



(21) 申请号 202210236624.8

(22) 申请日 2022.03.11

(30) 优先权数据

10-2021-0032773 2021.03.12 KR

10-2022-0003448 2022.01.10 KR

(71) 申请人 浦项工科大学校产学协力团

地址 韩国庆尚北道浦项市

(72) 发明人 车炯準 梁壮宇 朱桂一

(74) 专利代理机构 北京华睿卓成知识产权代理

事务所(普通合伙) 11436

专利代理师 程淼 刘海

(51) Int.Cl.

A61L 24/04 (2006.01)

A61L 24/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书14页

序列表15页 附图15页

(54) 发明名称

包含贻贝粘附蛋白的生物粘合剂组合物及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及生物粘合剂组合物及其制备方法,上述生物粘合剂组合物包含:贻贝粘附蛋白;以及聚丙烯酸及聚甲基丙烯酸中的至少一种,上述贻贝粘附蛋白与上述聚丙烯酸及聚甲基丙烯酸中的至少一种通过酰胺键来连接,上述生物粘合剂组合物具有三维网状结构。

1. 一种生物粘合剂组合物,其特征在于,包含:
贻贝粘附蛋白;以及
聚丙烯酸及聚甲基丙烯酸中的至少一种,
上述贻贝粘附蛋白与上述聚丙烯酸及聚甲基丙烯酸中的至少一种通过酰胺键来连接,
上述生物粘合剂组合物具有三维网状结构。
2. 根据权利要求1所述的生物粘合剂组合物,其特征在于,上述贻贝粘附蛋白由选自自由序列1、序列2、序列3、序列4、序列5、序列6、序列7、序列8、序列9、序列10、序列11、序列12、序列13、序列14及序列15组成的组中的一种以上的氨基酸序列组成。
3. 根据权利要求1所述的生物粘合剂组合物,其特征在于,贻贝粘附蛋白为酪氨酸残基转化为儿茶酚化合物的贻贝粘附蛋白、在贻贝粘附蛋白表面导入儿茶酚衍生物的贻贝粘附蛋白或者包括以上两者的贻贝粘附蛋白。
4. 根据权利要求3所述的生物粘合剂组合物,其特征在于,儿茶酚化合物为选自多巴、多巴邻醌、6-羟基多巴、6-羟基多巴醌以及它们的衍生物组成的组中的一种以上。
5. 根据权利要求1所述的生物粘合剂组合物,其特征在于,上述生物粘合剂组合物为上述贻贝粘附蛋白及聚丙烯酸通过酰胺键结合的第一成分、或上述贻贝粘附蛋白及聚甲基丙烯酸通过酰胺键结合的第二成分、或上述第一成分与第二成分的混合物。
6. 根据权利要求5所述的生物粘合剂组合物,其特征在于,第一成分或第二成分所包含的贻贝粘附蛋白与聚丙烯酸或聚甲基丙烯酸的质量比为1:1至1:5。
7. 根据权利要求6所述的生物粘合剂组合物,其特征在于,第一成分或第二成分所包含的贻贝粘附蛋白与聚丙烯酸或聚甲基丙烯酸的质量比为1:2.5至1:3.5。
8. 根据权利要求5所述的生物粘合剂组合物,其特征在于,以3:1至1:3的质量比混合上述第一成分与第二成分。
9. 根据权利要求1所述的生物粘合剂组合物,其特征在于,上述生物粘合剂组合物在干燥状态下显出非粘合性及非降解性,而在潮湿状态下显出粘合性及生物降解性。
10. 根据权利要求1所述的生物粘合剂组合物,其特征在于,生物粘合剂组合物为薄膜、单面或双面胶带或者水凝胶。
11. 一种生物粘合剂组合物的制备方法,其特征在于,包括:
步骤(a),制备由包含贻贝粘附蛋白的溶液与包含丙烯酸N-羟琥珀酸亚胺酯及甲基丙烯酸酐中的至少一种的溶液混合而成的混合溶液;
步骤(b),在上述混合溶液中溶解光引发剂;
步骤(c),向上述混合溶液中加入丙烯酸单体及甲基丙烯酸单体中的至少一种;以及
步骤(d),使上述混合溶液固化。
12. 根据权利要求11所述的生物粘合剂组合物的制备方法,其特征在于,上述生物粘合剂组合物的制备方法包括:
步骤(a-1),分别制备由包含贻贝粘附蛋白的溶液与包含丙烯酸N-羟琥珀酸亚胺酯的溶液混合而成的第一混合溶液以及由包含贻贝粘附蛋白的溶液与包含甲基丙烯酸酐的溶液混合而成的第二混合溶液;
步骤(b-1),分别在上述第一混合溶液及第二混合溶液中溶解光引发剂;

步骤(c-1),向上述第一混合溶液中加入丙烯酸单体,向上述第二混合溶液中加入甲基丙烯酸单体;以及

步骤(d-1),混合上述第一混合溶液及第二混合溶液后使其固化。

13.根据权利要求11所述的生物粘合剂组合物的制备方法,其特征在于,光引发剂为 α -酮戊二酸。

14.根据权利要求11所述的生物粘合剂组合物的制备方法,其特征在于,以混合溶液总重量为基准,包含7重量百分比至15重量百分比的贻贝粘附蛋白。

15.根据权利要求11所述的生物粘合剂组合物的制备方法,其特征在于,以混合溶液总重量为基准,包含0.6重量百分比至2.0重量百分比的丙烯酸N-羟琥珀酸亚胺酯及甲基丙烯酸酐中的至少一种。

16.根据权利要求11所述的生物粘合剂组合物的制备方法,其特征在于,以混合溶液总重量为基准,包含0.1重量百分比至0.4重量百分比的光引发剂。

17.根据权利要求12所述的生物粘合剂组合物的制备方法,其特征在于,上述步骤(d-1)为以3:1至1:3的质量比混合上述第一混合溶液与第二混合溶液的步骤。

18.根据权利要求11所述的生物粘合剂组合物的制备方法,其特征在于,上述生物粘合剂组合物在干燥状态下显出非粘合性及非降解性,而在潮湿状态下显出粘合性及生物降解性。

19.根据权利要求11所述的生物粘合剂组合物的制备方法,其特征在于,上述贻贝粘附蛋白为酪氨酸残基转化为儿茶酚化合物的贻贝粘附蛋白,上述儿茶酚化合物选自由多巴、多巴邻醌、6-羟基多巴、6-羟基多巴醌以及它们的衍生物组成的组中的一种以上。

20.根据权利要求11所述的生物粘合剂组合物的制备方法,其特征在于,上述贻贝粘附蛋白由选自由序列1、序列2、序列3、序列4、序列5、序列6、序列7、序列8、序列9、序列10、序列11、序列12、序列13、序列14及序列15组成的组中的一种以上的氨基酸序列组成。

包含贻贝粘附蛋白的生物粘合剂组合物及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及包含贻贝粘附蛋白的生物粘合剂组合物及其制备方法,更详细地,涉及能够应用于生物医学的包含贻贝粘附蛋白的生物粘合剂组合物及其制备方法。

背景技术

[0002] 生物粘合剂是指在生物的细胞膜、细胞壁、脂质、蛋白质、脱氧核糖核酸(DNA)、生长因子、细胞、组织等多种生物试样中具有粘合特性的物质,可以应用于组织粘合剂、止血剂、组织工程支架(scaffold)、药物传递载体(drug delivery carrier)、组织填充剂(tissue augmentation)、伤口治疗剂或者抗粘连剂等多种生物医学领域。

[0003] 这种生物粘合剂需要强力的粘合能力及交联能力,应在生物体中长期保持其功能。现在商业化或者实用化的生物粘合剂有氰基丙烯酸酯(cyanoacrylate)瞬间胶粘剂、纤维蛋白胶(fibrin glue)、明胶(gelatin glue)以及聚氨酯粘合剂等。

[0004] 然而,在利用合成高分子的生物粘合剂的情况下,在生物体内有水溶液的状态下显出很弱的粘合力,在氰基丙烯酸酯系列生物粘合剂的情况下,被指出具有在人体引起免疫反应等副作用的很大局限性。

[0005] 并且,在纤维蛋白胶系列生物粘合剂的情况下,虽然在人体内免疫反应等副作用少,但由于价格昂贵且粘合力很低,因此在使用上受限制,而在明胶生物粘合剂的情况下,用作交联剂的福尔马林(formalin)或戊二醛(glutaraldehyde)在生物体内还与蛋白质发生交联反应,因此具有引起组织毒性的问题,在聚氨酯生物粘合剂的情况下,作为合成原料的芳香族二异氰酸酯(diisocyanate)具有引起生物毒性的问题。

[0006] 相反,作为海洋生物的贻贝(mussel)可以通过生成及分泌粘附蛋白(adhesive proteins)来使贻贝自身坚固地附着于海中的岩石之类的潮湿的固体表面,不受波浪的冲击或海水浮力效应的影响。贻贝粘附蛋白已知为强力的天然粘合剂,与化学合成粘合剂相比,在表现出比大部分环氧树脂高两倍左右的抗拉强度的同时还具有能够弯曲的柔软性。

[0007] 并且,贻贝粘附蛋白具有能够粘附于塑料、玻璃、金属、聚四氟乙烯及生物物质等多种表面的能力,也可以在潮湿的表面上粘附几分钟,而这是在化学粘合剂的开发中仍未解决的一项难题。

[0008] 而且,已知贻贝粘附蛋白不攻击人类细胞或者引起免疫反应,因此应用于手术时粘合活体组织或粘合断裂的牙齿等医学领域的可能性大。上述贻贝粘附蛋白也可以用在细胞的表面粘合,细胞的表面粘合技术使细胞培养及组织工程领域所需的非常重要的技术之一,在促进细胞的增殖及分化方面非常重要。

[0009] 因此,需要利用贻贝粘附蛋白的多种生物医学应用。

发明内容

[0010] 技术问题

[0011] 本发明所要解决的问题为提供包含贻贝粘附蛋白的生物粘合剂组合物,该组合物

可以用作生物粘合胶带或者薄膜,可以调节降解时间。

[0012] 本发明所要解决的另一个问题为提供上述生物粘合剂组合物的制备方法。

[0013] 技术方案

[0014] 为了解决上述问题,本发明提供一种生物粘合剂组合物,包含:贻贝粘附蛋白;以及聚丙烯酸及聚甲基丙烯酸中的至少一种。上述贻贝粘附蛋白与上述聚丙烯酸及聚甲基丙烯酸中的至少一种通过酰胺键来连接,上述生物粘合剂组合物具有三维网状结构。

[0015] 上述贻贝粘附蛋白可以由选自序列1、序列2、序列3、序列4、序列5、序列6、序列7、序列8、序列9、序列10、序列11、序列12、序列13、序列14及序列15组成的组中的一种以上的氨基酸序列组成。

[0016] 贻贝粘附蛋白可以为酪氨酸残基转化为儿茶酚化合物的贻贝粘附蛋白、在贻贝粘附蛋白表面导入儿茶酚衍生物的贻贝粘附蛋白或者包括以上两者的贻贝粘附蛋白。

[0017] 上述儿茶酚化合物可以为选自由多巴(3,4-dihydroxyphenylalanine,DOPA)、多巴邻醌(Dopa o-quinone)、6-羟基多巴(2,4,5-trihydroxyphenylalanine,TOPA)、6-羟基多巴醌(Topa quinone)以及它们的衍生物组成的组中的一种以上。

[0018] 上述生物粘合剂组合物可以为上述贻贝粘附蛋白及聚丙烯酸通过酰胺键结合的第一成分、或上述贻贝粘附蛋白及聚甲基丙烯酸通过酰胺键结合的第二成分、或上述第一成分与第二成分的混合物。上述第一成分或第二成分所包含的贻贝粘附蛋白与聚丙烯酸或聚甲基丙烯酸的质量比可以为1:1至1:5。

[0019] 上述第一成分或第二成分所包含的贻贝粘附蛋白与聚丙烯酸或聚甲基丙烯酸的质量比可以为1:2.5至1:3.5。

[0020] 能够以3:1至1:3的质量比混合上述第一成分与第二成分。

[0021] 上述生物粘合剂组合物可以在干燥状态下显出非粘合性及非降解性,而在潮湿状态下显出粘合性及生物降解性。

[0022] 上述生物粘合剂组合物可以为薄膜、单面或双面胶带或者水凝胶。

[0023] 并且,本发明提供一种生物粘合剂组合物的制备方法,包括:步骤(a),制备由包含贻贝粘附蛋白的溶液与包含丙烯酸N-羟琥珀酸亚胺酯及甲基丙烯酸酐中的至少一种的溶液混合而成的混合溶液;步骤(b),在上述混合溶液中溶解光引发剂;步骤(c),向上述混合溶液中加入丙烯酸单体及甲基丙烯酸单体中的至少一种;以及步骤(d),使上述混合溶液固化;

[0024] 具体地,本发明提供一种生物粘合剂组合物的制备方法,包括:步骤(a-1),分别制备由包含贻贝粘附蛋白的溶液与包含丙烯酸N-羟琥珀酸亚胺酯的溶液混合而成的第一混合溶液以及由包含贻贝粘附蛋白的溶液与包含甲基丙烯酸酐的溶液混合而成的第二混合溶液;步骤(b-1),分别在上述第一混合溶液及第二混合溶液中溶解光引发剂;步骤(c-1),向上述第一混合溶液中加入丙烯酸单体,向上述第二混合溶液中加入甲基丙烯酸单体;以及步骤(d-1),混合上述第一混合溶液及第二混合溶液后使其固化。

[0025] 作为再一具体例,本发明提供一种生物粘合剂组合物的制备方法,包括:步骤(a-2),制备由包含贻贝粘附蛋白的溶液与包含丙烯酸N-羟琥珀酸亚胺酯的溶液混合而成的混合溶液;步骤(b-2),在上述混合溶液中溶解光引发剂;步骤(c-2),加入丙烯酸单体;以及步骤(d-2),固化。

[0026] 作为还有一具体例,本发明提供一种生物粘合剂组合物的制备方法,包括:步骤(a-3),制备由包含贻贝粘附蛋白的溶液与包含甲基丙烯酸酐的溶液混合而成的混合溶液;步骤(b-3),在上述混合溶液中溶解光引发剂;步骤(c-3),加入甲基丙烯酸单体;以及步骤(d-3),固化。

[0027] 上述光引发剂可以为 α -酮戊二酸。

[0028] 以混合溶液总重量为基准,可以包含7重量百分比至15重量百分比的上述贻贝粘附蛋白。

[0029] 以混合溶液总重量为基准,可以包含0.6重量百分比至2.0重量百分比的上述丙烯酸N-羧琥珀酸亚胺酯及甲基丙烯酸酐中的至少一种。

[0030] 以混合溶液总重量为基准,可以包含0.1重量百分比至0.4重量百分比的上述光引发剂。

[0031] 上述步骤(d-1)可以为以3:1至1:3的质量比混合上述第一混合溶液与第二混合溶液的步骤。

[0032] 在上述步骤(d-2)中,贻贝粘附蛋白与丙烯酸单体的质量比可以为以1:1至1:5。

[0033] 发明的效果

[0034] 本发明的生物粘合剂组合物形成贻贝粘附蛋白与聚(甲基)丙烯酸通过酰胺键连接的三维网状结构,在干燥状态下显出非粘合性及非降解性,在潮湿状态下生物粘合能力优异,可以用作能够在生物酶的作用下可生物降解的生物粘合胶带或薄膜。

