[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580027899.5

[51] Int. Cl.
A61L 27/34 (2006.01)
C08L 27/18 (2006.01)
A61L 31/10 (2006.01)
G02C 7/04 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 8 月 22 日

[11] 公开号 CN 101022838A

[22] 申请日 2005.8.17
[21] 申请号 200580027899.5
[30] 优先权
[32] 2004.8.18 [33] US [31] 10/920,580
[86] 国际申请 PCT/US2005/029663 2005.8.17
[87] 国际公布 WO2006/023795 英 2006.3.2
[85] 进入国家阶段日期 2007.2.15
[71] 申请人 纳幕尔杜邦公司
地址 美国特拉华州
[72] 发明人 J·F·伊姆巴尔扎诺
B·斯蒂格利茨

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 李 波 梁 谋

权利要求书 1 页 说明书 15 页 序列表 3 页

[54] 发明名称

纳米孔聚合物上的两亲蛋白涂层

[57] 摘要

本发明涉及纳米孔聚合物上的两亲蛋白涂层的形成。

1. 复合结构，包含具有两亲蛋白涂层的纳米孔聚合物。

2. 权利要求 1 的复合结构，其中所述两亲蛋白涂层增加所述聚合物的水可湿性，所述增加的水可湿性的特征在于润湿角减少至少约 15°。

3. 权利要求 1 的复合结构，其氧通透性是所述纳米孔聚合物的氧通透性的至少约 80％。

4. 权利要求 1 的复合结构，其中所述聚合物的纳米孔的平均直径不超过约 5 纳米。

5. 权利要求 1 的复合结构，其中所述纳米孔聚合物是膜。

6. 权利要求 5 的复合结构，其中所述膜是隐形眼镜。

7. 权利要求 1 的复合结构，其中所述纳米孔聚合物是无定形聚合物。

8. 权利要求 1 的复合结构，其中所述纳米孔聚合物是疏水性的，特征在于润湿角是至少约 90°。

9. 权利要求 8 的复合结构，其中所述聚合物是无定形的含氟聚合物。

10. 权利要求 8 的复合结构，其中所述两亲蛋白涂层是疏水蛋白。

纳米孔聚合物上的两亲蛋白涂层

发明领域

本发明涉及改变纳米孔聚合物（nanoporous polymer）表面的水可湿性的改变。

相关领域的描述

WO 2004/000880 A1公开了具有称作疏水蛋白的蛋白材料的表面涂层，所述疏水蛋白在所述表面形成两亲涂层。两亲表示该蛋白材料给涂层提供疏水和亲水基团（参见IUPAC Compendium of Chemical technology, 2nd Ed, 31, 612 (1972)中对两亲的定义）。疏水蛋白是一类所述蛋白材料的实例。根据疏水蛋白的两亲性质，蛋白材料在被涂布的基质表面自组装以形成涂层，所述涂层具有根据涂布的表面的可湿性而定向的疏水性和亲水性。如果该表面是疏水的，涂层的疏水侧与涂布的疏水表面接触，而涂层的外表面是亲水性的，从而增加了涂布的表面的水可湿性。疏水蛋白样材料公开于 WO 2004/000880，它不仅仅是从自然界分离的疏水蛋白，并且也是化学修饰或遗传修饰的疏水蛋白，但仍然具有在亲水或疏水界面自组装成两亲膜（涂层）的性质。为了简单，此处使用的术语“疏水蛋白”将包括疏水蛋白样材料。自组装前的疏水蛋白有时称作单体，表明自组装涉及单体在被涂布的表面的聚集或聚合，以形成两亲涂层。无论机理如何，得到的两亲涂层是不溶于水的，这与它在用于形成涂层的溶液中的水可溶性不同。涂层的水不溶性表明形成了更大的分子，这是通过聚合或其它机理。术语“疏水蛋白”也用于描述从疏水蛋白原料（单体）获得的不溶于水的涂层。

U.S. 2003/0134042 A1 公开了施加到表面后在表面活性剂的存在下加热两亲涂层，以增加涂层的稳定性。如该专利申请公开的实施例 2 和 4 中公开的 TEFLON®聚四氟乙烯片材上所证实的，热/表面活性剂处理的涂层在洗涤溶液中比未处理的涂层解吸更少的疏水蛋白。尽管涂层的改进的稳定性/耐久性是理想的，但这成为了一个必须进行的额外步骤，并且需要加热，对于涂层的使用者来说这将是不方便的，或者是不理想的。例如，隐形眼镜的涂布优选在室温下（15-25℃）进

行，而且不使用表面活性剂。此外，热处理过程中表面活性剂的存在，导致了涂层被残留的表面活性剂污染的问题。

发明简述

本发明通过在纳米孔聚合物上形成涂层，提供了不需要加热/表面活性剂处理的稳定/耐久的两亲蛋白涂层。聚合物的纳米级的孔与涂层相互作用，出乎意料地增加了其稳定性/耐久性。因此，本发明的一个实施方案可以描述为包含具有两亲蛋白涂层的纳米孔聚合物的复合结构。

