申请号 201180010546. X

(22) 申请日 2011. 02. 25

(30) 优先权数据

61/308, 454 2010. 02. 26 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 08. 22

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/026169 2011. 02. 25

(87) PCT申请的公布数据

W02011/106595 EN 2011. 09. 01

(71) 申请人 犹他大学研究基金会

地址 美国犹他州

(72) 发明人 拉塞尔·J·斯图尔特

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 武晶晶 杨淑媛

(51) Int. Cl.

A61K 47/00 (2006. 01)

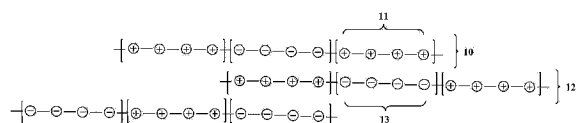
权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 3 页

(54) 发明名称

由静电缔合的嵌段共聚物制备的粘合剂络合物凝聚层以及其制造和使用方法

(57) 摘要

在此描述了由静电缔合的嵌段共聚物合成粘合剂络合物凝聚层, 其中该嵌段共聚物包含交替聚阳离子嵌段以及聚阴离子嵌段。在此还描述了用于制备并且使用所述粘合剂络合物凝聚层的方法。



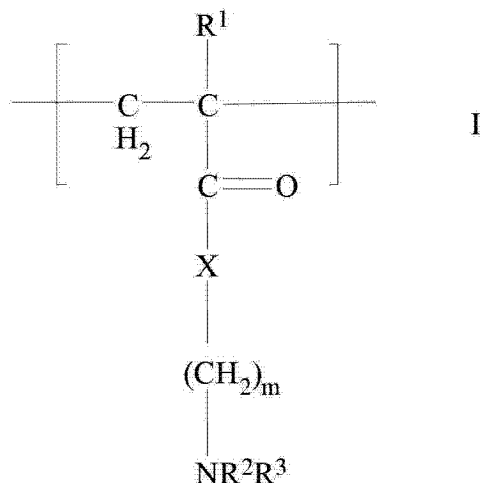
1. 一种包含静电缔合的嵌段共聚物的粘合剂络合物凝聚层,其中该嵌段共聚物包含交替聚阳离子嵌段以及聚阴离子嵌段。

2. 如权利要求 1 所述的凝聚层,其中该聚阳离子嵌段包含一种可生物降解的聚胺。

3. 如权利要求 2 所述的凝聚层,其中所述可生物降解的聚胺包括一种多糖、蛋白质、合成聚胺、或它们的任何组合。

4. 如权利要求 2 所述的凝聚层,其中该可生物降解的聚胺包括一种胺改性的天然聚合物。

5. 如权利要求 1 所述的凝聚层,其中该聚阳离子嵌段包含至少一个含式 I 的片段

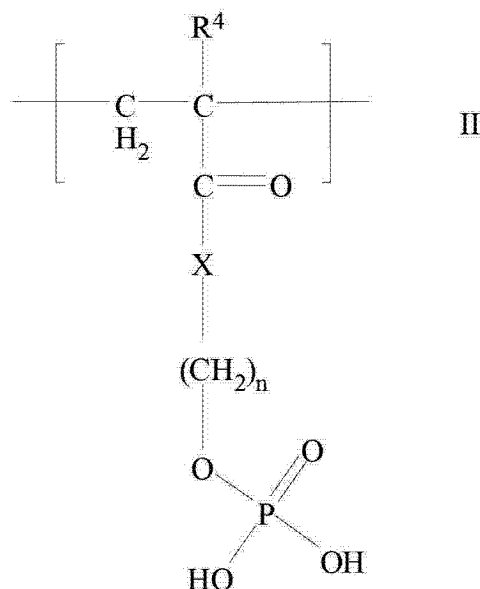


其中 R¹、R² 和 R³ 独立地为氢、一个烷基或胍鎓基团, X 为氧或 NR⁵, 其中 R⁵ 为氢或烷基, 并且 m 为从 1 至 10 ;或其药学上可接受的盐, 其中 R² 或 R³ 中的至少一者为一种可光化交联的基团。

6. 如权利要求 1 所述的凝聚层,其中所述聚阴离子嵌段包括聚磷酸化合物。

7. 如权利要求 1 所述的凝聚层,其中该聚阴离子嵌段包括一种含有一个或多个侧磷酸基的聚丙烯酸酯。

8. 如权利要求 1 所述的凝聚层,其中该聚阴离子嵌段包括一种含至少一个具有式 II 的片段的聚合物



其中 R4 为氢或烷基, X 为氧或 NR5, 其中 R5 为氢或一个烷基, 并且 n 为从 1 至 10 ; 或其药学上可接受的盐。

9. 如权利要求 1 所述的凝聚层, 其中该凝聚层还包含至少一种多价阳离子, 并且该多价阳离子包括 Ca²⁺ 和 / 或 Mg²⁺。

10. 如权利要求 1 所述的凝聚层, 其中该凝聚层还包含一种或多种包封在该凝聚层中的生物活性剂。

11. 如权利要求 10 所述的凝聚层, 其中该生物活性剂包括一种收敛剂。

12. 如权利要求 11 所述的凝聚层, 其中该收敛剂包括一种铝、铁、锌、锰、铋的无机盐, 或它们的任何组合。

13. 如权利要求 11 所述的凝聚层, 其中该收敛剂包括硫酸高铁、碱式硫酸铁、三氯化铁、氯化锌、氯化铝、硫酸铝、氢氧化铝、乙酸铝、硫酸钾铝、硫酸铵铝、或它们的任何组合。

14. 如权利要求 1 所述的凝聚层, 其中该聚阴离子嵌段包含至少一个能够经受氧化的二羟基芳族基团, 其中该二羟基芳族基团共价地连接到该聚阴离子上。

15. 如权利要求 1 所述的凝聚层, 其中该凝聚层还包含一种稳定化的氧化剂复合物。

16. 如权利要求 1 所述的凝聚层, 其中这些嵌段共聚物通过狄尔斯-阿尔德反应彼此交联。

17. 如权利要求 1 至 16 所述的凝聚层用于将一种材料或物体粘附至一个润湿基底上的用途。

18. 如权利要求 17 所述的用途, 其中该润湿基底包括一种金属基底或玻璃。

19. 一种用于将基底粘附至受试者的骨骼上的方法, 包括使该骨骼与如权利要求 1 至 16 所述的凝聚层接触并且将该基底施加至该经涂覆的骨骼上。

20. 如权利要求 19 所述的方法, 其中该基底为一种金属基底、背衬材料、塑料薄膜或箔片。

21. 一种用于将骨组织支架粘附至受试者的骨骼上的方法, 包括使该骨骼和组织与如权利要求 1 至 16 所述的凝聚层接触并且将该骨组织支架施加至所述骨骼和组织上。

22. 一种用于递送一种或多种生物活性剂的方法, 包括将如权利要求 1 至 16 所述的凝聚层施用至一位受试者上。

23. 一种用于修复受试者的角膜裂伤的方法, 包括将如权利要求 1 至 16 所述的凝聚层施加至该裂伤上。

24. 一种用于抑制受试者的血管中的血液流动的方法, 包括将如权利要求 1 至 16 所述的凝聚层引入至该血管中。

25. 一种用于抑制受试者的血管中的血液流动的方法, 包括将静电缔合的嵌段共聚物引入至该血管中, 其中该嵌段共聚物包含交替的聚阳离子嵌段以及聚阴离子嵌段。

26. 一种水基组合物, 包含如权利要求 1 至 16 所述的凝聚层。

27. 如权利要求 26 所述的组合物, 其中该组合物包含一种水基油漆。

28. 如权利要求 1 至 16 所述的凝聚层作为压敏粘合剂的用途。

29. 如权利要求 28 所述的用途, 其中该压敏粘合剂为一种医用粘合剂。

30. 一种由权利要求 1 至 16 所述的凝聚层生产的合成纤维。

31. 一种由权利要求 30 所述的纤维生产的织物。

由静电缔合的嵌段共聚物制备的粘合剂络合物凝聚层以及 其制造和使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2010 年 2 月 26 日提交的美国临时申请序列号 61/308,454 的优先权。该申请为了其所有传授内容的目的以其全文通过引用结合在此。

[0003] 致谢

[0004] 产生本发明的这项研究部分由国家科学基金会材料研究司资助,拨款号 0906014。在本发明中美国政府有某些权利。

背景技术

[0005] 对商业上重要的蚕丝进行了相对好的研究。该纤维的芯由重链丝心蛋白(H-丝心蛋白,250-500kDa)、轻链丝心蛋白(L-丝心蛋白,约 25kDa)以及糖蛋白 P25(约 30kDa)构成。这些蛋白在后部丝腺细胞中产生,以 6:6:1 的摩尔比组装成基本分泌单元,并从分泌颗粒释放到丝腺腔中。重链丝心蛋白和轻链丝心蛋白通过单个分子间二硫键而共价连接。在作为不溶解的长丝从唇吐丝器中抽出的过程中,浓缩的丝心蛋白悬浮液被粘性丝胶的异质混合物包覆,排列成微纤维,并在其通过丝腺的中部和前部区域时可能脱水。最终吐出的丝由来自成对丝腺的两个长丝构成,这两个长丝融合成包覆有粘的丝胶的单纤维。

[0006] 虽然对类似蛾和蚕的陆栖昆虫所产生的丝已进行了广泛的研究,但关于由石蛾产生的丝还所知甚少。石蛾(毛翅目)为一个大的水生昆虫种群。它们占据从寒冷的快速移动的山间溪流到静止的沼泽的淡水生境,在每种生境中通常有若干物种区分资源(dividing resource)。幼虫期在水下进食、成熟并化蛹。蛹“孵化”成短寿命的有翼成虫,成虫离开水以进行交配。石蛾成功渗透到不同水生生境主要是由于其幼虫使用水下丝来构建用于保护和食物采集的精细结构。