[0035] 并且,本发明的生物粘合剂组合物通过使两个贻贝粘附蛋白分别与聚(甲基)丙烯酸交联后调节它们的混合比,从而可以调节降解时间,不浸出有毒性的(甲基)丙烯酸单体,因此生物稳定性非常突出,由于无细胞毒性或细胞毒性非常低,因此可以用于需要生物粘合的多种生物医学应用中。

[0036] 并且,本发明的生物粘合剂组合物可以用作双面胶带或薄膜,可以用作基于生物材料的组织粘合剂,粘贴用于体内信号转导及药物给药的限时电路等,粘合后可以在无需额外手术的情况下实现器官的正常化及周期性药物给药。

[0037] 本发明的效果不限于上述效果,应该理解的是,还包括能够通过本发明的详细说明或者发明要求保护范围记载的发明结构推论出的所有效果。

附图说明

[0038] 图1图示本发明的实施例1的贻贝粘附蛋白及聚丙烯酸通过酰胺键结合的第一成分。

[0039] 图2图示本发明的实施例2的贻贝粘附蛋白及聚甲基丙烯酸通过酰胺键结合的第二成分。

[0040] 图3A示出现有的贻贝粘附蛋白(FP-151)的MALDI质谱,图3B示出实施例2中制备的甲基丙烯酸酯化的贻贝粘附蛋白的MALDI质谱。

[0041] 图4A示出现有的贻贝粘附蛋白(FP-151)的傅里叶变换红外光谱(FT-IR)数据,图4B示出实施例2中制备的甲基丙烯酸酯化的贻贝粘附蛋白的傅里叶变换红外光谱数据,图4C为通过傅里叶变换红外光谱确认实施例7的组合物合成与否的结果。

[0042] 图5为确认根据本发明的实施例1至实施例3制备的生物粘合剂组合物的降解度数

据的结果。

[0043] 图6为确认根据本发明的实施例1至实施例3制备的生物粘合剂组合物的粘合力的结果。

[0044] 图7A至图7D为评估本发明的生物粘合剂组合物的细胞毒性的结果,图7A为以柱状图示出的使用微孔板分光光度计测定在450nm波长处的实施例3的吸光度的CCK-8测试结果,图7B为进行活/死测试(Live-dead assay)来确认实施例3的细胞存活的结果(存活细胞为绿色、死亡细胞为红色),图7C为以柱状图示出的使用微孔板分光光度计测定在450nm波长处的实施例7的吸光度的CCK-8测试结果,图7D为进行活/死测试来确认实施例7的细胞存活的结果(存活细胞为绿色、死亡细胞为红色)。

[0045] 图8A为确认根据本发明的实施例1至实施例5制备的生物粘合剂组合物的干燥状态的图像,图8B为确认根据实施例6至实施例9制备的组合物的干燥状态的图像,图8C为比较并示出根据比较例1、比较例2及实施例7制备的组合物的干燥状态的图像。

[0046] 图9为在不存在生物酶及存在生物酶的情况下评估本发明的生物粘合剂组合物的生物降解性的结果。

[0047] 图10为利用本发明的实施例7的生物粘合剂组合物、比较例2的组合物及市售的粘合剂来在猪的皮肤中确认水中粘合能力的结果。

[0048] 图11A及图11B为本发明实施例2的生物粘合剂组合物的拉力测试结果。图11A为干燥状态的胶带拉力测试结果,图11B为潮湿状态的胶带拉力测试结果。

[0049] 图12A及图12B为在猪膀胱中通过反复的收缩/膨胀测试来确认本发明的实施例7的生物粘合剂组合物的拉力测试的结果,图12A为市售的防粘连薄膜的结果,图12B为实施例7的生物粘合剂组合物的结果。

具体实施方式

[0050] 在下述说明中应注意的是,将只说明理解本发明的实施例所需的部分,此外的部分将在不混淆本发明的要旨的范围内加以省略。

[0051] 在以下说明的本说明书及发明要求保护范围中所使用的术语或单词不应局限于通常的含义或词典的含义来解释,而应从发明人可以为以最优选的方法说明其发明而适当地定义术语的概念的原则出发,解释为符合本发明技术思想的含义和概念。因此,本说明书中记载的实施例和附图中示出的结构仅为本发明的优选实施例而已,不代表本发明的所有技术思想,因此,应该理解的是,在提出本申请时还可以有能够代替其的多种同等物和变形例。

[0052] 以下,详细说明本发明。

[0053] 本发明提供生物粘合剂组合物,包含:贻贝粘附蛋白;以及聚丙烯酸及聚甲基丙烯酸中的至少一种。上述贻贝粘附蛋白与上述聚丙烯酸及聚甲基丙烯酸中的至少一种通过酰胺键来连接,上述生物粘合剂组合物具有三维网状结构。

[0054] 上述贻贝粘附蛋白为源自贻贝的足丝的蛋白质,优选地,包括源自紫壳菜蛤(*Mytilus edulis*)、紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)或厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)的贻贝粘附蛋白或者其变体,但不限于于此。

[0055] 本发明的贻贝粘附蛋白可以包括分别源自上述贻贝种的Mefp(紫壳菜蛤足丝蛋白

(*Mytilus edulis* foot protein))-1、Mgfp(紫贻贝足丝蛋白(*Mytilus galloprovincialis* foot protein))-1、Mcfp(厚壳贻贝足丝蛋白(*Mytilus coruscus* foot protein))-1、Mefp-2、Mefp-3、Mgfp-3及Mgfp-5或者其变体,优选地,包括选自由fp(足丝蛋白(foot protein))-1(序列1)、fp-2(序列4)、fp-3(序列5)、fp-4(序列6)、fp-5(序列7)及fp-6(序列8)组成的组中的蛋白质,或者连接两种以上蛋白质的融合蛋白,或者上述蛋白质的变体,但不限于此。

[0056] 并且,本发明的贻贝粘附蛋白包括国际公开第W02006/107183号或者第W02005/092920记载的所有贻贝粘附蛋白。优选地,上述贻贝粘附蛋白可以包括选自由fp-151(序列9)、fp-131(序列10)、fp-353(序列11)、fp-153(序列12)及fp-351(序列13)组成的组中的融合蛋白,但不限于此。

[0057] 并且,本发明的贻贝粘附蛋白可以包括在连续连接在fp-1中重复80次左右的十肽(序列2)1次至12次或者以上的多肽。优选地,可以为连续连接上述序列2的十肽12次的fp-1变体(variant)多肽(序列3),但不限于此。

[0058] 并且,本发明的贻贝粘附蛋白可以为fp-151的变体(序列15),但不限于此。与序列9相比,序列15的蛋白质序列是除去链接序列等的序列。具体地,是在由序列14表示的fp-1变体序列之间融合由序列16表示的Mgfp-5序列的融合蛋白序列。更具体地,本发明的贻贝粘附蛋白可以由选自由序列1、序列2、序列3、序列4、序列5、序列6、序列7、序列8、序列9、序列10、序列11、序列12、序列13、序列14、序列15及序列16组成的组中的一种以上的氨基酸序列组成。

[0059] 本发明的贻贝粘附蛋白还可以在包括能够保持上述提及的贻贝粘附蛋白的特性的保守氨基酸序列的范围内变形。即,本发明的范畴可以包括与实质上显出相同效果的上述序列的氨基酸序列具有70%以上序列同一性的氨基酸序列,优选地,可以包括具有80%以上序列同一性的氨基酸序列,更优选地,可以包括具有90%以上,即95%、96%、97%、98%、99%或者以上的序列同一性的氨基酸序列。

[0060] 上述贻贝粘附蛋白可以为酪氨酸残基转化为儿茶酚化合物的贻贝粘附蛋白、在贻贝粘附蛋白表面导入儿茶酚衍生物的贻贝粘附蛋白或者包括以上两者的贻贝粘附蛋白。

[0061] 优选地,本发明的上述贻贝粘附蛋白为酪氨酸残基转化为儿茶酚化合物的贻贝粘附蛋白,优选地,为总酪氨酸残基的10%~100%转化为儿茶酚化合物的贻贝粘附蛋白。在大部分贻贝粘附蛋白的总氨基酸序列中,酪氨酸所占的比例可以为约1%~50%。贻贝粘附蛋白中的酪氨酸可以通过水合过程添加OH基来转化为作为儿茶酚化合物的多巴(DOPA)。

[0062] 然而,在大肠杆菌中生产的贻贝粘附蛋白的酪氨酸残基不被转化,因此,优选地,进行通过额外的酶及化学处理方法使酪氨酸转化为多巴的修饰反应。将贻贝粘附蛋白所包含的酪氨酸残基转化为多巴的修饰方法可以使用本发明所属技术领域已知的方法,不受特别限制。

[0063] 上述儿茶酚化合物为包含二羟基的化合物,是指通过交联作用来赋予贻贝粘附蛋白粘合力的化合物。具体地,可以为选自由多巴、多巴邻醌、6-羟基多巴、6-羟基多巴醌以及它们的衍生物组成的组中的一种以上。

[0064] 在本发明中,优选地,贻贝粘附蛋白的变体(mutants)可以为在保持贻贝粘附蛋白的粘合力的前提下,在上述贻贝粘附蛋白的羧基末端或氨基末端包含额外的序列,或者一

部分氨基酸转化为其他氨基酸的粘附蛋白。更优选地,可以为在上述贻贝粘附蛋白的羧基末端或者氨基末端连接由包含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)的由3个至25个氨基酸形成的多肽的贻贝粘附蛋白,或者为形成贻贝粘附蛋白的酪氨酸残基总数的1%至100%,优选地,5%至100%转化为3,4-二羟基苯基-L-丙氨酸(多巴)的贻贝粘附蛋白。

[0065] 优选地,上述贻贝粘附蛋白能够以可表达的方式插入以能够表达外部基因的用途制备的普通载体,通过遗传工程的方法大量生产。可以根据用于生产蛋白质的宿主细胞的种类及特性适当选择上述载体或新制备。将上述载体在宿主细胞中转化的方法及从转化体中生产重组蛋白的方法可以通过通常的方法轻松实施。本发明所属技术领域的普通技术人员可以轻松实施上述载体的选择、制备、转化及重组蛋白的表达等的方法,通常方法的一部分变形也包括于本发明。

[0066] 本发明的生物粘合剂组合物包含:贻贝粘附蛋白;以及聚丙烯酸及聚甲基丙烯酸中的至少一种,具体地,可以为上述贻贝粘附蛋白及聚丙烯酸通过酰胺键结合的第一成分、或上述贻贝粘附蛋白及聚甲基丙烯酸通过酰胺键结合的第二成分、或上述第一成分与第二成分的混合物。

[0067] 上述第一成分或第二成分所包含的贻贝粘附蛋白与聚丙烯酸或聚甲基丙烯酸的质量比可以为1:1至1:5,优选地,可以为1:2.5至1:3.5,更优选地,可以为1:3。可以通过调节上述贻贝粘附蛋白与聚丙烯酸或聚甲基丙烯酸的含量比(质量比)来调节制备的组合物物性。

[0068] 若本发明的生物粘合剂组合物中聚丙烯酸或聚甲基丙烯酸的含量相比于贻贝粘附蛋白小于上述范围,则组合物内会剩下残余的蛋白质结晶,在制备薄膜及胶带等时,会降低薄膜的柔软性,例如,会折断或破碎,昂贵的蛋白质因未反应而废弃,从而降低经济性。另一方面,若聚丙烯酸或聚甲基丙烯酸的含量大于上述范围,则会因组合物中的聚丙烯酸或聚甲基丙烯酸的比例过高而妨碍贻贝粘附蛋白的多巴胺残基的水中附着力,从而降低粘合力。

[0069] 相反,在包含上述范围的含量的聚丙烯酸或聚甲基丙烯酸的情况下,组合物内不存在未反应的蛋白质,从而可以将组合物制备为柔软性和抗拉强度突出的薄膜及胶带等,使制备的组合物通过贻贝粘附蛋白的多巴胺残基的水中附着力最大化,可以制备生物降解性优异且无细胞毒性或细胞毒性非常低的组合物。

[0070] 本发明的生物粘合剂组合物可以单独包含上述第一成分或第二成分,例如,第一成分:第二成分的质量比可以为10:0或0:10。

[0071] 并且,本发明的生物粘合剂组合物可以为上述第一成分及第二成分的混合物,在混合上述第一成分及第二成分的情况下,上述第一成分:第二成分的质量比可以为9:1至1:9,优选地,可以为3:1至1:3,更优选地,可以为1:1。在混合上述第一成分及第二成分的情况下,本发明的生物粘合剂组合物可以通过调节上述第一成分及第二成分的混合比(质量比)制备薄膜及胶带等来在生物体内粘合时调节降解时间。并且,若在上述混合比内使贻贝粘附蛋白最大化且不被结晶化,则可以不浪费蛋白质。

[0072] 本发明的生物粘合剂组合物为本发明的贻贝粘附蛋白与聚丙烯酸及聚甲基丙烯酸中的至少一种通过酰胺键结合的三维网状结构的生物粘合剂组合物,在干燥状态下不显出粘合力,为非降解性,但在潮湿(湿润)状态下,可以显出粘合性及生物降解性。在湿润状

态下,通过组合物中的贻贝粘附蛋白与聚丙烯酰基或聚甲基丙烯酸酯基之间的范德华力、亲水性引力和贻贝粘附蛋白的儿茶酚残基,例如多巴胺残基的水中粘合力等的共同作用提高粘合力。

[0073] 并且,本发明的生物粘合剂组合物为本发明的贻贝粘附蛋白与聚丙烯酸及聚甲基丙烯酸中的至少一种通过酰胺键结合的三维网状结构的生物粘合剂组合物,可以在生物体内通过生物酶被生物降解。本发明的上述生物粘合剂组合物即使在生物降解的情况下也不从组合物中分离或溶出丙烯酸单体,因此,无细胞毒性且稳定性突出。

[0074] 本发明上述生物粘合剂组合物可以为薄膜、单面或双面胶带或者水凝胶形式,但不限于于此,可以有效应用于需要生物粘合的生物医学用途中。例如,可以用作基于生物材料的组织粘合体,可以用作用于将为体内信号转导及药物给药而安装于生物体内的装置固定于生物体内的双面胶带。

[0075] 并且,本发明提供生物粘合剂组合物的制备方法,包括:步骤(a),制备由包含贻贝粘附蛋白的溶液与包含丙烯酸N-羟琥珀酸亚胺酯及甲基丙烯酸酐中的至少一种的溶液混合而成的混合溶液;步骤(b),在上述混合溶液中溶解光引发剂;步骤(c),向上述混合溶液中加入丙烯酸单体及甲基丙烯酸单体中的至少一种;以及步骤(d),使上述混合溶液固化。

[0076] 具体地,本发明的生物粘合剂组合物的制备方法可以包括:步骤(a-1),分别制备由包含贻贝粘附蛋白的溶液与包含丙烯酸N-羟琥珀酸亚胺酯的溶液混合而成的第一混合溶液以及由包含贻贝粘附蛋白的溶液与包含甲基丙烯酸酐的溶液混合而成的第二混合溶液;步骤(b-1),分别在上述第一混合溶液及第二混合溶液中溶解光引发剂;步骤(c-1),向上述第一混合溶液中加入丙烯酸单体,向上述第二混合溶液中加入甲基丙烯酸单体;以及步骤(d-1),混合上述第一混合溶液及第二混合溶液后使其固化。

