



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0718615-0 A2



(22) Data de Depósito: 13/11/2007
(43) Data da Publicação: 07/01/2014
(RPI 2244)

(51) Int.Cl.:
A61L 26/00
A61K 8/64
A61L 27/22
A61Q 19/00

(54) Título: USO DE TROPELASTINA PARA REPARO OU RESTAURAÇÃO DE TECIDO.

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 13/11/2006 AU 2006906319

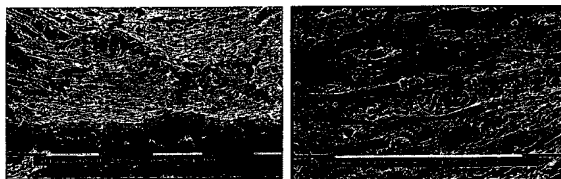
(73) Titular(es): The University Of Sydney

(72) Inventor(es): Anthony Steven Weiss, Suzanne Marie Mithieux

(74) Procurador(es): Orlando de Souza

(86) Pedido Internacional: PCT AU2007001738 de 13/11/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/058323de 22/05/2008



USO DE TROPOELASTINA PARA REPARO OU RESTAURAÇÃO DE TECIDO**Campo da invenção**

A presente invenção relaciona-se à tropoelastina e ao reparo e restauração de tecido usando materiais elásticos.

5 Fundamento da invenção

A elastina é uma proteína de matriz extracelular que é primariamente encontrada na pele, vasos sanguíneos, pulmão e outros tecidos e órgãos que requerem um grau de elasticidade para funcionar. É formada quando os resíduos
10 de lisina em moléculas de tropoelastina se tornam reticulados com resíduos de lisina em outras moléculas de tropoelastina pela lisil oxidase.

A elastina é esperada ser útil em aplicações médicas incluindo o reparo e restauração de tecido e em fornecer
15 superfícies biocompatíveis para os dispositivos médicos tendo predeterminada elasticidade. Nestas aplicações, a elastina é geralmente feita pela reticulação das cadeias laterais de resíduos de lisina em moléculas de tropoelastina recombinantes usando reagentes que reagem com
20 lisina e outros resíduos carregados, tais como glutaraldeído.

Um problema com a elastina produzida da tropoelastina recombinante é que os agentes de reticulação, tais como glutaraldeído podem ser tóxicos ou causar reações de tecido
25 indesejáveis ou alergia em alguns indivíduos. Adicionalmente, como as propriedades elásticas da elastina tendem a ser dependentes da reticulação de cadeias laterais de lisina, há um limite à faixa de propriedades elásticas que a elastina pode fornecer. Também, a exigência para a
30 reticulação impossibilita a liberação eficaz através de

algumas rotas padrão de administração, por exemplo, injeção, pois sem precaução especial, o agente de reticulação pode fazer a elastina se formar antes da liberação ao local em que a formação de elastina é pretendida.

Há uma necessidade para os materiais elásticos que podem ser formados sem uso de um agente de reticulação.

Há também uma necessidade para composições que podem ser administradas ao tecido por injeção para formar um material elástico em um local em relação ao local de injeção.

Há também uma necessidade para materiais elásticos tendo qualidades elásticas não encontradas na elastina ou outras proteínas e biomateriais usados para reparo de tecido, aumento e cura de ferida.

Há também uma necessidade para novas formulações para a liberação prolongada ou controlada de compostos farmacêuticos e fatores de tecido e para novas matrizes de célula e tecido.

Sumário da invenção

A invenção procura pelo menos minimizar uma das limitações ou problemas acima e em determinadas modalidades fornecer um processo para produzir um material elástico de tropoelastina. O processo inclui a etapa de aquecimento de uma solução de tropoelastina tendo um pH alcalino para formar um material elástico da tropoelastina na solução.

Em outras modalidades é fornecido um processo para produzir um material elástico de tropoelastina. O processo inclui aquecer uma solução de tropoelastina tendo um pH alcalino de pelo menos aproximadamente 7,5 e uma

concentração de sal de pelo menos aproximadamente 25 mM para formar um material elástico de tropoelastina na solução.

5 Em outras modalidades é fornecido um processo para produzir um material elástico de tropoelastina. O processo inclui fornecer um pH alcalino a uma solução de tropoelastina tendo uma temperatura de aproximadamente 37°C para formar um material elástico de tropoelastina na solução.

10 Em outras modalidades é fornecido um processo para produzir um material elástico de tropoelastina. O processo inclui fornecer um pH alcalino a uma solução de tropoelastina e permitir que a temperatura da solução aumente a aproximadamente 37°C para formar um material
15 elástico de tropoelastina na solução.

Em outras modalidades é fornecido um processo para produzir um material elástico de tropoelastina. O processo inclui a adição de tropoelastina a uma solução tendo um pH alcalino e uma temperatura de aproximadamente 37°C para
20 formar um material elástico de tropoelastina na solução.

Em outras modalidades é fornecido um processo para produzir um material elástico de tropoelastina. O processo inclui a adição de tropoelastina a uma solução tendo um pH alcalino e permitir que a temperatura de solução aumente a
25 aproximadamente 37°C para formar um material elástico de tropoelastina na solução.

Em outras modalidades é fornecido um processo para produzir um material elástico de tropoelastina. O processo inclui ajustar a concentração de sal de uma solução de
30 tropoelastina tendo um pH alcalino e uma temperatura de

aproximadamente 37°C para formar um material elástico de tropoelastina na solução.

Em outras modalidades é fornecido um processo para produzir um material elástico de tropoelastina. O processo
5 inclui ajustar a concentração de sal de uma solução de tropoelastina tendo um pH alcalino e permitir que a temperatura da solução aumente a aproximadamente 37°C para formar um material elástico da tropoelastina na solução.

Em uma outra modalidade é fornecido um agente de
10 volume para aumentar um tecido ou corrigir um defeito de tecido, o agente de volume sendo formado de um material elástico produzido por um processo descrito acima.

Em uma outra modalidade é fornecido um selante para uma ferida, o selante sendo formado de um material elástico
15 produzido por um processo descrito acima.

Em uma outra modalidade é fornecido uma prótese ou dispositivo médico tendo um material elástico sendo produzido por um processo descrito acima.

Em uma outra modalidade é fornecido um kit para formar
20 um material elástico incluindo um primeiro recipiente incluindo tropoelastina, um segundo recipiente incluindo um reagente a ser adicionado à tropoelastina para formar uma solução alcalina incluindo a tropoelastina e instruções escritas para formar um material elástico da tropoelastina
25 e do reagente.

Em uma outra modalidade é fornecida uma composição para formar um material elástico incluindo uma solução de tropoelastina tendo um pH alcalino e uma temperatura selecionada para prevenir a formação de um material
30 elástico de tropoelastina na solução.

Em outra modalidade é fornecido um aparelho para formar um material elástico de tropoelastina incluindo uma primeira câmara incluindo uma solução de tropoelastina; uma segunda câmara incluindo um reagente para ajustar o pH da solução da primeira câmara; meios distribuidores em uso para dispensar a solução da primeira câmara e o reagente para formar uma mistura da solução e do reagente, para formar o material elástico de tropoelastina na mistura.

