

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410024711.9

[51] Int. Cl.

C08J 9/00 (2006.01)

C08J 9/28 (2006.01)

A61L 27/22 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 7 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 1262579C

[22] 申请日 2004.5.27

[21] 申请号 200410024711.9

[71] 专利权人 复旦大学

地址 200433 上海市邯郸路 220 号

[72] 发明人 邵正中 曹正兵 陈 新 周 平

姚晋荣

审查员 秦 艳

[74] 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司

代理人 陆 飞 沈 云

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 发明名称

丝素蛋白海绵状三维多孔材料制备方法

[57] 摘要

本发明为一种丝素蛋白海绵状三维多孔材料的制备方法。具体是利用变性剂诱导丝蛋白构象转变后在低温下进一步发生冷冻相分离，形成结构均匀且形状可以任意调控的三维多孔海绵材料。可以通过调节丝蛋白浓度、变性剂添加量、变性剂种类、冷冻时间、冷冻温度、海绵体后处理等参数控制多孔材料的孔隙率、孔径尺寸、机械力学性能等。制备过程中无需加入任何交联剂、致孔剂、表面活性剂以及强毒性有机溶剂，制备工艺简单易行。用本方法制备的海绵状三维多孔材料质地均匀、孔隙率高、韧性好、具有良好的可塑性、复胀性和稳定性，压缩形变 > 90%，孔隙率可达到 98%，弹性回复率可达 100%，吸水率最高可达到 5000%。

- 
1. 一种丝素蛋白三维多孔材料的制备方法，其特征在于以天然的或再生丝素蛋白为原料，配成水溶液，丝素蛋白水溶液的浓度为 0.1~40%；用醇类有机溶剂作变性剂，诱导蛋白质变性，醇类有机溶剂加入的体积为丝素蛋白溶液体积的 0.01~20 倍；然后浇注到特定容器中，经冷冻一解冻得到乳白色的海绵状多孔材料；再用后处理溶剂浸泡、洗涤，调节海绵体的强度以及除去海绵体中残留的有机溶剂，再经真空干燥或冷冻干燥即得到丝素蛋白海绵状三维多孔材料；其中，所述醇类有机溶剂为甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、丙三醇、丁醇、异丁醇、叔丁醇、乙二醇、丙酮、四氢呋喃、吡啶之一种或几种。
  2. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于所述冷冻的温度为-80~0℃，冷冻时间为 12~120 小时。
  3. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于所用的后处理溶剂为甲醇、乙醇、去离子水之一种或几种。

## 丝素蛋白海绵状三维多孔材料制备方法

### 技术领域

本发明属于高分子化学、组织工程、基因工程、生物化学、蛋白质、医药学、生物技术领域，具体涉及一种用天然生物大分子—丝素蛋白制备三维多孔材料的方法。

### 背景技术

蚕丝是一种天然蛋白质纤维，由 18 种氨基酸组成。中国是丝绸之乡，蚕丝在中国的应用已有几千年的历史。蚕丝由于其独特的珍珠光泽、良好的透气性、质地柔软等性能而广泛用作服饰材料。由天然蚕丝或废蚕丝脱胶得到的丝素蛋白对人体无毒、抗原性微弱，和人体具有良好的生物相容性，它在生物医学领域的研究和应用已日益引起国内外研究人员的兴趣和重视。近几十年来，随着人们对蚕丝研究的深入，对其应用早已不仅仅局限于传统的纺织领域，还应用于医药、生物技术、日用化工、食品等方面。

丝素蛋白是一种对人体安全的绿色材料。利用丝素蛋白制备的丝素材料具有良好的生物相容性、无抗原性、易降解等特点，已广泛应用于医药、保健品、生物技术、精细化工等诸多领域。目前多用作医用手术缝合线、药物缓释材料、酶固定化材料、隐形眼镜、细胞培养基、医用材料、智能水凝胶等。

本发明人曾用丝素蛋白制备灵敏度很高的酶电极和纳米微球。

“组织工程”是一门新兴的学科，其最终的目的是将功能细胞与可降解三维支架材料（人工细胞外基质）在体外联合培养，构建成为有生命的组织或器官，然后植入体内，替代病损的组织，恢复其形态结构和功能；或构建一个有生命的体外装置，用于暂时替代病损器官的一部分或全部功能；或将某些生物活性物质如生物活性因子、干细胞等植入体内，引导或诱导自身组织再生，达到修复组织结构、恢复器官、器官功能的目的。