[0007] 所希望的是生产由石蛾产生的纤维的合成类似物,因为这些纤维将作为生物粘合剂并在工业应用中具有许多应用。

[0008] 概述

[0009] 在此描述了由静电缔合的嵌段共聚物合成粘合剂络合物凝聚层,其中这些嵌段共聚物包含交替的聚阳离子嵌段和聚阴离子嵌段。在此还描述了用于制造以及使用这些粘合剂络合物凝聚层的方法。本发明的优点将部分地在随后的说明中提出,并且部分地将从该说明中是明显的,或由以下所述的方面的实施了解到。以下所述优点将通过特别是在所附权利要求书中指出的要素以及组合而认识到并获得。应当理解,上述的总体说明以及以下详细说明均仅为示例性和解释性的而不是限制性的。

[0010] 附图简要说明

[0011] 结合到本说明书中并构成本说明书的一部分的附图示出了以下所述的若干方面。

[0012] 图 1 示出了用于制备本文的合成纤维的静电缔合的嵌段共聚物之间的静电相互作用。

[0013] 图 2 示出了:(A)部分地用实验室水族馆中的玻璃微珠构造的壳体中的

Brachycentrus echo 幼虫。(B-D) 在递增的放大率下的玻璃壳体的内部的 SEM(比例尺:分别为 500、250、100 微米)。(E) 通过 EDS 分析的在 F 中的区域的 SEM。蓝色 = 磷,紫色 = 硅(比例尺:10 微米)。

[0014] 图 3 示出了:(A) 丝蛋白与抗 pS 抗体的蛋白质印迹(western blot)。第 1 泳道:用 8M 尿素从剖开的丝腺中提取的石蛾(B. echo)丝,第 2 泳道:用 SDS 提取的石蛾丝,第 3 泳道:用 8M 尿素从剖开的丝腺中提取的蚕(B. mori)丝,第 4 泳道:用 SDS 提取的蚕丝。(B) B. echo 幼虫丝腺免疫染色对照。(C) 用抗 pS 抗体免疫染色的幼虫丝腺。头部(深色物体)仍然附接到成对的丝腺上。染色仅发生在完整丝腺的后部区域。(D) 抗 pS 对照。B. echo 丝纤维如 E 中一样处理而无抗 pS 一级抗体。(E) 在用抗 pS 抗体标记的玻璃微珠上的 B. echo 丝纤维。图 4 示出了由磷酸丝氨酸和 Ca^{2+} 形成的假想重复域结构的示意图。

[0015] 详细描述

[0016] 在披露并且描述本发明化合物、组合物、物品、装置和 / 或方法之前,应当理解,以下所述的方面并不限于具体化合物、合成方法或用途,因为这些当然可以改变。还应当理解,本文所用的术语仅为了描述具体方面的目的,而并非旨在进行限制。

[0017] 在本说明书和随后的权利要求书中,将参考一些术语,这些术语将定义为具有如下含义:

[0018] 必须指出,如在本说明书和所附权利要求书中使用的,单数形式“一个 / 一种(a/an)”和“该”包括复数指示物,除非内容以其它方式明确指定。因此,例如,提及“一种生物活性剂”包括两种或更多种这种试剂的混合物等。

[0019] “任选的”或“任选地”是指随后描述的事件或情况可能发生或不发生,并且该描述包括事件或情况发生的例子以及事件或情况不发生的例子。例如,短语“任选地取代的低级烷基”是指该低级烷基可为取代或未取代的,并且该描述包括未取代的低级烷基和其中存在取代的低级烷基两者。

[0020] 本文中范围可表述为从“约”一个具体值和 / 或至“约”另一个具体值。当表述这样一个范围时,另一个方面包括从该一个具体值和 / 或至该另一个具体值。类似地,当值表述为近似值时,通过使用先行词“约”,应当理解,该具体值形成另一个方面。还应当理解,每个范围的端值在与另一个端值相关和独立于另一个端值的情况下均为重要的。

[0021] 本说明书和最后的权利要求书中所提及的在组合物或物品中的具体元素或组分的重量份,表示该元素或组分与该重量份表述用于其中的组合物或物品中的任何其他元素或组分之间的重量关系。因此,在包含 2 重量份的组分 X 与 5 重量份的组分 Y 的化合物中, X 和 Y 以 2:5 的重量比存在,并且不管化合物中是否还包含其他组分都以该比率存在。

[0022] 组分的重量百分比,除非另外相反的指出,均是基于包含该组分的配制品或组合物的总重量。

[0023] 如本文所用的术语“烷基”为具有 1 至 25 个碳原子的支链或非支链的饱和烃基,例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、戊基、己基、庚基、辛基、癸基、十四烷基、十六烷基、二十烷基、二十四烷基等。长链烷基的例子包括(但不限于)棕榈酸基。“低级烷基”基团为包含一至六个碳原子的烷基基团。

[0024] 可用于本文的嵌段共聚物中的任何一种可为药学上可接受的盐。在一个方面,药学上可接受的盐通过用适当量的药学上可接受的碱处理游离酸来制备。代表性的药学上可

接受的碱为氢氧化铵、氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化锂、氢氧化钙、氢氧化镁、氢氧化亚铁、氢氧化锌、氢氧化铜、氢氧化铝、氢氧化铁、异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、乙醇胺、2-二甲基氨基乙醇、2-二乙基氨基乙醇、赖氨酸、精氨酸、组氨酸等。在一个方面，该反应在从约 0° C 至约 100° C 的温度下（例如在室温下）仅在水中或在水与惰性的可与水混溶的有机溶剂的组合中进行。在适用的某些方面，选择本文所述化合物与所用碱的摩尔比以提供任何具体盐所需的比率。为了制备例如游离酸起始材料的铵盐，可使用大约一当量的药学上可接受的碱处理该起始材料从而获得一种中性盐。

[0025] 在另一个方面，如果该嵌段共聚物具有一个碱性基团，则可用诸如 HCl、HBr 或 H₂SO₄ 之类的酸将其质子化以产生阳离子盐。在一个方面，这种嵌段共聚物与酸或碱的反应在从约 0° C 至约 100° C 的温度下（例如在室温下）仅在水中或在水与惰性的可与水混溶的有机溶剂的组合中进行。在适用的某些方面，选择本文的嵌段共聚物与所用碱的摩尔比以提供任何具体盐所需的比率。为了制备例如游离酸起始材料的铵盐，可使用大约一当量的药学上可接受的碱处理该起始材料从而获得一种中性盐。

[0026] 在此描述了由静电缔合的嵌段共聚物制备的粘合剂络合物凝聚层以及其应用。这些静电缔合的嵌段共聚物为由交替的聚阳离子嵌段和聚阴离子嵌段构成的水溶性聚合物。一种共聚物的聚阳离子嵌段静电吸引到存在于另一嵌段共聚物中的一个或多个聚阴离子嵌段上。这在图 1 中示出，其中共聚物 10 的聚阳离子嵌段 11 静电吸引到共聚物 12 中的聚阴离子嵌段 13 上。该例子提供了由石蛾产生的纤维的详细分析，该纤维显示了具有成组的带正电和带负电嵌段的类似模式。如下文所详述，当共聚物的净电荷接近中性时，这些嵌段共聚物在水中形成了一种不溶解的物质。本文所述的粘合剂络合物凝聚层的这种特性作为粘合剂，特别是医用粘合剂，具有多种应用。

[0027] 该粘合剂络合物凝聚层为具有动态结构的缔合型液体，在该动态结构中各个共聚物组分分散在整个相中。络合物凝聚层的流变学行为类似粘性颗粒分散体而不是粘弹性聚合物溶液。如上所述，粘合剂络合物凝聚层在施加至在水下的或为润湿的基底时在水中显示具有低界面张力。换言之讲，络合物凝聚层在界面上均匀铺展开而不成珠。

[0028] 这种嵌段共聚物总体上由具有交替的聚阳离子嵌段（即具有净正电荷的嵌段）以及聚阴离子嵌段（即具有净负电荷的嵌段）的聚合物主链构成。各个带正电荷或带负电荷的基团存在于各个嵌段中。这些基团可为从聚合物主链侧向伸出的和 / 或结合到该聚合物主链中。在某些方面，（例如生物医学应用），聚阳离子嵌段由一系列阳离子基团或通过调节 pH 可以容易地转化成阳离子基团的基团构成。在一个方面，聚阳离子嵌段为一种聚胺化合物。该聚胺的氨基可为支化的或为聚合物主链的一部分。该氨基可为伯氨基、仲氨基、叔氨基、或在选定 pH 下可被质子化而产生阳离子铵基的胍鎓基团。

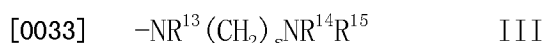
[0029] 在一个方面，该共聚物的聚阳离子嵌段可衍生自赖氨酸、组氨酸、精氨酸和 / 或咪唑的残基。任何阴离子抗衡离子可用于与该聚阳离子嵌段缔合。该抗衡离子应当与组合物的基本组分物理地和化学地相容，并且不另外不当地损害产物性能、稳定性或美观。此类抗衡离子的非限制性例子包括卤素离子（例如氯离子、氟离子、溴离子、碘离子）、硫酸根以及甲基硫酸根。

[0030] 在另一方面，聚阳离子嵌段可为一种可生物降解的聚胺。该可生物降解的聚胺可为一种合成聚合物或天然存在的聚合物。聚胺可降解的机制会根据所用的聚胺而不同。就