本发明的复合结构实现的另一个出乎意料的结果是纳米孔聚合物的氧通透性基本不受到涂层的破坏。

序列表简述

从以下说明书和形成本申请一部分的所附序列说明，可以更完全地理解本发明。

下列序列遵循 37 C.F.R. §1.821-1.825（“对含有核苷酸序列和/或氨基酸序列公开内容的专利申请的要求---序列规则”），并符合世界知识产权组织（WIPO）标准 ST.25（1998）以及 EPO 和 PCT 的序列列表要求（管理说明的规则 5.2 和 49.5（a-bis），以及第 208 节和附录 C）。应用于核苷酸和氨基酸序列信息的符号和格式遵循 37 C.F.R. §1.822 所述规则。

SEQ ID NO:1 是成熟 TT1 疏水蛋白的氨基酸序列。

SEQ ID NO:2 是编码嗜热踝节菌（Talaromyces thermophilus）的成熟 TT1 疏水蛋白的 DNA 序列。

SEQ ID NO:3 是前体 TT1 疏水蛋白的氨基酸序列。

SEQ ID NO:4 是编码嗜热踝节菌的前体 TT1 疏水蛋白的 DNA 序列。

发明详述

纳米孔材料公开于 Cientifica, Ltd 2003 年 10 月发表的题目为纳米孔材料的文章中，其是多种材料，包括具有小于 100 nm 的孔的聚合物。也公开了制备纳米孔材料的方法。用于本发明的纳米孔聚合物优选具有小于 50 nm 的平均纳米孔（开口）径，更优选不超过 5 nm。纳米孔聚合物可以是亲水或疏水的，并且两亲蛋白涂层将粘附于聚合物表面，涂层的外表面改变了聚合物表面的水可湿性，使其在疏水的

纳米孔聚合物的情况下可湿性更高，或在亲水的纳米孔聚合物的情况下可湿性更低。在任一情况下，聚合物的纳米孔与涂层相互作用，以增加其稳定性/耐久性。

获得纳米孔的优选方法是使聚合物成为无定形的，如通常是通过聚合物不含晶体结构而表明的，这是通过聚合物缺乏熔点而表明的。更详细地，“无定形”表示聚合物是非晶质的，这是通过熔解热不超过 3 J/g，优选不超过 1 J/g 表明的，熔解热是从聚合的聚合物的差示扫描量热术(DSC)检测的吸热作用确定的。通常，即使在第一次加热时观察到了弱吸热作用，在第二次 DSC 加热中不会观察到吸热作用。当吸热作用的 DSC 描记中的“背景噪音”是大约相同的 3 J/g，以致于对聚合物几乎不能检测到结晶（熔解）热时，3 J/g 的最大值被认为表明是无定形聚合物。聚合物的无定形状态的特征在于足够开放的分子结构和缺乏聚合物的晶体，以便诸如惰性气体的小分子可以通透从这些聚合物形成的膜。

A.Y. Alentiev et al., "High transport parameters and free volume of perfluoro dioxole copolymers", J. Membrane Science 126, Elsevier Science B.V.出版，pp. 123-132 (1997)公开了无定形聚合物状态的效果，即该聚合物具有自由体积，自由体积是聚合物的真实密度与聚合物中存在的纳米孔导致的实际上较低的密度之间的差异。这篇文章发现，全氟间二氧杂环戊烯共聚物的自由体积与聚(三甲基甲硅烷基丙炔)（PTMSP）的自由体积相同，并且高于含氟降冰片烯聚合物的自由体积。公开了正电子淹没寿命法，用于确定自由体积和聚合物中的孔径（称作自由体积元件），该文章报道了间二氧杂环戊烯共聚物的平均孔径是小于 1 nm: 5.9-6.4 Å (0.59- 0.64 nm)，PTMSP 是 6.7 Å (0.67 nm)。自由体积导致形成的无定形聚合物的无序状态。聚合物中的开口（孔）贯穿聚合物的整个厚度（典型地构造成膜），这样，氧可以通过膜。这样的小孔径将典型地形成烃类气体的屏障。如 Alentiev 的文章中的报道，形成的具有结晶性的聚合物尽管具有低水平的自由体积（对于 PTFE 是 14-18%），但相当程度是不能通透氧的，即，它们不是纳米孔的。熔融-可流动的部分晶质的含氟聚合物也具有较低的自由体积，这是由它们相对不通透氧而表明的。

用于本发明的聚合物的纳米孔结构应该与用于诸如过滤的微孔聚

合物结构进行区分，所述微孔聚合物结构是由诸如聚酰亚胺、聚砜、乙酸纤维素、聚芳酰胺和可以以 GORETEX®片材获得的多孔聚四氟乙烯的聚合物形成的，它们的孔径是微米范围的。1 微米 = 1000 纳米。因此，本发明采用的聚合物中的纳米孔比微孔聚合物基质中的孔小得多。

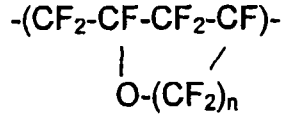
尽管微孔聚合物结构具有氧通透性，但由于聚合物中相对大的“洞”，不以某种方式处理或修饰以提供微孔的部分晶质的聚合物是氧的屏障，这是通过小于 425 厘巴（1 厘巴 = (cm^3 × cm/cm Hg cm^2) x 10^8)）的氧通透性而表明的。由于聚合物中存在结晶性，部分晶质的聚合物不是纳米孔的。必须对聚合物采用诸如上文提到的 Cientifica 文献中公开的技术之一，使其成为纳米孔的。

