



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 118079069 B

(45) 授权公告日 2024.08.27

(21) 申请号 202410176681.0

A61L 24/02 (2006.01)

(22) 申请日 2024.02.08

A61L 24/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 118079069 A

(56) 对比文件

CN 107899075 A, 2018.04.13

CN 112300420 A, 2021.02.02

(43) 申请公布日 2024.05.28

审查员 郑森

(73) 专利权人 浙江大学

地址 310030 浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号

(72) 发明人 毛峥伟 丁翊航 余丽莎

(74) 专利代理机构 北京兆君联合知识产权代理

事务所(普通合伙) 11333

专利代理师 刘俊玲

(51) Int. Cl.

A61L 24/10 (2006.01)

A61L 24/04 (2006.01)

权利要求书4页 说明书17页 附图2页

(54) 发明名称

一种双重交联高强度纤维蛋白凝胶及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供一种双重交联高强度纤维蛋白凝胶,它包含由静电作用和物理结构互锁作用形成的第一重交联凝胶,和由所述第一重交联凝胶上的碳碳双键自由基聚合形成的第二重交联凝胶;静电作用和物理结构互锁作用是纤维蛋白原的“孔”结构与“结”模拟肽结构之间的“孔-结相互作用”,碳碳双键自由基聚合是带碳碳双键的基团之间的光交联聚合;带碳碳双键的基团选自甲基丙烯酸基团或丙烯酸基团中的任意一种或两种的组合。本发明还提供制备所述双重交联高强度纤维蛋白凝胶的原料组合物及方法。本发明所述的双重交联纤维蛋白凝胶可快速止血、快速凝胶化、具有强机械性能,可以用于外伤或手术创口中的快速止血。

1. 一种双重交联高强度纤维蛋白凝胶,它包含由静电作用和物理结构互锁作用形成的第一重交联凝胶,和由所述第一重交联凝胶上的碳碳双键自由基聚合形成的第二重交联;所述的静电作用和物理结构互锁作用是纤维蛋白原的“孔”结构与“结”模拟肽结构的“孔-结相互作用”,所述的碳碳双键自由基聚合是带碳碳双键的基团之间的光交联聚合;所述的带碳碳双键的基团选自甲基丙烯基团或丙烯酸基团中的任意一种或两种的组合;所述的纤维蛋白凝胶由原料A、原料B和原料C制备得到;所述的原料A为同时提供纤维蛋白原的“孔”结构和碳碳双键结构的高分子化合物,选自甲基丙烯酰化纤维蛋白原或丙烯酰化纤维蛋白原;所述的原料B可同时提供“结”模拟肽结构和碳碳双键结构的高分子化合物,选自分子骨架上接枝有“结”模拟肽的甲基丙烯酰化明胶或分子骨架上接枝有“结”模拟肽的羧基化聚乙二醇丙烯酸酯;所述的“结”模拟肽是包含GPRP的短肽序列,选自GPRPFAC或GPRPAAC中的任意一种肽段;所述的原料C为光引发剂苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂;所述的原料A中“孔”和原料B中“结”模拟肽的摩尔比为10:1-1:10。

2. 用于制备权利要求1所述的双重交联高强度纤维蛋白凝胶的原料组合物,包括原料A、原料B和原料C;所述的原料A为同时提供纤维蛋白原的“孔”结构和碳碳双键结构的高分子化合物选自甲基丙烯酰化纤维蛋白原或丙烯酰化纤维蛋白原;所述的原料B为同时提供“结”模拟肽结构和碳碳双键结构的高分子化合物选自分子骨架上接枝有“结”模拟肽的甲基丙烯酰化明胶或分子骨架上接枝有“结”模拟肽的羧基化聚乙二醇丙烯酸酯;所述的“结”模拟肽是包含GPRP的短肽序列,选自GPRPFAC或GPRPAAC中的任意一种肽段;所述的原料C为光引发剂苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂;所述的原料A中“孔”和原料B中“结”模拟肽的摩尔比为10:1-1:10。

3. 如权利要求2所述的原料组合物,其特征在于:所述的原料A中“孔”和原料B中“结”模拟肽的摩尔比为5:1-1:5。

4. 如权利要求2所述的原料组合物,其特征在于:所述的原料A中“孔”和原料B中“结”模拟肽的摩尔比为2:1-1:2。

5. 如权利要求2所述的原料组合物,其特征在于:所述的原料A中“孔”和原料B中“结”模拟肽的摩尔比为1:1.5。

6. 如权利要求2所述的原料组合物,其特征在于:所述原料B是分子骨架上接枝有“结”模拟肽的甲基丙烯酰化明胶,所述的甲基丙烯酰化明胶的分子量范围为大于或等于100 kDa且小于280kDa。

7. 如权利要求2所述的原料组合物,其特征在于:所述的甲基丙烯酰化明胶的分子量范围为大于或等于150 kDa且小于280 kDa。

8. 如权利要求2所述的原料组合物,其特征在于:所述的甲基丙烯酰化明胶的分子量为240 kDa。

9. 如权利要求2-8任意一项所述的原料组合物,其特征在于:所述的原料B中,“结”模拟肽的含量为0.59 $\mu\text{mol/g}$ ~588 $\mu\text{mol/g}$ 。

10. 如权利要求2-8任意一项所述的原料组合物,其特征在于:所述的原料B中,“结”模拟肽的含量为1.12 $\mu\text{mol/g}$ ~29.4 $\mu\text{mol/g}$ 。

11. 如权利要求2-8任意一项所述的原料组合物,其特征在于:所述的原料B中,“结”模拟肽的含量为2.84 $\mu\text{mol/g}$ ~11.76 $\mu\text{mol/g}$ 。

12. 如权利要求2-8任意一项所述的原料组合物,其特征在于:所述的原料B中,“结”模拟肽的含量为 $8.82\mu\text{mol/g}$ 。

13. 如权利要求2-8任意一项所述的原料组合物,其特征在于:所述的原料A、原料B和原料C均以特定的浓度存在于溶液中;所述的原料A浓度为 $5\%(\text{w/v})\sim 20\%(\text{w/v})$;所述的原料B浓度为 $5\%(\text{w/v})\sim 20\%(\text{w/v})$;所述的原料C浓度为 $0.2\%(\text{w/v})\sim 2\%(\text{w/v})$ 。

14. 如权利要求13所述的原料组合物,其特征在于:所述的原料A浓度为 $10\%(\text{w/v})\sim 20\%(\text{w/v})$ 。

15. 如权利要求13所述的原料组合物,其特征在于:所述的原料A浓度为 $15\%(\text{w/v})\sim 20\%(\text{w/v})$ 。

16. 如权利要求13所述的原料组合物,其特征在于:所述的原料A浓度为 $20\%(\text{w/v})$ 。

17. 如权利要求13所述的原料组合物,其特征在于:所述的原料B浓度为 $10\%(\text{w/v})\sim 20\%(\text{w/v})$ 。

18. 如权利要求13所述的原料组合物,其特征在于:所述的原料B浓度为 $15\%(\text{w/v})\sim 20\%(\text{w/v})$ 。

19. 如权利要求13所述的原料组合物,其特征在于:所述的原料B浓度为 $20\%(\text{w/v})$ 。

20. 如权利要求13所述的原料组合物,其特征在于:所述的原料C浓度为 $1\%(\text{w/v})\sim 2\%(\text{w/v})$ 。

21. 如权利要求13所述的原料组合物,其特征在于:所述的原料C浓度为 $2\%(\text{w/v})$ 。

22. 用于制备权利要求1所述的双重交联高强度纤维蛋白凝胶的试剂盒,包括相互独立包装的第一前体试剂和第二前体试剂;所述的第一前体试剂含有同时具备纤维蛋白原的“孔”结构和碳碳双键结构的高分子化合物,所述的第二前体试剂含有同时提供“结”模拟肽结构和碳碳双键结构的高分子化合物和光引发剂;所述的同时具备纤维蛋白原的“孔”结构和碳碳双键结构的高分子化合物选自甲基丙烯酰化纤维蛋白原或丙烯酰化纤维蛋白原;所述的同时提供“结”模拟肽结构和碳碳双键结构的高分子化合物选自分子骨架上接枝有“结”模拟肽的甲基丙烯酰化明胶或分子骨架上接枝有“结”模拟肽的羧基化聚乙二醇丙烯酸酯;所述的“结”模拟肽是包含GPRP的短肽序列,选自GPRPFAC或GPRPAAC中的任意一种肽段;所述的光引发剂为苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂;所述的第一前体试剂中所含纤维蛋白原结构的“孔”与所述的第二前体试剂中所含“结”模拟肽结构的摩尔比为 $10:1-1:10$ 。

23. 如权利要求22所述的试剂盒,其特征在于:所述的第一前体试剂中所含纤维蛋白原结构的“孔”与所述的第二前体试剂中所含“结”模拟肽结构的摩尔比为 $5:1-1:5$ 。

24. 如权利要求22所述的试剂盒,其特征在于:所述的第一前体试剂中所含纤维蛋白原结构的“孔”与所述的第二前体试剂中所含“结”模拟肽结构的摩尔比为 $2:1-1:2$ 。

25. 如权利要求22所述的试剂盒,其特征在于:所述的第一前体试剂中所含纤维蛋白原结构的“孔”与所述的第二前体试剂中所含“结”模拟肽结构的摩尔比为 $1:1.5$ 。

26. 如权利要求22所述的试剂盒,其特征在于:所述的第一前体试剂和/或第二前体试剂中还包含辅料和/或添加剂;所述的辅料选自甘氨酸、盐酸精氨酸、枸橼酸钠、蔗糖、氯化钠中的一种或两种以上;所述的添加剂选自生长因子、白细胞介素、维生素、银离子中的一种或两种以上;所述的生长因子选自血小板生长因子、表皮生长因子或成纤维细胞生长因

子中的一种或多种;所述的白细胞介素选自白细胞介素2、白细胞介素6或白细胞介素8中的一种或多种;所述的维生素选自维生素B、维生素C、维生素E或维生素K中的一种或多种。

27. 如权利要求22-26任意一项所述的试剂盒,其特征在于:还包括独立包装的配置用溶剂,所述的配置用溶剂为磷酸缓冲盐溶液、HEPES生物缓冲液、0.9%氯化钠溶液、氯化钙溶液、去离子水中的任意一种或几种的混合物。

28. 制备权利要求1所述的双重交联高强度纤维蛋白凝胶的方法,包括:

1) 将甲基丙烯基团或丙烯酸基团接枝到纤维蛋白原上,得到甲基丙烯酰化纤维蛋白原或丙烯酰化纤维蛋白原,记作组分A;制备溶剂中溶解有组分A的第一前体溶液,控制第一前体溶液中组分A的浓度为5 % (w/v)~20 % (w/v);

2) ①制备“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶,将“结”模拟肽序列接枝在甲基丙烯酰化明胶或羧基化聚乙二醇丙烯酸酯上,得到“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶或“结”模拟肽-羧基化聚乙二醇丙烯酸酯,记作组分B;

②将①中制备的组分B与苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂溶解在溶剂中,得到第二前体溶液,控制第二前体溶液中苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂浓度为0.2% (w/v)~2 % (w/v);控制第二前体溶液中组分B浓度为5 % (w/v)~20 % (w/v);

3) 将1)所得的第一前体溶液与2)所得的第二前体溶液按照10:1~1:10的体积比混合,并控制所述第一前体溶液中“孔”和第二前体溶液中“结”模拟肽的摩尔比为10:1~1:10,然后照射蓝光,即可得到所述的双重交联高强度纤维蛋白凝胶。

29. 如权利要求28所述的方法,其特征在于,1)中控制第一前体溶液中组分A的浓度为10 % (w/v)~20 % (w/v)。

30. 如权利要求28所述的方法,其特征在于,1)中控制第一前体溶液中组分A的浓度为15 % (w/v)~20 % (w/v)。

31. 如权利要求28所述的方法,其特征在于,1)中控制第一前体溶液中组分A的浓度为20 % (w/v)。

32. 如权利要求28所述的方法,其特征在于,②中控制第二前体溶液中苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂浓度为0.5% (w/v)~2 % (w/v)。

33. 如权利要求28所述的方法,其特征在于,②中控制第二前体溶液中苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂浓度为1 % (w/v)~2 % (w/v)。

34. 如权利要求28所述的方法,其特征在于,②中控制第二前体溶液中苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂浓度为2% (w/v)。

35. 如权利要求28所述的方法,其特征在于,②中控制第二前体溶液中组分B浓度为10 % (w/v)~20 % (w/v)。

36. 如权利要求28所述的方法,其特征在于,②中控制第二前体溶液中组分B浓度为15 % (w/v)~20 % (w/v)。

37. 如权利要求28所述的方法,其特征在于,②中控制第二前体溶液中组分B浓度为20 % (w/v)。

38. 如权利要求28所述的方法,其特征在于,3)中将1)所得的第一前体溶液与2)所得的第二前体溶液按照1:3~3:1的体积混合。

39. 如权利要求28所述的方法,其特征在于,3)中将1)所得的第一前体溶液与2)所得的

第二前体溶液按照1:1的体积混合。

40. 如权利要求28所述的方法,其特征在于,3)中控制所述第一前体溶液中“孔”和第二前体溶液中“结”模拟肽的摩尔比为5:1-1:5。

41. 如权利要求28所述的方法,其特征在于,3)中控制所述第一前体溶液中“孔”和第二前体溶液中“结”模拟肽的摩尔比为1:1.5。

42. 如权利要求28所述的方法,其特征在于:3)所述的第一前体溶液和第二前体溶液的混合是以相同且均匀速率、同时注射或喷涂于同一处出血部位方式进行。

43. 如权利要求42所述的方法,其特征在于:所述的注射或喷涂使用双联注射器、注射器、巴氏吸管完成,以控制两种前体溶液的混合均匀程度。

44. 如权利要求28-43任意一项所述的方法,其特征在于:3)中所述的蓝光是波长405nm的蓝光;3)中所述的照射蓝光是在第一前体溶液和第二前体溶液混合5s后开始;3)中所述的照射蓝光的时间控制在1s-30s。

45. 如权利要求28-43任意一项所述的方法,其特征在于:3)中所述的照射蓝光是在第一前体溶液和第二前体溶液混合5s~30s后开始。

46. 如权利要求28-43任意一项所述的方法,其特征在于:3)中所述的照射蓝光是在第一前体溶液和第二前体溶液混合5s~10s后开始。

47. 如权利要求28-43任意一项所述的方法,其特征在于:3)中所述的照射蓝光的时间控制在1s-10s。

48. 如权利要求28-43任意一项所述的方法,其特征在于:3)中所述的照射蓝光的时间控制在1s~5s。

一种双重交联高强度纤维蛋白凝胶及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药材料领域,尤其涉及用于意外创伤和手术出血的双重交联高强度纤维蛋白凝胶粘合剂,及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 创伤后或手术期间发生的无法控制的出血是全球死亡的主要原因。不受控制的大出血通常导致不良结果和升高的死亡率。控制出血量是降低手术期并发症和死亡率、改善患者预后的重要措施。

[0003] 目前已经开发的一些组织粘合剂作为外科手术器械的组成部分,被广泛用作密封剂和止血剂,来辅助控制手术过程或创伤中的出血。纤维蛋白胶和氰基丙烯酸酯类化合物是极具代表性的两类临床上使用的组织粘合剂。纤维蛋白胶来源于浓缩的纤维蛋白原和凝血酶交联反应,在出血部位原位形成纤维蛋白凝块,封堵出血,具有较好的生物相容性和生物降解性。然而纤维蛋白胶的机械强度和粘附强度较低,在湿态组织上的机械强度和粘附强度进一步受到限制,在持续的组织张力和血液的影响下易被血流冲走,不利于发挥其止血性能。此外,纤维蛋白胶在使用时,凝血酶溶液可通过破损的血管缺口进入血液循环,具有形成血栓的高危风险。氰基丙烯酸酯类粘合剂能提供更强的组织粘附力,但此类粘合剂因能通过放热反应释放热量和降解成有毒物质(如氰乙酸酯、甲醛等)而致严重的组织刺激和炎症,并且难以去除,这些不利因素限制了其在创伤修复中的应用。因此,迫切需要开发具有优异机械强度、粘附强度和生物相容性的组织粘合剂。

[0004] 纤维蛋白胶是外科手术中广泛使用的止血剂,通过模拟凝血级联反应,在出血部位形成纤维蛋白凝块。在对纤维蛋白聚合过程的研究中发现,凝血酶促发纤维蛋白原中心区域的纤维蛋白肽释放,从而使功能性氨基酸序列暴露,该功能性氨基酸序列是结合位点,被称为纤维蛋白原“结”。“结”带有正电荷,而纤维蛋白原两端的“孔”结构具有很强的负电荷,“孔”和“结”通过强烈的静电作用和氢键作用特异性结合,该特异性结合被称为“孔-结相互作用”,“孔-结相互作用”是引发纤维蛋白聚合的关键步骤,并进一步交联形成纤维蛋白凝块。“孔-结相互作用”对纤维蛋白的自组装交联起关键作用(J.W.Weisel, R.I.Litvinov.Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications.Blood.2013.121(10))。研究发现纤维蛋白原“结”的模拟短肽序列也能特异性地与纤维蛋白原的“孔”结合,通过“孔-结相互作用”引发纤维蛋白聚合(I.Litvinov, O.V.Gorkun,S.F.Owen,H.Shuman,and J.W.Weisel.Polymerization of fibrin: specificity,strength,and stability of knob-hole interactions studied at the single-molecule level.Blood.2005.106(9))。现有技术中,研究设计了工程纤维蛋白基质,利用“孔-结相互作用”,在不依赖凝血酶的情况下,将治疗性蛋白聚合在纤维蛋白网络结构中,通过纤维蛋白这个递送平台,实现治疗性蛋白的持续灌注治疗功能(A.S.Soon, S.E.Stabenfeldt,W.E.Brown,and T.H.Barker.Biomaterials.2010.31(7))。Huang等人在2017年构建了应用于3D细胞工程的纤维蛋白原/透明质酸水凝胶,通过基于纤维蛋白原和

“结”模拟肽接枝的透明质酸之间的“孔-结相互作用”,完成自组装交联,原位形成水凝胶(S.Huang,C.Wang,J.Xu,L.Ma,and C.Gao.In situ assembly of fibrinogen/hyaluronic acid hydrogel via knob-hole interaction for 3D cellular engineering.Bioact Mater.2017.2(4))。该研究构建的水凝胶具有较好的生物相容性,提示了纤维蛋白原/“结”模拟肽接枝透明质酸水凝胶应用于3D细胞工程的生物学潜力。但该研究构建的水凝胶的力学性能弱,溶胀率高,且不具备粘附强度,该研究未提及应用到止血领域。

[0005] 组织粘合剂的机械强度对控制出血是非常重要的。为了提高水凝胶的机械强度,双网络水凝胶的概念于2003年被首次提出,并逐步验证了双网络结构确实可以显著提高水凝胶的机械强度,因此可促进水凝胶在某些生物医学领域的应用。但具体到作为快速止血材料的应用,现有的双网络水凝胶仍然难以满足需求。例如,J.P.Gong等的文献(J.P.Gong,Y.Katsuyama,T.Kurokawa,Y.Osada,Double-network hydrogels with extremely high mechanical strength)中以聚2-丙烯酰胺基-2-甲基-1-丙磺酸钠(PAMPS)构成既硬又脆的第一网络,以聚丙烯酰胺(PAAm)构成既软又有延展性的第二网络,这使得双网络水凝胶硬而不脆,延展而不软,由此增强了水凝胶的机械性能。但是实验发现该双网络水凝胶对于湿组织的粘附性仍然较低,这使得其止血性能不够理想,不适合作为快速止血材料。再如,Y.Hong等的文献(Y.Hong,F.Zhou,Y.Hua,X.Zhang,C.Ni,D.Pan,Y.Zhang,D.Jiang,L.Yang,Q.Lin,Y.Zou,D.Yu,D.E.Arnot,X.Zou,L.Zhu,S.Zhang,H.Ouyang A strongly adhesive hemostatic hydrogel for the repair of arterial and heart bleeds)中采用的主要原料是甲基丙烯酰化明胶(GelMA)、N-(2-氨基乙基)-4-(4-(羟甲基)-2-甲氧基-5-亚硝基苯氧基)丁酰胺(NB)和糖胺聚糖透明质酸(HA-NB),引发剂是苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰膦酸锂(LAP)。该凝胶成胶机理是,先通过光引发交联形成第一网络,而后通过希夫碱反应化学交联形成第二网络。尽管该具有双网络和广泛化学相互作用的粘性水凝胶可以承受高血压,但是在具体的止血应用中,由于其第一网络的交联依赖光引发,因而前体溶液接触伤口时不能立即成胶形成第一网络,对于大出血的伤口来说,该水凝胶的黏附和止血效果有明显不足。因此,仅通过双网络结构来提升水凝胶的机械性能还不能满足快速止血的需要。