Em uma outra modalidade é fornecido um aparelho para formar um material elástico de tropoelastina incluindo uma primeira câmara incluindo uma solução de tropoelastina tendo um pH alcalino; uma segunda câmara incluindo uma solução para fornecer uma concentração de sal de aproximadamente 150 mM ou menos à solução da primeira câmara; e meios distribuidores em uso para dispensar as soluções da primeira câmara e segunda câmara para formar uma mistura das soluções, para formar o material elástico de tropoelastina na mistura.

Em outra modalidade é fornecido um implante de liberação prolongada ou controlada o implante sendo formado de um material elástico produzido por um processo descrito acima.

Em outra modalidade é fornecida uma matriz de célula ou tecido, a matriz de célula ou tecido sendo formada de um material elástico produzido por um processo descrito acima.

Em outra modalidade é fornecido um método de formar uma solução purificada de tropoelastina incluindo:

- fornecer uma solução de tropoelastina;
- ajuste do pH da solução para formar uma solução tendo pH alcalino, para fazer a tropoelastina na solução ao

precipitar;

- remover o precipitado;

- adicionar o precipitado removido a uma solução tendo um pH substancialmente não alcalino, e/ou uma temperatura substancialmente diminuída, para fazer o precipitado dispersar na solução, para formar uma solução purificada de tropoelastina.

Em outra modalidade é fornecido um método de formar um material elástico da solução de tropoelastina incluindo:

10 - (1) fornecer uma solução de tropoelastina;

- (2) ajustar o pH da solução para formar uma solução tendo pH alcalino, para fazer a tropoelastina na solução precipitar;

- (3) remover o precipitado;

15 - (4) adicionar o precipitado removido a uma solução tendo um pH substancialmente não alcalino, e/ou uma temperatura substancialmente diminuída, para fazer o precipitado dispersar na solução; e

- (5) permitir que a temperatura da solução aumente a aproximadamente 37°C para formar um material elástico da tropoelastina na solução.

Breve Descrição dos Desenhos

Figura 1: H&E tingiu a fatia coletada do local de injeção no rato 15 dias após injeção.

25 Figura 2: H&E tingiu a fatia de material elástico com fibroblastos integrados. As células estão presentes nos pores dentro do material elástico.

Figura 3: Imagens SEM mostrando a folha de células de fibroblasto crescendo em cima do material elástico.

30 **Descrição detalhada das modalidades**

Os inventores descobriram que uma solução de tropoelastina pode ser feita para formar um material elástico ajustando a alcalinidade, temperatura ou concentração de sal da solução. Em determinadas 5 modalidades, o material elástico é formado ajustando a temperatura e/ou alcalinidade somente. Em outras determinadas modalidades, o material elástico pode ter uma concentração de sal de 0 mM.

10 O material elástico que os inventores desenvolveram não é o mesmo que a elastina, pois não requer o reticulação de moléculas de tropoelastina para sua formação. Em contraste, a elastina é formada quando a tropoelastina é reticulada pela lisil oxidase ou glutaraldeído ou agentes similares.

15 Uma vantagem é que o material elástico da invenção é geralmente mais biocompatível, pois não contém reticulantes químicos. Será compreendido, entretanto, que o material elástico da invenção pode ser reticulado com a lisil oxidase ou outros agentes químicos, tais como 20 glutaraldeído.

Outra vantagem é que o material elástico desta invenção pode ser fornecido com as propriedades que não podem ser encontradas na elastina. Estas propriedades incluem a força de tração e extensão, retrocesso, 25 compressibilidade, biodegradabilidade e persistência, particularmente em uma cavidade de tecido ou corpo. Conseqüentemente, com a invenção, a tropoelastina pode ser usada para fornecer dispositivos, próteses e agentes de reparo de tecido que não foram obteníveis usando elastina.

30 Uma vantagem adicional é que a formação do material

elástico pode ser controlada simplesmente ajustando a temperatura, pH ou sal. Como demonstrado aqui, isto permite mais eficazmente formar um material elástico em um tecido por uma rota de administração, tal como injeção.

5 Será compreendido que um "material elástico" refere-se a um material que possa ser formado de tropoelastina sem a reticulação de resíduos de aminoácido de tropoelastina que são de outra maneira reticulados quando a elastina é naturalmente formada (por exemplo, pela lisil oxidase) ou
10 quando a elastina é fabricada (por exemplo, pelo glutaraldeído). Uma vez formado, o material elástico da invenção pode ser reticulado com a lisil oxidase ou outros agentes químicos, tais como glutaraldeído.

 Como discutido abaixo um "material elástico" pode
15 também incluir outros componentes.

 Geralmente um "material elástico" não é um líquido de fluxo livre. Pode ser um gel, pasta, sólido, ou outra fase que significativamente não tem as propriedades de fluxo. Vantajosamente, de acordo com a invenção, pode-se projetar
20 ou de outra maneira selecionar as propriedades da fase que é requerida por parâmetros de manipulação de temperatura, pH ou sal durante a formação do material elástico, ou de outra maneira pela reticulação do material com um agente capaz de reticular as cadeias laterais de aminoácido
25 reticuláveis, onde um exemplo de tal reticulador é glutaraldeído.

 Um "material elástico" geralmente retorna a um formato particular ou conformação após uma força, tal como compressão ou extensão que lhe foi aplicada foi retirada.

30 O "material elástico" é referido também como uma

elasticidade compressível e extensível, mecanicamente durável, ou material flexível de histerese relativamente baixa. Este material pode ser referido como extensível, tração, resiliente ou capaz de retrocesso.

5 É possível observar visualmente a formação de um material elástico de uma solução de tropoelastina. A solução de tropoelastina é substancialmente límpida. Quando o material elástico se forma, a solução diminui em clareza e se torna opaco devido a uma fase tipo precipitado
10 transitória. O material elástico está substancialmente na forma sólida como mencionado acima e pode ter várias aparências dependendo de sua composição. A formação de material elástico pode também ser observada usando qualquer
15 técnica analítica apropriada conhecida na técnica, tal como o monitoramento de uma mudança na temperatura ou transmissão.

 Será compreendido que a "tropoelastina" geralmente significa um peptídeo que inclui ou consiste em uma sequência que é a mesma que ou similar a um domínio
20 hidrofílico de tropoelastina. Um domínio hidrofílico tem uma sequência que é tipicamente rica em resíduos de lisina e alanina. Estes domínios frequentemente consistem de estiramentos de lisina separados por 2 ou 3 resíduos de alanina, tais como AAKAAKAA (N° de Id. de Seq.: 1). Outros
25 domínios hidrofílicos não contêm o intervalo de poli-alanina, mas tem lisina próxima de uma prolina preferivelmente. Em contraste, os domínios hidrofóbicos de tropoelastina são ricos em aminoácidos não polares especialmente glicina, valina, prolina e alanina e
30 frequentemente ocorrem em repetições de 3 a 6 peptídeos,

tais como GVGVP (N° de Id. de Seq.: 2), GGVP (N° de Id. de Seq.: 3) e GVGVP (N° de Id. de Seq.: 4).

É importante que o peptídeo que é usado para formar o material elástico inclui pelo menos parte do domínio hidrofílico enquanto este domínio é acreditado ser importante para fazer o material elástico formar quando a alcalinidade, temperatura ou concentração de sal da solução de tropoelastina for ajustada.