用于本发明的优选无定形纳米孔聚合物是无定形的全氟聚合物。用于本发明的一组无定形全氟聚合物是四氟乙烯 (TFE)与含有 3－8 个碳原子的全氟烯烃，优选六氟丙烯 (HFP)的共聚物，如美国专利 5,543,217 和 5,663,255 中公开的该共聚物，或四氟乙烯 (TFE)与全氟（烷基乙烯基醚）的共聚物，其中烷基含有 1 或 2 个碳原子，如美国专利 No. 5,919,878 中公开的该共聚物。在这两篇专利中，与 TFE 共聚的共聚单体的量足以提供得到的含氟聚合物的无定形状态。根据这两篇专利，掺入共聚物中以提供无定形状态所需要的最小量的 HFP 或全氟（乙基乙烯基醚）(PEVE)是大约 20 mol%。如果存在其它共聚单体，则可以使用更少的量。在 TFE/PEVE 共聚物的情况下，全氟（甲基乙烯基醚）(PMVE)的量可以超过 PEVE 的量，前提是 PEVE 占含氟聚合物中 PEVE 和 PMVE 的组合重量的至少 15 wt%。

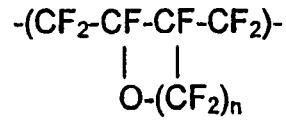
另一组无定形含氟聚合物是含有全氟化脂族环结构的那些，如全氟-2,2-二甲基-1 ,3-间二氧杂环戊烯 (PDD)。含氟聚合物可以是 PDD 的均聚物。在另一实施方案中，含氟聚合物是 PDD 的共聚物 (Alentiev 等描述的全氟间二氧杂环戊烯聚合物)，包括具有补充量的至少一种选自四氟乙烯、全氟（甲基乙烯基醚）、1,1-二氟乙烯和氯三氟乙烯的单体的共聚物。由于高度的气体通透性，优选的含氟聚合物是 PDD 和补充量的四氟乙烯的共聚物，特别是含有大约 65-99 摩尔%PDD 的聚合物。无定形聚合物优选具有至少约 140℃，更优选至少约 180℃的玻璃化转变温度。玻璃化转变温度(Tg)是本领域公知的，是指聚合物

从易碎的、玻璃质或玻璃样状态转变为橡胶状或塑性状态的温度。这些共聚物的实例公开于美国专利 Nos. 4,754,009 和 4,935,477。聚合物也可以是 PDD 与补充量的至少一种其它共聚单体的无定形共聚物，所述共聚物选自与全氟（丁烯基乙烯基醚）的二聚物和与全氟（丁烯基乙烯基醚）以及与第三种共聚单体的三聚物，其中第三种共聚单体可以是全卤烯烃，其中卤素是氟或氯中的至少一个，或是全氟（烷基乙烯基醚）；当存在第三种共聚单体时，其量优选最多是总组分的大约 40 摩尔%。所述含氟聚合物的 Tg 是从与四氟乙烯形成的具有较低量四氟乙烯共聚单体的二聚物的约 260℃到含有至少 60 摩尔%四氟乙烯的含氟聚合物的小于 100℃。可以用于本发明的其它含间二氧杂环戊烯的聚合物公开于美国专利 5,883,177，如 TFE 与 4,5,二氟-2,2-三氟甲基-1,3-间二氧杂环戊烯的共聚物。

用于本发明的另一组无定形含氟聚合物是具有在全氟（烯丙基乙烯基醚）或全氟（丁烯基乙烯基醚），如 $CF_2=CF-O-(CF_2)n-CF=CF_2$ 的聚合中形成的全氟化脂族环结构的聚合物，其中 n = 1 或 2，以形成含有环结构



和/或



的聚合物（其中 n 是整数 1 或 2）；及其共聚物，如 Nakamura 等的美国专利 No. 4,897,457 中的描述。

前述无定形含氟聚合物都是纳米孔的，因此具有氧通透性。

用于涂布纳米孔聚合物的原料是蛋白材料，其在形成涂层时表现出其两亲性质。蛋白材料可以具有宽范围的氨基酸序列，并且可以具有从肽到蛋白的大小。蛋白的一个实例是疏水蛋白，包括上文所述的疏水蛋白样材料。认为疏水蛋白包含 70－125 个氨基酸，而修饰的疏水蛋白可能达到 150 个氨基酸的长度：典型地，疏水蛋白含有保守排列的 8 个半胱氨酸。如 WO 2004/000880 中所公开的，疏水蛋白可以