[0006] 理想的快速止血材料应该同时兼具高机械强度和强组织粘附性,且不依赖于机体凝血机制,甚至当机体凝血障碍时亦可发挥止血作用,同时兼具理想的生物相容性、快速凝胶化。因此,亟需发明一种新型止血材料,以解决现有止血材料机械强度不足和止血效果不佳的问题。

发明内容

[0007] 为了克服现有技术中存在的上述缺点,本发明的首要目的在于:提供一种可快速止血、快速凝胶化、具有强机械性能的粘合剂,以期用于外伤或手术创口中的快速止血。

[0008] 本发明另一个目的在于:提供制备所述粘合剂的原料组合物及制备方法。

[0009] 本发明再一个目的在于:提供使用所述粘合剂止血的方法。

[0010] 为了实现上述目的,本发明采取以下技术方案:

[0011] 第一方面,本发明提供一种双重交联高强度纤维蛋白凝胶,即一种纤维蛋白粘合剂,它包含由静电作用和物理结构互锁作用形成的第一重交联凝胶,和由所述第一重交联凝胶上的碳碳双键自由基聚合形成的第二重交联凝胶;所述的静电作用和物理结构互锁作

用是纤维蛋白原的“孔”结构与“结”模拟肽结构之间的“孔-结相互作用”,所述的碳碳双键自由基聚合是带碳碳双键的基团之间的光交联聚合;所述的带碳碳双键的基团可以选自甲基丙烯基团或丙烯酸基团中的任意一种或两种的组合。

[0012] 本发明所述的凝胶是以快速的纤维蛋白交联为基础,并具有强机械性能的固态水凝胶;所述的强机械性能是在所述第一重交联基础上进一步发生所述第二重交联而获得的加强的机械性能,即通过形成双重交联结构大幅增强了纤维蛋白固态水凝胶的机械强度。

[0013] 本发明所述的双重交联凝胶结构的优势在于:第一交联是静电作用,一方面具有易自回复性、可自修复性,在出血伤口形成“创面形状适配”的水凝胶结构;另一方面,可以锁住未交联的前驱体溶液。第二交联是化学交联,可以在“创面形状适配”的前提下,进一步增强机械性能。双重交联增加了凝胶体系的能量耗散,对于凝胶整体黏附性和机械性能均有提高。在实际应用上,可以在第一时间通过酶催化引发的静电相互作用在创伤原位生成第一重交联凝胶,与创口贴合紧密的同时快速封堵伤口;而后通过光引发的碳碳双键的基团之间的化学交联,进一步增强凝胶的本体机械性能,可以高效实现内脏各种器官组织的封堵,并且有效保证凝胶在创面的封堵长期稳定性。

[0014] 相比于商用的止血纱布、止血海绵、凝胶贴片等现有产品,本发明材料对于出血创口界面的创面形状适配和封堵能力都更强,同时在本体强度上也有所加强,因而可以用于应对内脏出血、动脉大出血等各种出血状况。

[0015] 现有文献中所述的“孔-结相互作用”(knob-hole interaction)是指在纤维蛋白交联过程中,凝血酶催化后的纤维蛋白暴露出的具有结合活性的氨基酸序列被称为“结”(knob),“结”可以与纤维蛋白原两端的“孔”(hole),通过强烈的非共价相互作用(静电和氢键作用)结合在一起,形成纤维蛋白交联。而本发明所述的“孔-结相互作用”是指“结”模拟肽与纤维蛋白原两端的“孔”之间发生的强烈的非共价相互作用(静电和氢键作用),通过上述作用可以使两者结合在一起,形成纤维蛋白与接枝了“结”模拟肽的甲基丙烯酰化明胶交联。所述的“结”模拟肽是能够与纤维蛋白原的“孔”结构基于“孔-结相互作用”进行自组装的短肽序列;所述的“结”模拟肽是包含GPRP的短肽序列;优选是GPRFPAC或GPRPAAC中的任意一种肽段。

[0016] 本发明所述的双重交联高强度纤维蛋白凝胶由原料A、原料B和原料C制备得到;所述的原料A为可同时具备纤维蛋白原的“孔”结构和碳碳双键结构的高分子化合物,优选甲基丙烯酰化纤维蛋白原或丙烯酰化纤维蛋白原,所述的原料B为可同时提供“结”模拟肽结构和碳碳双键结构的高分子化合物,优选分子骨架上接枝有“结”模拟肽的甲基丙烯酰化明胶或分子骨架上接枝有“结”模拟肽的羧酸功能化聚乙二醇;所述的原料C为光引发剂,优选苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂。在应用所述原料制备所述的凝胶时,将原料A、原料B和原料C混合,混合时原料A和原料B通过“孔-结相互作用”快速形成纤维蛋白胶第一重交联,而后通过光引发原料C使原料A和原料B的碳碳双键相互交联形成第二重交联提高机械强度。

[0017] 本发明所述的双重交联高强度纤维蛋白凝胶的机械强度与原料中“孔”和“结”模拟肽的摩尔比有关,随着“孔:结”摩尔比的降低,双重交联高强度纤维蛋白凝胶的机械强度会增加,但当摩尔比降低至1:1.5之后,机械强度的增加幅度并不显著。此外,所述的双重交联高强度纤维蛋白凝胶的强度还与原料浓度有关,随着原料中纤维蛋白原浓度和原料B浓

度的升高,双重交联高强度纤维蛋白凝胶的强度会升高。鉴于上述原料中“孔:结”摩尔比、原料浓度对凝胶整体性能带来的影响,本发明通过实验进一步优化了原料中“孔:结”的摩尔比,优选的纤维蛋白凝胶中,原料的“孔:结”摩尔比为10:1-1:10;优选为5:1-1:5;更优选为2:1-1:2;最优选为1:1.5。在这些优选的“孔:结”摩尔比下,原料A和原料B之间能快速有效地完成高强度的双重交联。本发明还通过实验进一步优化了各原料浓度:以甲基丙烯酰化纤维蛋白原为原料A时,其浓度为5% (w/v) ~ 20% (w/v);优选为10% (w/v) ~ 20% (w/v);更优选为15% (w/v) ~ 20% (w/v);最优选为20% (w/v)。以“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶为原料时,其浓度为5% (w/v) ~ 20% (w/v);优选为10% (w/v) ~ 20% (w/v);更优选为15% (w/v) ~ 20% (w/v);最优选为20% (w/v)。所述的原料C光引发剂的浓度不低于0.2% (w/v);更优选为1% (w/v) ~ 2% (w/v);最优选为2% (w/v)。在这些优选的“孔:结”摩尔比、原料浓度下,本发明所述的双重交联高强度纤维蛋白凝胶整体上能具有更优的止血性能,尤其是“孔:结”摩尔比为1:1.5、原料浓度为20% (w/v)、苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂浓度为2% (w/v)时,凝胶的止血性能可达到最佳,即快速完成的第一重交联形成的纤维蛋白凝胶可被第二重交联提高凝胶强度。

[0018] 本发明优选的一种方案中,所述原料B是分子骨架上接枝有“结”模拟肽的甲基丙烯酰化明胶。其中,所述的甲基丙烯酰化明胶的分子量范围为大于或等于100kDa且小于280kDa,优选为大于或等于150kDa且小于280kDa,最优选240kDa;所述优选的甲基丙烯酰化明胶的分子量与纤维蛋白原分子量(340kDa)相近,有利于原料B的明胶和原料A中的纤维蛋白原结构通过“孔-结相互作用”进行交联。此外,进一步优选的上述原料B中,“结”模拟肽的含量为0.59 $\mu\text{mol/g}$ ~ 588 $\mu\text{mol/g}$,优选为1.12 $\mu\text{mol/g}$ ~ 29.4 $\mu\text{mol/g}$,更优选为2.84 $\mu\text{mol/g}$ ~ 11.76 $\mu\text{mol/g}$,最优选为8.82 $\mu\text{mol/g}$ 。优化的“结”模拟肽含量也能够促进原料B和原料A中的纤维蛋白原结构通过“孔-结相互作用”进行交联。

[0019] 原料A所述的纤维蛋白原结构可来自人纤维蛋白原、牛纤维蛋白原或猪纤维蛋白原中的任意一种。

[0020] 原料B分子接枝的所述的“结”模拟肽是包含GPRP的短肽序列;优选是GPRFPAC或GPRPAAC中的任意一种肽段。

[0021] 第二方面,本发明还提供一种用于制备本发明第一方面所述的双重交联高强度纤维蛋白凝胶的原料组合物,包括原料A、原料B和原料C;所述的原料A为可同时提供纤维蛋白原的“孔”结构和碳碳双键结构的高分子化合物,优选甲基丙烯酰化纤维蛋白原或丙烯酰化纤维蛋白原,所述的原料B为可同时提供“结”模拟肽结构和碳碳双键结构的高分子化合物,优选分子骨架上接枝有“结”模拟肽的甲基丙烯酰化明胶或分子骨架上接枝有“结”模拟肽的羧酸功能化聚乙二醇,所述的原料C为光引发剂,优选苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂;所述的原料A中“孔”和原料B中“结”模拟肽的摩尔比为10:1-1:10;优选为5:1-1:5;更优选为2:1-1:2;最优选为1:1.5。

[0022] 本发明优选的一种原料组合物方案中,所述的原料A、原料B和原料C均以特定的浓度存在于溶液中。所述的原料A浓度为5% (w/v) ~ 20% (w/v);优选为10% (w/v) ~ 20% (w/v);更优选为15% (w/v) ~ 20% (w/v);最优选为20% (w/v)。所述的原料B浓度为5% (w/v) ~ 20% (w/v);优选为10% (w/v) ~ 20% (w/v);更优选为15% (w/v) ~ 20% (w/v);最优选为20% (w/v)。所述的原料C浓度为0.2% (w/v) ~ 2% (w/v);更优选为1% (w/v) ~ 2% (w/v);最

优选为2% (w/v)。

[0023] 本发明通过实验发现,所述的原料组合物中,原料A和原料B的浓度与双重交联高强度纤维蛋白凝胶的强度有关:当原料A和原料B的浓度在5% (w/v) ~ 20% (w/v) 的范围内时,随着原料A和原料B浓度的升高,双重交联高强度纤维蛋白凝胶的强度升高,伤口封堵效果升高。

[0024] 本发明所述的原料组合物中,所述原料A结构中的纤维蛋白原结构可来自人纤维蛋白原、牛纤维蛋白原或猪纤维蛋白原中的任意一种。

[0025] 本发明所述的原料组合物中,所述原料B分子骨架上接枝的所述的“结”模拟肽是包含GPRP的短肽序列;优选是GPRPFPAC或GPRPAAC中的任意一种肽段。