Os exemplos de tropoelastina que poderiam ser usados para formar o material elástico da invenção são aqueles que consistem em um domínio hidrofílico ou um homólogo do mesmo, e aqueles que incluem um domínio hidrofílico ou homólogo e parte ou todo de um domínio hidrofóbico. Alguns exemplos são estabelecidos abaixo:

15 - GGVPGAIPGGVPGGVFYP (N° de Id. de Seq.: 5), GVGLPGVYP (N° de Id. de Seq.: 6), GVPLGYP (N° de Id. de Seq.: 7), PYTTGKLPYGYGP (N° de Id. de Seq.: 8), GGVAGAAGKAGYP (N° de Id. de Seq.: 9), TYGVGAGGFP (N° de Id. de Seq.: 10);

- KPLKP (N° de Id. de Seq.: 11), ADAAAAYKAAKA (N° de Id. de Seq.: 12), GAGVKPGKV (N° de Id. de Seq.: 13), GAGVKPGKV (N° de Id. de Seq.: 14), TGAGVKPKA (N° de Id. de Seq.: 15), QIKAPKL (N° de Id. de Seq.: 16), AAAAAAKAAAK (N° de Id. de Seq.: 17), AAAAAAAAKAAKYGAAAGLV (N° de Id. de Seq.: 18), EAAAKAAAKAAKYGAR (N° de Id. de Seq.: 19),

25 EAQAAAAAKAAKYGVGT (N° de Id. de Seq.: 20), AAAAAKAAAKAAQFGLV (N° de Id. de Seq.: 21), GGVAATAAKSAAKVAQAQLRAAAGLGAGI (N° de Id. de Seq.: 22), GALAAAKAAKYGAAV (N° de Id. de Seq.: 23), AAAAAAKAAAKAA (N° de Id. de Seq.: 24), AAAAAKAAKYGAA (N° de Id. de Seq.: 25),

30 CLGKACGRKRK (N° de Id. de Seq.: 26).

"Tropoelastina" pode ter uma sequência que é a mesma que a entrada mostrada na entrada de GenBank AAC98394. Outras sequências de tropoelastina incluindo um domínio hidrofílico são conhecidas na técnica, incluindo, mas não limitadas a, CAA33627 (*Homo sapiens*), P15502 (*Homo sapiens*), AAA42271 (*Rattus norvegicus*), AAA42272 (*Rattus norvegicus*), AAA42268 (*Rattus norvegicus*), AAA42269 (*Rattus norvegicus*), AAA80155 (*Mus musculus*), AAA49082 (*Gallus gallus*), P04985 (*Bos taurus*), ABF82224 (*Danio rerio*), ABF82222 (*Xenopus tropicalis*), P11547 (*Ovis aries*).

"Tropoelastina" pode também ser um fragmento destas sequências contanto que o fragmento inclui pelo menos parte de um domínio hidrofílico como discutido acima. Um exemplo são os aminoácidos 27 a 724 de AAC98394.

Tropoelastina pode também incluir um homólogo de um peptídeo tendo uma sequência, tal como descrito acima, em particular AAC98394, ou seja um homólogo de um peptídeo tendo uma sequência tal como descrita acima, ou ser um fragmento de um homólogo de um peptídeo tendo uma sequência tal como descrito acima. Aqui "homólogo" refere-se a uma proteína tendo uma sequência que não é a mesma que, mas que é similar a, uma sequência de referência. Também tem a mesma função que a sequência de referência, por exemplo, uma capacidade para formar um material elástico quando uma solução do homólogo é manipulada para ajustar a alcalinidade, temperatura ou concentração de sal como discutido aqui.

Em determinadas modalidades o homólogo tem pelo menos 60% de homologia a um peptídeo tal como descrito acima, em particular AAC98394 ou um fragmento de um peptídeo tal como

descrito acima que inclui pelo menos parte de um domínio hidrofílico.

Será compreendido que "tropoelastina" pode ser natural ou recombinante.

5 Aqui "peptídeos tipo elastina" (ELP) refere-se aos compostos formados pela polimerização de pequenas sequências de aminoácido (tipicamente menos de 5 aminoácidos em comprimento) isolados das regiões hidrofóbicas de tropoelastina ou elastina que são
10 essenciais para a coacervação das moléculas. Algumas sequências geralmente usadas incluem GVGVP (N° de Id. de Seq.: 2), GGVP (N° de Id. de Seq.: 3), e GVGVP (N° de Id. de Seq.: 4).

Os inventores descobriram que existe um subconjunto de
15 condições de temperatura, alcalinidade, e concentração de sal dos quais uma solução de tropoelastina pode ser feita para formar um material elástico. Ao não querer ser limitado pela hipótese, acredita-se que estas condições influenciam uma interação entre domínios hidrofílicos de
20 moléculas de tropoelastina que conduzem à formação do material elástico. Portanto, o material elástico não é o mesmo que a elastina natural ou artificial que é formada por reticulação de cadeias laterais de aminoácido carregadas. Nem é o mesmo que o material que é formado por
25 coacervação de ELP.

Assim em uma modalidade é fornecido um processo para produzir um material elástico de tropoelastina incluindo aquecer uma solução de tropoelastina tendo um pH alcalino para formar um material elástico da tropoelastina na
30 solução.

Em outras modalidades é fornecido um processo para produzir um material elástico de tropoelastina incluindo fornecer um pH alcalino a uma solução de tropoelastina tendo uma temperatura de aproximadamente 37°C para formar um material elástico de tropoelastina na solução.

Em outras modalidades é fornecido um processo para produzir um material elástico de tropoelastina incluindo fornecer um pH alcalino a uma solução de tropoelastina e permitir que a temperatura da solução aumente a aproximadamente 37°C para formar um material elástico da tropoelastina na solução.

Em outras modalidades é fornecido um processo para produzir um material elástico de tropoelastina incluindo a adição de tropoelastina a uma solução tendo um pH alcalino e uma temperatura de aproximadamente 37°C para formar um material elástico de tropoelastina na solução.

Em outras modalidades é fornecido um processo para produzir um material elástico de tropoelastina incluindo a adição de tropoelastina a uma solução tendo um pH alcalino e permitindo que a temperatura da solução aumente a aproximadamente 37°C para formar um material elástico da tropoelastina na solução.

Em outras modalidades é fornecido um processo para produzir um material elástico de tropoelastina incluindo o ajuste da concentração de sal de uma solução de tropoelastina tendo um pH alcalino e uma temperatura de aproximadamente 37°C para formar um material elástico da tropoelastina na solução.

Geralmente uma solução de concentração de tropoelastina maior do que aproximadamente 1,5 mg/mL é

capaz de formar um material elástico de integridade
desejável embora poucas concentrações sejam também úteis.
Na maioria das aplicações a concentração de solução é menor
do que aproximadamente 300 mg/mL. Conseqüentemente, uma
5 solução de tropoelastina tendo uma concentração de
aproximadamente 1,5 mg/mL a aproximadamente 300 mg/mL é
preferível. Mais preferivelmente, uma solução de
tropoelastina tendo uma concentração entre aproximadamente
10 mg/mL a aproximadamente 300 mg/mL é usada. Mais
10 preferivelmente, uma solução de tropoelastina tendo uma
concentração entre aproximadamente 10 mg/mL a
aproximadamente 200 mg/mL é usada.