截短为较短的氨基酸长度，其也可以用于本发明。具有更长长度，如多于约 500 个氨基酸的蛋白材料也可以用于本发明。可以用于本发明的其它蛋白材料的实例是 U.S. 2003/0134042 中公开的疏水蛋白和疏水蛋白样材料。具体的实例是 SC3 和 SC4 疏水蛋白(约 110 个氨基酸)。这些是 I 类疏水蛋白。II 类疏水蛋白的实例是 HBI 和 HFBII （约 80 个氨基酸）。疏水蛋白的另一个实例是 TT1（约 135 个氨基酸），即来自嗜热真菌嗜热踝节菌的 I 类疏水蛋白。下文将更详细描述该疏水蛋白。I 类疏水蛋白在诸如乙醇的极性溶剂中是不溶的，II 类疏水蛋白在这些溶剂中是可溶的。目前，来自多种真菌物种的超过 50 种疏水蛋白序列是已知的，并且可以获得，例如获自 GenBank 和国家生物技术信息中心(NCBI, Bethsda, MD)，这些疏水蛋白可以用于形成本发明中使用的两亲涂层。用于该涂布过程中的疏水蛋白可以包含其它蛋白，即，它不需要是 100％纯。

TT1 疏水蛋白是一种新发现的嗜热疏水蛋白，其是与本发明同一天提交的记录标识号 CL2504 的美国专利申请的主题。除去了分泌信号的成熟 TT1 蛋白的氨基酸和编码 DNA 序列分别示于 SEQ ID NOs: 1 和 2。具有完整分泌信号的前体 TT1 蛋白的氨基酸和编码 DNA 序列分别示于 SEQ ID NOs:3 和 4。"TT1 蛋白样品"是指用表达系统制备的部分纯化的 TT1 蛋白，所述表达系统中表达了编码成熟或前体 TT1 的多核苷酸。除 TT1 蛋白外，样品可以包含不排除于纯化方案之外的其它表达宿主蛋白。通过重组 DNA 技术，可以实现用于涂布纳米孔聚合物的 TT1 蛋白样品的制备。本领域技术人员已知如何制备包含适于在生产系统中表达前体或成熟 TT1 蛋白的 TT1 编码区的嵌合基因。优选的生产系统是分泌系统，其包括但不限于细菌表达系统，如芽孢杆菌属(Nagarajan, V et al. 1992 Gene 114:121-126)、酵母表达系统，如糖酵母属和毕赤酵母属，以及真菌系统，如木霉属 (Berquist, P. L. et al. 2004 32:293-7)和曲霉属(Gouka, RJ. et al. 1997 Appl Mictobiol Biotechnol 47:1-11)。为了表达，将 TT1 编码区可操作性连接于在需要的宿主中有功能的启动子，并且任选连接于其它调节信号序列，以制备嵌合基因。当用采用编码成熟 TT1 蛋白的 DNA 时，为了指导分泌，必须包括在嵌合基因中可操作性连接的编码分泌信号肽的多核苷酸序列。分泌信号肽可以来源于前体 TT1 蛋白，或它可以来源于异源

基因。用于芽孢杆菌属表达系统的分泌信号肽的实例描述于Nagarajan, V. et al. (1992, Gene 114:121-126)。用于表达系统中的分泌信号肽可以来源于在宿主中分泌的蛋白，例如，可以将疏水蛋白信号肽用于真菌表达系统中的分泌。

可以将多种标志物添加到嵌合基因，导致连接于表达的蛋白的肽标志物的表达。这些标志物的用途是本领域技术人员公知的，例如，用于检测和纯化表达的蛋白，因为标志物肽的抗体或将肽标志物吸附于基质的方法是可获得的。所述标志物的实例是 Flag 标志物和 His 标志物。

用于在木霉属表达 TT1 的嵌合基因构建体按照以下顺序包含以下成分:

1)来自木霉属 *cbh1*（纤维素霉）基因的启动子

2)编码 *cbh1* 前体蛋白的分泌信号肽的多核苷酸

3)不具有翻译终止密码子的编码成熟 TT1 蛋白的多核苷酸

4)编码 Flag 八肽和 His (6x)标志物的多核苷酸，所述多核苷酸是掺入用于促进筛选真菌转化体，并且帮助纯化，该多核苷酸后是翻译终止密码子

5)来自 *cbh1* 基因的转录终止序列

可以构建包含 TT1 嵌合基因的质粒载体，用于将嵌合基因转移到宿主中。质粒载体的选择依赖于选定的宿主和用于转化宿主细胞的方法。包含指导外来蛋白、标记基因和复制起点（如果需要）的高水平表达的调节序列的表达载体是本领域技术人员公知的。本领域技术人员充分了解为了成功转化、选择和繁殖含有重组 DNA 构建体或嵌合基因的宿主细胞而必须在质粒载体上存在的遗传元件。例如，可以包含选择标记基因，其用于鉴定转化体。重组 DNA 载体的转化可能得到一种质粒，其是宿主细胞的瞬时或复制稳定的存留物，或导致导入的 DNA 的全部或部分在宿主基因组中的整合。整合载体通常包括用于定向整合的宿主基因组的同源序列的多核苷酸。本领域技术人员也可以意识到，不同的独立整合稳定转化事件将导致不同水平的表达，因此必须筛选多个事件，以获得展示需要的表达水平的细胞系。所述筛选可以通过 DNA 的 Southern 分析、mRNA 表达的 Northern 分析、蛋白表达的 Western 分析或表型分析而实现。