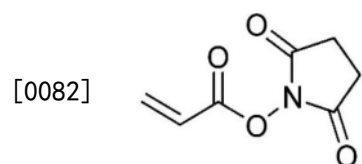
[0077] 作为再一具体例,本发明提供生物粘合剂组合物的制备方法,包括:步骤(a-2),制备由包含贻贝粘附蛋白的溶液与包含丙烯酸N-羟琥珀酸亚胺酯的溶液混合而成的混合溶液;步骤(b-2),在上述混合溶液中溶解光引发剂;步骤(c-2),加入丙烯酸单体;以及步骤(d-2),固化。

[0078] 作为还有一具体例,本发明提供生物粘合剂组合物的制备方法,包括:步骤(a-3),制备由包含贻贝粘附蛋白的溶液与包含甲基丙烯酸酐的溶液混合而成的混合溶液;步骤(b-3),在上述混合溶液中溶解光引发剂;步骤(c-3),加入甲基丙烯酸单体;以及步骤(d-3),固化。

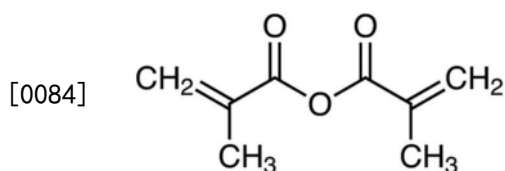
[0079] 在本发明中,贻贝粘附蛋白的定义如前所述。

[0080] 在本发明中,上述丙烯酸N-羟琥珀酸亚胺酯可以为由下述化学式1表示的化合物,上述甲基丙烯酸酐可以为由下述化学式2表示的化合物。

[0081] 化学式1



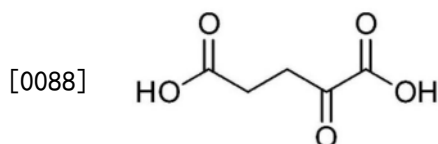
[0083] 化学式2



[0085] 在本发明中,上述光引发剂可以为 α -酮戊二酸,但不限于此,只要是形成聚丙烯酸或聚甲基丙烯酸就可以使用。

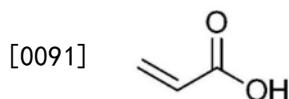
[0086] 在本发明中, α -酮戊二酸可以由下述化学式3表示的化合物。

[0087] 化学式3

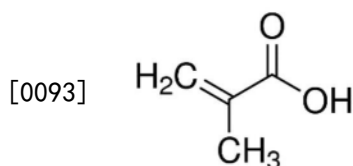


[0089] 根据本发明,上述丙烯酸单体可以由下述化学式4表示的化合物,上述甲基丙烯酸单体可以由下述化学式5表示的化合物。

[0090] 化学式4



[0092] 化学式5



[0094] 根据本发明,上述步骤(d)、步骤(d-1)、步骤(d-2)、步骤(d-3)的固化可以为光固化,优选地,可以为200nm至300nm光的照射,例如,可以为254nm的光的照射。通过上述光照射和光引发剂从丙烯酸单体形成聚丙烯酸,或者从甲基丙烯酸单体形成聚甲基丙烯酸,在贻贝粘附蛋白与聚丙烯酸或聚甲基丙烯酸之间形成酰胺键。

[0095] 如图1及图2所示,本发明的贻贝粘附蛋白与聚丙烯酸及聚甲基丙烯酸中的至少一种通过酰胺键形成三维网状结构。

[0096] 具体地,上述图1图示贻贝粘附蛋白及聚丙烯酸通过酰胺键结合的第一成分,图2图示贻贝粘附蛋白及聚甲基丙烯酸通过酰胺键结合的第二成分。

[0097] 根据本发明,以混合溶液总重量为基准,可以包含7重量百分比至15重量百分比的上述贻贝粘附蛋白,贻贝粘附蛋白与丙烯酸单体或甲基丙烯酸单体的质量比可以为1:1至1:5,优选地,可以为1:2.5至1:3.5,更优选地,可以为1:3。

[0098] 以混合溶液总重量为基准,在包含上述范围的上述贻贝粘附蛋白的情况下,具有生物粘合力优异的效果。并且,在上述贻贝粘附蛋白与丙烯酸单体或甲基丙烯酸单体的比例在上述范围内的情况下,无论在干燥状态或者潮湿(湿润)状态下都表现出优秀的机械物性,例如,可以制备拉力突出且生物粘合力优异的生物粘合用薄膜或双面胶带。

[0099] 在本发明中,以混合溶液总重量为基准,可以包含0.1重量百分比至0.4重量百分比的上述光引发剂,更优选地,可以包含0.2重量百分比至0.3重量百分比的上述光引发剂。

[0100] 作为反应时的催化剂,以混合溶液总重量为基准,在包含上述范围的上述光引发剂的情况下,可以使上述贻贝粘附蛋白与丙烯酸N-羟琥珀酸亚胺酯或甲基丙烯酸酐的反应变得容易。

[0101] 在本发明中,以混合溶液总重量为基准,可以包含0.6重量百分比至2.0重量百分比的丙烯酸N-羟琥珀酸亚胺酯及甲基丙烯酸酐中的至少一种,更优选地,可以包含0.8重量百分比至1.5重量百分比的丙烯酸N-羟琥珀酸亚胺酯及甲基丙烯酸酐中的至少一种。若丙烯酸N-羟琥珀酸亚胺酯及甲基丙烯酸酐中的至少一种的含量小于上述范围,则会因三维网状结构不够致密而使气孔变大,从而可能制备出拉力降低的薄膜或胶带,若大于上述范围,则会因三维网状结构过于致密而可能制备出弹力下降且粘合力降低的薄膜或胶带。相反,包含上述范围的丙烯酸N-羟琥珀酸亚胺酯及甲基丙烯酸酐中的至少一种的情况下,拉力优异,尤其提高粘合力,因此为优选。

[0102] 在本发明中,可以分别单独制备并使用上述第一混合溶液或上述第二混合溶液,在此情况下,上述第一混合溶液:第二混合溶液的质量比可以为10:0或0:10。

[0103] 并且,在本发明中,上述第一混合溶液:第二混合溶液的质量比可以为9:1至1:9,优选地,可以为3:1至1:3,更优选地,可以为1:1。在此情况下,本发明的生物粘合剂组合物可以通过调节上述第一混合溶液及第二混合溶液的混合比(质量比)制备薄膜及胶带等来在生物体内粘合时调节降解时间。并且,若在上述混合比内使贻贝粘附蛋白最大化且不被结晶化,则可以不浪费蛋白质。

[0104] 本发明的生物粘合剂组合物的制备方法还可以包括在上述步骤(d)中使混合溶液固化后,或者在步骤(d-1)、步骤(d-2)或步骤(d-3)中的混合第一混合溶液及第二混合溶液并固化后进行干燥的步骤。

[0105] 本发明的生物粘合剂组合物在干燥状态下为非粘合性及非降解性,在潮湿状态下显出粘合性。并且,可以在包含生物酶的潮湿条件,例如在存在有胶原酶的潮湿条件下显出生物降解性。但是,上述生物降解为生物降解结合贻贝粘附蛋白的部分,不排出有毒的丙烯酸单体或甲基丙烯酸单体,因此无细胞毒性,保持生物相容性。

[0106] 本发明的生物粘合剂组合物作为大有希望的粘合性材料,可以制备为薄膜、单面或双面胶带或者水凝胶,但不限于于此。

[0107] 并且,生物粘合剂组合物可以有效用作可穿戴电子产品、人工皮肤、超级电容器的机器人、储能材料、生物电极、可移植的电流检测生物传感器、电刺激药物缓释装置及神经假体等的粘合剂。

[0108] 以上说明为利用一实例来说明本发明技术思想的内容,本发明所属技术领域的普通技术人员可以在不脱离本发明的本质特性的范围内进行多种修改及变形。因此,本发明中说明的实施例仅用于说明本发明的技术思想,而非限制本发明的技术思想,本发明的技术思想的范围不限于上述实施例。本发明的保护范围应通过发明要求保护范围来解释,与之同等范围内的所有技术思想都应解释为包括在本发明的权利范围内。

[0109] 制备例

[0110] 制备例1:制备贻贝粘附蛋白

[0111] 通过如下方法制备序列9的贻贝粘附蛋白(fp-151):将由存在于自然界的贻贝粘附蛋白fp-1中重复80次左右的10个氨基酸构成的十肽(decapeptide)以能够在大肠杆菌中

表达的方式合成由6个十肽形成的fp-1变体,在2个fp-1变体之间加入Mgfp-5的基因(Genbank No.AAS00463或AY521220)后,在大肠杆菌中生产(D.S.Hwang et.al., Biomaterials 28,3560-3568,2007)。然后,在序列9的贻贝粘附蛋白(fp-151)中通过利用蘑菇酪氨酸酶的生物体外(in vitro)酶反应将贻贝粘附蛋白的酪氨酸转化为多巴来制备导入儿茶酚多巴残基的贻贝粘附蛋白。

[0112] 制备例2:制备贻贝粘附蛋白

[0113] 通过如下方法制备序列9的贻贝粘附蛋白(fp-151):将由存在于自然界的贻贝粘附蛋白fp-1中重复80次左右的10个氨基酸构成的十肽(decapeptide)以能够在大肠杆菌中表达的方式合成由6个十肽形成的fp-1变体,在2个fp-1变体之间加入Mgfp-5的基因(Genbank No.AAS00463或AY521220)后,在大肠杆菌中生产(D.S.Hwang et.al., Biomaterials 28,3560-3568,2007)。

[0114] 实施例

[0115] 实施例1.制备第一成分

[0116] 在去离子水中溶解10重量百分比的上述制备例1中制备的导入儿茶酚多巴残基的贻贝粘附蛋白、1重量百分比的丙烯酸N-羟琥珀酸亚胺酯、0.2重量百分比的作为光引发剂的 α -酮戊二酸后,加入20重量百分比的丙烯酸并混合来制备第一混合溶液。使用0.4 μ m的灭菌注射器过滤器过滤第一混合溶液后,倒入石英模具中。然后使用紫外线(UV)灯以254nm的波长、10W的功率固化30分钟。

[0117] 实施例2.制备第二成分

[0118] 在缓冲溶液(pH7.5的磷酸盐缓冲溶液(pbs))中溶解0.1重量百分比的根据上述制备例2制备的贻贝粘附蛋白后,以每1g上述贻贝粘附蛋白加入2ml的甲基丙烯酸酐,在40℃的水浴条件下以120rpm的转速边搅拌边进行反应1小时。放入4号透析袋(Dialysis bag)(Spectra/Por 4标准级再生纤维素透析膜管(Spectra/Por 4dialysis membrane Standard RC Tubing))中在40℃水浴的条件下在D.W中透析一天,将在贻贝粘附蛋白导入甲基丙烯酰基的贻贝粘附蛋白冻干后,通过将贻贝粘附蛋白的酪氨酸转化为多巴来制备导入儿茶酚多巴残基的贻贝粘附蛋白。在去离子水中溶解10重量百分比的上述导入儿茶酚多巴残基的贻贝粘附蛋白、0.2重量百分比的作为光引发剂的 α -酮戊二酸后,加入30重量百分比的甲基丙烯酸并混合来制备第二混合溶液。使用0.4 μ m的灭菌注射器过滤器过滤第二混合溶液后,倒入石英模具中。然后使用紫外线灯以254nm的波长、10W的功率固化1小时。

[0119] 实施例3.混合第一成分及第二成分(1:1质量比)

[0120] 使用0.4 μ m的灭菌注射器过滤器过滤以1:1的质量比混合根据上述实施例1制备的第一混合溶液与根据上述实施例2制备的第二混合溶液的混合溶液后,倒入石英模具中。然后使用紫外线灯以254nm的波长、10W的功率固化30分钟。

[0121] 实施例4.混合第一成分及第二成分(1:3质量比)

[0122] 使用0.4 μ m的灭菌注射器过滤器过滤以1:3的质量比混合根据上述实施例1制备的第一混合溶液与根据上述实施例2制备的第二混合溶液的混合溶液后,倒入石英模具中。然后使用紫外线灯以254nm的波长、10W的功率固化30分钟。

[0123] 实施例5.混合第一成分及第二成分(3:1质量比)

[0124] 使用0.4 μ m的灭菌注射器过滤器过滤以3:1的质量比混合根据上述实施例1制备的

第一混合溶液与根据上述实施例2制备的第二混合溶液的混合溶液后,倒入石英模具中。然后使用紫外线灯以254nm的波长、10W的功率固化30分钟。

[0125] 实施例6. 制备第一成分(贻贝粘附蛋白:丙烯酸=1:2质量比)

[0126] 在去离子水中溶解10重量百分比的根据制备例1制备的导入儿茶酚多巴残基的贻贝粘附蛋白、1重量百分比的丙烯酸N-羟琥珀酸亚胺酯、0.2重量百分比的作为光引发剂的 α -酮戊二酸后,加入20重量百分比的丙烯酸并混合。使用0.4 μ m的灭菌注射器过滤器过滤混合的溶液后,倒入石英模具中。然后使用紫外线灯以254nm的波长、10W的功率固化1小时后完全干燥。组合物干燥状态的图像如图8B所示。

[0127] 实施例7. 制备第一成分(贻贝粘附蛋白:丙烯酸=1:3质量比)

[0128] 除丙烯酸的浓度为30重量百分比以外,以实施例6的方法制备贻贝粘附蛋白与聚丙烯酸交联的组合物。组合物的干燥状态图像如图8B及图8C所示。通过傅里叶变换红外光谱(FT-IR)确认了制备的组合物,结果如图4C所示。在3000 cm^{-1} 中示出多巴波峰,在1710 cm^{-1} 中确认到聚丙烯酸的C=O伸缩,在1219 cm^{-1} 中确认到对称的C-N-C伸缩,在1307 cm^{-1} 中确认到不对称的S-N-C伸缩,从而确认组合物正常合成。

[0129] 实施例8. 制备第一成分(贻贝粘附蛋白:丙烯酸=1:4质量比)

[0130] 除丙烯酸的浓度为40重量百分比以外,以实施例6的方法制备贻贝粘附蛋白与聚丙烯酸交联的组合物。组合物的干燥状态图像如图8B所示。

[0131] 实施例9. 制备第一成分(贻贝粘附蛋白:丙烯酸=1:5质量比)

[0132] 除丙烯酸的浓度为50重量百分比以外,以实施例6的方法制备贻贝粘附蛋白与聚丙烯酸交联的组合物。组合物的干燥状态图像如图8B所示。

[0133] 比较例

[0134] 比较例1

[0135] 加入明胶替代贻贝粘附蛋白,以实施例1的方法制备组合物,以使丙烯酸浓度为30重量百分比。制备的组合物如图8C所示。

[0136] 比较例2. 包含非改性贻贝粘附蛋白及聚丙烯酸的组合物

[0137] 使用未导入多巴的非改性贻贝粘附蛋白,以实施例6的方法制备组合物,以使丙烯酸浓度为30重量百分比。制备的组合物如图8C所示。

[0138] 如图8B所示,在贻贝粘附蛋白:聚丙烯酸的质量比为1:2的情况下,在干燥状态下显出稍弱的机械特性。另一方面,在贻贝粘附蛋白:聚丙烯酸的质量比大于1:4的情况下,确认到硬度虽然强,但在潮湿状态下弹性降低。通过实验结果评估到贻贝粘附蛋白:聚丙烯酸的质量比为1:3的实施例7的组合物机械物性、拉力及弹力优异。