理想的组织工程支架材料通常应具备以下特点：

- (1) 良好的生物相容性，其本身或降解产物对种子细胞和机体无毒性，不会引起炎症和免疫排斥反应；
- (2) 适度的生物降解速率，且该降解速率需和组织再生的速率相匹配，最后可完全吸收或安全地排出体外；
- (3) 良好的结构相容性，具有一定的力学强度和可塑性，能保持稳定的三维立体结

构，海绵状或纤维网状三维支架应具有互相连通的孔结构与高的孔隙率，孔径大小适当，可以为种子细胞的均匀分布和生长提供足够的空间，同时也有利于营养物质和代谢产物的扩散。

(4) 良好的表面相容性，材料表面应有利于种子细胞的粘附与生长。

从临床应用的角度出发，组织工程的细胞支架不仅应在细胞培养过程中能保持一定的形状、不会在操作中破碎，而且还应能耐受灭菌消毒处理；需具有一定的柔韧性，使之既能同机体组织缝合并贴合，又不会对机体组织造成机械损伤。因此，理想的细胞支架应具有一定的生物降解速度、良好的生物相容性和细胞亲和性、有一定的力学性能、能灭菌消毒、具有特定三维多孔结构，且包含可以控制释放生长因子的超分子集合体。

用于组织工程支架的材料通常是可降解的，因为支架往往只起暂时作用，最终还是希望它能降解并被人体排泄掉。许多天然和人工合成高分子材料以及无机陶瓷材料，都可被用来制备组织工程支架。胶原和透明质酸、甲壳素、壳聚糖、糖胺聚糖、丝素蛋白等属于天然生物降解材料，它们的细胞相容性好，异体免疫性反应较弱，由它们得到的支架材料显示出一定的优越性。与天然材料相比，合成可降解高分子材料来源稳定，结构和性能可根据不同组织需要人为地修饰和调控，可适用于较多的制备技术。其中最受重视的合成生物降解材料已被美国食品与药物管理局（FDA）批准使用。较常见的有聚己内酯（poly  $\epsilon$ -caprolactone, PCL）和聚乙交酯（polyglycolide, PGA）、聚丙交酯（polylactide, PLA）及其共聚物聚丙交乙交酯。这些材料的突出优点是具有相对良好的生物相容性及可调节的物化性能，可以通过简单的水解而降解，产物经人体新陈代谢排出体外。但从更高的生物安全性角度来讲，天然高分子材料避免了合成高分子制备过程中可能存在的引发剂、强毒性有机溶剂残留以及是否能完全降解的问题。因此寻求开发一种天然的而又来源稳定，结构和性能可根据不同组织需要人为地修饰和调控的高分子材料就显得尤为重要。丝素蛋白由于其本身的特性，可作为一种潜在的兼有天然和合成高分子材料特性的生物材料。本发明人曾系统的研究了在温和条件下制备丝素蛋白纳米微球的工艺过程，研究结果显示如果工艺条件选择得当丝素蛋白就有很强的可塑性能，可以按应用目的制备不同的应用器件。传统的海绵状多孔材料都是用添加致孔剂、发泡法、低温反复冷冻等方法。

日本的 Rina Nazarov 等曾研究了三种制备再生丝素蛋白三维多孔材料的方法，分别用冻干法、发泡法、盐沥滤法制备多孔材料。但在制备工艺、材料的均一性、柔韧性、孔隙率、吸水率等方面仍有不足。

## 发明内容

本发明的目的在于提供一种全新的高性能丝素蛋白三维多孔材料的制备方法，使得工

艺简单，制得到材料性能优异，易于按特定需求浇注成型。

本发明提出的高性能丝素蛋白三维多孔材料的制备方法，是一种全新的方法，具体是以天然的或再生丝素蛋白为原料，配成水溶液，用醇类有机溶剂(如正丁醇等)作变性剂诱导蛋白质变性，然后浇注到特定容器，经冷冻一解冻得到乳白色的海绵状多孔材料；再用后处理溶剂浸泡、洗涤，调节海绵体的强度以及除去海绵体中残留的有机溶剂，再经真空干燥或冷冻干燥即得到丝素蛋白海绵状三维多孔材料。

上述方法中，所用的丝蛋白为天然蚕茧或工业废蚕丝经脱胶，中性盐溶解后用去离子水或 PEG 等水溶性高分子透析制备，重量浓度为 0.1~40%。

上述方法中，添加的变性剂为甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、乙二醇、丙三醇、丁醇、异丁醇、叔丁醇、丙酮、四氢呋喃、吡啶之一种或几种。加入的体积为丝素蛋白溶液体积的 0.1—20 倍。