[0026] 本发明还通过实验发现,有原料A和原料C同时存在的混合溶液储存性差,而有原料B和原料C同时存在的混合溶液储存性较好,因此,本发明优选的一种所述原料组合物的方案中,所述的原料组合物包括第一前体溶液和第二前体溶液,所述的第一前体溶液为含有原料A的溶液,所述的第二前体溶液为同时含有原料B与原料C的混合溶液。

[0027] 本发明所述的原料组合物可以是制药或临床上可接受的多种具体形式,例如可以是冻干粉剂、注射剂、海绵或颗粒。

[0028] 第三方面,本发明还提供用于制备本发明第一方面所述的双重交联高强度纤维蛋白凝胶的试剂盒,包括相互独立包装的第一前体试剂和第二前体试剂;所述的第一前体试剂含有可同时提供纤维蛋白原的“孔”结构和碳碳双键结构的高分子化合物,所述的第二前体试剂含有可同时提供“结”模拟肽结构和碳碳双键结构的高分子化合物和光引发剂;所述的可同时提供纤维蛋白原的“孔”结构和碳碳双键结构的高分子化合物优选为甲基丙烯酰化纤维蛋白原或丙烯酰化纤维蛋白原;所述的可同时提供“结”模拟肽结构和碳碳双键结构的高分子化合物优选分子骨架上接枝有“结”模拟肽的甲基丙烯酰化明胶或分子骨架上接枝有“结”模拟肽的羧酸功能化聚乙二醇;所述的光引发剂优选苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂。

[0029] 本发明优选的所述试剂盒中,所述的第一前体试剂中所含纤维蛋白原结构的“孔”与所述的第二前体试剂中所含“结”模拟肽结构的摩尔比为10:1-1:10;优选为5:1-1:5;更优选为2:1-1:2;最优选为1:1.5。

[0030] 本发明所述的试剂盒中,可同时提供纤维蛋白原的“孔”结构和碳碳双键结构的高分子化合物中的纤维蛋白原可来自人纤维蛋白原、牛纤维蛋白原或猪纤维蛋白原中的任意一种。

[0031] 本发明所述的试剂盒中,可同时提供“结”模拟肽结构和碳碳双键结构的高分子化合物中的“结”模拟肽是包含GPRP的短肽序列;优选是GPRPFPAC或GPRPAAC中的任意一种肽段。

[0032] 本发明优选的试剂盒中,所述的第一前体试剂和/或第二前体试剂中还包含辅料和/或添加剂。所述的辅料选自甘氨酸、盐酸精氨酸、枸橼酸钠、蔗糖、氯化钠中的一种或两种以上。所述的添加剂选自生长因子、白细胞介素、维生素、银离子中的一种或两种以上;所述的生长因子可进一步选自血小板生长因子、表皮生长因子或成纤维细胞生长因子中的一种或多种;所述的白细胞介素可进一步选自白细胞介素2、白细胞介素6或白细胞介素8中的一种或多种;所述的维生素可进一步选自维生素B、维生素C、维生素E或维生素K中的一种或

多种。

[0033] 本发明所述的试剂盒中,所述的第一前体试剂和第二前体试剂可以是制药或临床上可接受的多种具体形式,例如可以是冻干粉剂、注射剂、海绵或颗粒。

[0034] 本发明所述的试剂盒中,还可以进一步包括独立包装的配置用溶剂,所述的配置用溶剂可选为磷酸缓冲盐溶液、HEPES生物缓冲液、0.9%氯化钠溶液、氯化钙溶液、去离子水中的任意一种或几种的混合物。

[0035] 第四方面,本发明还提供制备本发明第一方面所述的双重交联高强度纤维蛋白凝胶的方法,包括:

[0036] 1) 将甲基丙烯基团或丙烯酸基团接枝到纤维蛋白原上,得到甲基丙烯酰化纤维蛋白原或丙烯酰化纤维蛋白原,记作组分A;制备溶剂中溶解有组分A的第一前体溶液,控制第一前体溶液中组分A的浓度为5% (w/v) ~ 20% (w/v);

[0037] 2) ①制备“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶,将“结”模拟肽序列接枝在甲基丙烯酰化明胶或羧基化聚乙二醇丙烯酸酯上,得到“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶或“结”模拟肽-羧酸功能化聚乙二醇,记作组分B;

[0038] ②将①中制备的组分B与苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂溶解在溶剂中,得到第二前体溶液,控制第二前体溶液中苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂浓度为0.2% (w/v) ~ 2% (w/v)、组分B浓度为5% (w/v) ~ 20% (w/v);

[0039] 3) 将1)所得的第一前体溶液与2)所得的第二前体溶液按照10:1 ~ 1:10的体积比混合,并控制所述第一前体溶液中“孔”和第二前体溶液中“结”模拟肽的摩尔比为10:1 ~ 1:10,然后照射蓝光,即可得到所述的双重交联高强度纤维蛋白凝胶。

[0040] 本发明优选的制备方法中,1)所述的第一前体溶液中所述的组分A浓度为10% (w/v) ~ 20% (w/v);更优选为15% (w/v) ~ 20% (w/v);最优选为20% (w/v)。

[0041] 本发明优选的制备方法中,2)所述的第二前体溶液中所述的组分B浓度为10% (w/v) ~ 20% (w/v);更优选为15% (w/v) ~ 20% (w/v);最优选为20% (w/v)。

[0042] 本发明优选的制备方法中,2)所述的第二前体溶液中苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂浓度为0.5% (w/v) ~ 2% (w/v);更优选为1% (w/v) ~ 2% (w/v);最优选为2% (w/v)。

[0043] 本发明优选的制备方法中,3)中将1)所得的第一前体溶液与2)所得的第二前体溶液按照1:3 ~ 3:1的体积混合,最优选按照1:1的体积混合。

[0044] 本发明优选的制备方法中,3)中控制所述第一前体溶液中“孔”和第二前体溶液中“结”模拟肽的摩尔比为5:1-1:5;最优选为1:1.5。

[0045] 本发明所述的制备方法中,当3)所述的第一前体溶液和第二前体溶液混合时,组分A提供的纤维蛋白原的“孔”结构与组分B提供的“结”-模拟肽会先通过孔-结相互作用快速形成第一重交联凝胶,此后组分A提供的碳碳双键和组分B提供的碳碳双键在组分C光引发剂作用下,于光照条件下,在第一重交联凝胶基础上进一步通过碳碳双键的光引发交联形成第二重交联凝胶,所述第二重交联凝胶的形成实现了对第一重交联凝胶的强化,最终可快速成胶,获得高机械强度的双重交联纤维蛋白凝胶。

[0046] 在上述双重交联的成胶过程中,可以通过更加均匀地完成所述第一重交联来使最终获得的纤维蛋白凝胶具有更高的机械强度。为了所述第一重交联更加均匀,本发明优选

的制备方法中,3)所述的第一前体溶液和第二前体溶液的混合是以相同且均匀速率、同时注射或喷涂于同一处出血部位方式进行;更优选的制备方法中,所述的注射或喷涂使用双联注射器、注射器、巴氏吸管完成,以控制两种前体溶液的混合均匀程度。

[0047] 此外,上述双重交联的成胶过程中,还可以通过控制所述的蓝光的照射时机和时长来调节所述第二重交联生成的凝胶的密度和强度。

[0048] 本发明优选的制备方法中,3)中所述的蓝光是波长405nm的蓝光。

[0049] 本发明优选的制备方法中,3)中所述的照射蓝光是在第一前体溶液和第二前体溶液混合5s后开始;更优选在第一前体溶液和第二前体溶液混合5s~30s后开始;进一步优选在第一前体溶液和第二前体溶液混合5s~10s后开始。

[0050] 本发明优选的制备方法中,3)中所述的照射蓝光的时间控制在1s-30s,更优选控制在1s-10s,最优选控制在1s~5s。

[0051] 本发明所述的制备方法中,所述的第一前体试剂和/或第二前体试剂是冻干剂、海绵或颗粒;所述的配置用溶剂为注射剂。

[0052] 本发明所述的制备方法中,1)所述的纤维蛋白原可选自人纤维蛋白原、牛纤维蛋白原或猪纤维蛋白原中的任意一种。2)所述的“结”模拟肽是包含GPRP的短肽序列;优选是GPRFPAC或GPRPAAC中的任意一种肽段。

[0053] 第五方面,本发明还提供本发明所述的原料在制备原位快凝止血材料中的应用。

[0054] 所述的原料应用包括:将所述的原料A制备成可注射的第一前体溶液,同时将所述的原料B、原料C混合制备成可注射的第二前体溶液,然后将第一前体溶液和第二前体溶液同时均匀的注射或喷涂于出血伤口部位,可在出血伤口部位快速形成固态水凝胶第一重交联,后通过照射波长蓝光快速形成固态水凝胶第二重交联。

[0055] 所述的出血伤口包括由于意外创伤导致或手术中发生的器官出血;所述的器官可以是肝脏、脾脏、肾脏、胃肠、心脏或皮肤。

[0056] 本发明所述的应用中,在出血伤口注射所述的试剂时,(1)原料A和B可瞬间(1s~2s)在伤口表面形成纤维蛋白凝胶第一重交联;光引发可瞬间(2s-3s)在纤维蛋白凝胶中通过原料A和B上的碳碳双键交联形成第二重交联;(2)高浓度的原料增强双重交联纤维蛋白凝胶的强度,可抵抗血液压力,保持凝胶的完整性,提高封堵伤口效果;(3)同时,双重交联高强度纤维蛋白凝胶在第一重交联基础上形成第二重交联,可显著提高凝胶机械强度,可抵抗血液冲击,保护双重交联纤维蛋白凝胶不因大出血而冲走,进一步增强封堵伤口效果。

[0057] 针对背景技术中纤维蛋白胶的低机械强度和依赖凝血酶而产生的血栓风险等缺点,本发明通过创新技术设计以所述原料A和所述原料B为主要原料,原料B中的“结”模拟肽结构,在不依赖凝血酶的情况下,可以通过“孔-结相互作用”,与原料A中的纤维蛋白原的“孔”结构快速发生交联,形成固态纤维蛋白凝胶第一重交联;同时,分别来自原料A和原料B的的碳碳双键在光引发下相互交联形成第二重交联,大幅提高纤维蛋白胶的机械强度。

[0058] 有益效果:

[0059] 相对于现有技术,本发明的优点在于:快速凝胶化、高凝胶强度、强粘附力、止血效果佳。本发明的高强度纤维蛋白凝胶可即刻(1s~2s)发生第一重交联纤维蛋白交联,形成固态纤维蛋白凝胶第一重交联,率先起到封堵伤口的作用,随后光引发可瞬间(2s-3s)在纤维蛋白凝胶中通过碳碳双键光引发交联形成第二重交联,起到对第一重交联的加强作用,

从而提高纤维蛋白凝胶的机械强度,可抵抗血液压力,抵抗血液冲击,保持凝胶的完整性,避免被血流冲走,增强封堵伤口效果。此外,本发明的双重交联纤维蛋白凝胶的形成不依赖凝血酶的作用,极大程度上避免了高活性的凝血酶储存性差、凝血酶催化纤维蛋白胶交联导致血栓堵塞血管引起并发症等问题。

[0060] 正是由于本发明提供的双重交联高强度纤维蛋白凝胶具有高凝胶强度和快速止血效果,因此可用于意外创伤或手术中的肝脏、脾脏、肾脏、心脏、胃肠和皮肤出血的止血应用。

附图说明

[0061] 图1是实施例1中“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶的核磁共振氢谱图。

[0062] 图2体现了实施例1和对比例1~对比例4在止血时间上的比较。

[0063] 图3和图4体现了实施例1及对比例1在止血时间和失血量上的比较。

具体实施方式

[0064] 下面结合具体实施例对本发明要解决的技术问题、技术方案和有益效果进行详细说明。以下实施例将有助于本领域的技术人员进一步理解本发明,但不以任何形式限制本发明。应当指出的是,对本领域的普通技术人员,在不脱离本发明构思的前体下,还可以做出若干变形和改进。这些都属于本发明的保护范围。

[0065] 本发明提供一种双重交联高强度纤维蛋白凝胶,它是一种纤维蛋白粘合剂,在不依赖凝血酶的情况下,由原料中的纤维蛋白原的“孔”结构与“结”模拟肽结构先通过“孔-结相互作用”完成纤维蛋白交联,形成固态纤维蛋白凝胶的第一重交联,再由原料中的碳碳双键经光引发交联形成第二重交联,第二重交联的形成显著提高了凝胶的机械强度。所述原料中的纤维蛋白原结构的“孔”与“结”模拟肽结构的“结”的摩尔比为10:1~1:10;优选为5:1-1:5;更优选为2:1-1:2;最优选为1:1.5。

[0066] 所述双重交联高强度纤维蛋白凝胶具有高机械强度,是在所述第一重交联基础上进一步形成第二重交联而获得的加强的机械性能。

[0067] 所述的双重交联高强度纤维蛋白凝胶原料包括原料A、原料B和原料C,可按照以下优选的方法制备得到:

[0068] (1) 原料A溶液的制备:将甲基丙烯基团接枝到纤维蛋白原上,优选用甲基丙烯酸N-羟琥珀酸亚胺酯修饰纤维蛋白原,得到甲基丙烯酰化纤维蛋白原;将所述的甲基丙烯酰化纤维蛋白原溶解,得到原料A溶液;控制所得原料A溶液浓度不低于5% (w/v),优选为10% (w/v) ~ 20% (w/v)。

[0069] (2) 原料B与原料C混合溶液的制备:将功能性短肽序列接枝在甲基丙烯酰化明胶上,所述的功能性短肽序列选自GPRPFAC或GPRPAAC中的任意一种短肽序列,得到“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶,将所述的“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶与光引发剂苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂溶解,得到原料B与原料C混合溶液,控制所得原料B与原料C混合溶液中原料B浓度为5% (w/v) ~ 20% (w/v),优选为10% (w/v) ~ 20% (w/v);苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂浓度为0.2% (w/v) ~ 2% (w/v),优选为1% (w/v) ~ 2% (w/v)。

[0070] (3) 储存方法:将得到的原料A溶液和原料B与原料C混合溶液按体积比为1:10~

10:1分别进行冷冻干燥,成为海绵后储存。

[0071] 使用上述冻干海绵制备双重交联纤维蛋白凝胶:将海绵状A组分和海绵状B组分与C组分混合物分别溶于溶剂中,得到可注射溶液状A组分溶液和B组分与C组分混合溶液。将等体积的A组分溶液和B组分与C组分混合溶液均匀的注射/喷涂于出血部位,可在出血部位原位快速形成固态水凝胶第一重交联,再用波长为405nm的蓝光光照快速引发交联形成第二重交联。作为优选方案,所述的可注射溶液在使用时的注射工具为双联注射器、注射器、巴氏吸管。

[0072] 上述制备方案中,所述的溶剂可选为磷酸缓冲盐溶液、HEPES生物缓冲液、0.9%氯化钠溶液中的任意一种或几种的组合,且其使用量没有特别限制,可以根据实际需要浓度进行配制。

[0073] 基于上述实施方式,本发明进一步列举以下实施例予以说明。

[0074] 实施例1

[0075] 制备一种双重交联高强度纤维蛋白凝胶,具体原料及步骤如下:

[0076] (1)A组分溶液的制备,即甲基丙烯酰化纤维蛋白原溶液的制备:

[0077] ①用甲基丙烯酸N-羟琥珀酸亚胺酯修饰纤维蛋白原:纤维蛋白原经溶解后,转移至烧杯中,并用搅拌磁子搅拌,缓慢滴入溶有甲基丙烯酸N-羟琥珀酸亚胺酯的DMSO溶液,避光密封搅拌4h后透析、冻干,由此将甲基丙烯基团接枝在纤维蛋白原上,得到甲基丙烯酰化纤维蛋白原;所述的甲基丙烯酰化纤维蛋白原经¹H核磁共振氢谱的检测,可观察到相比于纤维蛋白原,甲基丙烯酰化纤维蛋白原在5.63ppm和5.39ppm具有特征峰,出现双峰,显示甲基丙烯酸基团成功接枝在纤维蛋白原上。

[0078] ②取1g甲基丙烯酰化纤维蛋白原缓慢置于预热的0.9%氯化钠溶液中,完全溶解后,得到质量体积百分比(w/v)为20%(w/v)的A组分溶液。

[0079] (2)B组分与C组分混合溶液的制备,即“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶与苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂混合溶液的制备:

[0080] ①将功能性短肽序列GPRPFAC接枝在甲基丙烯酰化明胶上,具体步骤为:将功能性短肽序列GPRPFAC和甲基丙烯酰化明胶溶解在pH=7.4的PBS溶液中,加入三乙胺TEA,控制溶液的pH在8.4-10.0之间,在氮气条件下,磁子搅拌速度250rpm-350rpm,室温避光反应24h,进行两天PBS缓冲溶液透析(3500D),得到“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶。控制接枝后化合物中“结”模拟肽的含量为8.82μmol/g得到B组分“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶。所述的“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶中,“结”模拟肽和甲基丙烯酰化明胶成功接枝在明胶上的核磁表征如图1所示:相比于甲基丙烯酰化明胶,“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶在5.63ppm和5.39ppm的峰强(甲基丙烯基对应的氢峰)显著下降,显示“结”模拟肽成功接枝在明胶上。

[0081] ②将所述的“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶和C组分苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂完全溶解在预热的0.9%氯化钠溶液中,得到B组分与C组分混合溶液,其中“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶质量体积百分比为(w/v)为20%(w/v)、苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂质量体积百分比为(w/v)为2%(w/v)。

[0082] (3)储存:将得到的A组分溶液和B组分与C组分的混合溶液按照体积比为1:1的比例分别进行冷冻干燥,以海绵状进行储存;

[0083] (4) 使用方法:将海绵状A组分和B组分按照1:1的体积份额比例分别溶于含有0.9%氯化钠溶液中,分别得到可注射的第一前体溶液和第二前体溶液,其中第一前体溶液中A组分浓度为20% (w/v),第二前体溶液中B组分的浓度为20% (w/v)、C组分的浓度为2% (w/v)。此时第一前体溶液中A组分中的“孔”和第二前体溶液中B组分中的“结”的摩尔比为1:1.5。将第一前体溶液和第二前体溶液等体积的装入双联注射器,通过喷头注射/喷涂在出血部位,而后通过波长405nm蓝光照射得到双重交联高强度纤维蛋白凝胶。

[0084] 实施例2

[0085] 制备方法和使用方法大体与实施例1相同,不同之处在于:通过将实施例1步骤(1)中甲基丙烯酰化纤维蛋白原的用量从1g调整为3g,使最终步骤(4)得到的等体积装入双联注射器的第一前体溶液中的A组分与第二前体溶液中的B组分的“孔:结”摩尔比为1:0.5。

[0086] 实施例3

[0087] 制备方法和使用方法大体与实施例1相同,不同之处在于:通过将实施例1步骤(1)中甲基丙烯酰化纤维蛋白原的用量从1g调整为0.33g,使最终步骤(4)得到的等体积装入双联注射器的第一前体溶液中的A组分第二前体溶液中的B组分的“孔:结”摩尔比为1:5。

[0088] 实施例4

[0089] 制备方法和使用方法大体与实施例1相同,不同之处在于:通过将实施例1步骤(1)中甲基丙烯酰化纤维蛋白原的用量从1g调整为0.15g,使最终步骤(4)得到的等体积装入双联注射器的第一前体溶液中的A组分第二前体溶液中的B组分的“孔:结”摩尔比为1:10。

[0090] 实施例5

[0091] 制备方法和使用方法大体与实施例1相同,不同之处在于:通过调节实施例1步骤(4)氯化钠溶液的用量,使可注射的第二前体溶液中的苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂浓度为1% (w/v)。

[0092] 实施例6

[0093] 制备方法和使用方法大体与实施例2相同,不同之处在于:通过调节实施例2氯化钠溶液的用量,使可注射的第一前体溶液中的A组分甲基丙烯酰化纤维蛋白原浓度为10% (w/v),第二前体溶液中的B组分“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶浓度为10% (w/v)。

[0094] 实施例7

[0095] 制备方法和使用方法大体与实施例1相同,不同之处在于:通过调节实施例1步骤(4)氯化钠溶液的用量,使可注射的第一前体溶液中的A组分浓度为15% (w/v),第二前体溶液中B组分“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶浓度为15% (w/v)。

[0096] 实施例8

[0097] 制备一种双重交联高强度纤维蛋白凝胶,具体原料及步骤如下:

[0098] (1) A组分溶液的制备,即丙烯酰化纤维蛋白原溶液的制备:

[0099] ①参考实施例1中用甲基丙烯酸N-羟琥珀酸亚胺酯修饰纤维蛋白原的方法,换用丙烯酸N-羟琥珀酸亚胺酯修饰纤维蛋白原,将丙烯基团接枝在纤维蛋白原上,得到丙烯酰化纤维蛋白原;