Determinou-se que um pH de aproximadamente 7,5 ou mais
é suficiente para fazer um material elástico se formar da
15 tropoelastina na solução. O pH é geralmente mantido do
excedente aproximadamente pH 13 como acima disto o material
elástico é menos bem formado. Mais preferivelmente um pH
entre aproximadamente pH 9 e pH 13 de é desejável.
Entretanto, mais preferivelmente um pH entre
20 aproximadamente pH 10 e pH 11 é usado. Outras medidas de pH
que poderiam ser usadas incluem 8,0, 8,5, 9,5, 10, 10,5, e
11,5.

A alcalinidade pode ser ajustada por um número de
aproximações incluindo 1) diretamente adindo uma substância
25 que aumente o pH a uma solução de tropoelastina, 2)
misturando uma solução contendo quantidades suficientes de
uma substância que aumente o pH para fazer com que seja
alcalina com uma solução de tropoelastina. A substância que
aumente o pH podia ser uma base, tampão, material
30 adsorvente de próton. Os exemplos incluindo base Tris,

NH_4OH e NaOH foram descobertos por serem úteis como substâncias que aumentam ou controlam o pH.

Onde o pH é alcalino e menor do que aproximadamente 9,5, o sal pode ser requerido para formar o material elástico da invenção. Onde o sal é usado, a concentração é geralmente mais do que 25 mM e pode ser até 200 mM. Preferivelmente, a concentração de sal está entre aproximadamente 100 mM e 150 mM. Mais preferivelmente, a concentração de sal é aproximadamente 150 mM. Em particular, os inventores descobriram que enquanto o pH diminui (no entanto permanece alcalino) abaixo de pH 10, o sal é requerido para fazer a formação do material elástico e a quantidade de sal requerida aumenta enquanto o pH diminui. Assim por exemplo, aproximadamente em pH 9 a 10, o sal é requerido, por exemplo, uma concentração de sal equivalente a aproximadamente 60 mM deve ser fornecida à solução. Em algumas modalidades, a solução deve ter uma osmolaridade equivalente à da solução salina isotônica de mamífero (150 mM) ou menos. Em outras modalidades, a solução deve ter uma osmolaridade maior do que 150 mM. A concentração de sal pode também ser 0 mM.

A concentração de sal da solução pode ser controlada adicionando o sal, incluindo qualquer composto iônico, íons monovalentes ou divalentes, ou espécies de baixo peso molecular capazes de afetar a osmolaridade da solução. Por exemplo, NaCl , KCl , MgSO_4 , Na_2CO_3 ou glicose podem ser usados. Um sal preferido é NaCl .

Em uma outra modalidade é fornecido um método de formar um material elástico da solução de tropoelastina incluindo:

- (1) fornecendo uma solução de tropoelastina;
- (2) ajustando o pH da solução para formar uma solução tendo pH alcalino, para fazer a tropoelastina na solução precipitar;
- 5 - (3) removendo o precipitado;
- (4) adicionando o precipitado removido a uma solução tendo um pH substancialmente não alcalino, e/ou uma temperatura substancialmente diminuída, para fazer o precipitado à dispersão na solução; e
- 10 - (5) permitindo que a temperatura da solução aumente a aproximadamente 37°C para formar um material elástico da tropoelastina na solução.

Em uma modalidade a temperatura da solução está preferivelmente entre aproximadamente 4°C a aproximadamente 15 37°C na etapa (2) e menos do que aproximadamente 4°C na etapa (4). Adicionalmente, em uma modalidade o pH da solução é preferivelmente pelo menos aproximadamente pH 9 na etapa (2) e menos do que aproximadamente pH 9 na etapa (4). O pH pode ser tão baixo quanto aproximadamente pH 7,5 20 na etapa (4). Ainda, em uma modalidade a concentração de sal da solução está preferivelmente entre aproximadamente 0 mM e 200 mM.

Assim, em outras modalidades é fornecido um processo para produzir um material elástico de tropoelastina 25 incluindo aquecer uma solução de tropoelastina tendo um pH alcalino que é menos de 10 e uma concentração de sal de 150 mM ou menos para formar um material elástico da tropoelastina na solução. Estas modalidades são particularmente preferíveis para aplicações *in vivo* desde 30 que o pH da solução de tropoelastina e o material elástico

é mais próximo ao pH de mamífero

Em modalidades adicionais é fornecido um processo para produzir um material elástico de tropoelastina incluindo o ajuste da concentração de sal de uma solução de tropoelastina tendo um pH alcalino e permitindo que a temperatura da solução aumente aproximadamente a 37°C para formar um material elástico de tropoelastina na solução.

Determinou-se que uma temperatura ao redor de 37°C é preferível para fazer um material elástico se formar da tropoelastina na solução. Entretanto, em determinadas modalidades uma temperatura de menos de 37°C pode ser usada. Geralmente a temperatura é maior do que 4°C. É geralmente menor do que 42°C. Os inventores descobriram que a temperatura requerida para formar um material elástico é inversamente relacionada à concentração de tropoelastina na solução de tropoelastina. Isto é, uma solução com uma concentração baixa de tropoelastina irá requerer uma temperatura mais alta para formar um material elástico. Os inventores descobriram também que a flexibilidade aumenta, e a integridade persiste por mais tempo, como uma função do tempo onde a solução de tropoelastina é mantida em uma determinada temperatura.

A solução pode ser aquecida fornecendo a solução em ou sobre um tecido de mamífero e permitindo que transferência de calor de tecido aumente a temperatura da solução, ou irradiando o tecido.

Alternativamente, a solução pode ser aquecida contatando a solução com uma superfície inanimada e aquecendo a superfície. A superfície inanimada pode ser fornecida em um molde fornecendo o material elástico

formado pelo método com um formato ou conformação predefinida, e em uma pode adicionalmente ser fornecida em uma prótese, stent ou dispositivo similar.

Onde o aquecimento da solução é fornecido para 5 provocar a formação do material elástico (isto é, onde o pH apropriado e/ou condições de sal foram fornecidos), a solução é geralmente armazenada em temperaturas abaixo de 30°C, preferivelmente aproximadamente 4°C, até que seja requerida para a formação de um material elástico.

10 É preferível que a maioria de tropoelastina inicialmente em solução seja usada para formar o material elástico.

Em determinadas modalidades o material elástico formada de uma solução de tropoelastina por um processo 15 descrito acima pode ser reticulada com um agente capaz de reticular as cadeias laterais de resíduos de tropoelastina, tais como lisina. Como discutido aqui, a reticulação não é necessária para a formação do material elástico e certamente este é um ponto de distinção entre o material 20 elástico da invenção e elastina. Ao não desejarem ser limitados pela teoria, os inventores acreditam que os materiais elásticos formam pelo menos em parte devido a uma combinação de interações de carga incluindo resíduos de tirosina, lisina e arginina carregados, assim como 25 estabilizando ligações de hidrogênio. Os inventores acreditam que ditirosina pode ser formada. De forma importante, estas interações ocorrem na ausência de um agente de reticulação.

Entretanto, em determinadas aplicações descritas 30 abaixo, é útil reticular estas cadeias laterais quando o

material elástico foi formado enquanto este fornece propriedades adicionais ao material elástico. Especificamente, em comparação com o material elástico formado na ausência de reticulador, o uso de um reticulador, tal como glutaraldeído dá um material elástico que é mais duro, mais denso, mais resistente, e portanto provavelmente mais bioestável *in vivo*. Os inventores sugerem que este material pode ser preferível sobre o material elástico ligado não reticulado para aplicações de restauração de tecido mais exigentes ou quando a adesão com o tecido natural circunvizinho é não essencial. Nota-se, quando o glutaraldeído é adicionado a uma solução de pH alcalino de tropoelastina, os inventores descobriram surpreendentemente que uma cor distintiva aparece quando o material elástico se forma, que podem ser clinicamente úteis como um determinante de formação sólida.