上述方法中，所用的后处理剂为醇类溶剂(如甲醇、乙醇)、去离子水之一种或几种。

上述方法的操作步骤如下：将废蚕丝用 0.1~3.0% 的  $\text{NaHCO}_3$  或  $\text{NaCO}_3$  溶液，或 0.1~1.0mol/L 的硼酸—硼砂缓冲溶液，在 90~100°C 的温度下处理 20~90 分钟，然后用去离子水漂洗干净；按需要重复 1~5 次以完全脱除丝胶；65°C 下干燥 24h；接着将脱胶干燥后的丝蛋白用某种中性盐（如 7~10mol/L 的 BrLi 溶液）或  $\text{CaCl}_2\text{-H}_2\text{O-C}_2\text{H}_5\text{OH}$  三元体系恒温 25~90°C 搅拌下溶解，溶液灌入膜通量为 10,000~1,4000 的纤维素透析袋中，用去离子水透析三天，制备的丝蛋白可调配浓度为 0.1~40.0% 的溶液。

取 5mL 丝蛋白溶液，在 25°C 低速搅拌下滴加 0.1~20mL 变性剂，放入变温冰箱冷冻 12~120h，冷冻温度为 -80—0°C。取出结冰的丝蛋白溶液室温下解冻之后即得到白色海绵状材料，再用乙醇等醇类有机溶剂和去离子水浸泡、洗涤以调节海绵体的强度同时除去海绵体中残留的有机溶剂，再经真空干燥或冷冻干燥即得到丝素蛋白海绵状三维多孔材料。

上述方法制备的丝素蛋白海绵状三维多孔材料具有很好的柔韧性和机械力学性能，孔隙率高、浇铸性能好、复胀性好。实物和扫描电子显微镜如附图 1、2 所示。本发明可以通过调节丝蛋白浓度、变性剂添加量、变性剂种类、冷冻时间、冷冻温度、海绵体后处理时间等参数控制海绵体的孔隙率、孔径尺寸、机械力学性强度等。用本方法制备的丝素蛋白海绵状多孔材料稳定性好、孔径均一；柔韧性、弹性好，可任意折叠弯曲而不出现断裂，压缩形变>90%，孔隙率可达到 98%，弹性回复率可达 100%，吸水率最高可达到 5000%；复胀性能好，干态海绵放入水中五分钟左右即完全复原。

与现有技术相比，采用本发明的技术措施所取得的独特效果：

本发明利用变性剂诱导丝蛋白构象转变后在低温下进一步发生冷冻相分离制得性能

优异的丝素蛋白海绵状三维多孔材料，整个工艺工程无需添加任何引发剂、致孔剂、表面活性剂、交联剂和强毒性有机溶剂，具有更高的生物安全性。制备过程中还可以通过调节丝蛋白浓度、变性剂添加量、变性剂种类、冷冻时间、冷冻温度、海绵体后处理时间等参数很方便的控制海绵体的孔隙率、孔径尺寸、机械力学性强度等。同时可以根据需要制备成特定形状的多孔材料。

此外，丝蛋白是一种弱的两性聚电解质， $pI$  为 3.9~4.2，具有潜在的 pH 敏感性，可以在不同的 pH 条件下控制释放。同时丝蛋白是一种纯天然生物大分子，在体内可完全降解，是作为药物载体的理想材料。本发明的工艺过程简单，成本低廉，因此，本发明在组织工程、基因工程、生物医药领域具有重要的应用价值。

#### 附图说明

图 1 中 (a)、(b) 为两种形状的丝蛋白海绵状三维多孔材料实物照片。

图 2 中 (a)、(b) 为两种丝蛋白海绵状三维多孔材料的电子显微镜照片。

#### 具体实施方式

以下利用实施例进一步详细说明本发明。

实施例 1：将 10g 左右去蛹蚕茧浸入 2L 0.5%  $\text{NaHCO}_3$  溶液中，搅拌煮沸 55min 后取出，用去离子水洗涤干净。重复以上操作一次后将蚕丝 65℃下烘干 24h 放入干燥器备用。

称取上述处理后的脱胶蚕丝 3g 溶解于 100mL 浓度为 9.5mol/L 的 BrLi 溶液中，45℃下恒温低速磁力搅拌下溶解。将此蛋白质溶液灌入纤维素透析袋中，用去离子水透析三天，得到浓度为 2.32% 的丝蛋白水溶液，调节丝蛋白浓度为 1.0%。