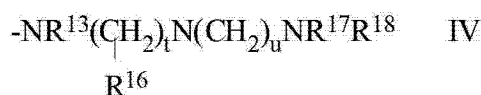
天然聚合物而言,它们为可生物降解的是因为存在可水解该聚合物并打破聚合物链的酶。例如,蛋白酶可水解类似明胶的天然蛋白。就合成可生物降解的聚胺而言,它们还具有化学不稳定的键。例如, β -氨基酯具有可水解的酯基。除了聚胺的性质之外,还可以改变诸如聚胺的分子量以及粘合剂的交联密度之类的其他考虑以改变生物降解性的程度。

[0031] 在一个方面,该可生物降解的聚胺包括一种多糖、蛋白质、肽或合成聚胺。在本文中可以使用具有一个或多个氨基的多糖。在一个方面,多糖为诸如壳聚糖的天然多糖。类似地,蛋白质可为一种合成或天然存在的化合物。在另一方面,可生物降解的聚胺为一种合成聚胺,例如聚(β -氨基酯)、聚酯胺、聚(二硫胺)、混合聚(酯和酰胺胺)以及肽交联的聚胺。

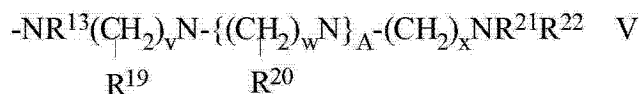
[0032] 在聚阳离子嵌段为一种合成聚合物的情况下,可以使用多种不同的聚合物;然而,在诸如生物医学应用的某些应用中,希望聚合物为一种生物相容性的并且对细胞和组织无毒。在一个方面,这种可生物降解的聚胺可为一种胺改性的天然聚合物。例如,胺改性的天然聚合物可为用一个或多个烷基氨基、杂芳基、或被一个或多个氨基取代的芳族基团改性的明胶。烷基氨基的例子在式 III-V 中示出。



[0034]



[0035]



[0036] 其中 R^{13} - R^{22} 独立地为氢、烷基或含氮的取代基。

[0037] s 、 t 、 u 、 v 、 w 和 x 为从 1 至 10 的整数;并且

[0038] A 是从 1 至 50 的整数,

[0039] 其中该烷基氨基共价地连接至天然聚合物上。在一个方面,如果该天然聚合物具有一个羧基(例如酸或酯),则该羧基可与聚胺化合物反应以生成酰胺键并将烷基氨基结合到该聚合物中。因此,参见式 III-V,氨基 NR^{13} 共价连接至该天然聚合物的羰基上。

[0040] 如式 III-V 中所示,氨基数可不同。在一个方面,烷基氨基为 $-\text{NHCH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、

[0041] $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、

[0042] $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、

[0043] $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、

[0044] $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 或

[0045] $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_d\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, 其中 d 为从 0 至 50。

[0046] 在一个方面,当该聚阳离子嵌段为一种胺改性的天然聚合物时,该胺改性的天然聚合物可包含具有一个或多个直接或间接附接至芳族基团的氨基上的芳基。作为替代方案,该氨基可结合到该芳族环中。例如,该芳族氨基为吡咯、异吡咯、吡唑、咪唑、三唑或呋喃。在另一方面,该芳族氨基包括存在于组氨酸中的异咪唑基团。在另一方面,这种可生物

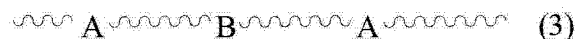
降解的聚胺可为用乙二胺改性的明胶。

[0047] 在一方面,该聚阳离子嵌段包括具有一个或多个侧氨基的聚丙烯酸酯。例如,该聚阳离子嵌段的主链可为来源于丙烯酸酯或甲基丙烯酸酯单体的聚合作的均聚物或共聚物。

[0048] 在其他方面,聚阳离子嵌段自身可为一种共聚物(即无规或嵌段),其中该共聚物的链段或部分具有阳离子基团,该阳离子基团取决于用于产生共聚物的单体的选择。在这方面,存在于聚阳离子嵌段中的带正电荷基团数可从百分之几变化至最多 100%(例如在 10% 与 50% 之间)。在这方面,聚阳离子嵌段可为中性单体(即不带电基团)和具有带正电荷基团的单体之间的聚合产物,其中每种单体的量将决定该聚阳离子嵌段的总体正电荷。因此,有可能在静电缔合的嵌段共聚物中产生不同的聚阳离子嵌段。

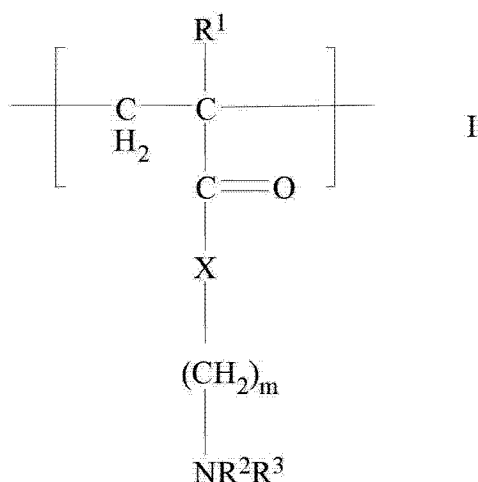
[0049] 下式 1-3 示出了关于聚阳离子嵌段的不同实施方案。在式 1 中,将相同的聚阳离子嵌段(A) 结合到嵌段共聚物中。在式 2 中,在每个聚阳离子嵌段中存在两种不同的聚阳离子嵌段(A 和 B)。在式 2 中的聚阳离子嵌段 AB 的情况下,具有不同的阳离子基团的单体可用于产生聚阳离子嵌段 AB。因此,聚阳离子嵌段自身可为一种嵌段共聚物。这在式 2 中示出,其中 A 表示聚阳离子嵌段中的第一嵌段,B 表示第二嵌段。在式 3 中,存在两种不同的聚阳离子嵌段,其中每种嵌段(A 和 B) 均为相同单体的聚合产物。

[0050]



[0051] 在一个方面,聚阳离子嵌段具有至少一个式 I 所示的片段。

[0052]



[0053] 其中 R^1 、 R^2 和 R^3 独立地为氢、烷基或胍鎓基团 $[-\text{C}=\text{NH}(\text{NH}_2)]$, X 为氧或 NR^5 , 其中 R^5 为氢或一个烷基, 并且 m 为从 1 至 10, 或其药学上可接受的盐。在另一方面, R^1 、 R^2 和 R^3 为甲基, 并且 m 为 2。在另一方面, R^2 为氢并且 R^3 为胍鎓基团。参见式 I, 该聚阳离子嵌段的聚合物主链由具有侧 $-\text{C}(\text{O})\text{X}(\text{CH}_2)_m\text{NR}^2\text{R}^3$ 单元的 CH_2-CR^1 单元构成。在这方面, 具有式 I 的片段为一个丙烯酸酯或甲基丙烯酸酯的残基。

[0054] 类似于聚阳离子嵌段,本文所述的共聚物中的聚阴离子嵌段可为一种合成聚合物。该聚阴离子嵌段通常为具有阴离子基团或通过调节 pH 可以容易地转化成阴离子基团的基团的任何聚合物。可转化成阴离子基团的基团的例子包括(但不限于)羧酸、磺酸、膦酸、硼化物(boronate)、硫酸、硼酸(borate)或磷酸基团(phosphate)。如果满足以上所述的考虑因素,任何阳离子抗衡离子可用于与阴离子聚合物缔合。

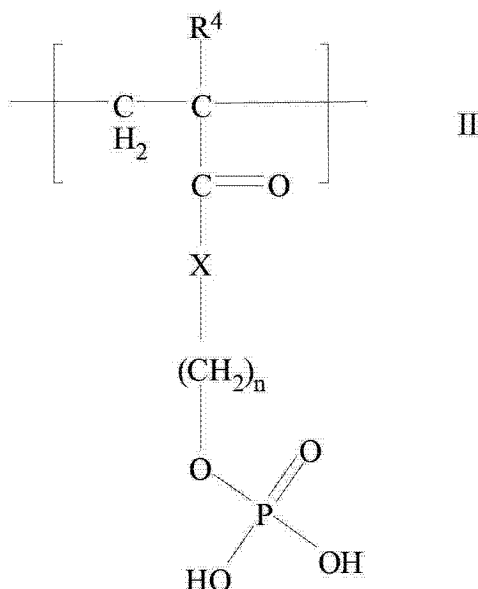
[0055] 该聚阳离子嵌段自身可为一种共聚物(即无规或嵌段),其中该共聚物的链段或部分具有阳离子基团,该阳离子基团取决于用于产生该共聚物的单体的选择。在这方面,存在于该聚阴离子嵌段中的带负电荷基团的数目可从百分之几变化至最多 100%(例如在 10% 与 50% 之间)。在这方面,该聚阴离子嵌段可为一种中性单体(即不带电的基团)以及一种具有带负电荷基团的单体之间的聚合产物,其中每种单体的量将决定聚阴离子嵌段的总体负电荷。因此,有可能在静电缔合的嵌段共聚物中产生不同的聚阴离子嵌段。

[0056] 在一个方面,该聚阴离子嵌段为多磷酸根。在另一方面,该聚阴离子为具有从 10 摩尔 % 至 90 摩尔 % 磷酸基的多磷酸化合物(即无规共聚物)。例如,该多磷酸可为具有附接至聚阴离子嵌段的聚合物主链上的侧磷酸基和 / 或存在于聚阴离子嵌段的聚合物主链(例如磷酸二酯主链)中的磷酸基的聚合物。在一个方面,聚磷酸可通过用化学方法或酶法使蛋白质(例如天然富丝氨酸蛋白质)磷酸化来制备。