[0139] 另一方面,比较比较例1、比较例2及实施例7的结果,确认到与比较例1、比较例2相比,实施例7的组合物在干燥状态下的机械稳定性突出,在潮湿状态下拉力优异。

[0140] 试验例

[0141] 试验例1. MALDI质谱分析

[0142] 通过在现有的贻贝粘附蛋白(fp-151)与实施例2中制备的贻贝粘附蛋白中导入甲基丙烯酸酯基来对甲基丙烯酸酯化的贻贝粘附蛋白进行结晶化后放入mal di板(mal di plate)中检查分子量,结果如图3A及图3B所示。

[0143] 图3A示出现有的贻贝粘附蛋白(FP-151)的MALDI质谱,图3B示出实施例2中制备的

甲基丙烯酸酯化的贻贝粘附蛋白的MALDI质谱。

[0144] 参照图3A及图3B,看到大波峰的平均分子量从22.6kDa增加到27.5kDa,从而确认到贻贝粘附蛋白被甲基丙烯酰化。

[0145] 试验例2.傅里叶变换红外光谱(FT-IR)分析

[0146] 通过在现有的贻贝粘附蛋白(fp-151)与实施例2中制备的贻贝粘附蛋白中导入甲基丙烯酰基来对甲基丙烯酸酯化的贻贝粘附蛋白进行结晶化后测定傅里叶变换红外光谱,结果如图4所示。

[0147] 参照图4,将明胶变化为明胶甲基丙烯酸酯时,通过在 1710cm^{-1} 确认到的波峰变化确认实施例2的贻贝粘附蛋白被甲基丙烯酰化。

[0148] 试验例3.降解度测试

[0149] 将根据实施例1至实施例3制备的粘合剂组合物准备为长、宽为1cm,高为0.5mm的尺寸。

[0150] 将上述准备好的根据实施例1至实施例3制备的粘合剂组合物放入10ml的包含0.01%浓度的胶原酶(collagenase)与0.01%浓度的溶菌酶(lysozyme)的磷酸盐缓冲溶液中,在37度温度的恒温箱(incubator)中放置最多2周后回收。将在放入上述磷酸盐缓冲溶液之前的干燥的重量与回收后冻干后的重量进行比较来以百分比(%)确认剩余量,结果如图5所示。

[0151] 试验例4.粘合力测试

[0152] 准备根据实施例1至实施例3制备的粘合剂组合物和作为对照组的氰基丙烯酸、纤维蛋白胶。将根据实施例1至实施例3制备的粘合剂组合物准备为长、宽为1cm,高为0.5mm的尺寸,分别使用300 μl 的氰基丙烯酸和胶原蛋白胶。在丙烯酸板上以长、宽1cm的尺寸粘贴猪的皮肤,在猪的皮肤之间粘贴粘合剂后在磷酸盐缓冲溶液中放置4小时后,检测剪切应力(shear stress)和界面应力(interfacial stress),结果如图6所示。

[0153] 参照图6,可以确认与难以用于人体的氰基丙烯酸相比,虽然本发明的粘合剂组合物的粘合力都降低,但与市售的纤维蛋白胶相比,表现出突出的粘合力。

[0154] 试验例5.细胞毒性测试

[0155] 以每孔 5×10^4 细胞的密度在24孔组织培养板中接种HaCaT细胞后,培养过夜。分别使用溶解于杜氏改良伊戈尔培养基高葡萄糖(Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose)溶液的2%的实施例3及实施例7的组合物溶液处理细胞。培养细胞1天后,向各孔加入溶解于杜氏改良伊戈尔培养基的5%的CCK-8(Dojindo Laboratories公司,东京,日本)试剂,培养细胞3小时后,使用微孔板分光光度计测定在450nm波长处的吸光度。并且,在相同的条件下,进行活/死测试来评估细胞毒性(存活细胞为绿色,死亡细胞为红色),结果如图7A至图7D所示。

[0156] 图7A为以柱状图示出的使用微孔板分光光度计测定在450nm波长处的实施例3的吸光度的CCK-8测试结果,图7B为进行活/死测试来确认实施例3的细胞存活的结果(存活细胞为绿色、死亡细胞为红色),图7C为以柱状图示出的使用微孔板分光光度计测定在450nm波长处的实施例7的吸光度的CCK-8测试结果,图7D为进行活/死测试来确认实施例7的细胞存活的结果(存活细胞为绿色、死亡细胞为红色)。

[0157] 如图7A所示,在CCK-8测试中,细胞存活率示出70%以上。并且,如图7B所示,几乎

观察不到红色。通过上述结果确认本发明的生物粘合剂组合物的细胞毒性非常低。并且,这样的结果可以看作未引起丙烯酸单体的浸出。

[0158] 如图7C所示,在CCK-8测试中,细胞存活率示出90%以上。并且,如图7D所示,几乎观察不到红色。通过上述结果确认本发明的生物粘合剂组合物的细胞毒性非常低。并且,这样的结果可以看作未引起丙烯酸单体的浸出。

[0159] 试验例6. 确认粘合剂形成

[0160] 可以在根据实施例1至实施例5制备的生物粘合剂组合物中确认能够以多种第一成分与第二成分的浓度变化(第一成分:第二成分=10:0、3:1、1:1、1:3、0:10)形成粘合剂,结果如图8所示。

[0161] 试验例7. 评估生物体外生物降解性

[0162] 将实施例7的生物粘合剂组合物准备为具有相同重量的约10mm×10mm大小的薄膜样品。为了评估生物降解性,为了在生物体外(In vitro)防止其他微生物的繁殖,分别准备添加有0.01% (w/v) 的叠氮化钠的杜氏磷酸盐缓冲溶液(Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS))中未加入胶原酶以及加入0.005% (w/v) 的胶原酶的两种培养基。在将准备好的样品放入各培养基之前,在75%的乙醇中灭菌15分钟,使用杜氏磷酸盐缓冲溶液(DPBS)洗涤3次后使用。分别向锥形管中加入15ml的未添加胶原酶或添加5%的胶原酶的培养基,接着放入生物粘合剂组合物样品后在37℃的温度下以60rpm的转速摇动来评估不同时间的生物降解度。评估是在将生物粘合剂组合物样品从培养基中拿出来后用去离子水完全清洗并冻干后进行的。重量损失是以实验前冻干的样品的干燥质量为标准,以各时间间隔的实验后的冻干的样品的质量的百分比来确定,结果如图9所示。

[0163] 本发明的生物粘合剂组合物在杜氏磷酸盐缓冲溶液培养基中表现出缓缓生物降解的倾向,在作为生物酶的胶原酶存在的情况下,表现出4小时内生物降解50%以上的倾向。这意味着本发明的生物粘合剂组合物在与生物体内环境相同的酶存在的环境中易于生物降解。

[0164] 试验例8. 水中粘合力测试

[0165] 为了确认薄膜的水中粘合力,利用Instron进行拉力测试。在测试前将猪的皮肤及由实施例7的生物粘合剂组合物制备的胶带放入添加有0.01% (w/v) 的叠氮化钠的杜氏磷酸盐缓冲溶液中,为防止分解、脱水及污染,保管10分钟以上。以如下方式进行测试:将潮湿状态的猪的皮肤切割为10mm×10mm的大小并粘贴在丙烯酸棒后在猪的皮肤之间放置切割为10mm×10mm大小的实施例7的胶带后使用磷酸盐缓冲溶液清洗表面,以1kPa的压力压缩5秒钟来使实施例7的胶带附着于猪的皮肤上。对于粘合样品的机械测试,为了保障在潮湿环境中粘合的胶带的平行膨胀,在初始压力后进行6小时。将市售的两种粘合剂(纤维蛋白胶、明胶)及比较例2的组合物作为对照组,按照不同材料确认它们的剪切应力和界面应力。所有测试都以50mm/分钟的规定剥离速度进行,界面韧性(Interfacial toughness)分为停滞力(180°剥离测试的情况)的2倍或者停滞力(90°剥离测试的情况)来确定。

[0166] 如图10所示,与作为市售的粘合剂的纤维蛋白胶和明胶相比,本发明实施例7的生物粘合剂组合物在水中粘合力优异。并且,确认到使用儿茶酚化合物改性表面进一步提高了粘合力。

[0167] 试验例9. 拉力测试

[0168] 使用Instron将1cm×1cm的实施例7的胶带固定在仪器上后以50mm/分钟(min)的速度连续上下拉拽。胶带各以完全干燥的状态与潮湿的状态进行确认,确认至胶带撕裂的瞬间。潮湿的胶带使将完全干燥的胶带完全浸泡在杜氏磷酸盐缓冲溶液中10秒钟后拿出来的。图11A为干燥状态的胶带拉力测试结果,图11B为潮湿状态的胶带拉力测试结果。

[0169] 参照图11A及11B,在干燥状态下伸长0.4583mm,拉伸了4.6%。相反,在潮湿状态下伸长至5.32mm,确认到拉伸了53.2%。

[0170] 试验例10. 在猪膀胱中的拉力测试

[0171] 将本发明的实施例7的生物粘合剂组合物的薄膜和作为对照组的市售的防粘连薄膜附着于摘出的猪膀胱上后,在装满1×磷酸盐缓冲溶液的水槽中,向猪的膀胱内以2.5ml/s的注入速度反复注入9次250ml的磷酸盐缓冲溶液来观察附着的薄膜的性能变化。

[0172] 图12A为附着防粘连薄膜的猪膀胱的图像,图12B为附着实施例7的薄膜的猪膀胱的图像。在图12A中观察到,在反复的膀胱膨胀/收缩测试中,由于防粘连薄膜没有拉伸至膀胱大小,因此显出一部分附着部位从膀胱脱落的结果。相反,在图12B观察到,在反复的膀胱膨胀/收缩测试中实施例7的薄膜也显出随之膨胀/收缩的倾向,显出在猪膀胱的表面以良好的效率保持附着的结果。

[0173] 以上参照本发明的优选实施例进行了说明,但可以理解的是,本发明所属技术领域的熟练从业人员或普通技术人员可以在不脱离随附的发明要求保护范围所记载的本发明的思想及技术领域的范围内对本发明进行多种修改及变更。

[0174] 因此,本发明的技术范围不应限于说明书中详细说明的内容,而应由发明要求保护范围来决定。

<110> 浦项工科大学校产学协力团
 <120> 包含贻贝粘附蛋白的生物粘合剂组合物及其制备方法
 <130> POSTECH1-90P
 <160> 16
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 800
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> fp-1
 <400> 1

Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro
1				5					10					15	
Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys
			20					25					30		
Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr
		35					40					45			
Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser
	50					55				60					
Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys
65				70					75					80	
Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro
			85					90					95		
Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys
		100						105					110		
Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr
		115					120					125			
Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser
	130					135					140				
Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys
145				150					155					160	
Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro
			165					170					175		
Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys
		180						185					190		
Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr
	195						200					205			

Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser		
210	215	220
Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys		
225	230	235 240
Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro		
245	250	255
Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys		
260	265	270
Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr		
275	280	285
Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser		
290	295	300
Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys		
305	310	315 320
Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro		
325	330	335
Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys		
340	345	350
Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr		
355	360	365
Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser		
370	375	380
Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys		
385	390	395 400
Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro		
405	410	415
Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys		
420	425	430
Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr		
435	440	445
Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser		
450	455	460
Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys		
465	470	475 480
Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro		
485	490	495
Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys		
500	505	510
Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr		

515	520	525
Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser		
530	535	540
Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys		
545	550	555
Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro		560
565	570	575
Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys		
580	585	590
Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr		
595	600	605
Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser		
610	615	620
Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys		
625	630	635
Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro		640
645	650	655
Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys		
660	665	670
Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr		
675	680	685
Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser		
690	695	700
Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys		
705	710	715
Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro		720
725	730	735
Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys		
740	745	750
Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr		
755	760	765
Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser		
770	775	780
Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys		
785	790	795
		800

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> fp-1变体

<400> 2

Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys

1 5 10

<210> 3

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> fp-1变体

<400> 3

Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro

1 5 10 15

Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys

20 25 30

Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr

35 40 45

Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser

50 55 60

Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys

65 70 75 80

Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro

85 90 95

Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys

100 105 110

Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys

115 120

<210> 4

<211> 472

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> fp-2

<400> 4

Leu Phe Ser Phe Phe Leu Leu Leu Thr Cys Thr Gln Leu Cys Leu Gly

1 5 10 15

Thr Asn Arg Pro Asp Tyr Asn Asp Asp Glu Glu Asp Asp Tyr Lys Pro

20 25 30

Pro	Val	Tyr	Lys	Pro	Ser	Pro	Ser	Lys	Tyr	Arg	Pro	Val	Asn	Pro	Cys
35				40				45							
Leu	Lys	Lys	Pro	Cys	Lys	Tyr	Asn	Gly	Val	Cys	Lys	Pro	Arg	Gly	Gly
50				55				60							
Ser	Tyr	Lys	Cys	Phe	Cys	Lys	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Asn	Cys	Asn
65				70				75				80			
Leu	Lys	Asn	Ala	Cys	Lys	Pro	Asn	Gln	Cys	Lys	Asn	Lys	Ser	Arg	Cys
85				90				95							
Val	Pro	Val	Gly	Lys	Thr	Phe	Lys	Cys	Val	Cys	Arg	Asn	Gly	Asn	Phe
100				105				110							
Gly	Arg	Leu	Cys	Glu	Lys	Asn	Val	Cys	Ser	Pro	Asn	Pro	Cys	Lys	Asn
115				120				125							
Asn	Gly	Lys	Cys	Ser	Pro	Leu	Gly	Lys	Thr	Gly	Tyr	Lys	Cys	Thr	Cys
130				135				140							
Ser	Gly	Gly	Tyr	Thr	Gly	Pro	Arg	Cys	Glu	Val	His	Ala	Cys	Lys	Pro
145				150				155				160			
Asn	Pro	Cys	Lys	Asn	Lys	Gly	Arg	Cys	Phe	Pro	Asp	Gly	Lys	Thr	Gly
165				170				175							
Tyr	Lys	Cys	Arg	Cys	Val	Asp	Gly	Tyr	Ser	Gly	Pro	Thr	Cys	Gln	Glu
180				185				190							
Asn	Ala	Cys	Lys	Pro	Asn	Pro	Cys	Ser	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Ser	Ala
195				200				205							
Asp	Lys	Phe	Gly	Asp	Tyr	Ser	Cys	Glu	Cys	Arg	Pro	Gly	Tyr	Phe	Gly
210				215				220							
Pro	Glu	Cys	Glu	Arg	Tyr	Val	Cys	Ala	Pro	Asn	Pro	Cys	Lys	Asn	Gly
225				230				235				240			
Gly	Ile	Cys	Ser	Ser	Asp	Gly	Ser	Gly	Gly	Tyr	Arg	Cys	Arg	Cys	Lys
245				250				255							
Gly	Gly	Tyr	Ser	Gly	Pro	Thr	Cys	Lys	Val	Asn	Val	Cys	Lys	Pro	Thr
260				265				270							
Pro	Cys	Lys	Asn	Ser	Gly	Arg	Cys	Val	Asn	Lys	Gly	Ser	Ser	Tyr	Asn
275				280				285							
Cys	Ile	Cys	Lys	Gly	Gly	Tyr	Ser	Gly	Pro	Thr	Cys	Gly	Glu	Asn	Val
290				295				300							
Cys	Lys	Pro	Asn	Pro	Cys	Gln	Asn	Arg	Gly	Arg	Cys	Tyr	Pro	Asp	Asn
305				310				315				320			
Ser	Asp	Asp	Gly	Phe	Lys	Cys	Arg	Cys	Val	Gly	Gly	Tyr	Lys	Gly	Pro
325				330				335							
Thr	Cys	Glu	Asp	Lys	Pro	Asn	Pro	Cys	Asn	Thr	Lys	Pro	Cys	Lys	Asn