Contempla-se que qualquer agente de reticulação que pode ser usado para formar a elastina, se naturalmente ou artificialmente, pode ser usado. Os exemplos incluem lisil oxidase, transglutaminase, glutaraldeído, genipina e reticulantes reativos a amina, tais como BS3. Em uma modalidade, o agente de reticulação é glutaraldeído e é usado em uma concentração de aproximadamente 0,001% de peso/vol de solução a aproximadamente 0,5% de peso/vol de solução.

O processo da invenção e o material elástico formado deste são particularmente úteis em aplicações de volume de tecido, por exemplo, aplicações onde há uma necessidade em realçar ou melhorar cosmeticamente a aparência (por exemplo, enchimento de lábios, preenchendo dentro de dobras

nasolabiais, redução de rugas ou outros melhoramentos de tecido), ou aplicações médicas onde há uma necessidade de suportar um defeito congênito, ou defeito causado por doença ou ressecção cirúrgica.

5 Mais detalhadamente, enquanto a formação do material elástico pode ser controlada simplesmente ajustando a temperatura, pH ou sal, isto permite formar um agente de volume *in situ* injetando uma solução de tropoelastina tendo, um pH alcalino em um local desejado e permitir que
10 transferência de calor do tecido faça que o material elástico se forme. Adicionalmente, o sincronismo da formação do material elástico, e as propriedades e persistência elástica do material assim formado podem ser ajustadas manipulando o sal ou pH, ou adicionando agentes
15 de reticulação após o material elástico ter sido forma.

Um benefício principal é que o agente de volume pode eficazmente ser fornecido usando uma agulha de calibre fino. Neste modo de administração, a viscosidade da solução de tropoelastina para formar o agente de volume pode ser
20 controlada manipulando um ou mais de temperatura, concentração de pH ou sal, ou o tempo de incubação em pH elevado antes de abaixar o pH em preparação para a injeção.

A solução de tropoelastina pode ser injetada intradermicamente ou subcutaneamente, ou mais profundo ou
25 abaixo da derme, ou em outro tecido, a fim de fornecer um depósito de material elástico.

Conseqüentemente, em uma modalidade a invenção fornece um método para cosmeticamente melhorar um tecido incluindo injetar uma solução contendo tropoelastina em um tecido que
30 requerendo melhoramento cosmético para formar um material

elástico de acordo com um processo descrito acima no tecido. O melhoramento cosmético pode ser remover ou reduzir as rugas de pele, aumentar lábios ou de outra maneira reduzir ou remodelar a aparência de um tecido, perfil de tecido, ou característica facial. A solução de tropoelastina pode ser mantida fresca, por exemplo aproximadamente 4°C antes de injeção e ser aquecida à temperatura corporal por transferência de calor do tecido. Alternativamente, uma fonte de energia externa pode ser usada para irradiar o tecido para aumentar a temperatura da solução de tropoelastina para formar o material elástico no tecido.

A solução de tropoelastina pode também ser aplicada à superfície de um tecido para fornecer uma cobertura ou sustentação pelo material elástico.

Conseqüentemente, em uma outra modalidade, a invenção fornece um método para sustentar um tecido ou órgão em um local de doença, trauma, ressecção cirúrgica ou outra ferida incluindo injetar ou de outra maneira aplicar uma solução contendo tropoelastina em ou sobre um tecido ou órgão requerendo suporte para formar um material elástico de acordo com um processo descrito acima em ou sobre o tecido ou órgão. Em um exemplo a solução de tropoelastina é injetada para formar um material elástico que fornece o aumento sobre o local de um esfíncter, tal como seria requerido para aumentar em torno do esfíncter de bexiga como uma forma de tratamento de incontinência urinária.

Nas modalidades acima, a solução de tropoelastina alcalina pode ser resfriada, por exemplo a aproximadamente 4°C, antes da injeção e então ser aquecida à temperatura

corporal por transferência de calor do tecido. Alternativamente, uma fonte de energia externa pode ser usada para irradiar o tecido para aumentar a temperatura da solução de tropoelastina para formar o material elástico no
5 tecido.

Será compreendido que o material elástico pode ser preparado externamente de acordo com um processo descrito acima e então inserido em um tecido ou cavidade de tecido.

Por exemplo, a solução de tropoelastina pode ser
10 moldada em um molde e o material elástico formado de acordo com um processo descrito acima a fim gerar um formato apropriado para implantação subsequente em um paciente. Um exemplo é onde a remoção cirúrgica de parte de um tecido de paciente deixa uma cavidade requerendo preenchimento com um
15 material elástico biocompatível. Sob estas condições, o formato da posição que requer preenchimento pode ser avaliado usando métodos conhecidos e um molde apropriado preparado baseado nesta avaliação. A solução de tropoelastina é então moldada dentro do molde e um material
20 elástico formado de acordo com um processo descrito acima para implantação dentro da posição requerendo preenchimento.

Em um outro exemplo, a solução de tropoelastina pode ser formada em um material elástico de acordo com um
25 processo descrito acima na forma de partículas. Por exemplo, as partículas podem ser formadas usando uma emulsão, microfluidica, ou outro sistema como conhecido na técnica para fazer partículas. As partículas podem também ser formadas de uma solução de tropoelastina de
30 concentração de tropoelastina menor do que aproximadamente

1,5 mg/mL. As partículas podem ser substancialmente esféricas e ter um diâmetro variando de 0,1 micrômetros a 10 micrômetros. As partículas de material elástico podem ser enviadas à posição requerendo tratamento usando as técnicas de liberação de alta velocidade conhecidas na técnica.

Uma vantagem de formar o material elástico de uma solução de tropoelastina de acordo com um processo descrito acima é que o material elástico pode ser feito para se formar rapidamente, certamente mais rapidamente do que pode ser conseguido quando a elastina é formada. Isto permite uma variedade de formatos intrincados e complexos a serem formados em um molde que não pode ser formado pela elastina. Uma vantagem adicional é que como a taxa de formação do material elástico de um material de tropoelastina pode ser controlada pela temperatura, pH e/ou sal de manipulação, os gases podem ser introduzidos em um processo controlado para formar bolhas e gerar uma matriz tipo esponja aberta. Alternativamente, a formação de bolhas pode ser evitada se desejado.

Uma outra abordagem para formar um implante de tecido externamente é o uso de técnicas incluindo a litografia a base de laser, eletropulverização e eletrorotação.

O material elástico formado de uma solução de tropoelastina de acordo com um processo descrito acima é particularmente útil para o fechamento de feridas, ou para adicionar sustentação às feridas recentemente reparadas, em particular feridas onde o tecido de granulação foi colocado, mas a fibrose substancial que daria de outra maneira a força à ferida curada não ocorreu. Os exemplos

destas feridas incluem feridas cirúrgicas, ou feridas causadas por trauma, tal como laceração, abrasão, perfuração, ou queimaduras ou outros defeitos. As feridas podem ser encontradas dermicamente, subcutaneamente, em 5 tecido profundo ou em um órgão requerendo pelo menos alguma elasticidade para funcionar.