优选用本领域技术人员熟悉的方法在真菌表达系统中制备 TT1，如 Scholtmeijer, M et al. (2002 Applied and Environmental Microbiology 68: 1367-1373)对裂褶菌属的描述，Gouka, R.J. et al. (1997 Appl Mictobiol Biotechnol 47:1-11)对曲霉属的描述，和 WO2000058342 对木霉属的描述。使通过选择鉴定的含上述嵌合基因构建体的转化体在含纤维素的培养基上生长，以诱导 *cbh1* 基因启动子的表达。采用抗 Flag 抗体，通过免疫检测分析 TT1 的产生，以鉴定最高表达菌株。可以通过本领域技术人员公知的方法对 TT1 多肽制备 TT1 的抗体，然后可以将其用作在转化体中免疫检测 TT1 的替代探针。

在真菌表达宿主中，可以阻断内源疏水蛋白的表达，使得内源疏水蛋白不与生产的疏水蛋白共同纯化。可以通过本领域技术人员公知的方法阻断内源基因表达，例如，通过去除编码基因或基因的一部分、在编码基因中插入阻断基因、破坏编码基因的启动子、表达内源疏水蛋白信使 RNA 的反义 RNA，和其它这样的方法。优选的是除去木霉属表达宿主菌株中的内源 HFB II 疏水蛋白表达，以生产 TT1。

可以用本领域技术人员公知的疏水蛋白纯化方法对表达的 TT1 蛋白进行部分纯化。这些方法通常涉及将疏水蛋白掺入其表面的泡沫的形成。可以通过诸如从位于容器底部的 Pt 阴极释放氢气泡的方法，并且通过快速混合产生，所述容器在介质表面下具有阳极(Scholtmeijer et al., 2002, Appl and Envrt. Microbio. 68:1367-1373)。收集泡沫样品，然后冻干。可以将样品重悬于三氟乙酸（TFA），然后通过蒸发到干燥而除去三氟乙酸，将样品重悬于水中。可以将 TT1 泡沫样品直接溶解于水，然后用 pH 7.5 的 15mM 乙酸铵脱盐。替代的疏水蛋白纯化法是将疏水蛋白吸附于表面，然后通过在低于 90℃的温度下在含有表面活性剂的溶液中温育，溶解吸附的疏水蛋白，并且分离得到的富含疏水蛋白的溶液(US20030166960)。可以按照下文所述，将部分纯化的疏水蛋白用于材料涂布应用中。或者，可以用 His 标志物、TT1 抗体或本领域技术人员公知的其它蛋白纯化方法制备进一步纯化的 TT1 蛋白。

在 TT1 涂布研究前，可以将 TT1 蛋白样品的冻干的粉末悬浮于小体积的三氟乙酸中，蒸发到干燥，然后重悬并稀释于除去气体的水

中。可以通过凝胶电泳分离样品中的蛋白，目测用考马斯亮蓝染色的蛋白，从而可以估计 TT1 的浓度。已知蛋白浓度的样品中 TT1 蛋白的百分比的估计值提供了 TT1 的蛋白浓度。可以在 TT1 涂层中包含于 TT1 共同纯化的其它蛋白。TT1 涂层可以是保留在材料表面的任何量的 TT1，使得该表面的水接触角改变约 15°，优选至少改变 20°。

本发明发现，两种类型的疏水蛋白作为纳米孔聚合物的涂层都是稳定和耐久的。长度长得多的两亲蛋白材料的一个实例是牛血清白蛋白（BSA），其可以获自 Sigma，并且是由超过 500 个氨基酸单位组成。

所有蛋白原料在水中都是可溶的，以便可以用水溶液将涂层涂布到纳米孔聚合物基质。该应用典型地涉及将基质浸入溶液中，维持获得需要的涂层的时间。尽管 TT1 疏水蛋白表现出当在高温下进行涂布操作时涂层形成速度增加的优点，但浸入过程优选在室温下进行，并且可以持续数小时。在浸入过程中，纳米孔聚合物基质对蛋白材料的亲水或疏水结构域的吸引力导致在基质上形成涂层。该疏水蛋白涂层在获得涂层的溶液中是不溶的。当基质疏水时，涂层的暴露表面容易是亲水性的，即，表现出比包被前的基质更小的接触角。当基质亲水时，涂层的暴露表面容易是疏水性的，即，表现出比包被前的基质更大的接触角。典型地，所述涂层在典型的 1 升/分钟的典型自来水流速下进行热（37℃）自来水冲洗时，所述涂层也是不溶的。然后在室温下晾干涂层。

涂层非常薄，以至于不可见；厚度通常不超过约 10 nm，但通过测量涂层表面的润湿角，并且将该润湿角于聚合物基质的润湿角相比，可以确定涂层的存在。优选地，两亲涂层使润湿角产生至少约 15° 的改变，更优选改变至少 20°。此处描述的润湿角是通过 van der Mei, H. C. et al. 1991 , Microbial Cell Surface Analysis, pp. 261-267, edited by D. S. Mozes et al., VCH, New York 描述的固着液滴法测量的，所述方法采用 Krus DSA MK2 仪器，和液滴形状分析软件程序。全氟聚合物典型地表现出约 110°的润湿角，其优选被本发明的蛋白涂层至少减少到 90°，更优选至少减少到 75°，甚至更优选至少减少到 60°。一些功能性全氟聚合物，如 TFE 与大约 15 摩尔 % PSEPVE (全氟-3,6-二氧杂-4-甲基-7-辛烯磺酰氟) 的共聚物表现出 90°的接触角，并且仍然被认为是疏水的，在该聚合物的基质上形成蛋白涂层，表现出 70°和更小