340	345	350
Gly Gly Lys Cys Asn Tyr Asn Gly Lys Ile Tyr Thr Cys Lys Cys Ala		
355	360	365
Tyr Gly Trp Arg Gly Arg His Cys Thr Asp Lys Ala Tyr Lys Pro Asn		
370	375	380
Pro Cys Val Val Ser Lys Pro Cys Lys Asn Arg Gly Lys Cys Ile Trp		
385	390	395
Asn Gly Lys Ala Tyr Arg Cys Lys Cys Ala Tyr Gly Tyr Gly Gly Arg		
405	410	415
His Cys Thr Lys Lys Ser Tyr Lys Lys Asn Pro Cys Ala Ser Arg Pro		
420	425	430
Cys Lys Asn Arg Gly Lys Cys Thr Asp Lys Gly Asn Gly Tyr Val Cys		
435	440	445
Lys Cys Ala Arg Gly Tyr Ser Gly Arg Tyr Cys Ser Leu Lys Ser Pro		
450	455	460
Pro Ser Tyr Asp Asp Asp Glu Tyr		
465	470	
<210> 5		
<211> 50		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> fp-3		
<400> 5		
Pro Trp Ala Asp Tyr Tyr Gly Pro Lys Tyr Gly Pro Pro Arg Arg Tyr		
1	5	10
Gly Gly Gly Asn Tyr Asn Arg Tyr Gly Arg Arg Tyr Gly Gly Tyr Lys		
20	25	30
Gly Trp Asn Asn Gly Trp Lys Arg Gly Arg Trp Gly Arg Lys Tyr Tyr		
35	40	45
Gly Ser		
50		
<210> 6		
<211> 750		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> fp-4		
<400> 6		

Tyr	Gly	Arg	Arg	Tyr	Gly	Glu	Pro	Ser	Gly	Tyr	Ala	Asn	Ile	Gly	His
1				5					10					15	
Arg	Arg	Tyr	Tyr	Glu	Arg	Ala	Ile	Ser	Phe	His	Arg	His	Ser	His	Val
				20				25					30		
His	Gly	His	His	Leu	Leu	His	Arg	His	Val	His	Arg	His	Ser	Val	Leu
				35				40					45		
His	Gly	His	Val	His	Met	His	Arg	Val	Ser	His	Arg	Ile	Met	His	Arg
				50				55				60			
His	Arg	Val	Leu	His	Gly	His	Val	His	Arg	His	Arg	Val	Leu	His	Asn
65					70				75					80	
His	Val	His	Arg	His	Ser	Val	Leu	His	Gly	His	Val	His	Arg	His	Arg
				85					90					95	
Val	Leu	His	Arg	His	Val	His	Arg	His	Asn	Val	Leu	His	Gly	His	Val
				100					105				110		
His	Arg	His	Arg	Val	Leu	His	Lys	His	Val	His	Asn	His	Arg	Val	Leu
				115				120					125		
His	Lys	His	Leu	His	Lys	His	Gln	Val	Leu	His	Gly	His	Val	His	Arg
				130				135					140		
His	Gln	Val	Leu	His	Lys	His	Val	His	Asn	His	Arg	Val	Leu	His	Lys
145					150				155					160	
His	Leu	His	Lys	His	Gln	Val	Leu	His	Gly	His	Val	His	Thr	His	Arg
				165					170					175	
Val	Leu	His	Lys	His	Val	His	Lys	His	Arg	Val	Leu	His	Lys	His	Leu
				180					185				190		
His	Lys	His	Gln	Val	Leu	His	Gly	His	Ile	His	Thr	His	Arg	Val	Leu
				195				200					205		
His	Lys	His	Leu	His	Lys	His	Gln	Val	Leu	His	Gly	His	Val	His	Thr
				210				215					220		
His	Arg	Val	Leu	His	Lys	His	Val	His	Lys	His	Arg	Val	Leu	His	Lys
225					230				235					240	
His	Leu	His	Lys	His	Gln	Val	Leu	His	Gly	His	Val	His	Met	His	Arg
				245					250					255	
Val	Leu	His	Lys	His	Val	His	Lys	His	Arg	Val	Leu	His	Lys	His	Val
				260					265				270		
His	Lys	His	His	Val	Val	His	Lys	His	Val	His	Ser	His	Arg	Val	Leu
				275				280					285		
His	Lys	His	Val	His	Lys	His	Arg	Val	Glu	His	Gln	His	Val	His	Lys
				290				295					300		
His	His	Val	Leu	His	Arg	His	Val	His	Ser	His	His	Val	Val	His	Ser

305	310	315	320
His Val His Lys His Arg Val Val His Ser His Val His Lys His Asn			
	325	330	335
Val Val His Ser His Val His Arg His Gln Ile Leu His Arg His Val			
	340	345	350
His Arg His Gln Val Val His Arg His Val His Arg His Leu Ile Ala			
	355	360	365
His Arg His Ile His Ser His Gln Ala Ala Val His Arg His Val His			
	370	375	380
Thr His Phe Glu Gly Asn Phe Asn Asp Asp Gly Thr Asp Val Asn Leu			
385	390	395	400
Arg Ile Arg His Gly Ile Ile Tyr Phe Gly Gly Asn Thr Tyr Arg Leu			
	405	410	415
Ser Gly Gly Arg Arg Arg Phe Met Thr Leu Trp Gln Glu Cys Leu Glu			
	420	425	430
Ser Tyr Gly Asp Ser Asp Glu Cys Phe Val Gln Leu Leu Glu Gly Asn			
	435	440	445
Gln His Leu Phe Thr Val Val Gln Gly His His Ser Thr Ser Phe Arg			
	450	455	460
Ser Asp Leu Ser Asn Asp Leu His Pro Asp Asn Asn Ile Glu Gln Ile			
465	470	475	480
Ala Asn Asp His Val Asn Asp Ile Ala Gln Ser Thr Asp Gly Asp Ile			
	485	490	495
Asn Asp Phe Ala Asp Thr His Tyr Asn Asp Val Ala Pro Ile Ala Asp			
	500	505	510
Val His Val Asp Asn Ile Ala Gln Thr Ala Asp Asn His Val Lys Asn			
	515	520	525
Ile Ala Gln Thr Ala His His His Val Asn Asp Val Ala Gln Ile Ala			
	530	535	540
Asp Asp His Val Asn Asp Ile Gly Gln Thr Ala Tyr Asp His Val Asn			
545	550	555	560
Asn Ile Gly Gln Thr Ala Asp Asp His Val Asn Asp Ile Ala Gln Thr			
	565	570	575
Ala Asp Asp His Val Asn Ala Ile Ala Gln Thr Ala Asp Asp His Val			
	580	585	590
Asn Ala Ile Ala Gln Thr Ala Asp Asp His Val Asn Asp Ile Gly Asp			
	595	600	605
Thr Ala Asn Ser His Ile Val Arg Val Gln Gly Val Ala Lys Asn His			
610	615	620	

$\langle 220 \rangle$

<223> fp-6

<400> 8

Ile	Ala	Ala	Leu	Cys	Gly	Ile	Val	Lys	Ser	Ile	Asp	Ser	Asp	Asp	Ser
1				5				10					15		
Asp	Tyr	Asp	Tyr	Lys	Gly	Arg	Gly	Tyr	Cys	Thr	Asn	Lys	Gly	Cys	Arg
			20					25					30		
Ser	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Phe	Gly	Asn	Lys	Gly	Tyr	Cys	Lys	Tyr	Gly	Glu
			35					40					45		
Lys	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Asn	Cys	Asn	Ser	Tyr	Ala	Gly	Cys	Cys	Leu	Pro
			50					55				60			
Arg	Asn	Pro	Tyr	Gly	Lys	Leu	Lys	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Asn	Lys	Tyr	Gly
65						70				75					80
Cys	Pro	Asn	Asn	Tyr	Tyr	Phe	Tyr	Asn	Asn	Lys	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Leu
						85				90					95
Glu	His	His	His	His	His	His	His								

<210> 9

<211> 199

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> fp-151

<400> 9

Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro
1				5				10					15		
Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys
			20					25					30		
Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr
			35					40					45		
Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Pro	Trp	Ser	Ser
			50					55				60			
Glu	Glu	Tyr	Lys	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Pro	Gly	Asn	Thr	Tyr	His	Tyr	His
65						70				75					80
Ser	Gly	Gly	Ser	Tyr	His	Gly	Ser	Gly	Tyr	His	Gly	Gly	Tyr	Lys	Gly
						85				90					95
Lys	Tyr	Tyr	Gly	Lys	Ala	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Tyr	Lys	Tyr	Lys	Asn	Ser
			100					105					110		
Gly	Lys	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Lys	Lys	Ala	Arg	Lys	Tyr	His	Arg	Lys	Gly
			115					120					125		

Tyr Lys Lys Tyr Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Ala Lys Pro Ser Tyr Pro
 130 135 140
 Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys
 145 150 155 160
 Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr
 165 170 175
 Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser
 180 185 190
 Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Leu
 195
 <210> 10
 <211> 171
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> fp-131
 <400> 10
 Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro
 1 5 10 15
 Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys
 20 25 30
 Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Pro Trp Ala Asp
 50 55 60
 Tyr Tyr Gly Pro Lys Tyr Gly Pro Pro Arg Arg Tyr Gly Gly Gly Asn
 65 70 75 80
 Tyr Asn Arg Tyr Gly Arg Arg Tyr Gly Gly Tyr Lys Gly Trp Asn Asn
 85 90 95
 Gly Trp Lys Arg Gly Arg Trp Gly Arg Lys Tyr Tyr Gly Ser Ala Lys
 100 105 110
 Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr
 115 120 125
 Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser
 130 135 140
 Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys
 145 150 155 160
 Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Leu
 165 170

<210> 11

<211> 175

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> fp-353

<400> 11

```

Pro Trp Ala Asp Tyr Tyr Gly Pro Lys Tyr Gly Pro Pro Arg Arg Tyr
1          5          10          15
Gly Gly Gly Asn Tyr Asn Arg Tyr Gly Arg Arg Tyr Gly Gly Tyr Lys
          20          25          30
Gly Trp Asn Asn Gly Trp Lys Arg Gly Arg Trp Gly Arg Lys Tyr Tyr
          35          40          45
Pro Trp Ser Ser Glu Glu Tyr Lys Gly Gly Tyr Tyr Pro Gly Asn Thr
          50          55          60
Tyr His Tyr His Ser Gly Gly Ser Tyr His Gly Ser Gly Tyr His Gly
65          70          75          80
Gly Tyr Lys Gly Lys Tyr Tyr Gly Lys Ala Lys Lys Tyr Tyr Tyr Lys
          85          90          95
Tyr Lys Asn Ser Gly Lys Tyr Lys Tyr Leu Lys Lys Ala Arg Lys Tyr
          100          105          110
His Arg Lys Gly Tyr Lys Lys Tyr Tyr Gly Gly Ser Ser Gly Ser Ala
          115          120          125
Asp Tyr Tyr Gly Pro Lys Tyr Gly Pro Pro Arg Arg Tyr Gly Gly Gly
          130          135          140
Asn Tyr Asn Arg Tyr Gly Arg Arg Tyr Gly Gly Tyr Lys Gly Trp Asn
145          150          155          160
Asn Gly Trp Lys Arg Gly Arg Trp Gly Arg Lys Tyr Tyr Gly Ser
          165          170          175

```

<210> 12

<211> 187

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> fp-153

<400> 12

```

Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro
1          5          10          15
Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys

```

20	25	30
Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys	Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr	
35	40	45
Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Pro Trp Ser Ser		
50	55	60
Glu Glu Tyr Lys Gly Gly Tyr Tyr Pro Gly Asn Thr Tyr His Tyr His		
65	70	75
Ser Gly Gly Ser Tyr His Gly Ser Gly Tyr His Gly Gly Tyr Lys Gly		
85	90	95
Lys Tyr Tyr Gly Lys Ala Lys Lys Tyr Tyr Tyr Lys Tyr Lys Asn Ser		
100	105	110
Gly Lys Tyr Lys Tyr Leu Lys Lys Ala Arg Lys Tyr His Arg Lys Gly		
115	120	125
Tyr Lys Lys Tyr Tyr Gly Gly Ser Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Tyr Gly		
130	135	140
Pro Lys Tyr Gly Pro Pro Arg Arg Tyr Gly Gly Gly Asn Tyr Asn Arg		
145	150	155
Tyr Gly Arg Arg Tyr Gly Gly Tyr Lys Gly Trp Asn Asn Gly Trp Lys		
165	170	175
Arg Gly Arg Trp Gly Arg Lys Tyr Tyr Gly Ser		
180	185	

<210> 13

<211> 187

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> fp-351

<400> 13

Pro Trp Ala Asp Tyr Tyr Gly Pro Lys Tyr Gly Pro Pro Arg Arg Tyr		
1	5	10
Gly Gly Gly Asn Tyr Asn Arg Tyr Gly Arg Arg Tyr Gly Gly Tyr Lys		
20	25	30
Gly Trp Asn Asn Gly Trp Lys Arg Gly Arg Trp Gly Arg Lys Tyr Tyr		
35	40	45
Pro Trp Ser Ser Glu Glu Tyr Lys Gly Gly Tyr Tyr Pro Gly Asn Thr		
50	55	60
Tyr His Tyr His Ser Gly Gly Ser Tyr His Gly Ser Gly Tyr His Gly		
65	70	75
Gly Tyr Lys Gly Lys Tyr Tyr Gly Lys Ala Lys Lys Tyr Tyr Tyr Lys		

				85					90					95					
Tyr	Lys	Asn	Ser	Gly	Lys	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Lys	Lys	Ala	Arg	Lys	Tyr				
				100					105					110					
His	Arg	Lys	Gly	Tyr	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Ala				
				115					120					125					
Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro				
				130					135					140					
Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro				
145									150					155					160
Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr				
									165					170					175
Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys									
				180					185										

<210> 14

<211> 60

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> fp-1变体

<400> 14

Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro				
1				5					10					15					
Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys				
				20					25					30					
Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr				
				35					40					45					
Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys								
				50					55					60					

<210> 15

<211> 196

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> fp-151变体

<400> 15

Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro				
1				5					10					15					
Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys				
				20					25					30					

Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	
35			40			45										
Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ser	Ser	Glu	Glu	
50			55			60										
Tyr	Lys	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Pro	Gly	Asn	Thr	Tyr	His	Tyr	His	Ser	Gly	
65			70			75			80							
Gly	Ser	Tyr	His	Gly	Ser	Gly	Tyr	His	Gly	Gly	Tyr	Lys	Gly	Lys	Tyr	
85			90			95										
Tyr	Gly	Lys	Ala	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Tyr	Lys	Tyr	Lys	Asn	Ser	Gly	Lys	
100			105			110										
Tyr	Lys	Tyr	Leu	Lys	Lys	Ala	Arg	Lys	Tyr	His	Arg	Lys	Gly	Tyr	Lys	
115			120			125										
Lys	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	
130			135			140										
Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	
145			150			155			160							
Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	
165			170			175										
Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys	Pro	Ser	Tyr	Pro	
180			185			190										
Pro	Thr	Tyr	Lys													
195																
<210> 16																
<211> 76																
<212> PRT																
<213> 人工序列																
<220>																
<223> mgfp-5																
<400> 16																
Ser	Ser	Glu	Glu	Tyr	Lys	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Pro	Gly	Asn	Thr	Tyr	His	
1			5			10			15							
Tyr	His	Ser	Gly	Gly	Ser	Tyr	His	Gly	Ser	Gly	Tyr	His	Gly	Gly	Tyr	
20			25			30										
Lys	Gly	Lys	Tyr	Tyr	Gly	Lys	Ala	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Tyr	Lys	Tyr	Lys	
35			40			45										
Asn	Ser	Gly	Lys	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Lys	Lys	Ala	Arg	Lys	Tyr	His	Arg	
50			55			60										
Lys	Gly	Tyr	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser					
65			70			75										

丙烯酸 N-羟琥珀酸亚胺酯

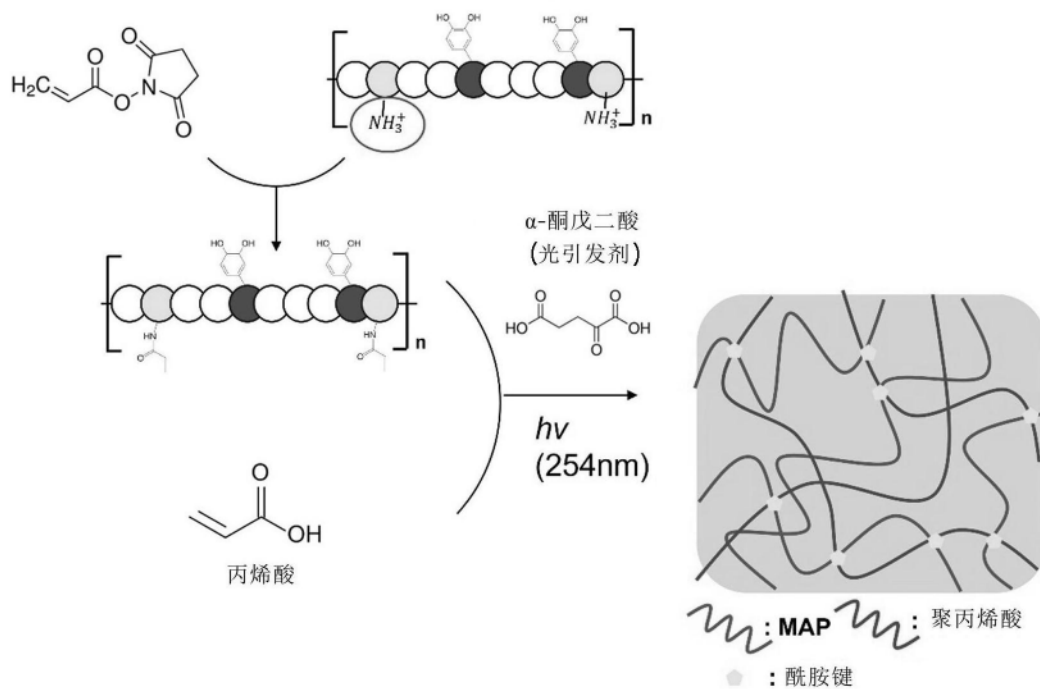
多巴取代的贻贝粘附蛋白
(MAP; Fp-151)

图1

甲基丙烯酸酐

贻贝粘附蛋白 (MAP; Fp-151)