O material elástico formado da solução de tropoelastina de acordo com um processo descrito acima é útil em circunstâncias em que os selantes de fibrina e 10 colas cirúrgicas são convencionalmente usados. Um exemplo é onde uma anastomose requer o fechamento eficaz para reduzir a perda de fluido. Outro exemplo é onde há uma necessidade de rapidamente originar fluxo sanguíneo, ou prevenir a invasão por microrganismos.

15 Há várias rotas de administração. Estas incluem pulverização, limpar, derramar, colar ou contatar uma solução de tropoelastina na ferida para fazer o material elástico se formar de acordo com um processo descrito acima, e/ou na superfície da ferida.

20 Assim, em uma modalidade é fornecido um método para fechar um tecido ferido incluindo a pulverizar, colar, derramar, limpar ou contatar uma solução de tropoelastina contra uma ferida de tecido para fazer um material elástico se formar de acordo com um processo descrito acima.

25 Nestas modalidades, a solução de tropoelastina pode ser suplementada com outros compostos, proteínas e fatores para facilitar, modular ou melhorar o fechamento de uma ferida.

30 Como notado acima, uma vantagem de formar o material elástico de uma solução de tropoelastina de acordo com um

processo descrito acima é que o material elástico pode ser feito para se formar rapidamente, certamente mais rapidamente do que pode ser conseguido quando elastina é formada. Consequentemente, é previsto que seria possível obter o fechamento rápido de uma ferida. Adicionalmente, o fato que a manipulação de temperatura, pH e/ou sal afeta a taxa de formação do material elástico significa que a taxa de fechamento de uma ferida pode ser controlada mais eficazmente.

Adicionalmente à sustentação de tecido e agentes de volume descritos, o material elástico formado de uma solução de tropoelastina de acordo com um processo descrito acima é particularmente útil para a fabricação de próteses e dispositivos médicos. Os exemplos incluem enxertos ou stents para prender estruturas biológicas abertas, tais como vasos e câmaras. Outros exemplos incluem faixas para ajudar as estruturas biológicas com retrocesso.

Uma aplicação adicional é fornecer um revestimento biocompatível a um dispositivo médico de outra maneira biologicamente incompatível (tal como um marcapasso ou implante coclear) que é elástico, resiliente e capaz de persistir em um local de tecido. Nestas modalidades, o material elástico é particularmente importante para evitar fibrose.

O fato que o material elástico pode ser feito para se formar rapidamente, certamente mais rapidamente do que pode ser conseguido quando elastina é formada, significa que um revestimento de superfície uniformemente fino pode ser aplicado a um dispositivo médico, fornecendo biocompatibilidade sem interferir com o desempenho do

dispositivo.

Em outras modalidades são fornecidos kits e composições úteis para formar um material elástico usando uma solução de tropoelastina de acordo com um método
5 descrito acima. Em uma forma, um kit inclui um primeiro recipiente incluindo tropoelastina, um segundo recipiente incluindo um reagente para fornecer uma solução alcalina, e instruções escritas para formar um material elástico usando a tropoelastina e o reagente.

10 Em uma modalidade é fornecido uma composição para formar um material elástico incluindo uma solução de tropoelastina tendo um pH alcalino e uma temperatura selecionados para prevenir a formação de um material elástico de tropoelastina na solução. A composição pode
15 incluir o sal, particularmente onde o pH da solução é menos do que pH 10, como discutido acima. Em determinadas formas, a composição pode ser fornecida em uma forma de pó que em uso deve ser hidratada para fornecer uma solução de tropoelastina. Em aquecimento, o material elástico é
20 formado da tropoelastina na solução.

Dependendo do uso ao qual os kits e composições são postos (por exemplo, para aumentar tecido, fechamento de ferida ou outras aplicações descritas aqui), os kits e composições podem também ser fornecidos com moléculas
25 adicionais. Por exemplo, outras moléculas de tecido conectivo podem ser fornecidas em formulação com, ou para formulação com, tropoelastina. Os exemplos incluem colágeno, elastina, queratina, fibrina, glicosaminoglicanos tais como sulfato de hialuronan e de heparina, condroitinas
30 e moléculas similares. As formas artificiais destas

moléculas podem também ser fornecidas, por exemplo, ELPs.

Em outras formas, compostos farmacêuticos, incluindo antibióticos, promotores de crescimento, anti-sépticos, compostos angiogênicos, agentes anticâncer, e similares, 5 podem ser fornecidos para formulação com, ou em formulação com, tropoelastina.

Formas adicionais podem fornecer fatores biológicos, tais como fatores de tecido, citocinas, fatores de crescimento e similares. São preferidos particularmente 10 aqueles fatores envolvidos no fechamento de ferida, fibrose e granulação.

Outras formas podem fornecer células, em particular, células que são envolvidas na cura da ferida. Os exemplos incluem células epiteliais, fibrócitos, fibroblastos, 15 precursores de queratinócito, queratinócitos, miofibroblastos, fagócitos e similares.

Em outra modalidade é fornecido um aparelho ou um dispositivo para formar um material elástico de tropoelastina incluindo uma primeira câmara incluindo uma 20 solução de tropoelastina; uma segunda câmara incluindo um reagente para ajustar o pH da solução da primeira câmara; meios distribuidores para dispensar a solução à primeira câmara e o reagente da segunda câmara para formar um mistura da solução e do reagente, para formar o material 25 elástico de tropoelastina na mistura.

Em uma outra modalidade é fornecido um aparelho para formar um material elástico de tropoelastina incluindo uma primeira câmara incluindo uma solução de tropoelastina tendo um pH alcalino; uma segunda câmara incluindo uma 30 solução para fornecer uma concentração de sal de

aproximadamente 150 mM ou menor à solução da primeira câmara; e meios distribuidores para dispensar as soluções das primeira e segunda câmaras para formar uma mistura das soluções, para formar o material elástico de tropoelastina na mistura.

Estes aparelhos podem ser usados para aplicar a solução de tropoelastina para formação de um produto elástico de acordo com um processo descrito acima pulverizando, colando, esfregando ou injetando a solução a um local desejado de tecido ou a uma superfície inanimada, tal como um molde. Por exemplo, o aparelho pode ser adaptado para ser conectável a uma agulha de calibre fino. Em outra forma o aparelho pode ser adaptado para ser conectável a um atomizador.

Será compreendido que o aparelho pode conter outras moléculas, compostos, fatores e células como descritos acima na primeira ou segunda câmara, ou em uma câmara adicional do aparelho.

Os inventores descobriram que um precursor ou uma forma intermediária do material elástico da invenção pode ser gerado que pode ser retornado para forma de solução quando pH, concentração de sal, ou temperatura são apropriadamente manipulados. Mais detalhadamente, os inventores descobriram que quando o pH de uma tropoelastina contendo a solução é ajustado aproximadamente a pH acima de 9 em temperaturas maiores do que aproximadamente 4°C, preferivelmente aproximadamente 37°C, um precipitado é formado que pode então ser separado da solução. Quando o pH é então diminuído às condições não alcalinas e/ou a temperatura é diminuída, é possível fazer o precipitado

dissociar e dispersar. O precipitado dispersado contém pelo menos alguma tropoelastina livre.

Esta descoberta espera-se ser particularmente útil na purificação de tropoelastina dos sistemas de expressão recombina-
5 recombina-nte.