[0057] 在一个方面,该聚阴离子嵌段包括具有一个或多个侧磷酸基的聚丙烯酸酯。例如,聚阴离子嵌段的主链可为来源于一种包括(但不限于)丙烯酸酯以及甲基丙烯酸酯的丙烯酸酯单体的聚合作的均聚物或共聚物,类似于以上针对聚阳离子嵌段在式 1-3 中所示出的,这些聚阳离子嵌段可由相同或不同嵌段(A 和 B)构成。

[0058] 在一个方面,该聚阴离子嵌段为一种多磷酸。在另一方面,该聚阴离子嵌段为具有至少一个具有式 II 的片段的聚合物

[0059]



[0060] 其中 R^4 为氢或一个烷基, X 为氧或 NR^5 , 其中 R^5 为氢或一个烷基, 并且 n 为从 1 至 10 ; 或其药学上可接受的盐。在另一方面, 其中 R^4 为甲基并且 n 可为 2、3 或 4。类似于式 VII, 式 II 所示的聚合物主链由丙烯酸酯或甲基丙烯酸酯的残基构成。式 II 的剩余部分为侧磷酸基。

[0061] 在某些方面,聚阳离子嵌段和聚阴离子嵌段包含如下基团,这些基团在固化时允许不同共聚物之间交联从而产生新共价键以及合成纤维。交联的机制可根据交联基团的选择而不同。在一个方面,交联基团可为亲电试剂以及亲核试剂。例如,该聚阴离子嵌段可具有一个或多个亲电基团,而该聚阳离子嵌段可具有一个或多个能够与亲电基团反应以产生新共价键的亲核基团。亲电基团的例子包括(但不限于)酸酐基团、酯、酮、内酰胺(例如马来酰亚胺和琥珀酰亚胺)、内酯、环氧基团、异氰酸酯基团以及醛。亲核基团的例子如下示出。

[0062] 在另一方面,这些聚阳离子嵌段和聚阴离子嵌段各自具有可光化交联的基团。如本文所用,关于固化或聚合的“可光化交联的基团”是指聚阳离子和聚阴离子之间的交联通过诸如 UV 辐照、可见光辐照、电离辐射

[0063] (例如伽马射线或 X 射线辐照)、微波辐照等的光化辐照进行。光化固化方法是本领域技术人员所熟知的。可光化交联的基团可为一种不饱和的有机基团,例如烯属基团。可用于本文的烯属基团的例子包括(但不限于)一种丙烯酸酯基团、甲基丙烯酸酯基团、丙烯酰胺基团、甲基丙烯酰胺基团、烯丙基、乙烯基、乙烯基酯基团或苯乙烯基团。

[0064] 在其他方面,存在于该聚阳离子嵌段和 / 或聚阴离子嵌段上的交联剂可与过渡金属离子形成配位络合物。例如,可将过渡金属离子添加至该共聚物中,其中该共聚物包含能够与过渡金属离子配位的交联剂。配位和解离的速率可通过选择交联剂、过渡金属离子和 pH 来控制。在本文中可以使用诸如铁、铜、钒、锌和镍之类的过渡金属离子。

[0065] 在一个方面,聚阳离子嵌段可为具有一个或多个侧氨基(例如咪唑基)的聚丙烯酸酯。在聚阴离子嵌段的情况下,在一个方面,可将聚磷酸改性成包含可光化交联的基团。可使用活化酯实现连续的共价交联,该活化酯包括 N- 羟基琥珀酰亚胺酯、咪唑基氨基甲酸酯衍生物以及其他。在某些方面,硫吡啶衍生物、马来酰亚胺以及其他可以作为可交联的部分包含到一种多磷酸的共聚物上以形成具有合适的机械性能的粘合剂。例如,该聚阳离子嵌段包含至少一个具有上述式 I 的片段,其中 R^2 或 R^3 中的至少一者为一个可光化交联的基团。

[0066] 在某些方面,可以通过控制温度改变使该由交替的聚阳离子嵌段以及聚阴离子嵌段构成的嵌段共聚物与彼此交联,从而产生粘合剂络合物凝聚层。在一个方面,使用热致可逆狄尔斯-阿尔德反应可用于交联共聚物。在这方面,一种亲二烯物与一种共轭二烯(例如呋喃和马来酰亚胺基团)之间的环偶联可通过提高温度来进行而不需要任何化学催化剂或引发剂。此外,水的存在可加快该反应速率。该亲二烯物和共轭二烯可存在于该聚阳离子嵌段和 / 或聚阴离子嵌段上。

[0067] 在另一方面,这种可交联的基团包括在存在氧化剂的情况下能够发生氧化的二羟基取代的芳族基团。在一个方面,该二羟基取代的芳族基团为二羟基苯酚或卤化二羟基苯酚基团,例如像 DOPA 和儿茶酚(3,4 二羟基苯酚)。例如,在 DOPA 的情况下,它可被氧化成多巴醌。多巴醌为能够与相邻 DOPA 基团或另一亲核基团反应的亲电基团。在诸如氧的氧化剂或其他添加剂存在的情况下,包括(但不限于)过氧化物、高碘酸盐(如 NaIO_4)、过硫酸盐、高锰酸盐、重铬酸盐、过渡金属氧化剂(例如 Fe^{+3} 化合物、四氧化钨)或酶(例如儿茶酚氧化酶),该二羟基取代的芳族基团可被氧化。在另一方面,交联可经由光活化的通过叠氮基的交联而在聚阳离子和聚阴离子之间进行。再次,在这种类型的交联过程中形成了新的共价键。

[0068] 在某些方面,氧化剂可被稳定化。例如,不是氧化还原活性的与高碘酸盐形成配位络合物的化合物可导致稳定化的氧化剂。换句话讲,高碘酸盐以非氧化形式被稳定,并且当在络合物中时不能氧化该二羟基取代的芳族基团。该配位络合物是可逆的,并且虽然具有非常高的稳定常数,但仍存在少量的未配合的高碘酸盐。二羟基取代的芳族基团与所述化合物竞争该少量的游离高碘酸盐。随着游离高碘酸盐被氧化,更多的游离高碘酸盐从该可逆络合物中释放。在一个方面,在六元环上具有顺,顺-1,2,3- 三醇基团的糖可形成竞争性高碘酸盐络合物。形成稳定高碘酸盐络合物的具体化合物的例子为 1,2-O- 异亚丙基- α -D- 呋喃葡萄糖。稳定化的氧化剂可以控制交联速率。不希望受理论的束缚,稳定化的氧化剂降低了氧化速率,使得有时间来添加氧化剂并在纤维(即粘合剂)不可逆地硬化之前定位基底。

[0069] 被氧化的交联剂的稳定性可以不同。例如,本文所述的含膦酰基的聚阴离子嵌段可以包含可氧化的交联剂,这些交联剂在溶液中是稳定的并且不会与它们自己交联。这允许存在于聚阳离子嵌段上的亲核基团与被氧化的交联剂反应。这是一种所希望的特性,它允许形成分子间键并最终形成强效粘合剂。可用的亲核基团的例子包括(但不限于)羟基、硫醇和含氮基团,例如取代或未取代的氨基以及咪唑基。例如,赖氨酸、组氨酸和 / 或半胱氨酸或化学类似物的残基可以结合到该聚阳离子嵌段中并引入亲核基团。

[0070] 凝聚层可任选地包含一个或多个多价阳离子(即具有+2 或更大的电荷的阳离子)。在一个方面,该多价阳离子可为由一种或多种碱土金属构成的二价阳离子。例如,该二价阳离子可为一种 Ca^{+2} 和 Mg^{+2} 的混合物。在其他方面,具有+2 或更大的电荷的过渡金属离子可用作多价阳离子。除了 pH 之外,多价阳离子的浓度也可以决定水中纤维形成的速率和程度。用于本文的多价阳离子的量可以改变。在一个方面,该量是基于分别存在于该聚阴离子嵌段和聚阳离子嵌段中的阴离子基团和阳离子基团的数目。

[0071] 本文所述的共聚物可以使用本领域已知的技术来制备。例如,可逆加成断裂链转移(RAFT)聚合允许使用丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯单体精确合成嵌段共聚物。在 RAFT 方法中,如常规自由基聚合中一样使用热、光化学或化学氧化还原引发剂来产生初级自由基。RAFT 聚合在存在诸如 $(\text{S}=\text{C}(\text{Z})-\text{S}-\text{R})$ 形式的双硫酯之类的链转移剂(CTA)的情况下进行,该链转移剂比具有自由基的单体具有更高的反应性。CTA 可逆地加成到初级引发剂自由基从而形成一种中间自由基物质,该中间自由基物质断裂成一种新 CTA (大分子 CTA) 一种一种再引发聚合的 CTA 衍生的自由基 ($\text{R}\cdot$)。随着反应进行,建立起一种稳态,在稳态中 CTA 迅速地并且可逆地在中止聚合物链和增长聚合物链之间转移,其效果是防止自由基二聚化和歧化反应,该反应过早终止聚合物链,从而产生具有宽多分散性的聚合物。在成功的活性聚合中,聚合物链被迅速地引发,然后以恒定速率相对慢地生长,从而导致聚合物质量的线性增加并产生具有窄多分散性的聚合物。

[0072] 在一个方面,具有交替的聚阳离子嵌段和聚阴离子嵌段的共聚物可以通过 RAFT 聚合来制备,方式是在线性生长期过程中将共聚单体(例如具有阳离子基团的丙烯酸酯)加入到与第二共聚单体(例如具有阴离子基团的丙烯酸酯)的聚合反应中。考虑到相对反应性,可将每种共聚单体以程序化的速率加入,从而以限定的方式改变沿链的组成。例如,一种共聚单体的恒定加入速率将导致梯度共聚物。因此,通过在链延长过程中的不同时间改变共聚单体的比率,可以控制共聚物中聚阳离子嵌段和聚阴离子嵌段的大小和分布。