的接触角。相反，当根据本发明涂布表现出小于 60°的接触角的亲水聚合物时，其表现出至少 75°，更优选至少 90°的接触角。

尽管涂层厚度非常小，但如实施例所示，其仍然可以改变聚合物基质的水可湿性。但是，相对于聚合物基质中纳米孔的孔径，涂层的厚度仍然是大的，实际上，在涂层溶液中浸入纳米孔聚合物的涂布方法提供了使溶解的两亲蛋白材料进入孔的机会。通过纳米孔聚合物上涂层的稳定性/耐久性的增加，表明了一些进入。出乎意料地，涂布的纳米孔聚合物基质的氧通透性仍然是相当高的，优选是在聚合物基质上形成涂层前的通透性的至少约 80％。

由于无定形含氟聚合物具有很高的氧通透性，特别是在 PDD 间二氧杂环戊烯全氟聚合物的情况下，它们特别适于用作隐形眼镜。所述隐形眼镜比任何其它可获得的隐形眼镜材料更可透气（具有更高的氧通透性），例如，比任何其它可获得的隐形眼镜材料对氧的通透性高至少 5 倍。但是，无定形含氟聚合物是疏水性的，具有大于约 95°的水接触角。本发明的复合结构（其中纳米孔聚合物是无定形全氟聚合物膜的形式）提供了来自膜上的两亲蛋白涂层的水可湿表面，使得该富合结构可以用作隐形眼镜。膜仅仅是用于本发明的涂层的纳米孔聚合物的一种结构。所述膜可以是受支持的或非支持的，并且可以是单面的、弯曲的、或形成环形，如管状。在所有这些形式中，纳米孔聚合物即使在涂布后也作为膜，允许需要的分子种类如氧通过。本发明的复合结构的其它用途包括水下应用窗，如光学传感器、用于液体核心波导器的水可湿的包覆层、水可湿的排气管或膜、疏水的水可湿表面，如用于燃料室扩散器的碳化 PAN 或 PMMA 片、用于可透气但水不可湿的外衣、鞋、帽子和运动装备的疏水性水可湿的织物。

实施例

方法

制备蛋白材料溶液

通过 Bailey et al. 2002, Appl. Microbiol. Biotechnol 58 721-727 和 Linder et al. 2001 , Biomacromolecules 2, 511- 517 的方法制备的纯化的疏水蛋白 HFBII 购自 VTT Biotechnology (Finland). 按照 Wosten et al 1993, Plant Cell. 5, 1567-1574, 和 Scholtmeijer et al 2002, Appl.

Environ. Microbiol. 68, 1367-1373 的描述从群交裂褶菌 ATCC 44200 的培养物滤液纯化疏水蛋白 SC3。由 VTT Bioechnology (Finland)在 Trichoderma reesei 中克隆和超量表达，获得疏水蛋白 TT1。将 TT1 融合蛋白的冻干粉末溶解于小体积的三氟乙酸中，然后蒸发到干燥，然后重新溶解和稀释于脱气的水中。按照下文制备其它疏水蛋白的溶液。将冻干的 HFBII 粉末直接重悬于去离子和脱气的水中。将冻干的 SC3 粉末重悬于小体积的三氟乙酸(TFA)中，用氮流将其蒸发到干燥，然后重悬于脱气的水中(WO 01/57528 A1)。通过溶解于脱气的水中，将获自 Sigma (Aldrich 冻干粉末，目录号 7030)的牛血清白蛋白 BSA (约 660 个氨基酸)溶解于脱气的水中。用 Sigma (Sigma 程序 No. TPRO-562)供应的 Bicinchoninic Acid Protein Assay 试剂盒确定所有疏水蛋白冻干粉末的蛋白浓度。制备合适的稀释液，以提供下文实施例中的疏水蛋白浓度。

用纳米孔聚合物上的两亲涂层的蛋白材料进行表面涂布:

在经过清洁（丙酮、乙醇和水清洗）和干燥的聚合物表面进行平均孔径是大约 0.6nm 的四氟乙烯/全氟-2,2-二甲基-1 ,3-间二氧杂环戊烯膜的无定形共聚物的涂布，所述共聚物可以以 TEFLON® AF 2400 无定形含氟共聚物获得。清洁干燥的膜的 WCA (水接触角) 是 110°。室温下将共聚物的小的膜条(0.8 × 22 mm)浸入具有实施例中指出的浓度的蛋白材料的溶液中，持续 16 小时。从溶液取出浸入的条，用蒸馏水漂洗，晾干。在涂布的晾干的复合结构上测定 WCA。采用固着液滴技术，通过 WCA 测量值确定表面疏水性或亲水性，所述技术采用 Krus DSA MK2 仪器和液滴形状分析软件程序。从未涂布的膜表面与涂布的膜表面的 WCA 测量值的改变，推断出存在两亲蛋白涂层。

两亲蛋白涂层的坚固性:

通过用全压力（1 升/分钟）的热（37℃）自来水冲洗涂层 5 分钟，然后在室温下干燥涂布的膜（为了简便，该暴露称作自来水）并且重新测量涂布的膜的 WCA，评估两亲蛋白涂布的表面的坚固性或稳定性。也采用了更严苛的处理，如实施例 3 的描述。