Em outra modalidade é fornecido um método de formar uma solução purificada de tropoelastina incluindo:

- fornecendo uma solução de tropoelastina;
- ajustando o pH da solução para formar uma solução
10 tendo pH alcalino, para fazer a tropoelastina na solução precipitar;
- removendo o precipitado;
- adicionando o precipitado removido a uma solução tendo um pH substancialmente não alcalino, e/ou uma
15 temperatura substancialmente diminuída, para fazer o precipitado dispersar na solução, para formar uma solução purificada de tropoelastina.

Uma particularmente de aplicação importante do material elástico formado de uma solução de tropoelastina
20 de acordo com um método descrito acima é fornecer um mecanismo para a liberação prolongada ou controlada de um composto. Mais especificamente, manipulando o pH ou sal durante a formação do material, ou por reticulação do material com glutaraldeído ou outros agentes de reticulação
25 depois que o material é formado, é possível projetar ou selecionar um material elástico que tenha qualidades particulares de persistência. Por exemplo, os inventores descobriram que as formas reticuladas do material elástico tendem a ser mais duras, mais densas e mais robustas do que
30 as formas não reticuladas. O último tende a assemelham-se

mais proximamente à elastina natural. Algumas formas tendem a ser degradadas mais facilmente no tecido, portando fornecendo uma liberação mais rápida de um produto farmacêutico ou molécula similar semeada dentro do material elástico. Outras formas são mais persistentes, degradadas menos prontamente e fornecem um termo mais longo de liberação de um produto farmacêuticos ou molécula similar.

Assim em uma modalidade é fornecido um implante de liberação prolongada ou controlada, o implante sendo um material elástico que é formado de uma solução de tropoelastina de acordo com um processo descrito acima. O implante de liberação prolongada pode conter moléculas, compostos, fatores e células como descritas acima.

Como discutido acima, como a taxa de formação do material elástico de uma solução de tropoelastina pode ser controlada manipulando a temperatura, pH e/ou sal, gases podem ser introduzidos em um processo controlado para formar bolhas e gerar um material elástico tendo uma matriz aberta tipo esponja. Isto fornece uma estrutura ou matriz particularmente útil para semear células, tecidos e fatores para permitir a regeneração de tecido e reparo de ferida. Os exemplos de células e fatores apropriados são discutidos acima.

Vantajosamente, a porosidade do material elástico pode ser controlada, permitindo uma estrutura ser formada através da qual o tecido regenerando possa penetrar. Alternativamente, uma estrutura pode de ser formada tendo pores que são suficientes para permitir a difusão de moléculas e fatores dentro e fora do material elástico somente.

Assim em outra modalidade é fornecido uma matriz de célula ou tecido, a matriz de célula ou tecido sendo formada de um material elástico produzido por um processo descrito acima.

5 **Exemplos**

Exemplo 1 - Formação de material elástico na ausência de agente de reticulação

Tropoelastina é misturada preferivelmente em uma concentração de mais de 1,5 mg/mL, tipicamente 10-200 mg/mL em solução salina tamponada de fosfato e a solução é ajustada usando 1M de NaOH a um pH entre aproximadamente de pH 9 aproximadamente a pH 13, preferivelmente pH 11. A solução é então aquecida mais de 4°C preferivelmente a aproximadamente 37°C. Uma entidade tipo pasta macia é formada, que então se ajusta para formar o material elástico.

Exemplo 2 - Formação de material elástico em um pH alcalino mais baixo varia com sal

Tropoelastina foi dissolvida em uma solução aquosa em uma concentração de 10 mg/mL. A concentração de sal e pH da solução aquosa foi titulada entre 0 - 150 mM e pH 7 - 12, respectivamente. A temperatura da solução de tropoelastina foi elevada para 37°C e a habilidade de formar um material elástico avaliada visualmente e pelo tato. Qualquer material elástico assim formado foi testado para sua persistência sob resfriamento.

Dois pontos de transição foram vistos quando o pH diminuiu. Acima de um pH 10, não havia nenhuma necessidade para o sal dentro da solução a fim de formar um material elástico persistente da tropoelastina na solução.

Entretanto, quando o pH diminuiu abaixo de 10, uma concentração de sal de aproximadamente 60 mM foi necessária a fim de formar um material elástico persistente da tropoelastina na solução.

5 Exemplo 3 - Formação de material elástico na presença de reticulador

 Uma solução de tropoelastina é misturada em uma concentração de mais de 1,5 mg/mL, tipicamente 10-200 mg/mL com glutaraldeído (0,001-0,5% de peso/vol) em solução
10 salina tamponada de fosfato em um pH alcalino de aproximadamente 8,5 e aquecida para formar um material elástico. O material tem uma cor rosa e uma densidade e rigidez mais elevadas do que o material elástico formado de acordo com os exemplos 1 e 2.

15 Exemplo 4 - Purificação de tropoelastina

 Uma tropoelastina crua contendo o sobrenadante obtido de um sistema de expressão bacteriano foi ajustada para dar um pH entre 9 e 13, preferivelmente 11, para precipitar as moléculas de tropoelastina da solução para formar um
20 precipitado. O precipitado foi separado do sobrenadante e ressuspenso em um tampão tendo um pH não alcalino e uma temperatura mais baixa para fazer o precipitado dispersar para formar uma solução no tampão. A solução foi armazenada então sob condições de refrigeração.

25 Exemplo 5 - Formação material de elástico *in vivo*

 Uma única dose bolus (0,1 ml) de pH ajustado de 200 mg/ml de solução de tropoelastina foi injetada intradermicamente usando uma agulha de calibre 26 em um
30 rato Sprague Dawley fêmea saudável. A temperatura corporal do rato conduziu ao início rápido da formação de material

elástica induzida por calor. O animal foi observado por um período de 15 dias e então examinado histologicamente. Um material substancialmente amorfo estava presente na hipoderme incluindo o tecido conectivo frouxo abaixo do músculo cutâneo (Figura 1). A presença de um material elástico persistente neste depósito grande foi confirmada por imunohistotintagem com o anticorpo específico de elastina BA-4.

Exemplo 6 - Material elástico com fármacos incorporados

O material elástico foi feito ajustando o pH a 10,8, incubando em 37°C por 1 hora, resfriando então reajustando o pH a 7,4. As partículas do fármaco paclitaxel foram incorporadas na amostra. Aquecendo a 37°C o conjunto de amostra para dar um material elástico que contivesse partículas distribuídas do fármaco. As células de câncer de pulmão H1299 foram semeadas sobre e em torno do material elástico preparado. Uma amostra de material elástico controle não continha nenhum paclitaxel. As células semeadas em material elástico contendo paclitaxel foram observadas como sendo apoptóticas. As células invadiram as amostras controle. As amostras controle e o material elástico que continham o paclitaxel, mas não encostaram nas células não eram apoptóticas.

Exemplo 7 - Interação de material elástico e célula

As células de fibroblasto foram incorporadas em (Figura 2), ou semeadas sobre (Figura 3), o material elástico.