[0073] 在另一方面,对合成嵌段之后产生的大分子 CTA 复合物进行分离,然后使用一种不同的单体重新引发聚合物增长。例如,可将磷酸酯嵌段(聚阴离子嵌段 Y)进行 RAFT 聚合,分离,然后使用含胺单体(聚阳离子嵌段 Z)延长以形成 YZ 两嵌段共聚物。因此,可通过重复该过程来形成 YZ 共聚物。为了将蛋白质、肽或其他天然聚合物作为嵌段掺入到嵌段共聚物中,可以在蛋白质、肽或天然聚合物上合成 RAFT 试剂或将 RAFT 试剂偶联到蛋白质、肽或天然聚合物。所得构造可用作大分子 CTA 以引发带电荷嵌段聚合到蛋白质或肽或其他天然聚合物上。

[0074] 这种粘合剂络合物凝聚层可以通过在受控的 pH 和温度下在水中混合一种或多种静电缔合的嵌段共聚物来制备。在这一点上,该凝聚层可以容易地按照需要进行处理和施用。通过改变诸如 pH 和温度之类的条件,有可能将该凝聚层转化成水不溶性材料。例如,可使用注射器泵在受控的温度和 pH 下将凝聚层通过套管挤出到水中以制备纤维或长丝。在这方面,模拟了石蚕丝的类似物的湿法纺丝(参见实例),其中粘合剂络合物凝聚层可以形成水不溶性纤维。不希望受理论的束缚,存在于共聚物中的具有相反电荷的交替嵌段的交错静电缔合可如络合物凝聚层一样驱动液-液相分离。当带相反电荷的聚电解质在水溶液中通过相互的电荷中和作用而缔合时,发生聚合凝聚以及纤维的形成。当该溶液为近净电荷中性时,一个致密的浓缩聚合物水相与聚合物耗尽水相分离,该聚合物耗尽水相部分地由小抗衡离子以及水的释放导致的熵增驱动。在后续纤维挤出过程的步骤中,应力引起的延长和凝聚的共聚物相的重组会导致纳米原纤形成,额外的电荷中和以及纤维在挤出到水中的过程中的脱水。然后纤维可被纺成二维织物。

[0075] 本文所述的粘合剂络合物凝聚层的性质使得它们在润湿条件下为理想的粘合剂。例如,该粘合剂络合物凝聚层可用作压敏粘合剂。例如,可将该粘合剂络合物凝聚层作为涂层直接施加到一个背衬材料(例如塑料)的表面上,该背衬材料随后可粘附至一个润湿或潮湿的基底上。此时,粘合剂络合物凝聚层作用类似一种“润湿创可贴”。作为替代方案,可将凝聚层作为纤维挤出在该背衬上以制备压敏粘合剂。因此,在这些方面,粘合剂络合物凝聚层和由此制备的纤维作为医用粘合剂具有许多应用。

[0076] 在一个方面,该粘合剂络合物凝聚层和由此制备的纤维可用于将支架固定至骨骼和其他组织上,例如软骨、韧带、肌腱、软组织、器官和这些材料的合成衍生物。这些粘合剂络合物凝聚层以及纤维可用于将生物支架定位在一位受试者中。在某些方面,该支架可包含一种或多种有利于骨骼和组织生长或修复的药物。在其他方面,该支架可包含防止感染的药物,例如抗生素。例如,可用药物涂覆支架,或作为另外一种选择,可将药物掺入在支架中,使得药物随着时间推移从支架中洗脱。

[0077] 在一个方面,该凝聚层包含一种收敛剂以减少或停止外科手术部位的流血。因此,除了在外科手术过程中帮助密封一个或多个组织切口,凝聚层还可以减少或防止出血。收敛剂的例子,铝、铁、锌、锰、铋等的无机盐以及包含这些金属的其他盐,例如高锰酸盐。合适的止血收敛剂的非限制性例子包括硫酸高铁、碱式硫酸铁、三氯化铁、氯化锌、氯化铝、硫酸铝、氢氧化铝以及乙酸铝。还可以使用诸如硫酸钾铝和硫酸铵铝之类的矾。此外,单宁酸或其他相关的多酚类化合物可用作收敛剂。在某些方面,收敛剂可有利于固化凝聚层并停止流血。例如,硫酸高铁可发挥这种作用。

[0078] 在其他方面,这种粘合剂络合物凝聚层和由此生产的纤维可将一个金属基底粘附

至骨骼上。例如,由氧化钛、不锈钢或其他金属制成的植入物常常用于修复碎裂的骨骼。可在将基底粘附至骨骼上之前将这些粘合剂络合物凝聚层和由此生产的纤维施加至金属基底、骨骼、或这两者上。在某些方面,存在于聚阳离子嵌段或聚阴离子嵌段上的交联基团可与氧化钛形成一个强效键。例如,已有显示 DOPA 可强力粘结至润湿氧化钛表面上(Lee 等人,PNAS 103:12999(2006))。因此,除了粘结骨骼碎片之外,粘合剂络合物凝聚层和由此生产的纤维可有利于将金属基底粘结至骨骼上,这可有利于骨修复和恢复。除了金属基底之外,可将粘合剂络合物凝聚层和由此生产的纤维施加至其他基底上,例如背衬材料、塑料薄膜或箔片。

[0079] 还设想,这些粘合剂络合物凝聚层和由此生产的纤维可封装一种或多种生物活性剂。释放速率可通过选择用于制备复合物的材料以及生物活性剂的电荷(如果该试剂为盐的话)来控制。

[0080] 例如,当粘合剂络合物凝聚层通过温度和 / 或 pH 的改变而转化成水不溶性材料(即合成纤维)时,可将粘合剂络合物凝聚层施用至一位受试者上并在原位产生不溶性材料。因此,在这方面,水不溶性材料可用作局部控制的药物释放储存处。有可能同时固定组织和骨骼以及递送生物活性剂从而提供更大的患者舒适度、加速骨骼愈合和 / 或防止感染。

[0081] 粘合剂络合物凝聚层和纤维可用于多种其他外科手术程序。例如,它们可用于修复由创伤或由外科手术程序本身所导致的裂伤。在一个方面,这些粘合剂络合物凝聚层和纤维可用于修复受试者的角膜裂伤。在其他方面,这些粘合剂络合物凝聚层和纤维可用于抑制受试者的血管中的血液流动。在一个方面,将粘合剂络合物凝聚层注射到血管中,然后将凝聚层转化成水不溶性材料,该水不溶性材料可以部分地或完全地阻塞血管。这种方法具有许多应用,包括止血或生成人工栓塞以阻止血液流至肿瘤或动脉瘤。

[0082] 除了生物医学应用之外,本文所述的粘合剂络合物凝聚层和纤维还在工业应用中具有许多应用。总体而言,可将粘合剂络合物凝聚层和纤维添加至任何组合物中,该组合物被施加至一个润湿或潮湿的基底上。如上所述,粘合剂络合物凝聚层和纤维提高了该组合物到润湿或潮湿基底的附着。例如,可将该粘合剂络合物凝聚层和纤维添加至类似油漆的水基组合物中。在这方面,这些粘合剂络合物凝聚层和纤维增强了油漆与基底之间的粘结。

[0083] 实例

[0084] 提出以下实例来为本领域的普通技术人员提供如何制备并且评价本文所述并且提出权利要求的化合物、组合物和方法的完整披露内容和说明,并且旨在仅为示例性的,并非旨在限制发明人视为其发明的内容的范围。已经做出努力来确保关于数字(例如量、温度等)的精确性,但一些误差和偏差也应考虑。除非另外指出,否则份数为重量份,温度为以 $^{\circ}\text{C}$ 计或为环境温度,并且压力为大气压或接近大气压。存在可用于优化由所述方法获得的产物纯度和产率的以下反应条件的许多变型形式和组合,例如组分浓度、所希望的溶剂、溶剂混合物、温度、压力和其他反应范围和条件。仅要求合理的常规实验来优化这些工艺条件。

[0085] 材料和方法

[0086] 样品制备。从美国犹他州的 Provo 河下游收集 *Brachycentrus echo* 石蛾幼虫。将具有天然壳体的幼虫保存在具有 12°C 循环蒸馏水的水族馆中。使用精细镊子将天然石壳

部分或完全地移除。然后将幼虫放置在干净玻璃小瓶中的预洗的 0.5mm 玻璃微珠床上。在 1-2 天之后,从幼虫取走构建在天然壳体末端上的或完全使用玻璃微珠重建的玻璃壳体,幼虫将重新开始重建其壳体。将收获的玻璃壳体在 -80°C 下冷冻,冻干,然后安装在导电性碳带上以用于 SEM 和 EDS 分析(FEI 公司,Quanta 600FEG)。

[0087] 氨基酸和元素分析。对来自重新构造的壳体的玻璃微珠仔细检查污染砂石或矿物。在冻干之后,将从相同小瓶收集的经称重的含丝和不含丝的微珠样品在 110°C 下于真空中在 500ml 含有 0.1% 苯酚的 5.7N HCl 中煮解 24 小时。将等分试样的水解产物进行氨基酸分析(Beckman 6300)并且将来自相同水解产物的第二等分试样在用 40% 硝酸稀释之后通过 ICP-OES (PerkinElmer, Optima 3100XL)进行金属分析。通过与使用商业混合金属标准品(PerkinElmer)制备的标准曲线比较来对元素定量。