取上述丝蛋白溶液 5mL，25℃恒温水浴匀速搅棒下滴加 3mL 正丁醇，稳定 2min 后倒入塑料盒再放入低温冰箱 -25℃下冷冻 48h。丝蛋白冷冻 48h 后形成乳白色冰块，室温下解冻形成乳白色海绵，乳白色海绵经乙醇浸泡 1h，再用去离子水浸泡冲洗，去除有机溶剂，再冷冻干燥即得到丝素蛋白海绵状多孔材料。

实施例 2：将 30g 左右废蚕丝浸入 3L 0.5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液中，搅拌煮沸 45min 后取出，用去离子水洗涤干净。重复以上操作两次后将蚕丝 65℃下烘干之后放入干燥器备用。

称取上述处理后的脱胶蚕丝 6g 溶解于 100mL 浓度为 10.0mol/L 的 BrLi 溶液中，45℃下恒温低速磁力搅拌下溶解。将此蛋白质溶液灌入纤维素透析袋中，用去离子水透析三天，得到浓度为 8% 的丝蛋白水溶液，再通过稀释，调节丝蛋白溶液浓度为 5%。

取上述丝蛋白溶液 10mL，25℃恒温水浴匀速搅拌下滴加 5mL 丙酮，稳定 2min 后放入低温冰箱 -30℃下冷冻 24h。丝蛋白冷冻后形成乳白色冰块，室温下解冻形成乳白色海绵，海绵用去离子水漂洗去除海绵体中的有机溶剂再真空干燥即得到较结实的海绵状多孔材

料。

实施例 3：将 20g 左右废蚕丝浸入 2L 0.5mol/L 的硼酸一硼砂缓冲溶液溶液中，搅拌煮沸 60min 后取出，用去离子水洗涤干净。重复以上操作一次后将蚕丝 65℃下烘干放入干燥器备用。

称取上述处理后的脱胶蚕丝 12g 溶解于 100mL 浓度为 10.0mol/L 的 LiBr 溶液中，45℃下恒温低速磁力搅拌下溶解。将此蛋白质溶液灌入纤维素透析袋中，用去离子水透析三天，得到浓度为 11% 的丝蛋白水溶液，通过稀释调节丝蛋白浓度为 10%。

取上述丝蛋白溶液 10mL，25℃恒温水浴下滴加 10mL 叔丁醇，稳定 2min 后倒入球形容其中并放入低温冰箱 -40℃下冷冻 36h。丝蛋白冷冻后形成乳白色冰块，室温下解冻形成乳白色球海绵体，海绵体用去离子水浸泡、漂洗除孔隙中的有机溶剂再真空干燥即得到海绵状多孔材料。

实施例 4：将 15g 左右废蚕丝浸入 2L 0.5mol/L 的硼酸一硼砂缓冲溶液溶液中，搅拌煮沸 60min 后取出，用去离子水洗涤干净。重复以上操作一次后将蚕丝 65℃下烘干备用。

称取上述处理后的脱胶蚕丝 10g 溶解于 100mL 浓度为  $\text{CaCl}_2\text{-H}_2\text{O-C}_2\text{H}_5\text{OH}$  三元溶液中，78℃下恒温低速磁力搅拌下溶解。将此蛋白质溶液灌入纤维素透析袋中，用去离子水透析三天，得到浓度为 11% 的丝蛋白水溶液。再按专利介绍的方法，用 PEG 透析制备浓度为 35% 的丝蛋白溶液。

取上述丝蛋白溶液 10mL，25℃恒温水浴下滴加 10mL 四氢呋喃，稳定 3min 后倒入塑料盒后放入低温冰箱 -50℃下冷冻 24h。丝蛋白冷冻后形成乳白色冰块，室温下解冻形成乳白色海绵体，海绵体经甲醇浸泡再用去离子水浸泡、漂洗去除正戊醇之后再真空干燥即得到丝素蛋白海绵状多孔材料。

实施例 5：将 20g 左右废蚕丝浸入 2L 0.5mol/L 的硼酸一硼砂缓冲溶液溶液中，搅拌煮沸 60min 后取出，用去离子水洗涤干净。重复以上操作一次后将蚕丝 65℃下烘干备用。