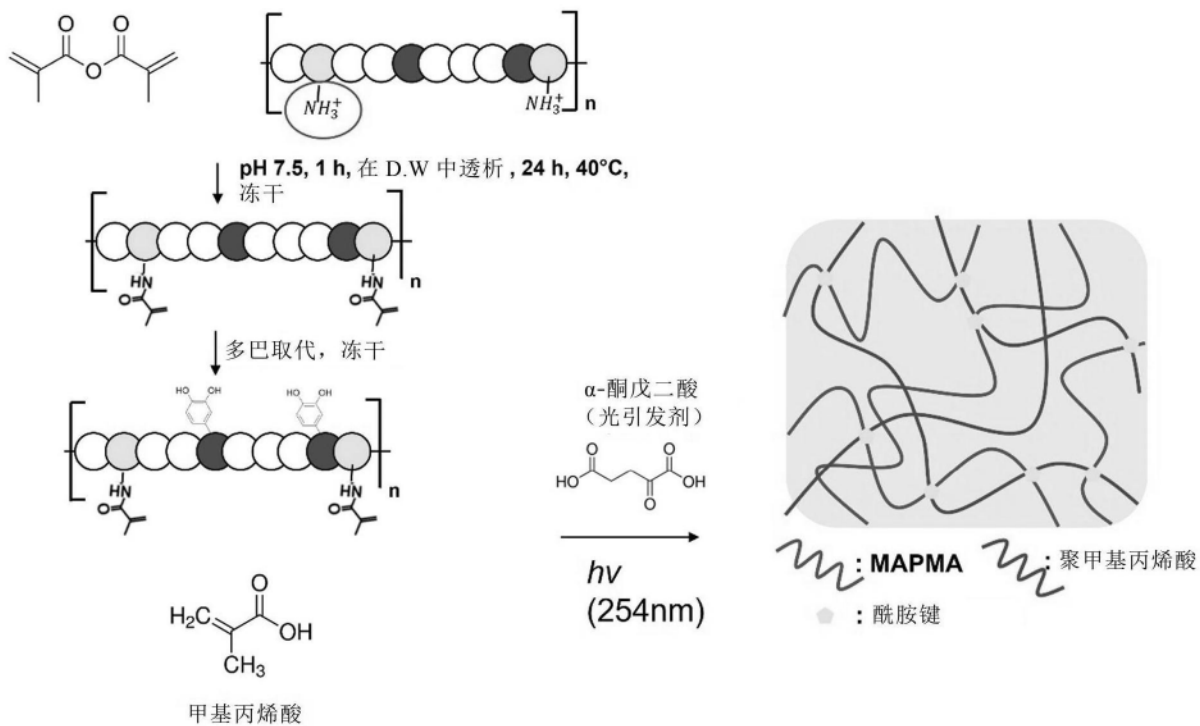


图2

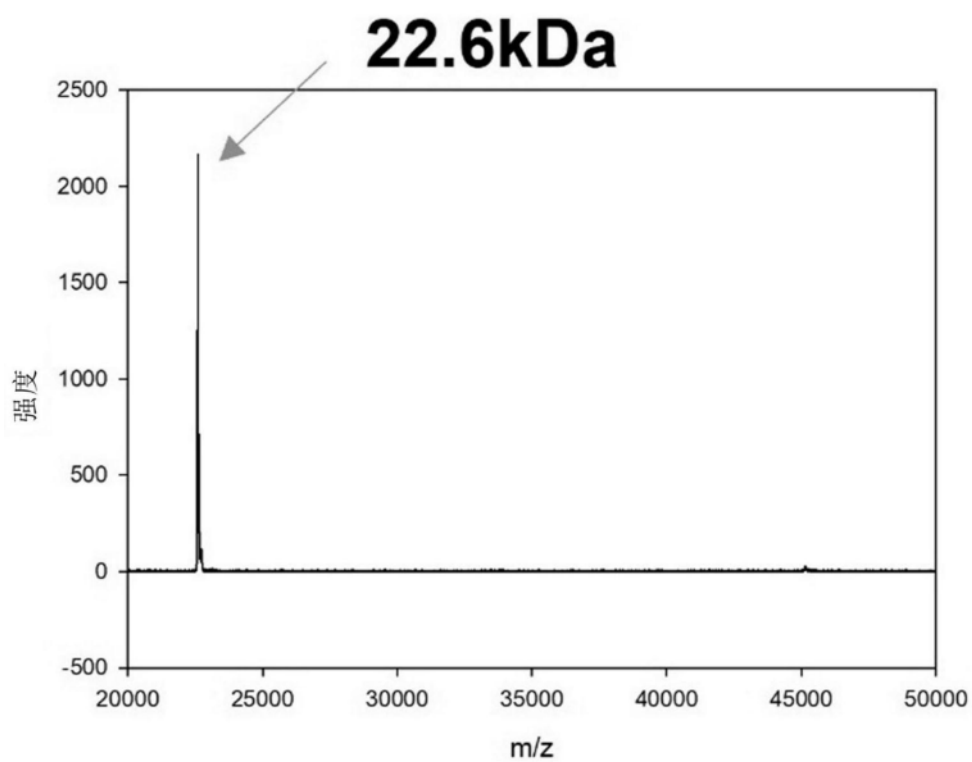


图3A

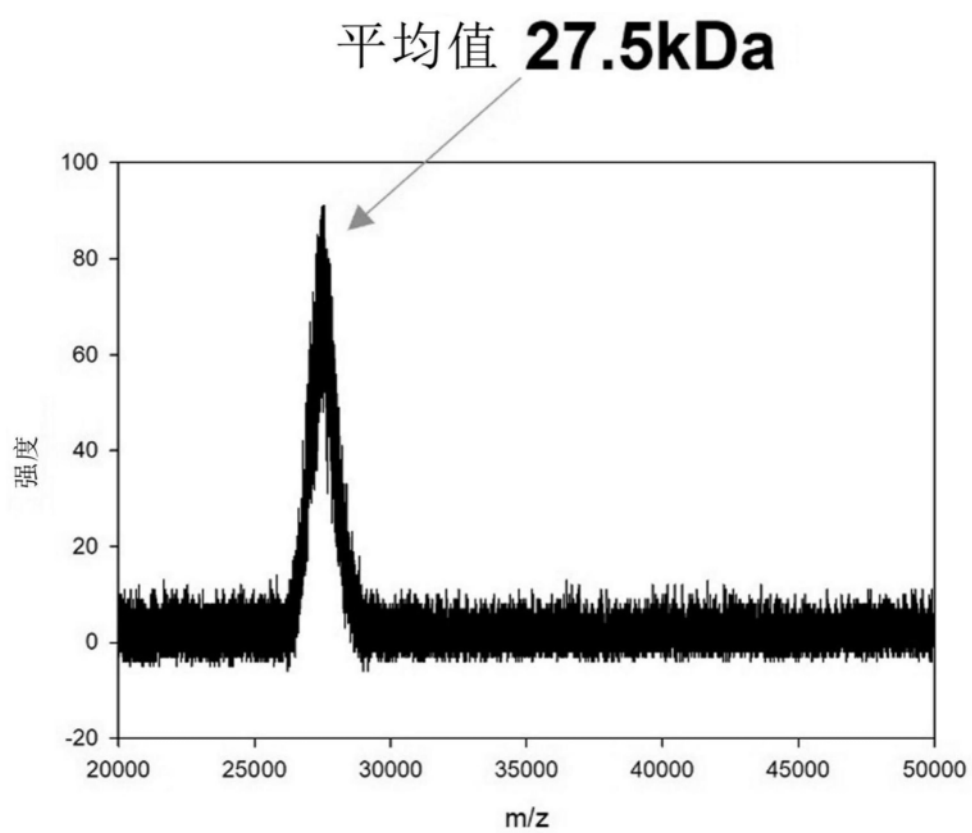


图3B

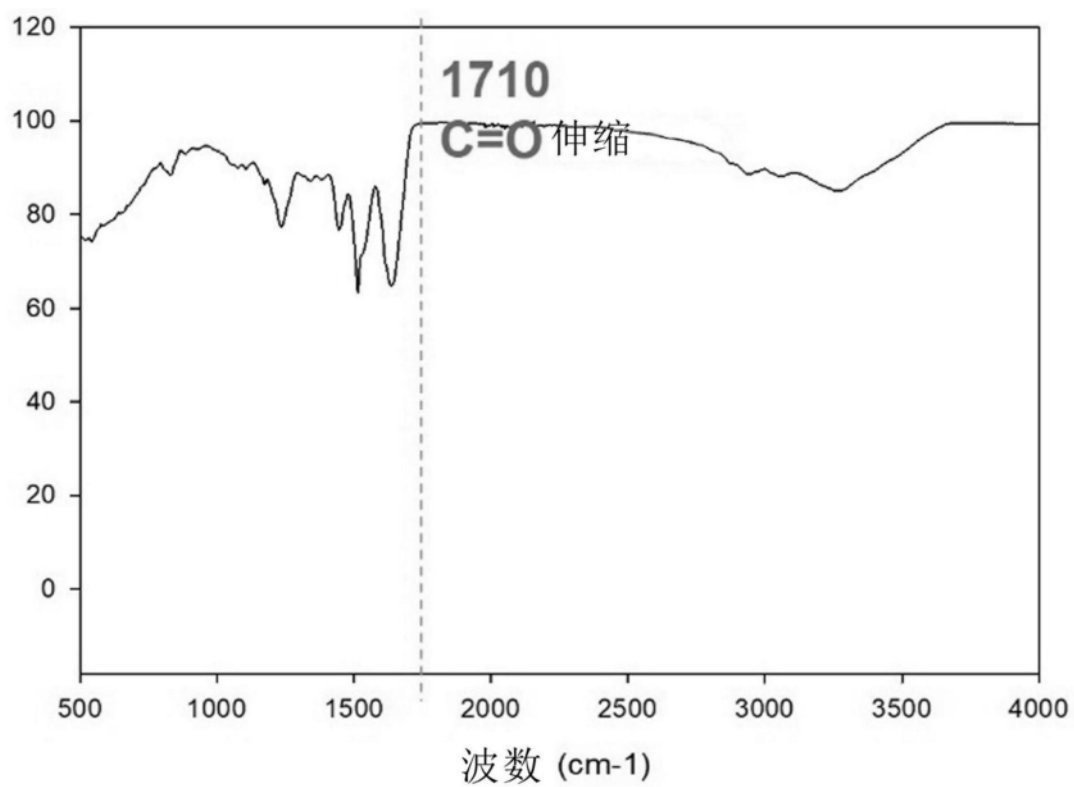


图4A

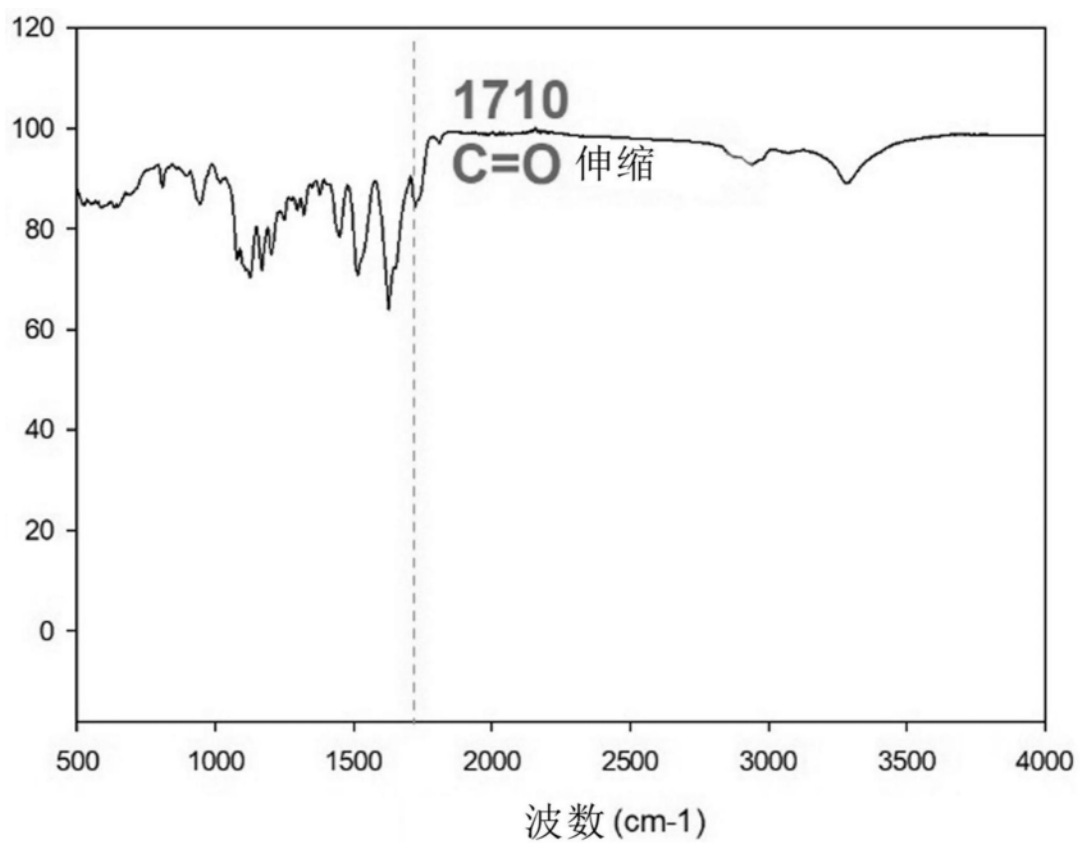


图4B

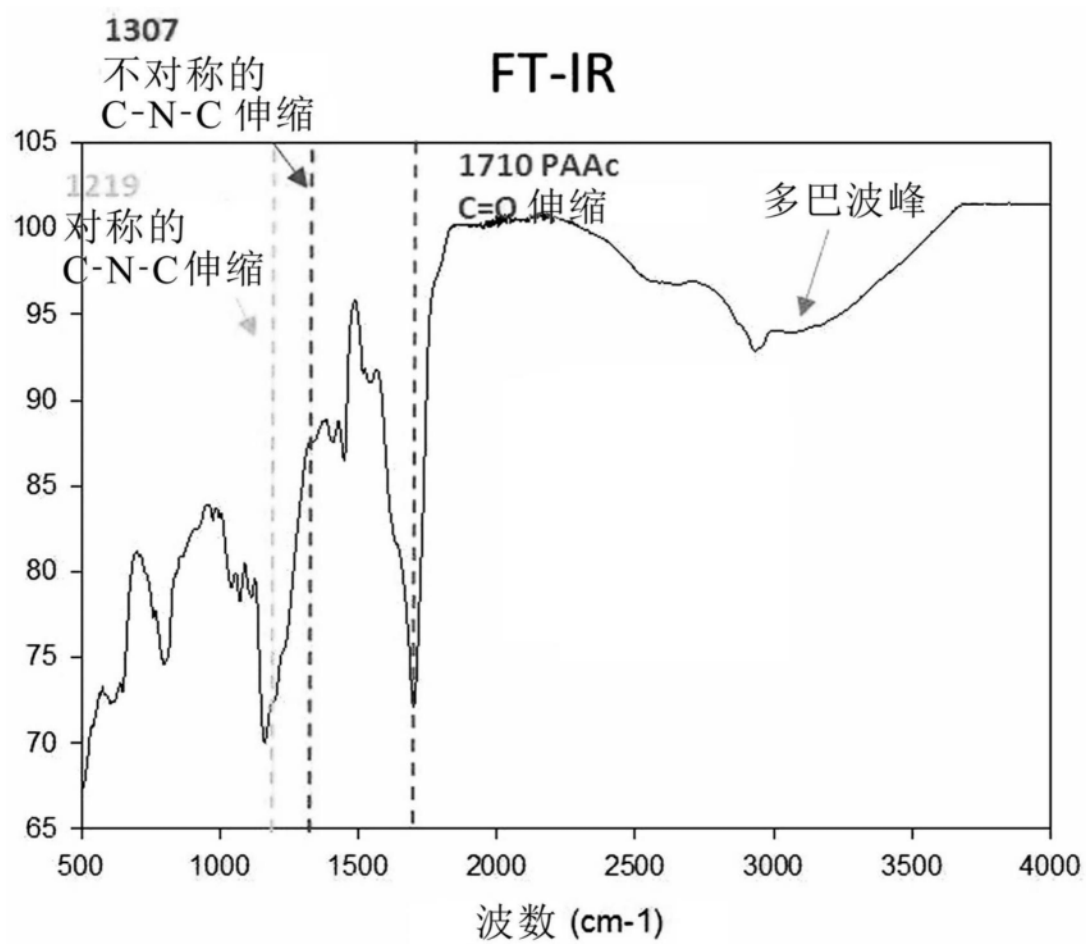


图4C

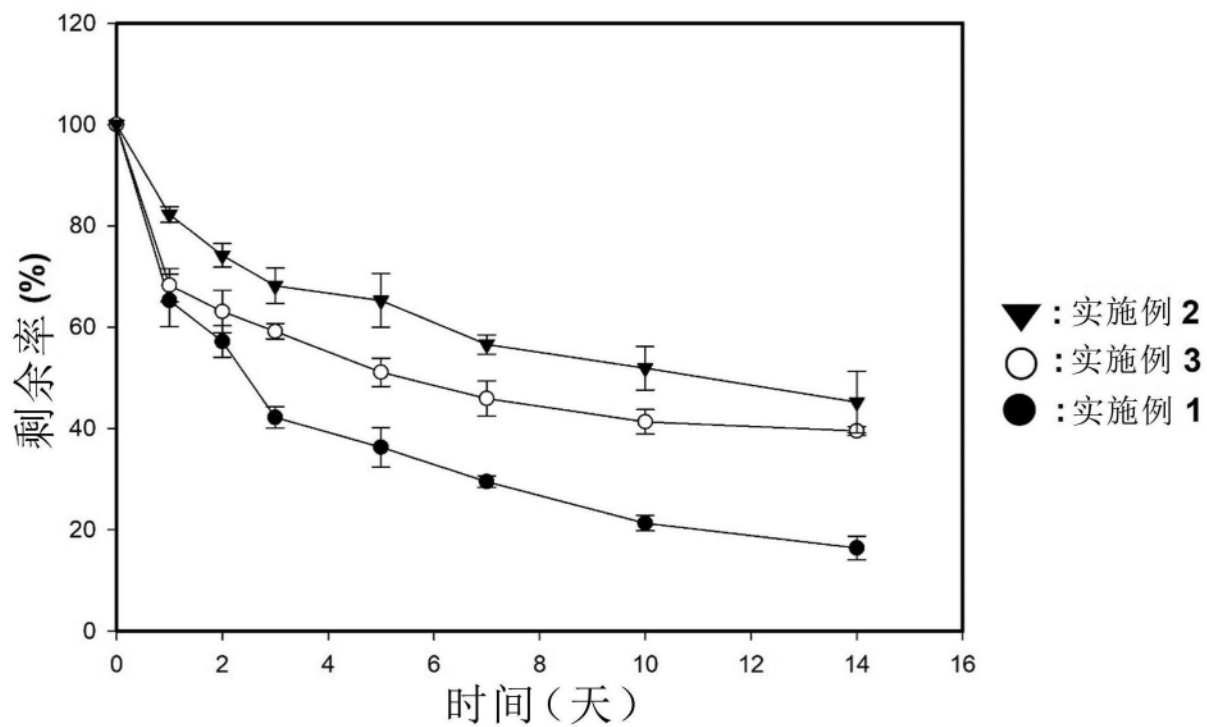


图5

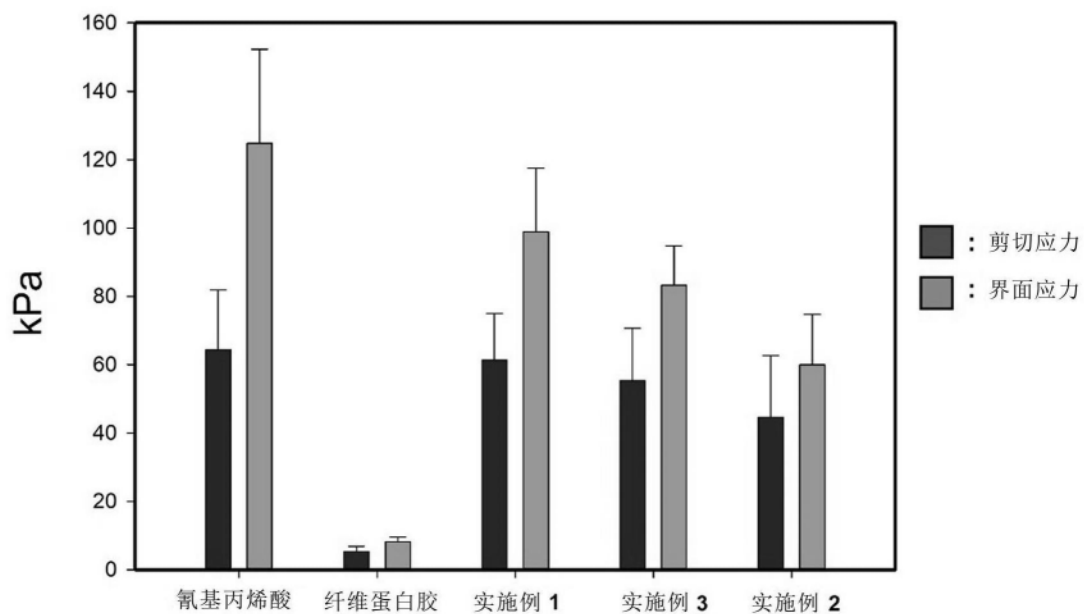


图6

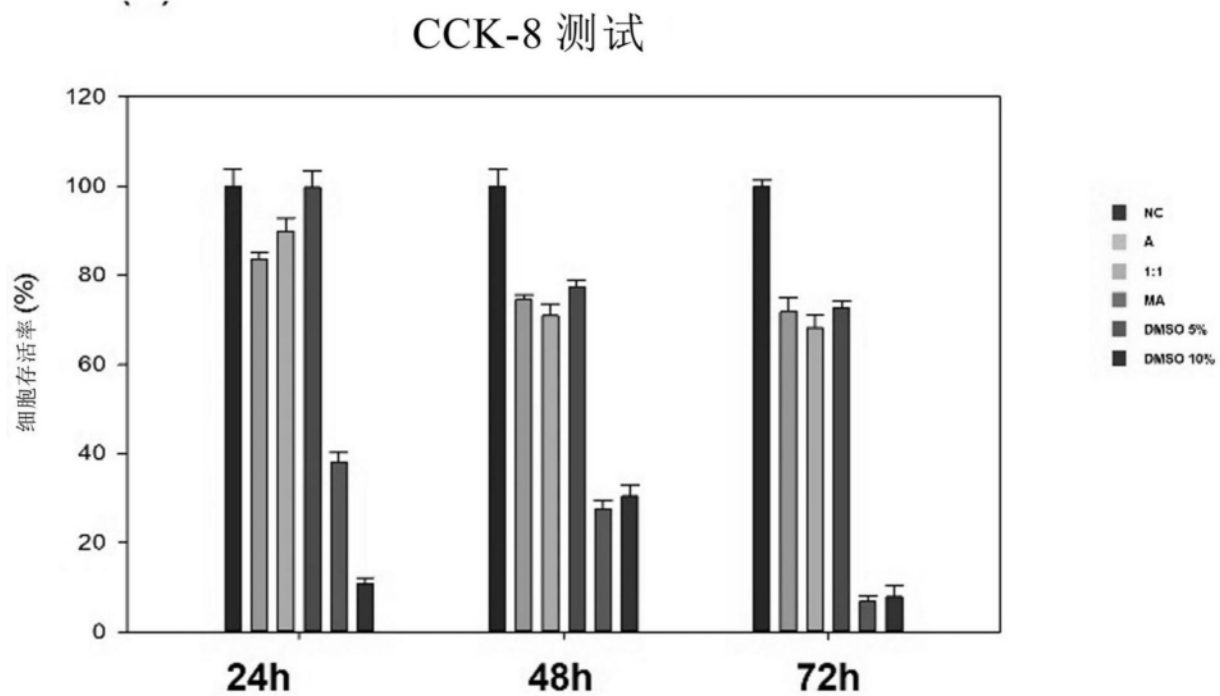