[0088] 凝胶电泳和蛋白质印迹分析。将剖开的丝腺转移到包含 4°C DI 水的干净离心管中。丝蛋白在 20 分钟内从腺体中释放出来。为了收集可溶性丝蛋白部分,将样品在室温下以 13,000rpm 旋转 5 分钟。将上清转移到一个新管中用于蛋白质浓度确定(Bio-Rad)。将四十 mg 的可溶性丝蛋白在 15% 凝胶上进行 SDS-PAGE。对于蛋白质印迹分析,将分离的蛋白质转移到 PVDF 膜上,然后在室温下将 PVDF 膜用磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中的 2mg/mL BSA 封闭至少 2 小时。在 4°C 下使用抗磷酸丝氨酸鼠抗体(Abcam, #PSR45, 1:1000)对印迹探测过夜。在室温下与辣根过氧化物酶羊抗鼠 HRP (1:5000)二级抗体(Jackson Immuno Research, #115-035-166)孵育 1 小时之后,使用 ECL (Pierce, #32109)显影信号。

[0089] 丝腺免疫染色。用在 DI 水中的 7% 乙醇杀死幼虫,然后移除成对丝腺且仍附接到头部上。在室温下用在 PBS 中的 4% 多聚甲醛将腺体固定 30 分钟,然后在室温下用蛋白酶酶解缓冲液(在 PBS 中的 2ug/mL 蛋白酶 K, 1% SDS, 0.1% Triton X-100)酶解 15 分钟。在室温下将丝腺用 PBS 中的 2mg/mL BSA 封闭至少 2 小时,然后在室温下与抗 pS 抗体(Abcam, #PSR45, 1:1000)孵育 1 小时。在室温下将一级抗体用羊抗鼠碱性磷酸酶偶联二抗(Abcam, #6729, 1:5000)再标记 1 小时。将蓝色信号用 AP 缓冲液(150mM NaCl, 100mM Tris(pH 8.8), 5mM MgCl_2 和 0.05% Tween-20)中的 NBT/BCIP (3:1 摩尔比)进行显影直到蓝色出现。然后将腺体用系列乙醇稀释液(100%、70%、50% 和 TBS)脱水以移除非特异性染色,随后进行系列水化以用于照片成像。

[0090] 串联质谱。在 25mM 碳酸氢铵中从剖开的 *B. echo* 丝腺分离丝蛋白。将丝蛋白在 100°C 下热变性,在冰上迅速冷却以限制复性并在 37°C 下以约 1:25 的酶与丝蛋白的比率用胰蛋白酶酶解 2 小时。根据制造商关于磷酸肽富集の説明,使用 SwellGel Gallium Disc (Pierce) 通过固定化金属亲和色谱(IMAC)富集来自丝蛋白酶解产物的磷酸肽。使用 LTQ-FT 组合质谱仪(美国热电公司)通过 LC/MS/MS 分析 IMAC 富集的肽。使用 C18 纳米孔(nanobore)柱和纳米电喷雾离子化(美国热电公司)通过纳米 LC (Eksigent, Inc.)将肽引入到质谱仪中。对肽使用含 0.1% 甲酸的 5%-60% 乙腈的 50 分钟线性梯度进行洗脱。通过 FT-ICR 确定一级肽分子量并且通过 LTQ-FT 组合质谱仪的线性离子阱中的碰撞诱导解离来确定肽序列。使用 Mascot 搜索引擎(版本 2.2.1, Matrix Science)通过 MS/MS 搜索来鉴定肽。搜索中包括 S、T 和 Y 上的可能的磷酸化。Mascot 阈值为一级质量误差 $<3\text{ppm}$, MS/MS 离子得分 >20 , 以及预期值 <1 。

[0091] 结果

[0092] 从犹他州中的 Provo 河下游收集西部山区称为“石辊”的石壳制造者的当地物种 (*Brachycentrus echo*), 以进一步研究水下丝的分子适应性。当部分或全部地取走石壳并给幼虫提供玻璃微珠时, 它们重建玻璃壳(图 2A)。通过扫描电镜(SEM)检查玻璃壳揭示: 这些微珠已在管的内侧上与丝纤维“缝”在一起(图 2B 和 C), 这看起来为成对扁平的带状物, 在带状物之间具有清晰的接缝(图 2C 和 D)。高分辨率的 SEM 图像揭示了纤维中的纤维亚结构(图 2D)。通过能量色散 X 射线光谱(EDS)发现浓缩的磷与丝纤维同在(图 2E 和 F)。在蚕丝中未检测到磷。

[0093] 蛋白质印迹上的与从石蛾丝腺分离的蛋白一起的抗磷酸丝氨酸抗体(α -pS)确认了磷酸化丝氨酸(pS)形式的磷的存在。在 MW>200kDa 处(与 H 丝心蛋白一致)、约 50kDa 处、约 30kDa 处(预期为 L 丝心蛋白的近似 MW)、以及 17kDa 和以下处(图 3A, 泳道 1、2)检测到磷酸化带。带模式取决于提取方法; 十二烷基硫酸钠(SDS)使石蛾 H 丝心蛋白增溶, 而 8M 尿素不会。使用尿素或 SDS 从 *B. mori* 的丝腺提取并使用 α -pS 探测的蛋白质不具有与 H 丝心蛋白对应的带, 但在约 30kDa 和 17kDa 以下处(图 3A, 泳道 3、4)具有微弱的免疫反应性带。通过使用抗 pS 对分离的石蛾幼虫丝腺免疫染色而获得对磷酸化丝蛋白的进一步确认。成对腺体的后部区域针对 pS 染色(图 3C)。从壳体重新获得的玻璃微珠上的丝纤维也被抗 pS 抗体强烈标记(图 3E)。

[0094] 将从剖开的丝腺分离的石蛾丝蛋白热变性, 迅速冷却, 并用胰蛋白酶酶解。通过固定化金属亲和色谱(IMAC)分离针对磷酸肽富集的胰蛋白酶酶解肽并通过串联质谱进行分析。使用 Mascot 搜索引擎对实验性肽质量与由翻译的石蛾丝心蛋白序列计算的肽质量进行比较, 石蛾丝心蛋白序列存储在 GenBank 中。Genbank 包含 *H. augustipennis* (*H. augustipennis*)、*L. decipiens* 和 *R. obliterata* 的部分 H 丝心蛋白序列和所有这三个石蛾种的完整 L 丝心蛋白序列。鉴定了十八个独特的肽, 其中的 16 个在大多数情况下为多磷酸化的(表 1)。石蛾 H 丝心蛋白的中部区域为已指定为字母 A-F 的独特重复的重复组。所有四个种共用示于表 1 中的保守 D 重复。鉴定的肽一起横跨整个 D 重复, 该 D 重复从 *L. decipiens* H 丝心蛋白序列随机取出。在 *B. echo* 丝中鉴定的肽具有与 *L. decipiens* H 丝心蛋白相同的序列表明这些种为近缘的。两个 (SX)₄ 基序在所有四个种中的位置的保守表明 *B. echo* 磷酸化模式可能也是保守的。位于具有中心脯氨酸的疏水区域两侧的两个磷酸化嵌段的更大重复基序一定是石蛾丝的重要结构元件。*L. decipiens* F 重复在 15-18 个残余胰蛋白酶酶解肽中包含 (SX)₃₋₅ 基序, 但对应的肽或磷酸肽在 *B. echo* 质量分析中未鉴定到。这些肽在 *B. echo* 中可能不是完全保守的, 或这一个或多个位点可能是胰蛋白酶不可触及的。同样, 未鉴定到来自 L 丝心蛋白的磷蛋白。

[0095] 将从实验室水族馆中的 *E. echo* 构造的玻璃壳回收的微珠冻干, 并在用 50% HCl 水解之后进行氨基酸分析。酸解的丝纤维的氨基酸组成与由 GenBank 中的部分 H 丝心蛋白序列推导的其他三个石蛾种的氨基酸组成类似。丙氨酸含量更高, 但这可能是由于拿整个丝纤维与仅 H 丝心蛋白进行比较。例如, *L. decipiens* L 丝心蛋白含有 14 摩尔 % 的丙氨酸。*B. echo* L 丝心蛋白中的类似摩尔 % 丙氨酸和 1:1 比率的 H 丝心蛋白比 L 丝心蛋白将导致组成与其他石蛾一致。为了估计磷酸与丝氨酸残基的比率, 还通过电感耦合等离子体光发射光谱分析了来自两份酸水解产物的等分试样。在用未胶合的微珠进行的背景测量中不存在可测量的丝氨酸或 P, 这些未胶合的微珠在与玻璃壳相同的时间从水族馆的相同区域收集。

石蛾丝在水解产物中包含 114nmol P, 对应于 166nmol 丝氨酸, 并在第二份水解产物中包含 164nmol P, 对应于 256nmol 丝氨酸, 比率分别为 0.69 和 0.64。考虑到通过质谱发现的磷酸化丝氨酸的比率, 这些估计似乎是合理的。丝蛋白中的第二最丰富的元素是 Ca^{2+} , 其与 P 的比率为 0.5 和 0.7 (表 3)。

[0096] 讨论:

[0097] B. echo 丝蛋白包含相对于正电荷两倍至三倍多余的负电荷(假定 60% 的丝氨酸为磷酸化的), 多余的负电荷必须由小抗衡离子来平衡(表 2 和 3)。观察到的丝纤维 Ca^{2+} 与磷酸侧链的缔合可造成 $(\text{pSX})_n$ 基序分子内和 / 或分子间交联成类似于蜘蛛和蚕丝的 β 结晶区的刚性域(图 4)。实际上, 若干石蛾丝的 X 射线衍射研究提供了重复三层有序结构的证据(尽管不存在丙氨酸)。 Ca^{2+} 交联的磷酸丝氨酸域的形成也将有助于显著亲水的丝蛋白在浸入水中时脱水, 因为聚磷酸和 Ca^{2+} 的溶解度在中性 pH 下较低。这种作用将类似于在干丝中通过广泛形成 β 片层的水排除。