称取上述处理后的脱胶蚕丝 15g 溶解于 100mL 浓度为  $\text{CaCl}_2\text{-H}_2\text{O-C}_2\text{H}_5\text{OH}$  三元溶液中，80℃下恒温低速磁力搅拌下溶解。将此蛋白质溶液灌入纤维素透析袋中，用去离子水透析三天，得到浓度为 12% 的丝蛋白水溶液。再按专利介绍的方法，用 PEG 透析制备浓度为 40.0% 的丝蛋白溶液。

取上述丝蛋白溶液 5mL，25℃恒温水浴下滴加 4.0mL 正戊醇，稳定 3min 后放入低温冰箱 -75℃下冷冻 12h。丝蛋白冷冻后形成乳白色冰块，室温下解冻形成乳白色海绵体，海绵体经甲醇浸泡再用去离子水浸泡、漂洗去除正戊醇之后再真空干燥即得到丝素蛋白海绵状多孔材料。

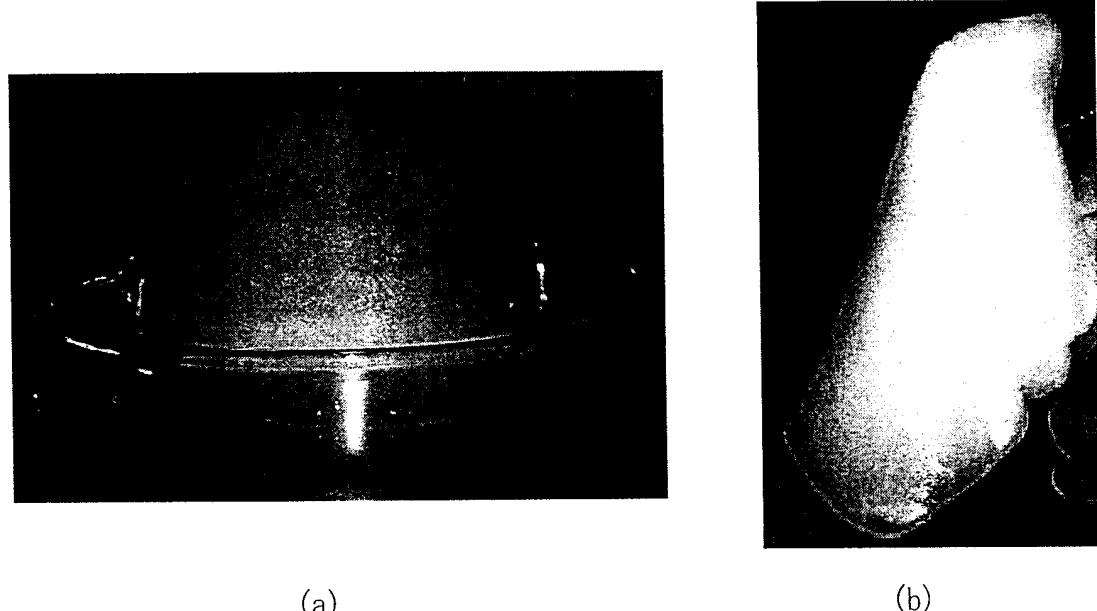


图 1

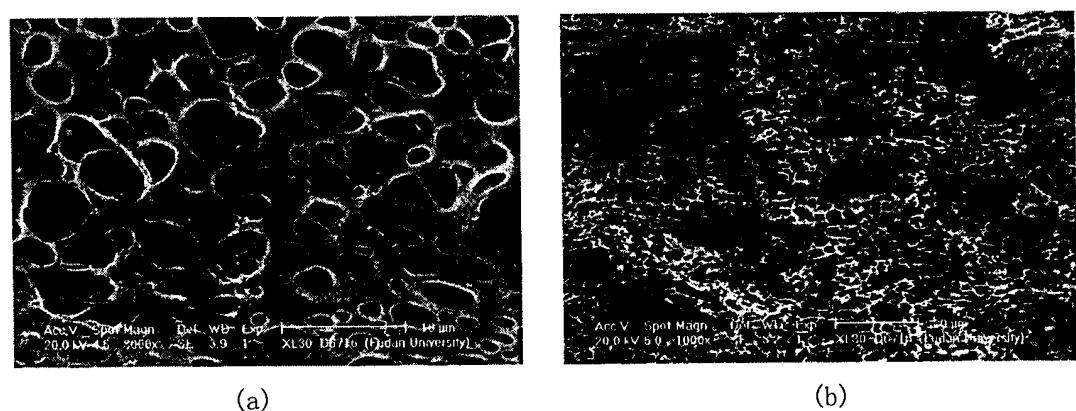


图 2