图7A

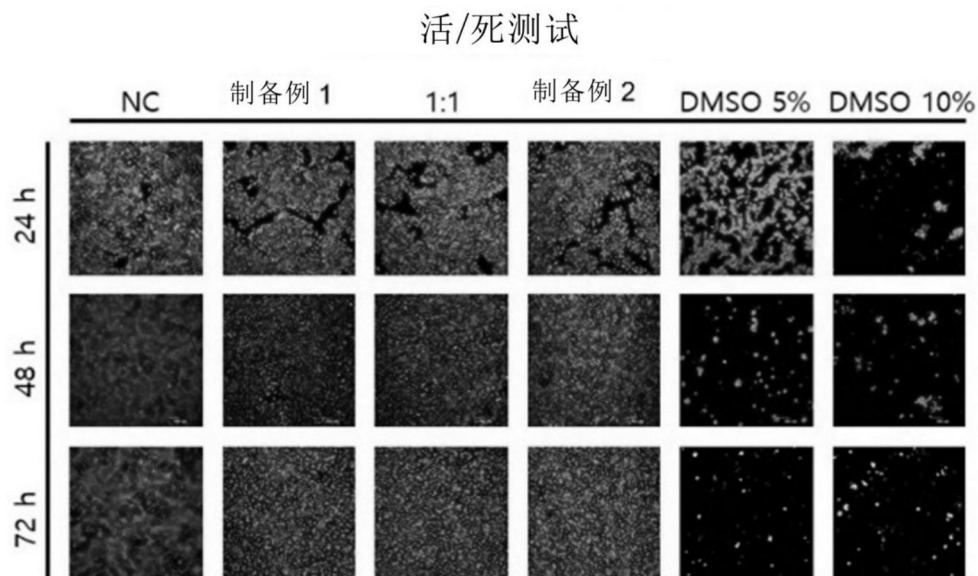


图7B

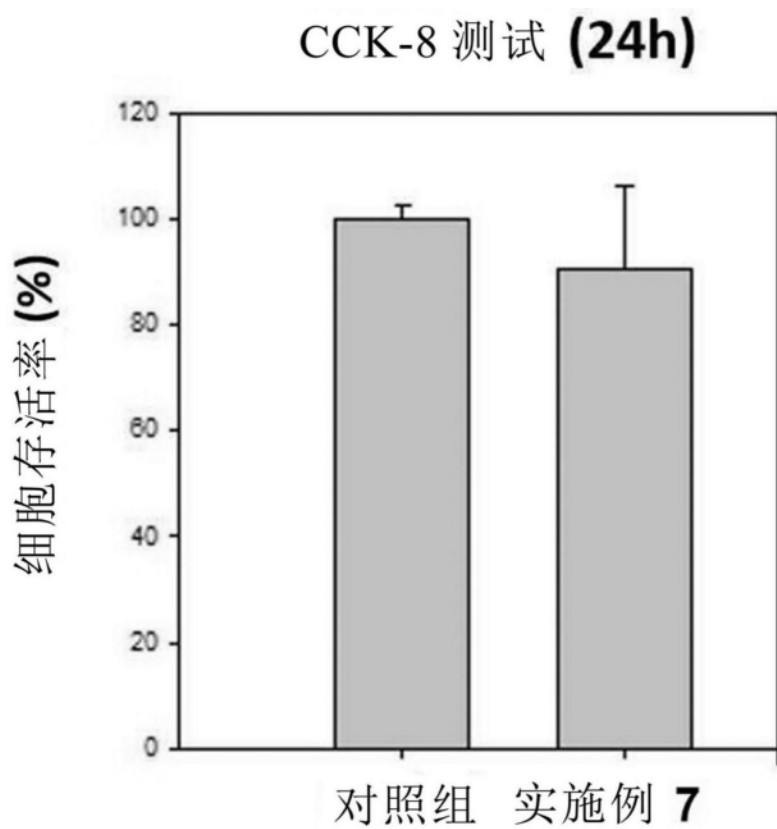


图7C

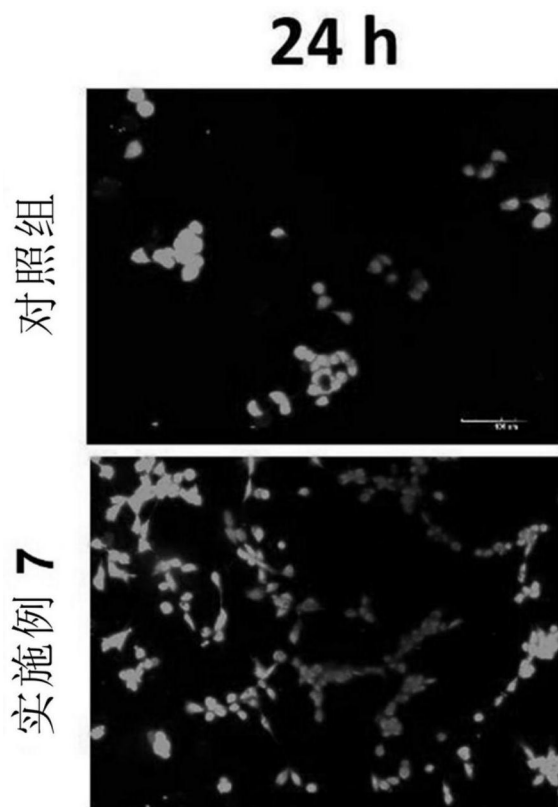


图7D



图8A

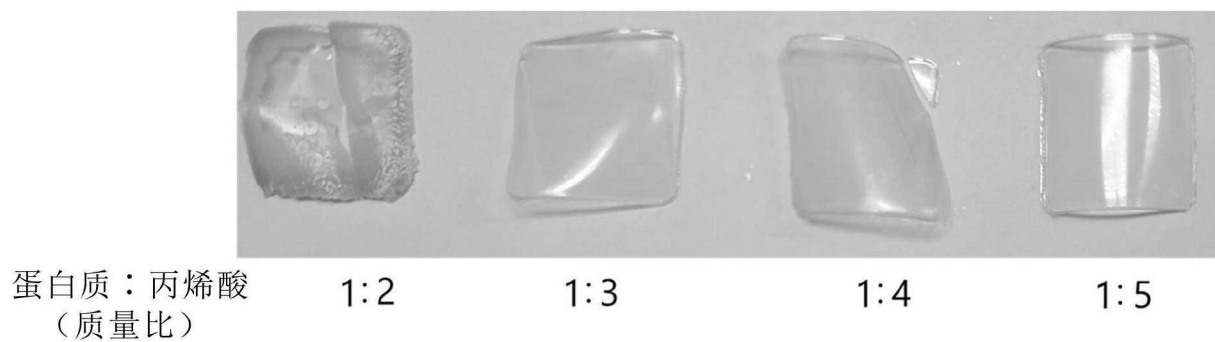


图8B



图8C

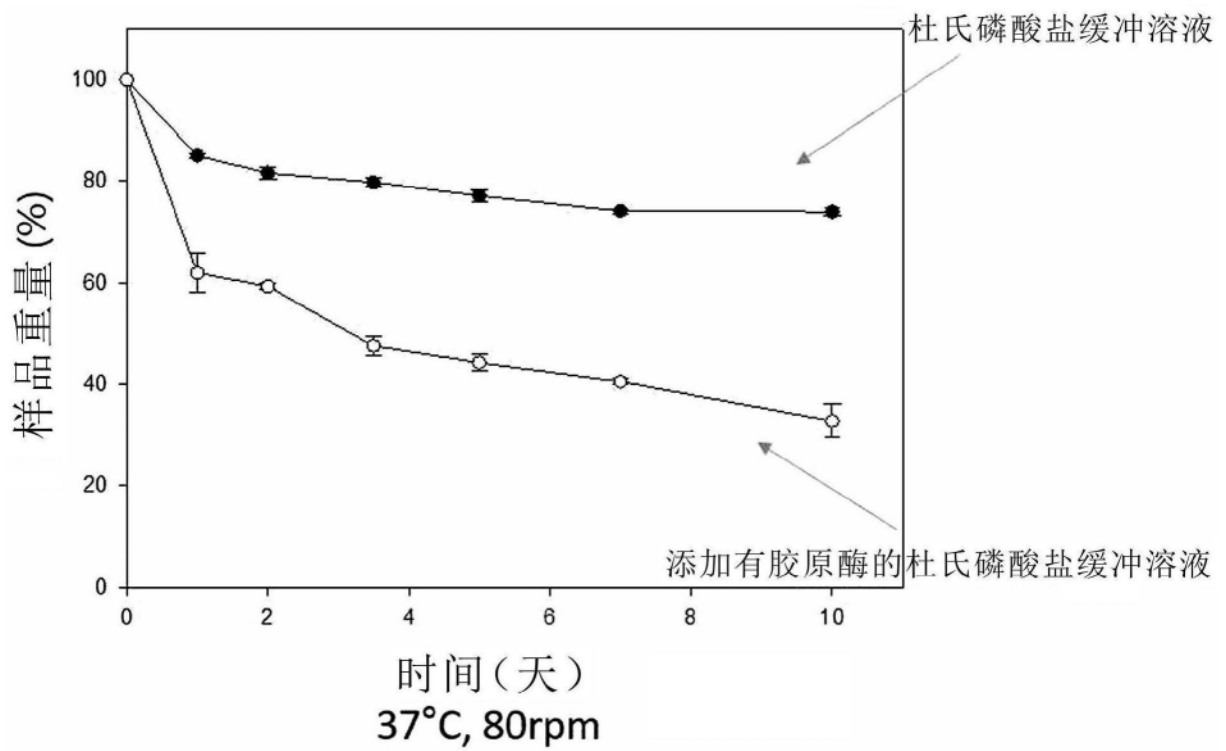


图9

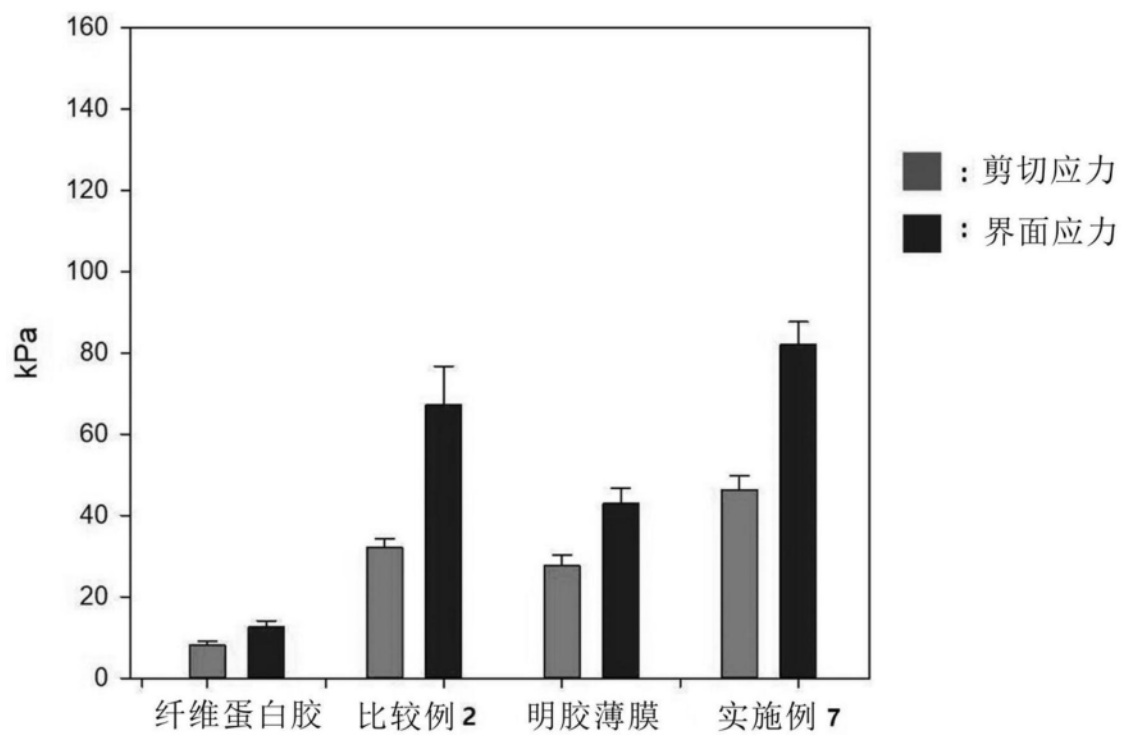


图10

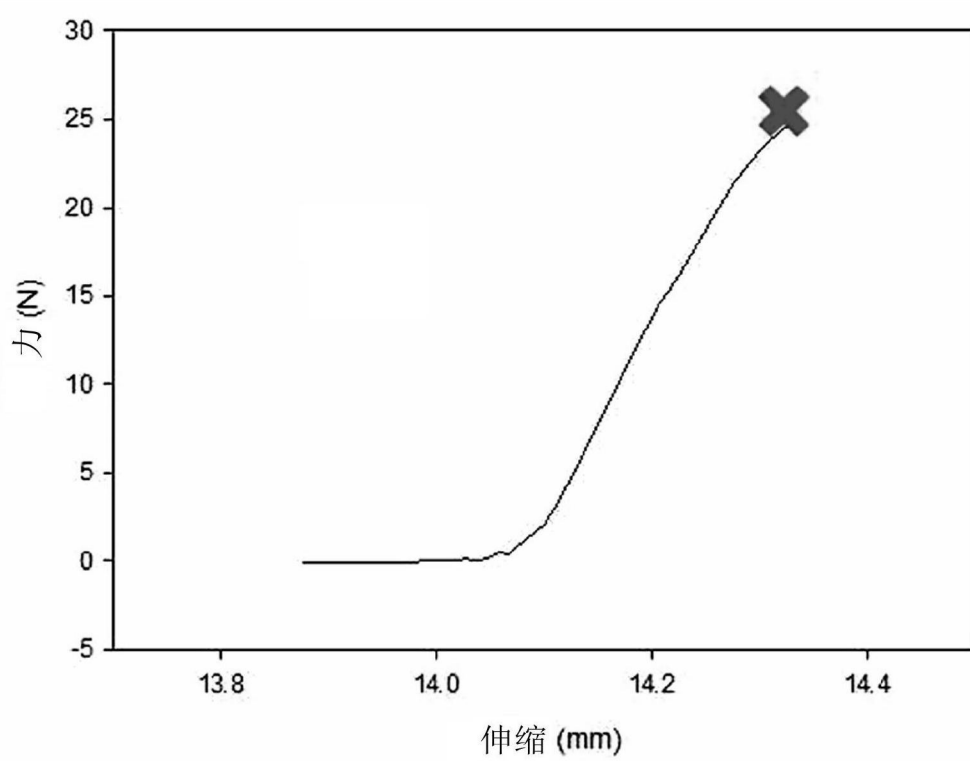


图11A

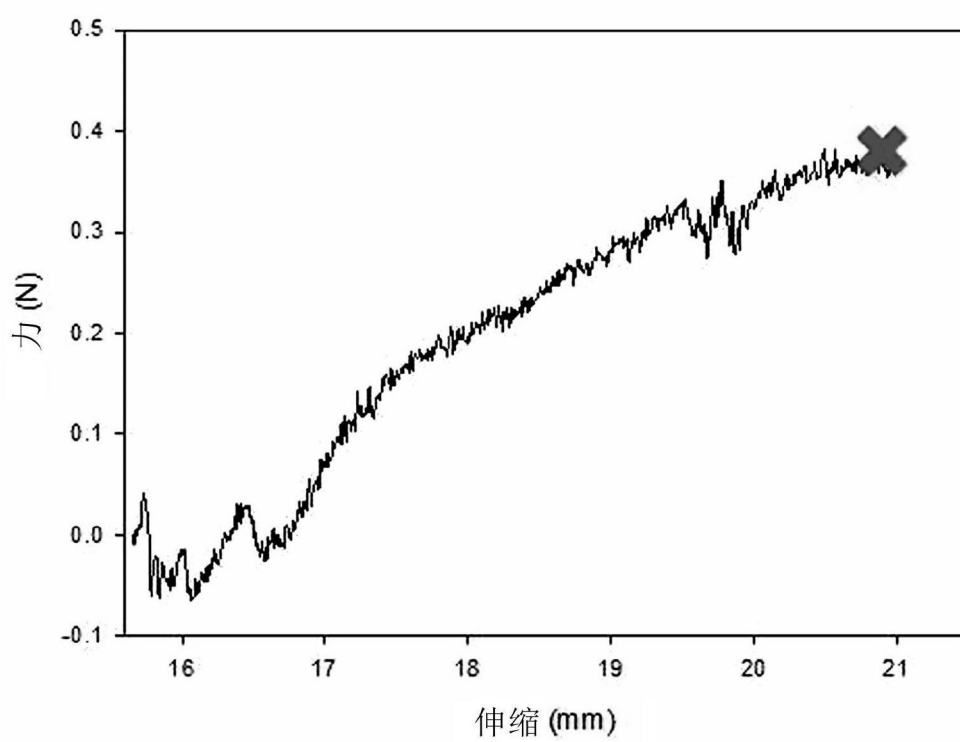


图11B



图12A



图12B