实施例 1

在本实施例中，蛋白材料是各种溶液浓度的 BSA，如表 1 所示。

在施加来自每种溶液的涂层后和将涂层暴露于自来水后，确定涂布的膜的 WCA。这些实验在膜样品上重复，按照 TEFLON® AF2400 的膜的相同方式清洁和干燥，其中聚合物膜是可商购的部分晶质的四氟乙烯/全氟（丙基乙烯基醚）的共聚物，其熔点是大约 305℃，可以以 TEFLON PFA 1000LP 含氟聚合物 (DuPont Company, Wilmington DE USA)获得，WCA 为 110°，这些结果也示于表 1。

表 1. Teflon® AF2400 和 Teflon® PFA 1000LP 的 BSA 涂布

BSA 浓度 (μg/ml)	水接触角（度）			
	Teflon® AF2400		Teflon® PFA 1000LP	
	未处理	自来水	未处理	自来水
100	101	99	99	106
500	80	73	80	95
1000	81	74	77	85
2500	59	55	63	87

如表 1 所示，对于 AF 和 PFA 共聚物，随着涂布溶液中 BSA 浓度的增加，可湿性也增加（接触角减小）。但是，暴露于自来水，并没有增加 WCA（WCA 的增加表示涂层的不稳定性和缺乏耐久性），而是表现出 WCA 的进一步减小。相反，PFA 聚合物上的涂层的 WCA 随着暴露于自来水而增加。用其它两亲蛋白涂层也获得了相似结果。因此，与部分晶质的 PFA 聚合物相比，无定形聚合物基质的纳米孔结构增加了涂层的稳定性/耐久性，这是因为 PFA 的部分晶质性不是纳米孔的。

实施例 2

本实施例在表 2 中示出了上文所述用多种来自水溶液的蛋白材料涂布纳米孔聚合物的结构，以及导致的 WCA 减小。

表 2. Teflon® AF2400 的疏水蛋白和牛血清白蛋白涂布

蛋白	浸入蛋白浓度 (μg/ml)	水接触角 (度)
HFBII	220	54
SC3	50	38
BSA	2500	62
BSA	1000	78
无	对照	110

实施例 3

本实施例在表 3 中显示了在暴露于自来水时纳米孔聚合物上涂层的坚固性。在暴露于自来水时，SC3 和 BSA 涂层表现出 WCA 几乎没有改变，而 HFBII 的 WCA 增加到了仍然显著小于未涂布的聚合物的 WCA 的水平。暴露于调理溶液比自来水对 HFBII 涂层具有更小的作用。在该暴露后，BSA 涂层显示出了 WCA 的最小改变。随后更严苛的暴露处理是设计用于从隐形眼镜除去蛋白的酶溶液。HFBII 涂层的性能与暴露于自来水时同样好。SC3 涂层也具有很好的表现，而 BSA 涂层表现出 WCA 几乎没有增加。蛋白涂层的稳定性和耐久性使得它们承受了设计用于除去蛋白的溶液的去除作用。暴露于 Boston 清洁剂是最严苛的处理，如未涂布的聚合物的 WCA 的回复所表明的，其除去了大多数蛋白涂层。在本实施例中，与清洁剂的接触、调理溶液和酶溶液都是根据制造商(Boston)的标签说明书。

表 3. 从 Teflon® AF2400 除去疏水蛋白和牛血清白蛋白

蛋白 (μg/ml)	水接触角（度） 表面清洁 自来水 初始	最终	Boston 清洁剂 初始	最终	Boston 调理溶液 初始	最终	Boston 酶溶液 初始	最终
HFBII (220)	54	70	56	109	56	63	54	70
SC3 (50)	36	35	36	107	38	48	38	44
BSA (2500)	64	68	59	110	63	59	59	69

制造商对隐形眼镜应用描述了 Boston 调理溶液、酶溶液和清洁剂溶液，如下所示：

Boston Advance Comfort 调理溶液：无菌水性、轻微缓冲的高渗溶液，含有阳离子纤维素衍生物聚合物、纤维素粘度调节剂（viscofier）、聚乙烯醇和衍生的聚乙二醇作为润湿剂和缓冲剂；用葡糖酸洗必泰(0.003%)、聚氨基酸丙基双胍(0.0005%)和乙二胺四乙酸二钠(0.05%)作为防腐剂，用于与 Boston Advance 清洁剂一起使用时破坏有害生物。

Boston 液体酶清洁剂：一种无菌水溶液，含有蛋白水解酶（枯草杆菌蛋白酶）作为活性成分，并且含有甘油。不含防腐剂，用于除去蛋白沉积物。

Boston Advance 清洁剂：一种无菌、浓缩的均质表面活性剂溶液，含有硫酸烷酯、乙氧基化的烷基苯酚、基于三季胺可可脂的磷脂和二氧化硅作为清洁剂，含有二氧化钛用于清洁坚固的含氟丙烯酸硅酮和丙烯酸硅酮可透气隐形眼镜。