[0098] 在一个更长的长度尺度上, 交替的亲水嵌段以及疏水嵌段的相分离是蜘蛛和蚕两者的丝纤维组装模型的主要方面。它们的两亲性结构首先可导致后部丝腺中的液晶或胶束形成, 然后随着在纤维挤出期间在应力引起的丝蛋白延长的过程中交错的两亲性嵌段横向缔合, 形成了原纤。水生石蛾可使用具有广泛类似之处但有关键差异的机制。不是交替亲水嵌段和疏水嵌段, 具有相反电荷的交替嵌段的交错静电缔合可作为络合物凝聚层驱动液-液相分离。在后续纤维形成过程的步骤中, 应力引起的延长和凝聚的蛋白相的重组会导致纳米原纤形成, 额外的电荷中和以及纤维在挤出过程中的脱水。带有相反电荷的链段的完美登录(registry)会导致蛋白沉淀, 而电荷排列的一些缺陷会导致保留下来的抗衡离子和水从而提供局部的塑性。

[0099] 石蛾 H 丝心蛋白与蛾 H 丝心蛋白共用若干结构设计特征: 安排在重复嵌段中的保守基序的长中心区两侧的非重复性 N 末端和 C 末端, 中心核中的规则交替的疏水和亲水区域以及共价交联 H 丝心蛋白和 L 丝心蛋白的半胱氨酸残基的保守位置和间距。在氨基酸水平, 共同特征包括类似 GX、GGX、GPGXX 和 SXSXSX 的简单基序占优势, 这反映在石蛾和蛾 H 丝心蛋白两者中的高含量的 G 和 S (表 2)。氨基酸组成的显著差异在于石蛾中比较低的丙氨酸出现率, 丙氨酸在蛾和蜘蛛 H 丝心蛋白中以连续(run)聚(A)和聚(GA)形式出现, 连续聚(A)和聚(GA)赋予它们的丝纤维 β 结晶度和机械强度。另一个显著差异是高浓度(约 15 摩尔%)的带正电荷的碱性残基, 尤其是精氨酸, 它们在蛾丝中是比较罕见的。在三个石蛾种中的任一个中均未能鉴定到 P25 的 cDNA 或蛋白同源物。P25 在蛾丝的长丝组装和分泌中的重要作用表明这可能是干丝与湿丝的加工和组装中的另一重要差异。

[0100] 在整个本申请中, 提及了多个出版物。这些出版物的披露内容以其全文通过引用结合在此, 以便更加全面地描述本文所述的化合物、组合物和方法。

[0101] 可以对本文所述的化合物、组合物和方法做出各种修改和变化。鉴于本说明书以及本文所披露的化合物、组合物和方法的实施, 本文所述的化合物、组合物和方法的其他方面将是明显的。本说明书和实例旨在视为示例性的。

[0102] 表

[0103] 表 1. 通过串联质谱鉴定的磷酸化肽

[0104]

肽序列		Mr(expt)	E (pp m)*	MS/M S 得分
Ha S m Ro Ld	KISRSASYSVERIVTPTVITRISGSHSVSAE (序列 ID NO 1)			
	KASVSHSVSVETYVRAPIVRHFSSRSGSVSIE (序列 ID NO 2)			
	VSISHSISIERVITPGVYTSIHRSVSVSHSVSVE (序列 ID NO 3)			
	GKKVSISRSGSIERIVTPGVYTKISRSSSVSVEGGRRR GPWGYGR (序列 ID NO 4)			
1	GKVSISR (序列 ID NO 5)	825.4113	0.6	36
2	SVSIE (序列 ID NO 6)	769.3379	1.1	31
3	SVSIE (序列 ID NO 7)	849.303	0.5	21

[0105]

		9		
4	RGKVSISRSGSIER (序列 ID NO 8)	1892.77 13	0.01	21
5	GKVSISRSGSIER (序列 ID NO 9)	1656.69 68	-3.3	29
6	GKVSISRSGSIER (序列 ID NO 10)	1736.67 08	0.4	24
7	IVTPGVYTK (序列 ID NO 11)	976.559 6	0.2	47
8	IVTPGVYTKISR (序列 ID NO 12)	1412.74 30	0.1	68
9	TPGVYTK (序列 ID NO 13)	764.407 6	1.0	41
10	VTPGVYTKISR (序列 ID NO 14)	863.475 6	0.4	43
11	TPGVYTKISR (序列 ID NO 15)	1200.59 03	0.1	56
12	TPGVYTKISR (序列 ID NO 16)	1200.59 03	-0.1	50
13	PGVYTKISR (序列 ID NO 17)	1099.54 28	0.1	48
14	PGVYTKISR (序列 ID NO 18)	1099.54 13	-1.3	40
15	ISRSSSVSVEGGR (序列 ID NO 19)	1639.54 53	0.4	29
16	ISRSSSVSVEGGR (序列 ID NO 20)	1639.54 53	0.4	29
17	SSSVSVEGGR (序列 ID NO 21)	1123.39 53	0.4	35
18	SSSVSVEGGR (序列 ID NO 22)	1203.36 13	0.1	34

[0106] 表 1: 上部四个肽行是来自 *H. augustipennis* (Ha)、*S. marmorata* (Sm)、*R. oblitterata* (Ro) 和 *L. diciptiens* (Ld) 的保守 D 重复。磷酸化残基被加粗并加下划线。保守丝氨酸被加阴影。* 实验性相对分子量 ($M_{r(\text{expt})}$) 误差 $E = (M_{\text{expt}} - M_{\text{calc}}) / M_{\text{calc}}$, 以份每一百万份 (ppm) 给出。MS/MS 离子得分为 $-10 (\text{LogP})$, 其中 P 为观察的肽是随即匹配的概率。

[0107] 表 2. 四个石蛾种和两个蛾种的氨基酸组成。

[0108]

残基	B. echoa (mol% s.d.)	L. decipiens (摩尔%)	R. oblitterata (摩尔%)	H. augustipennis (摩尔%)	家蚕 (B. mori) (摩尔%)	大蜡螟 (G. mellonella) (摩尔%)
Gly	20.1 ± 0.4	24.6	24.9	19.4	45.9	28.6
Ala	6.3 ± 1.1	0.4	1.9	4.5	30.3	21.3

[0109]

Ser	15.4 ± 1.8	17.2	14.7	12.5	12.1	17.0
Thr	3.2 ± 0.5	2.3	1.9	2.5	0.9	3.2
Ile	3.8 ± 0.4	4.3	9.1	6.6	0.2	4.2
Leu	6.0 ± 0.6	5.0	9.5	5.4	0.1	6.6
Val	4.1 ± 0.5	12.2	5.9	9.4	1.8	6.2
Tyr	4.1 ± 0.8	2.7	1.8	6.2	5.3	0.5
Phe	1.2 ± 0.06	0.8	0.2	0.1	0.6	0.4
Pro	4.0 ± 0.3	4.8	3.3	9.6	0.3	3.8
Asx	11.7 ± 1.6	2.6	3.8	3.4	0.9	2.8
Glx	3.5 ± 0.4	3.5	4.0	3.8	0.8	2.5
Arg	8.8 ± 0.5	14.1	7.7	9.6	0.3	1.6
His	0.7 ± 0.2	0.2	6.2	2.7	0.1	0.1
Lys	4.2 ± 0.4	2.3	3.3	2.1	0.2	0.3

[0110] ^a 来自对 *B. echo* 丝的四次独立的分析的实验性氨基酸组成。其他种的氨基酸组成由可得自 GenBank 的 H 丝心蛋白序列推导。

[0111] 表 3. *B. echo* 丝蛋白中的元素

	元素	样品 1 (nmol ± sd)	样品 2 (nmol ± sd)
[0112]	Ca	55.7 ± 3.39	123.0 ± 3.16
	Fe	14.4 ± 0.07	28.7 ± 0.06
	Mg	24.0 ± 0.09	15.4 ± 0.11
	Mn	1.0 ± 0.0	0.90 ± 0.0
	Zn	3.1 ± 0.02	3.5 ± 0.01
	S	38.5 ± 0.35	55.4 ± 0.23
	P	114.2 ± 0.48	164.2 ± 0.14