[0100] ②取1g丙烯酰化纤维蛋白原缓慢置于预热的0.9%氯化钠溶液中,完全溶解后,得到质量体积百分比 (w/v) 为20% (w/v) 的A组分溶液。

[0101] (2) B组分与C组分混合溶液的制备,即“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶与苯基-2,

4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂混合溶液的制备:

[0102] ①按照与实施例1相同的方法,将功能性短肽序列GPRPFAC接枝在甲基丙烯酰化明胶上,控制接枝后化合物中“结”模拟肽的含量为 $8.82\mu\text{mol/g}$ 得到B组分“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶;

[0103] ②将所述的“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶和C组分苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂完全溶解在预热的0.9%氯化钠溶液中,得到B组分与C组分混合溶液,其中“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶质量体积百分比为(w/v)为20% (w/v)、苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂质量体积百分比为(w/v)为2% (w/v)。

[0104] (3) 储存:将得到的A组分溶液和B组分与C组分的混合溶液按照体积比为1:1的比例分别进行冷冻干燥,以海绵状进行储存;

[0105] (4) 使用方法:将海绵状A组分和B组分按照1:1的体积份额比例分别溶于含有0.9%氯化钠溶液中,分别得到可注射的第一前体溶液和第二前体溶液,其中第一前体溶液中A组分浓度为20% (w/v),第二前体溶液中B组分的浓度为20% (w/v)、C组分的浓度为2% (w/v)。此时第一前体溶液中A组分中的“孔”和第二前体溶液中B组分中的“结”的摩尔比为1:1.5。将第一前体溶液和第二前体溶液等体积的装入双联注射器,通过喷头注射/喷涂在出血部位,而后通过波长405nm蓝光照射得到双重交联高强度纤维蛋白凝胶。

[0106] 实施例9

[0107] 制备方法和使用方法大体与实施例8相同,不同之处在于:通过将实施例8步骤(1)中丙烯酰化纤维蛋白原的用量从1g调整为0.33g,使最终步骤(4)得到的等体积装入双联注射器的第一前体溶液中的A组分第二前体溶液中的B组分的“孔:结”摩尔比为1:5。

[0108] 实施例10

[0109] 制备方法和使用方法大体与实施例8相同,不同之处在于:通过将实施例8步骤(1)中丙烯酰化纤维蛋白原的用量从1g调整为3g,使最终步骤(4)得到的等体积装入双联注射器的第一前体溶液中的A组分与第二前体溶液中的B组分的“孔:结”摩尔比为1:0.5。

[0110] 实施例11

[0111] 制备一种双重交联高强度纤维蛋白凝胶,具体原料及步骤如下:

[0112] (1)A组分溶液的制备,即丙烯酰化纤维蛋白原溶液的制备:

[0113] ①参考实施例1中用甲基丙烯酸N-羟琥珀酸亚胺酯修饰纤维蛋白原的方法,换用丙烯酸N-羟琥珀酸亚胺酯修饰纤维蛋白原,将丙烯基团接枝在纤维蛋白原上,得到丙烯酰化纤维蛋白原;

[0114] ②取1g丙烯酰化纤维蛋白原缓慢置于预热的0.9%氯化钠溶液中,完全溶解后,得到质量体积百分比(w/v)为20% (w/v)的A组分溶液。

[0115] (2)B组分与C组分混合溶液的制备,即“结”模拟肽-聚乙二醇与苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂混合溶液的制备:

[0116] ①参考实施例1中B组分的制备方法,将功能性短肽序列GPRPFAC接枝在羧基化聚乙二醇丙烯酸酯上,控制接枝后化合物中“结”模拟肽的含量为 $8.82\mu\text{mol/g}$ 得到B组分“结”模拟肽-聚乙二醇;

[0117] ②将所述的“结”模拟肽-聚乙二醇和C组分苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂完全溶解在预热的0.9%氯化钠溶液中,得到B组分与C组分混合溶液,其中“结”模拟肽-聚

乙二醇质量体积百分比为(w/v)为20% (w/v)、苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂质量体积百分比为(w/v)为2% (w/v)。

[0118] (3) 储存:将得到的A组分溶液和B组分与C组分的混合溶液按照体积比为1:1的比例分别进行冷冻干燥,以海绵状进行储存;

[0119] (4) 使用方法:将海绵状A组分和B组分按照1:1的体积份额比例分别溶于含有0.9%氯化钠溶液中,分别得到可注射的第一前体溶液和第二前体溶液,其中第一前体溶液中A组分浓度为20% (w/v),第二前体溶液中B组分的浓度为20% (w/v)、C组分的浓度为2% (w/v)。此时第一前体溶液中A组分中的“孔”和第二前体溶液中B组分中的“结”的摩尔比为1:1.5。将第一前体溶液和第二前体溶液等体积的装入双联注射器,通过喷头注射/喷涂在出血部位,而后通过波长405nm蓝光照射得到双重交联高强度纤维蛋白凝胶。

[0120] 实施例12

[0121] 制备方法和使用方法大体与实施例11相同,不同之处在于:通过将实施例11步骤(1)中甲基丙烯酰化纤维蛋白原的用量从1g调整为0.33g,使最终步骤(4)得到的等体积装入双联注射器的第一前体溶液中的A组分第二前体溶液中的B组分的“孔:结”摩尔比为1:5。

[0122] 实施例13

[0123] 制备方法和使用方法大体与实施例11相同,不同之处在于:通过将实施例11步骤(1)中甲基丙烯酰化纤维蛋白原的用量从1g调整为3g,使最终步骤(4)得到的等体积装入双联注射器的第一前体溶液中的A组分与第二前体溶液中的B组分的“孔:结”摩尔比为1:0.5。

[0124] 实施例14

[0125] 制备一种双重交联高强度纤维蛋白凝胶,具体原料及步骤如下:

[0126] (1) A组分溶液的制备,即甲基丙烯酰化纤维蛋白原溶液的制备:

[0127] ①采用与实施例1相同的方法,用甲基丙烯酸N-羟琥珀酸亚胺酯修饰纤维蛋白原,将甲基丙烯基团接枝在纤维蛋白原上,得到甲基丙烯酰化纤维蛋白原;

[0128] ②取1g甲基丙烯酰化纤维蛋白原缓慢置于预热的0.9%氯化钠溶液中,完全溶解后,得到质量体积百分比(w/v)为20% (w/v)的A组分溶液。

[0129] (2) B组分与C组分混合溶液的制备,即“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶与苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂混合溶液的制备:

[0130] ①参考实施例1中B组分的制备方法,换将功能性短肽序列GPRPAAC接枝在甲基丙烯酰化明胶上,控制接枝后化合物中“结”模拟肽的含量为 $7.01\mu\text{mol/g}$ 得到B组分“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶;

[0131] ②将所述的“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶和C组分苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂完全溶解在预热的0.9%氯化钠溶液中,得到B组分与C组分混合溶液,其中“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶质量体积百分比为(w/v)为20% (w/v)、苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂质量体积百分比为(w/v)为2% (w/v)。

[0132] (3) 储存:将得到的A组分溶液和B组分与C组分的混合溶液按照体积比为1:1的比例分别进行冷冻干燥,以海绵状进行储存;

[0133] (4) 使用方法:将海绵状A组分和B组分按照1:1的体积份额比例分别溶于含有0.9%氯化钠溶液中,分别得到可注射的第一前体溶液和第二前体溶液,其中第一前体溶液中A组分浓度为20% (w/v),第二前体溶液中B组分的浓度为20% (w/v)、C组分的浓度为2%

(w/v)。此时第一前体溶液中A组分中的“孔”和第二前体溶液中B组分中的“结”的摩尔比为1:1.5。将第一前体溶液和第二前体溶液等体积的装入双联注射器,通过喷头注射/喷涂在出血部位,而后通过波长405nm蓝光照射得到双重交联高强度纤维蛋白凝胶。

[0134] 实施例15

[0135] 制备方法和使用方法大体与实施例14相同,不同之处在于:通过将实施例14步骤(1)中甲基丙烯酰化纤维蛋白原的用量从1g调整为0.33g,使最终步骤(4)得到的等体积装入双联注射器的第一前体溶液中的A组分第二前体溶液中的B组分的“孔:结”摩尔比为1:5。

[0136] 实施例16

[0137] 制备方法和使用方法大体与实施例14相同,不同之处在于:通过将实施例14步骤(1)中甲基丙烯酰化纤维蛋白原的用量从1g调整为3g,使最终步骤(4)得到的等体积装入双联注射器的第一前体溶液中的A组分与第二前体溶液中的B组分的“孔:结”摩尔比为1:0.5。

[0138] 对比例1

[0139] 外用冻干纤维蛋白粘合剂(护固莱士,购于上海莱士),包括酶试剂和纤维蛋白原试剂。将酶试剂和纤维蛋白原试剂按其说明书分别配制成溶液,混合后约1s完成酶交联得到纤维蛋白粘合剂。

[0140] 对比例2

[0141] 分别制备凝血酶溶液和20% (w/v) 纤维蛋白原溶液,其制备方法和使用方法和对比例1步骤相似,不同之处在于:纤维蛋白原溶液浓度为20% (w/v),得到纤维蛋白凝胶。

[0142] 对比例3

[0143] 按照实施例1的步骤(1)制备20% (w/v) 甲基丙烯酰化纤维蛋白原溶液作为A组分溶液,并参考实施例1的步骤(2)制备含20% (w/v) “结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶的溶液作为B组分溶液,但B组分溶液中不含有光引发剂苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂。使用方法为将等体积的A组分溶液和B组分溶液均匀的注射,且注射后不需要进行光引发,得到单交联的纤维蛋白凝胶。

[0144] 对比例4

[0145] 仅制备含10% (w/v) 甲基丙烯酰化明胶和1% (w/v) 苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂的混合液,并将该混合溶液通过喷头注射/喷涂在出血部位,而后通过波长405nm蓝光照射,得到光交联凝胶。所述混合溶液中只有单组分甲基丙烯酰化明胶的碳碳双键光引发交联,构成单交联的明胶凝胶网络结构。

[0146] 对比例5

[0147] 参照实施例1的步骤(1)制备20% (w/v) 甲基丙烯酰化纤维蛋白原溶液作为A组分溶液,并参照实施例1的步骤(2)制备20% (w/v) 甲基丙烯酰化明胶和2% (w/v) 苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂的混合溶液作为B组分和C组分的混合溶液,其制备方法和使用方法和实施例1步骤相似,不同之处在于:B组分和C组分的混合溶液中使用甲基丙烯酰化明胶替代了“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶,得到单交联的凝胶。