实施例 4

本实施例显示了涂布的纳米孔聚合物的氧通透性的出乎意料的保留。根据 ASTM D 3985-95 中的程序确定氧通透性。从这些结果，可以看出未涂布的聚合物的氧通透性非常高。尽管 HFBII 和 TT1 的涂层（溶液中的浓度是 16μg/ml）使润湿角减少了至少 43%，但保留了最初的氧通透性的至少 85%。

表 4: 疏水蛋白涂布的 Teflon® AF2400 的氧通透性

样品	水接触角（度）	O_2 通透 [(mil*cc)/(m^{2*} 天)]
对照	111	2,877,000
HFBII	64	2,621,000
SC3	30	2,532,000
TT1	61	2,441,000

<110> E I du Pont de Nemours and Company

<120> 纳米孔聚合物上的两亲蛋白涂层

<130> FL0270PCT

<160> 4

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 135
<212> PRT
<213> 嗜热踝节菌 (Talaromyces thermophilus)

<400> 1

Leu Pro Asn Val Gly Pro Ser Gly Lys Thr Ala His Lys Pro His Gln
1 5 10 15

Glu Pro Phe Trp Pro Val Gln Gln Asp Val Thr Val Glu Gln Ala Lys
20 25 30

Ala Ile Cys Gly Glu Gly Asn Gln Val Ala Cys Cys Asn Glu Val Ser
35 40 45

Tyr Ala Gly Asp Thr Thr Glu Ile Ala Thr Gly Pro Leu Ala Gly Thr
50 55 60

Leu Lys Asp Leu Leu Gly Gly Lys Asn Gly Ala Lys Gly Leu Gly Leu
65 70 75 80

Phe Asp Lys Cys Ser Arg Leu Asn Val Asp Leu Leu Leu Gly Leu Ser
85 90 95

Ser Leu Ile Asn Gln Glu Cys Lys Gln His Ile Ala Cys Cys Gln Gly
100 105 110

Asn Glu Ala Asp Ser Ser Asn Asp Leu Ile Gly Leu Asn Ile Pro Cys
115 120 125

Ile Ala Leu Gly Ser Leu Leu
130 135

<210> 2
<211> 405

<212> DNA
<213> 嗜热踝节菌

<400> 2
ctgccaaacg tcggtcccag tgggaagacg gctcacaagc cgcaccagga gcctttctgg 60

cctgtgcagc aggacgtgac cgtggaacag gccaaggcta tctgtggtga aggcaaccag 120

gtcgcttgct gcaacgaggt cagctacgcg ggcgacacca ccgaaatcgc gaccggcccc 180

ctggctggca ccctcaagga cctgctcggc ggcaagaacg gcgccaaggg cctgggtctc 240

ttcgacaagt gctcgcgtct caatgtcgat ctcctgcttg gcctgtcgag cctcatcaac 300

caagaatgca agcagcacat tgcctgctgc cagggcaacg aggccgattc ctccaacgac 360

ctcatcggtc tcaacattcc ttgcattgcc cttggctcgc tgctg 405

<210> 3
<211> 151
<212> PRT
<213> 嗜热踝节菌

<400> 3

Met Lys Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Val Ala Ala Ala Ala Thr Ala
1 5 10 15

Leu Pro Asn Val Gly Pro Ser Gly Lys Thr Ala His Lys Pro His Gln
20 25 30

Glu Pro Phe Trp Pro Val Gln Gln Asp Val Thr Val Glu Gln Ala Lys
35 40 45

Ala Ile Cys Gly Glu Gly Asn Gln Val Ala Cys Cys Asn Glu Val Ser
50 55 60

Tyr Ala Gly Asp Thr Thr Glu Ile Ala Thr Gly Pro Leu Ala Gly Thr
65 70 75 80

Leu Lys Asp Leu Leu Gly Gly Lys Asn Gly Ala Lys Gly Leu Gly Leu
85 90 95

Phe Asp Lys Cys Ser Arg Leu Asn Val Asp Leu Leu Leu Gly Leu Ser
100 105 110

Ser Leu Ile Asn Gln Glu Cys Lys Gln His Ile Ala Cys Cys Gln Gly
115 120 125

Asn Glu Ala Asp Ser Ser Asn Asp Leu Ile Gly Leu Asn Ile Pro Cys
130 135 140

Ile Ala Leu Gly Ser Leu Leu
145 150

<210> 4
<211> 453
<212> DNA
<213> 嗜热踝节菌

<400> 4
atgaagttcg ccggtgtctt gcttgctgtc gccgctgcgg cgactgccct gccaaacgtc 60

ggtcccagtg ggaagacggc tcacaagccg caccaggagc ctttctggcc tgtgcagcag 120

gacgtgaccg tggaacaggc caaggctatc tgtggtgaag gcaaccaggt cgcttgctgc 180

aacgaggtca gctacgcggg cgacaccacc gaaatcgcga ccggcccccc ggctggcacc 240

ctcaaggacc tgctcggcgg caagaacggc gccaagggcc tgggtctctt cgacaagtgc 300

tcgcgtctca atgtcgatct cctgcttggc ctgtcgagcc tcatcaacca agaatgcaag 360

cagcacattg cctgctgcca gggcaacgag gccgattcct ccaacgacct catcggtctc 420

aacattcctt gcattgccct tggctcgctg ctg 453