[0113] 所述量为在扣除背景之后每 70mg 来自石蛾壳体的玻璃微珠中的 nmol 数。背景使用从相同水族馆收集的等质量的非粘结的玻璃珠确定。

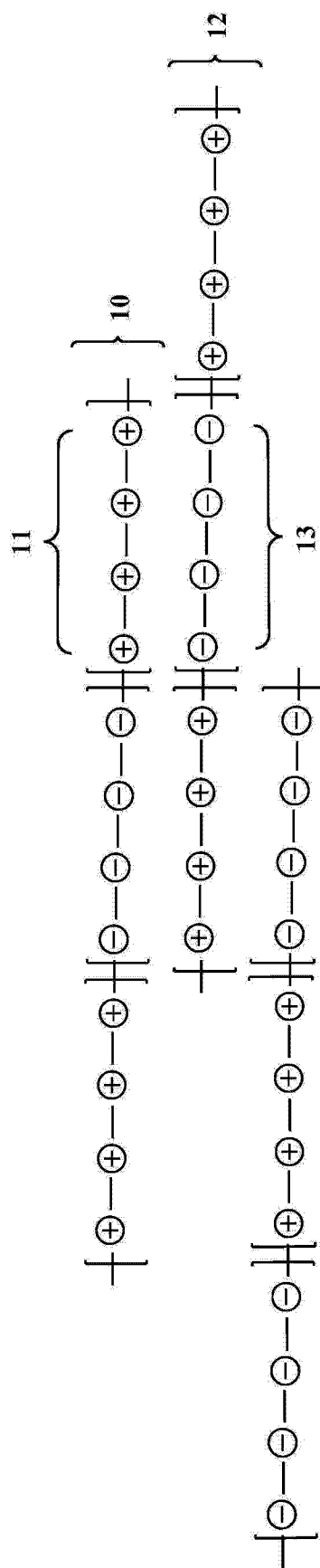


图 1

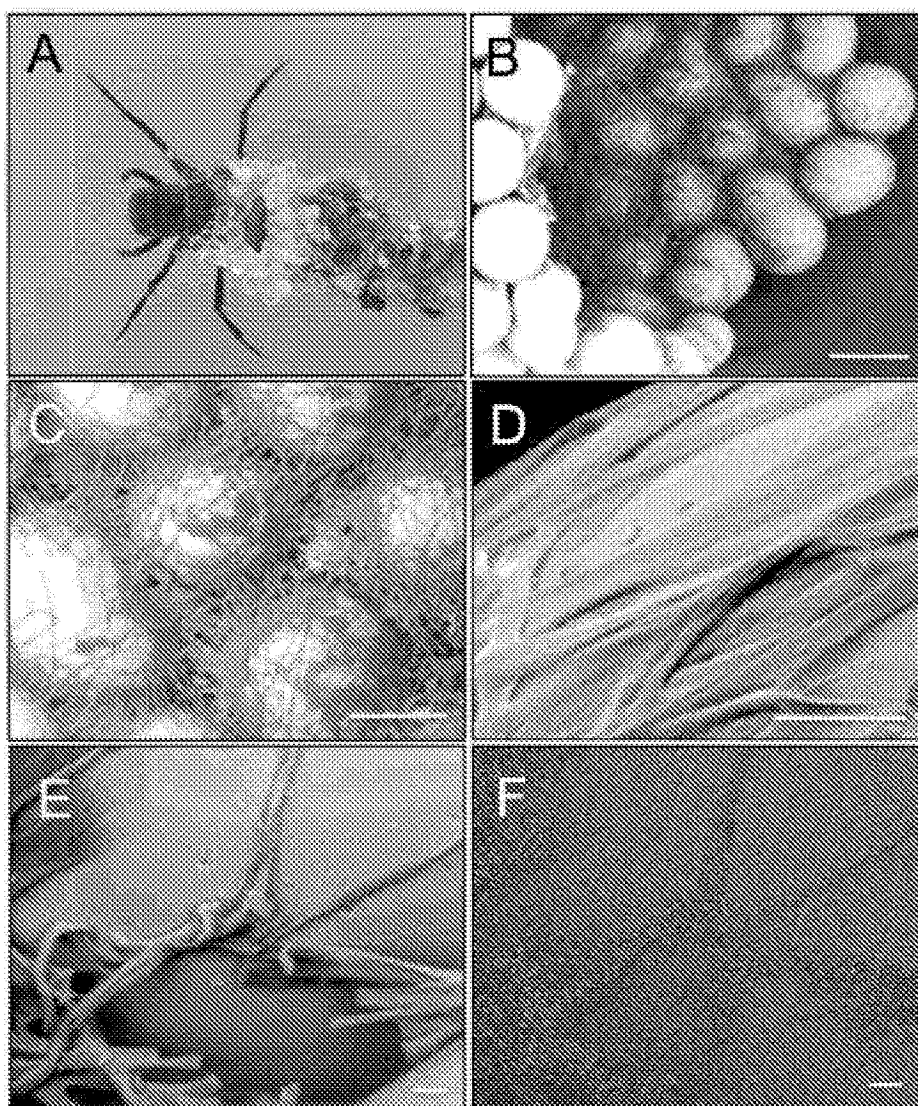


图 2

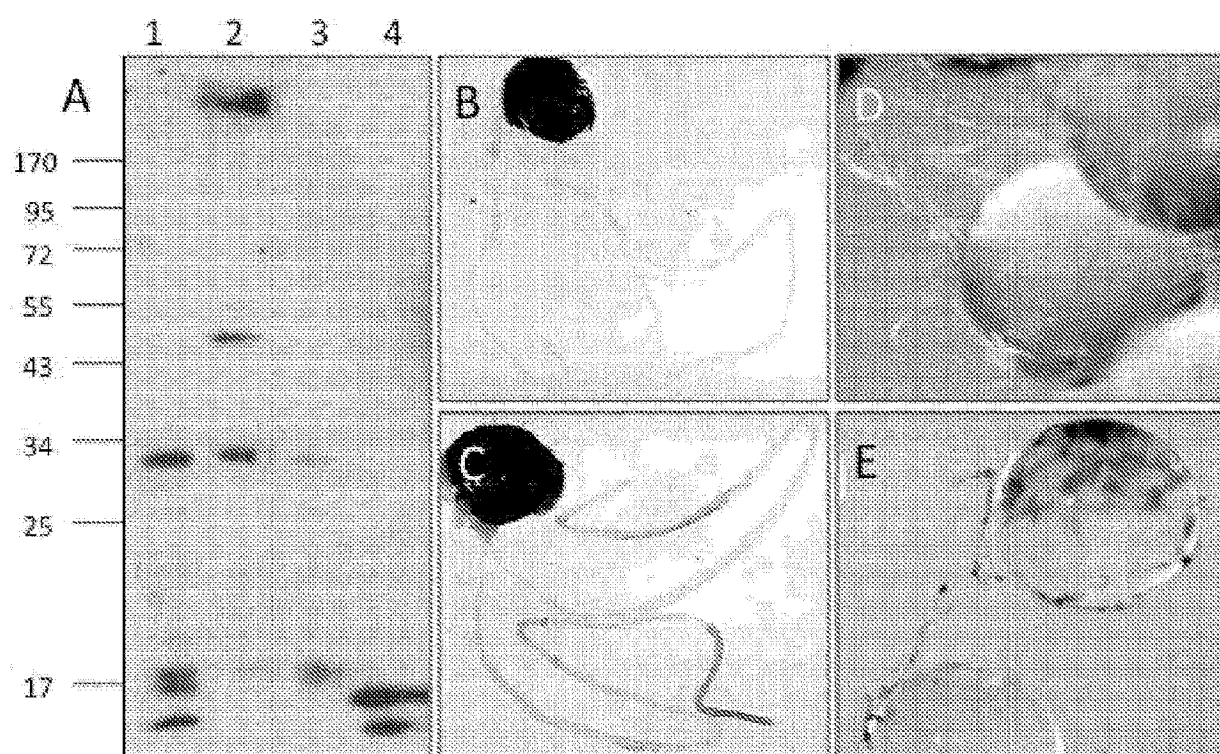


图 3

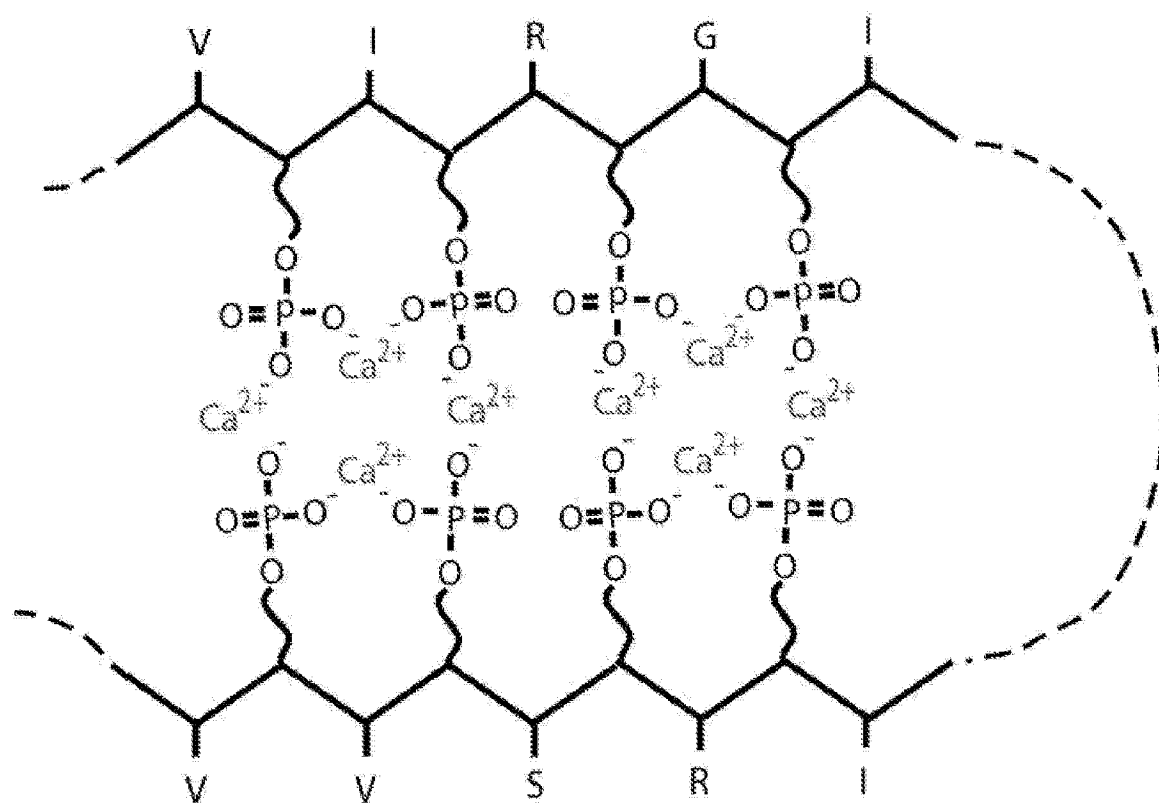


图 4