[0148] 对比例6

[0149] 参照实施例1的步骤(1)制备20% (w/v) 甲基丙烯酰化纤维蛋白原溶液作为A组分溶液,并按照实施例1的步骤(2)制备“结”模拟肽的含量为0.88 $\mu\text{mol/g}$ “结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶,制备20% (w/v) 甲基丙烯酰化明胶和2% (w/v) 苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次

磷酸锂的混合溶液作为B组分和C组分的混合溶液,使用方法和实施例1步骤相似,不同之处在于:B组分“结”模拟肽的含量为 $0.88\mu\text{mol/g}$,使最终步骤得到的等体积装入双联注射器的第一前体溶液中的A组分第二前体溶液中的B组分的“孔:结”摩尔比为6.7:1。

[0150] 对比例7

[0151] 参照实施例1的步骤(1)制备20% (w/v) 甲基丙烯酰化纤维蛋白原溶液作为A组分溶液,并按照实施例1的步骤(2)制备“结”模拟肽的含量为 $88.20\mu\text{mol/g}$ “结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶,制备20% (w/v) 甲基丙烯酰化明胶和2% (w/v) 苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂的混合溶液作为B组分和C组分的混合溶液,使用方法和实施例1步骤相似,不同之处在于:B组分“结”模拟肽的含量为 $88.20\mu\text{mol/g}$,使最终步骤得到的等体积装入双联注射器的第一前体溶液中的A组分第二前体溶液中的B组分的“孔:结”摩尔比为1:15。

[0152] 对比例8

[0153] 制备方法和使用方法大体与实施例1相同,不同之处在于:将实施例1步骤(1)中甲基丙烯酰化明胶的相对分子质量从240kDa调整为100kDa,因甲基丙烯酰化明胶相对分子质量过小,导致凝胶的机械强度与力学性能不足。

[0154] 对比例9

[0155] 制备方法和使用方法大体与实施例1相同,不同之处在于:将实施例1步骤(1)中甲基丙烯酰化明胶的相对分子质量从240kDa调整为300kDa,因甲基丙烯酰化明胶相对分子质量过大,导致第二前体溶液在室温、不经过光引发的情况下易自发成胶,导致流动性不足,无法从双联注射器中挤出。

[0156] 对比例10

[0157] 制备方法和使用方法大体与实施例1相同,不同之处在于:通过调节实施例1氯化钠溶液的用量,使可注射的第一前体溶液中的A组分甲基丙烯酰化纤维蛋白原浓度为2% (w/v),第二前体溶液中的B组分“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶浓度为2% (w/v),形成的双重交联凝胶密度过低导致难以成型支撑凝胶。

[0158] 对比例11

[0159] 制备方法和使用方法大体与实施例1相同,不同之处在于:第一前体溶液中也溶解苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次磷酸锂(组分C),且其质量体积百分比为(w/v)为2% (w/v)。在使用过程中发现,第一前体溶液在 37°C 、避光的条件下也容易交联成胶,这导致第一前体溶液的流动性较差、形成的凝胶堵塞双联注射器注射口,且与第二前体溶液混合后难以充分形成第一重交联,因此在溶液的状态下,加入组分C的第一前体溶液的储存性能较差。

[0160] 对比例12

[0161] 吸收性明胶海绵(祥恩),按其说明书使用。

[0162] 性能测试

[0163] 为验证实施例1~16的双重交联纤维蛋白凝胶、对比例1~8的凝胶及对比例12所得凝胶的性能,下面分别对其进行剪切强度测试、凝胶强度测试、粘附强度测试、爆破压测试和动物止血实验。

[0164] 剪切强度测试

[0165] 检测对象:

[0166] 本发明实施例1~16的双重交联纤维蛋白凝胶以及对比例1~8的凝胶;

[0167] 检测方法:

[0168] 对24种凝胶(实施例1~16的双重交联纤维蛋白凝胶和对比例1~8的凝胶)分别以相同方法进行凝胶机械强度测试,具体操作方法为:在两片载玻片间用200 μ l的待测凝胶进行粘合,控制粘合面积为20mm \times 20mm的正方形,之后以5mm/min的应变速度进行剪切强度的测试,记录凝胶断裂时的读数,即为剪切强度(kPa),其结果见表1和图2。

[0169] 由表1和图2可知,实施例1-实施例5的剪切强度均大于57kPa,大多高于90kPa,甚至达到100~114kPa。在“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶种类和浓度相同的情况下,凝胶的剪切强度随着“孔:结”摩尔比的降低而升高。以实施例1为例,从剪切强度数据看,实施例1的剪切强度为96.05kPa,显著高于对比例1(2.44kPa)、对比例2(2.21kPa)、对比例3(9.05kPa)、对比例4(24.86kPa)和对比例5(52.61kPa),显示“孔-结相互作用”和原料A、B间的碳碳双键光引发交联形成的双重交联结构大幅增强了纤维蛋白凝胶的剪切强度。然而,通过增加“结”模拟肽接枝比率以降低“孔:结”摩尔比时,如果“结”模拟肽接枝比率过高,达到1:15时,凝胶的剪切强度会下降,这可能是由于接枝“结”模拟肽的迈克尔加成反应消耗碳碳双键基团,这使得“结”模拟肽-甲基丙烯酰化明胶中所含的碳碳双键基团减少,导致在第一重交联密度上升的同时,影响凝胶机械性能的第二重交联的交联密度和强度下降,第一重交联主要影响凝胶成胶与止血时间,而第二重交联主要影响凝胶的机械强度,因而在表1可观察到,虽然对比例7在止血时间上优于实施例4,但是在剪切强度、凝胶强度、剥离强度和爆破压方面均低于实施例4。

[0170] 凝胶强度测试

[0171] 检测对象:

[0172] 本发明实施例1~16的双重交联纤维蛋白凝胶,以及对比例1~8的凝胶;

[0173] 检测方法:

[0174] 对24种凝胶(实施例1~16的双重交联纤维蛋白凝胶及对比例1~8的凝胶)分别以相同方法进行流变学分析,来比较其凝胶强度,具体操作方法:使用具有平行板(P20 TiL, 20-mm直径)几何结构的HAAKE RS6000光流变仪在37 $^{\circ}$ C下进行动态流变实验。待测凝胶水凝胶的时间扫描振荡测试在5%应变、1Hz频率下进行300秒。记录凝胶强度为最终扭转模量G'(kPa)。其结果见表1。

[0175] 由表1可知,实施例1的凝胶强度G'为13.35kPa,显著高于对比例1(0.82kPa)、对比例2(1.52kPa)、对比例3(1.76kPa)、对比例4(2.44kPa)和对比例5(5.94kPa),显示“孔-结相互作用”和原料A、B间的碳碳双键光引发交联形成的双重交联结构大幅增强了纤维蛋白凝胶的凝胶强度。

[0176] 剥离强度测试

[0177] 检测对象:

[0178] 本发明实施例1~16的双重交联纤维蛋白凝胶,以及对比例1~8的凝胶及对比例12所得凝胶;

[0179] 检测方法:

[0180] 具体操作:将猪皮切成40毫米 \times 20毫米的长方形,两片猪皮间分别用500 μ l的凝胶进行粘合。之后以20mm/min的应变速率进行剥离强度的测试。记录凝胶从猪皮脱落时的读数,即为剥离强度(J \cdot m $^{-2}$)。检测结果见表1。

[0181] 由表1可知,实施例1的剥离强度 $31.83\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$,实施例显著高于对比例1($13.17\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$)、对比例2($2.21\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$)、对比例3($9.05\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$)、对比例4($24.86\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$)和对比例5($52.61\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$),显示“孔-结相互作用”和原料A、B间的碳碳双键光引发交联形成的双重交联结构增强了纤维蛋白凝胶的剥离强度。

[0182] 爆破压测试

[0183] 检测对象:

[0184] 本发明实施例1~16的双重交联纤维蛋白凝胶,对比例1~8的凝胶;

[0185] 检测方法:在猪皮上打直径为8mm的圆形孔,对猪皮孔洞分别用 $500\mu\text{l}$ 的凝胶进行封堵。之后以 $2\text{ml}/\text{min}$ 的气体注射速率进行爆破压的测试。记录凝胶爆裂时的气压读数,即为爆破压(mm Hg)。检测结果见表1。

[0186] 由表1可知,实施例1的爆破压为 659mmHg ,显著高于对比例1(15.5mmHg)、对比例3(32.30mmHg)、对比例4(281.75mmHg)、对比例5(233.85mmHg),显示“孔-结相互作用”和原料A、B间的碳碳双键光引发交联形成的双重交联结构增强了纤维蛋白凝胶的爆破压。实施例1的爆破压远大于正常人体的动脉压($70\text{mmHg}\sim 105\text{mmHg}$),显示出“孔-结相互作用”和原料A、B间的碳碳双键光引发交联形成的双重交联结构对于人体内突发的大出血具有优秀的创口封堵作用。

[0187] 止血效果测试

[0188] 检测对象:

[0189] 本发明实施例1、实施例4的双重交联纤维蛋白凝胶、对比例1~7的凝胶以及对比例12所得的凝胶;

[0190] 检测方法:

[0191] SD大鼠肝部分切除出血模型:将SD大鼠麻醉后,暴露腹部,固定在手术台,腹部正中切口,暴露肝脏,手术剪刀在肝脏上造 $3\text{cm}\times 0.5\text{cm}$ 的肝部分切除出血模型;分别用已称重的滤纸覆盖在出血部位、用本发明实施例1的第一前体溶液和第二前体溶液按照实施例1的使用方法在出血部位共注射、以及用对比例1和对比文件12的粘合剂按照其说明书方法施用在出血部位,从所述覆盖、共注射和施用时开始计时,直至出血停止,记录出血时间和失血量,其结果见表1、图3和图4。

[0192] 由表1和图3、图4可知,本发明实施例1制备的凝胶的平均止血时间为6s,显著低于对比例1的91.8s的平均止血时间。实施例1制备的凝胶的平均失血量为 36.25mg ,显著低于对比例1的 521.80mg 的平均失血量。