Listagem de Sequência

<110> The University of Sydney

5 <120> USO DE TROPOELASTINA PARA REPARO OU RESTAURAÇÃO DE TECIDO

<130> 81301417:TPG:KES

10 <150> 2006906319

<151> 13/11/2006

<160> 26

15 <170> PatentIn na versão 3.4

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 1

Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys Ala Ala

1 5

25 <210> 2

<211> 5

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Val Gly Val Pro

35 1 5

<210> 3

<211> 4

40 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

45 Gly Gly Val Pro

1

<210> 4

50 <211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

55 Gly Val Gly Val Ala Pro

1 5

5 <210> 5
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 5
 Gly Gly Val Pro Gly Ala Ile Pro Gly Gly Val Pro Gly Gly Val Phe
 1 5 10 15

15 Tyr Pro

20 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 6
 Gly Val Gly Leu Pro Gly Val Tyr Pro
 1 5

30 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 7
 Gly Val Pro Leu Gly Tyr Pro
 1 5

40 <210> 8
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 8
 Pro Tyr Thr Thr Gly Lys Leu Pro Tyr Gly Tyr Gly Pro
 1 5 10

50 <210> 9
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55

<400> 9

Gly Gly Val Ala Gly Ala Ala Gly Lys Ala Gly Tyr Pro
1 5 10

5

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 10

Thr Tyr Gly Val Gly Ala Gly Gly Phe Pro
1 5 10

15

<210> 11

<211> 5

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

25 Lys Pro Leu Lys Pro
1 5

<210> 12

30 <211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

35

Ala Asp Ala Ala Ala Ala Tyr Lys Ala Ala Lys Ala
1 5 10

40 <210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

45 <400> 13

Gly Ala Gly Val Lys Pro Gly Lys Val
1 5

50

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

55

<400> 14

Gly Ala Gly Val Lys Pro Gly Lys Val
 1 5

5

<210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 15

Thr Gly Ala Gly Val Lys Pro Lys Ala
 1 5

15

<210> 16
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 16

Gln Ile Lys Ala Pro Lys Leu
 1 5

25

<210> 17
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 17

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Lys
 1 5 10

35

<210> 18
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40

<400> 18

45

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys Tyr Gly
 1 5 10 15

Ala Ala Ala Gly Leu Val
 20

50

<210> 19
 <211> 16
 <212> PRT

55

<213> Homo sapiens

<400> 19

5 Glu Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys Tyr Gly Ala Arg
1 5 10 15

<210> 20

10 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

15

Glu Ala Gln Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys Tyr Gly Val Gly
1 5 10 15

20 Thr

<210> 21

25 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

30

Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Lys Ala Ala Gln Phe Gly Leu
1 5 10 15

35 Val

<210> 22

40 <211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

45

Gly Gly Val Ala Ala Ala Ala Lys Ser Ala Ala Lys Val Ala Ala Lys
1 5 10 15

50 Ala Gln Leu Arg Ala Ala Ala Gly Leu Gly Ala Gly Ile
20 25

<210> 23

55 <211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

5 Gly Ala Leu Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys Tyr Gly Ala Ala Val
1 5 10 15

<210> 24

10 <211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

15

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Lys Ala Ala
1 5 10

20 <210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 25

Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys Tyr Gly Ala Ala
1 5 10

30

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35

<400> 26

Cys Leu Gly Lys Ala Cys Gly Arg Lys Arg Lys
1 5 10

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para produzir um material elástico a partir de tropoelastina caracterizado pelo fato de incluir o aquecimento de uma solução de tropoelastina tendo um pH
5 alcalino para formar um material elástico a partir da tropoelastina na solução.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o pH alcalino é maior do que aproximadamente 7,5.

10 3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o pH alcalino é maior do que aproximadamente 9.

4. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que a
15 temperatura é maior do que aproximadamente 4°C.

5. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, caracterizado pelo fato de que a temperatura é aproximadamente 37°C.

6. Processo, de acordo com qualquer uma das
20 reivindicações 1, 2, 3, 4 ou 5, caracterizado pelo fato de que a solução de tropoelastina tem uma concentração de sal de menos do que aproximadamente 200 mM.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a concentração de sal é
25 maior do que aproximadamente 60 mM e o pH é menor do que aproximadamente 10.

8. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7, caracterizado pelo fato de que a tropoelastina está presente na solução em uma
30 concentração maior do que aproximadamente 1,5 mg/mL.

9. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que a tropoelastina está presente na solução em uma concentração entre aproximadamente 10 mg/mL e 200 mg/mL.

5 10. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9, caracterizado pelo fato de que a tropoelastina inclui uma sequência que é a mesma ou similar a um domínio hidrofílico de tropoelastina.

10 11. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10, caracterizado pelo fato de que a tropoelastina consiste em uma sequência que é a mesma ou similar a um domínio hidrofílico de tropoelastina.

15 12. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que o material elástico ainda inclui um componente selecionado do grupo consistindo de produtos farmacêuticos, células biológicas, fatores
20 biológicos, e moléculas biológicas.

13. Material elástico para o uso em aplicações médicas caracterizado pelo fato de que o material elástico é formado de acordo com o processo de qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12.

25 14. Material elástico, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a aplicação médica é selecionada do grupo consistindo de aumentar um tecido, corrigir um defeito de tecido, e fechar uma ferida.

30 15. Material elástico, de acordo com a reivindicação 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que o material

elástico é um produto selecionado do grupo consistindo de uma prótese ou dispositivo médico, um implante de liberação prolongada ou controlada, uma matriz de célula ou tecido.

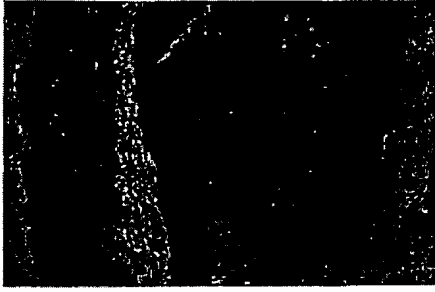


FIGURA 1

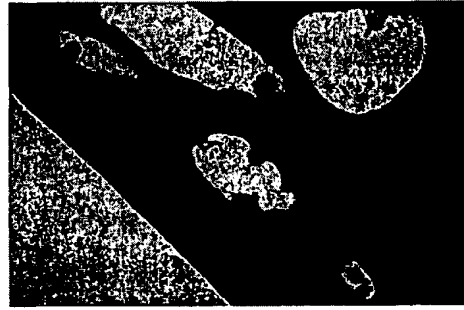


FIGURA 2

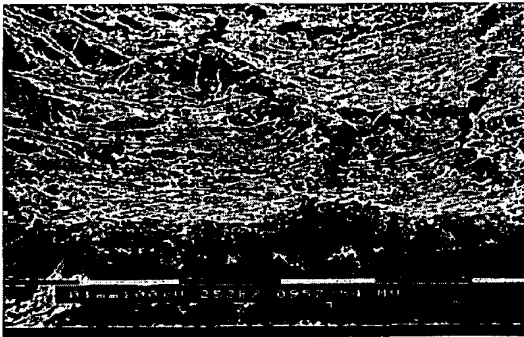


FIGURA 3

USO DE TROPOELASTINA PARA REPARO OU RESTAURAÇÃO DE TECIDO

A presente invenção relaciona-se à tropoelastina e ao reparo e restauração de tecido usando os materiais elásticos. É divulgado um processo para produzir um material elástico de tropoelastina incluindo aquecer uma solução de tropoelastina tendo um pH alcalino para formar um material elástico a partir da tropoelastina na solução. São também divulgados os materiais elásticos preparados de acordo com este processo e suas aplicações.