[0193] 表1

例别	剪切强度 (kPa)	凝胶强度 (kPa)	剥离强度 (J * m ⁻²)	爆破压 (mm Hg)	止血时间 (s)	失血量 (mg)
实施例 1	96.05	13.35	31.83	659.00	6.0±1.0	36.25±8.28
实施例 2	57.39	6.71	15.22	277.83	/	/
实施例 3	102.07	14.05	33.01	667.34	/	/
实施例 4	114.76	14.53	33.98	672.41	5.9±0.6	35.18±7.64
实施例 5	91.34	13.18	31.22	644.17	/	/
实施例 6	28.71	2.74	14.99	254.78	/	/
实施例 7	54.13	6.41	15.08	263.86	/	/
实施例 8	89.73	12.87	30.04	618.74	/	/
实施例 9	92.15	13.44	31.72	630.82	/	/
[0194] 实施例 10	53.69	6.32	13.55	256.93	/	/
实施例 11	91.60	12.99	30.97	631.58	/	/
实施例 12	98.31	13.67	32.37	657.24	/	/
实施例 13	55.34	6.50	32.94	262.50	/	/
实施例 14	93.16	13.14	31.22	641.02	/	/
实施例 15	99.16	13.81	32.44	659.91	/	/
实施例 16	56.46	6.65	33.01	263.72	/	/
对比例 1	2.44	0.82	13.17	15.50	91.8±7.98	391.97±72.43
对比例 2	2.21	1.52	8.83	16.43	90.1±5.92	382.12±47.96
对比例 3	9.05	1.76	23.33	32.30	78.2±9.11	372.15±59.29
对比例 4	24.86	2.44	26.50	281.75	12.9±1.20	60.24±13.85
对比例 5	52.61	5.94	13.83	233.85	10.7±0.9	51.67±8.79
对比例 6	25.13	2.48	26.74	288.53	13.2±1.30	54.22±6.77
对比例 7	110.27	14.36	33.78	669.93	5.6±0.7	33.83±10.69
对比例 8	74.12	10.08	23.28	489.83	/	/
[0195] 对比例 9	/	/	/	/	/	/
对比例 10	/	/	/	/	/	/
对比例 11	/	/	/	/	/	/
对比例 12	/	/	0	/	155.3±15.72	1103±93.64

[0196] 注:止血时间和失血量的数值用(均值±标准差)来表示。

[0197] 总之,本发明的双重交联纤维蛋白凝胶,应用在出血伤口时,可快速交联形成纤维蛋白第一重交联,起到快速封堵伤口作用,阻挡血液流出;同时,高浓度的原料交联形成的纤维蛋白凝块可抵抗血液压力,保持凝胶的完整性,增强封堵伤口效果;同时,纤维蛋白凝块中的碳碳双键通过光引发相互交联,大幅增强凝块的机械强度和剥离强度,可抵抗血液冲击,保护纤维蛋白凝块免被血流冲走,进一步增强封堵伤口作用。双重交联纤维蛋白凝胶的快速成胶和碳碳双键的相互交联,使凝胶具快速封堵伤口和高机械强度,从而达到优异的止血效果。

[0198] 以上对本发明的具体实施例进行了详细介绍。需要理解的是,本发明并不局限于特定实施方式,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何变形或修改、等同替换和改进等,并不影响本发明的实质内容,均应包含在本发明权利要求的保护范围之内。

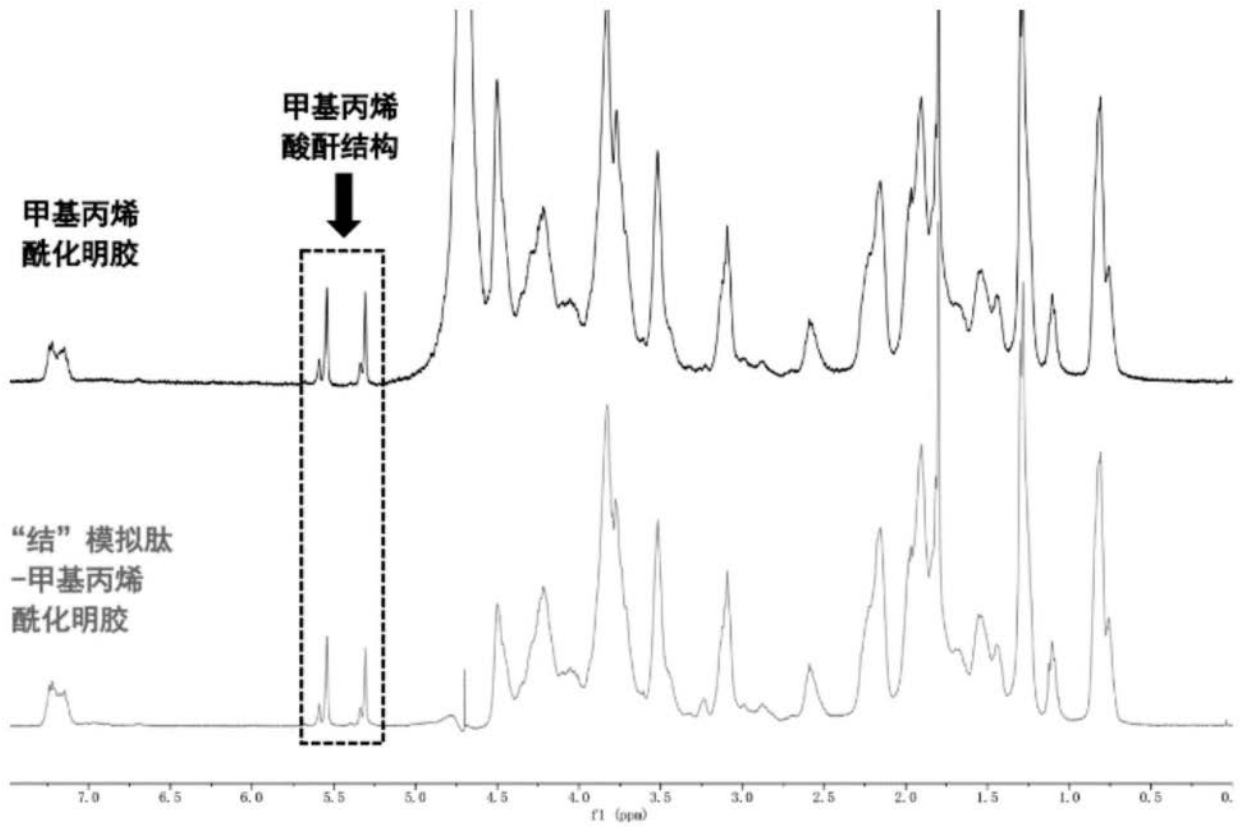


图1

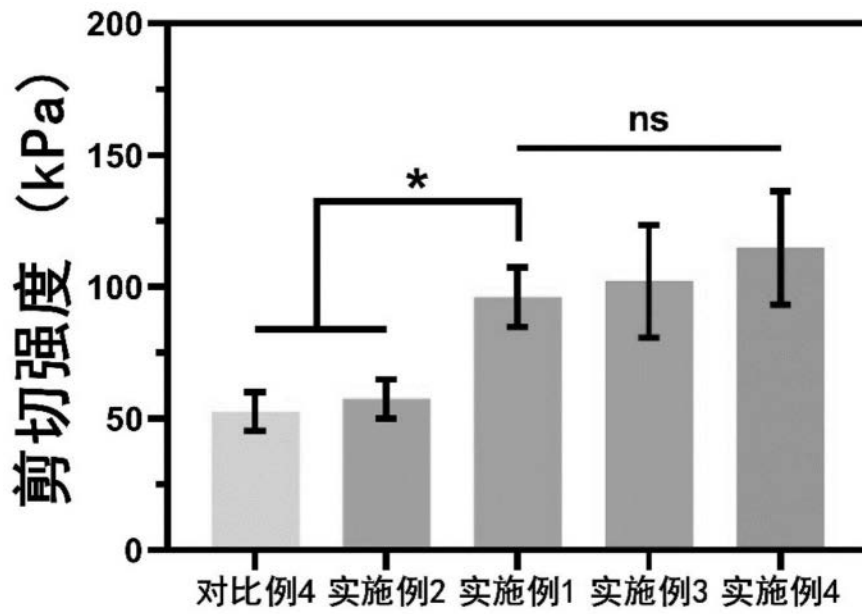


图2

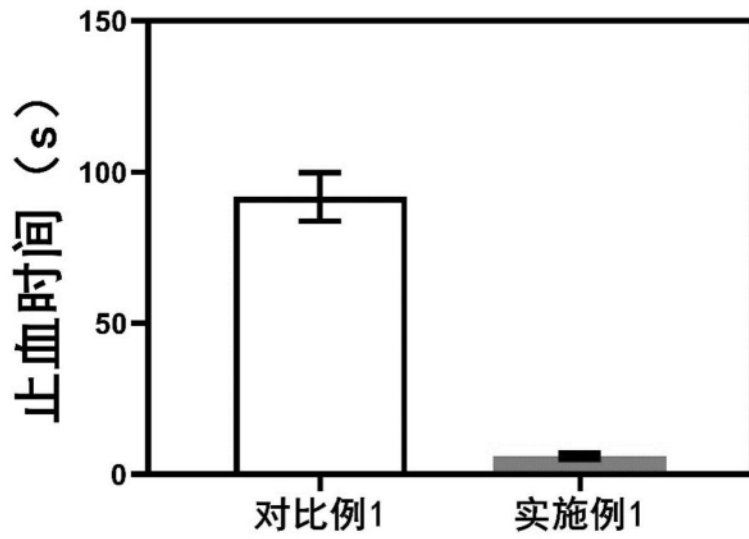


图3

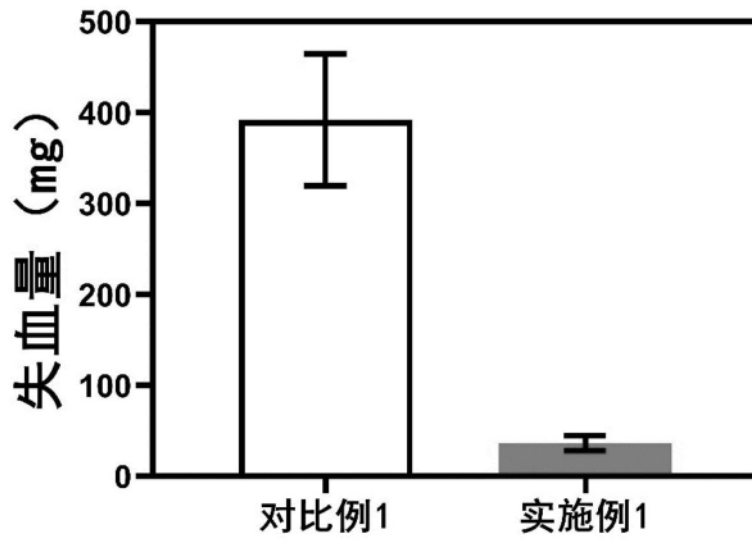


图4