



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112566767 A

(43) 申请公布日 2021.03.26

(21) 申请号 201980050677.7

J·维斯贾格

(22) 申请日 2019.08.12

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

(30) 优先权数据

72003

62/717,622 2018.08.10 US

代理人 付文川 吴小瑛

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2021.01.29

B29C 43/02 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

B29C 43/36 (2006.01)

PCT/US2019/046222 2019.08.12

B32B 9/02 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/033970 EN 2020.02.13

(71) 申请人 保尔特纺织品公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 L·雷 N·E·埃尔-迪夫拉维

P·A·盖雷特 M·布莱特-奥德特

G·W·赖斯 J·T·基托森

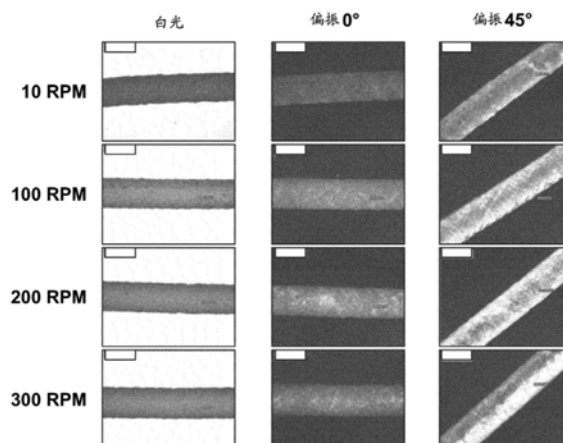
权利要求书4页 说明书38页 附图14页

(54) 发明名称

用于模制体的组合物

(57) 摘要

本公开涉及一种用于模制体的组合物,其包含重组蜘蛛丝蛋白和增塑剂。另外,本公开涉及一种包含重组蜘蛛丝蛋白和增塑剂的模制体以及一种用于制备所述模制体的方法。



1. 一种用于模制体的组合物,其包含重组蜘蛛丝蛋白和增塑剂,其中所述组合物能够被诱导成可流动状态,其中所述重组蜘蛛丝蛋白在所述可流动状态下大致上不降解。
2. 如权利要求1所述的组合物,其中所述组合物能够通过施加剪切力和压力来被诱导成所述可流动状态。
3. 如权利要求2所述的组合物,其中所述组合物能够通过未加热的情况下施加剪切力和压力来被诱导成所述可流动状态。
4. 如权利要求3所述的组合物,其中所述组合物能够被诱导成所述可流动状态并挤压多次,其中在所述组合物内所述重组蜘蛛丝蛋白保持大致上不降解。
5. 如权利要求1所述的组合物,其中所述组合物为热塑性的。
6. 如权利要求2所述的组合物,其中所述组合物能够通过施加范围为1.5Nm至13Nm的剪切力来被诱导成所述可流动状态。
7. 如权利要求2所述的组合物,其中所述组合物能够通过施加范围为2Nm至6Nm的剪切力来被诱导成所述可流动状态。
8. 如权利要求2所述的组合物,其中所述组合物能够通过施加范围为1MPa至300MPa的压力来被诱导成所述可流动状态。
9. 如权利要求2所述的组合物,其中所述组合物能够通过施加范围为5MPa至75MPa的压力来诱导成所述可流动状态。
10. 如权利要求6至9中任一项所述的组合物,其中所述组合物能够在低于120℃、低于80℃、低于40℃或在室温下被诱导成所述可流动状态。
11. 如权利要求1至10中任一项所述的组合物,其中如根据ASTM D1238在95℃下用2.16kg的负荷所测试,所述组合物的熔体流动指数为至少0.5、至少1、至少2或至少5。
12. 如权利要求1至10中任一项所述的组合物,其中如根据ASTM D1238在95℃下用21.6kg的负荷所测试,所述组合物的熔体流动指数为至少0.5、至少1、至少2或至少5。
13. 如权利要求1所述的组合物,其中所述组合物为大致上均匀的。
14. 如权利要求1所述的组合物,其中所述重组蜘蛛丝蛋白包含重复单位。
15. 如权利要求1所述的组合物,其中所述重组蜘蛛丝蛋白包含在2个至20个范围内的重复单元,所述重复单元的氨基酸残基长度的范围为60至100个氨基酸。
16. 如权利要求1所述的组合物,其中所述重组蜘蛛丝蛋白的分子量的范围为20至2000kDa。
17. 如权利要求1所述的组合物,其中所述重组蜘蛛丝蛋白包含出现至少两次的重复单元,所述重复单元包含:
  - 多于150个氨基酸残基并且分子量为至少10kDa;
  - 具有6个或更多个连续氨基酸的富含丙氨酸的区域,其包含至少80%的丙氨酸含量;以及
  - 具有12个或更多个连续氨基酸的富含甘氨酸的区域,其包含至少40%的甘氨酸含量和少于30%的丙氨酸含量。
18. 如权利要求1所述的组合物,其中所述增塑剂选自多元醇、水和/或尿素。
19. 如权利要求16所述的组合物,其中所述多元醇包括甘油。
20. 如权利要求1所述的组合物,其中所述增塑剂包括水。

21. 如权利要求1所述的组合物,其中所述重组蜘蛛丝蛋白存在于重组蜘蛛丝多肽粉末中,并且其中增塑剂与重组丝多肽粉末的重量比的范围为0.05:1至4:1。

22. 如权利要求1所述的组合物,其中所述重组蜘蛛丝蛋白存在于重组蜘蛛丝多肽粉末中,并且增塑剂与重组丝多肽粉末的重量比的范围为0.20:1至0.70:1。

23. 如权利要求1所述的组合物,其中所述重组蜘蛛丝蛋白存在于重组蜘蛛丝多肽粉末中,并且所述组合物中重组蜘蛛丝多肽粉末的量的范围为1至90重量%的重组蜘蛛丝蛋白。

24. 如权利要求1所述的组合物,其中所述重组蜘蛛丝蛋白存在于重组蜘蛛丝多肽粉末中,并且所述组合物中重组蜘蛛丝多肽粉末的量的范围为20至41重量%的重组蜘蛛丝蛋白。

25. 如权利要求1所述的组合物,其包含在1至90重量%的范围内的甘油作为增塑剂。

26. 如权利要求1所述的组合物,其包含在15至30重量%的范围内的甘油作为增塑剂。

27. 如权利要求1所述的组合物,其包含在5至80重量%的范围内的水作为增塑剂。

28. 如权利要求1所述的组合物,其包含在19至27重量%的范围内的水作为增塑剂。

29. 如权利要求1所述的组合物,其中所述重组蜘蛛丝蛋白在所述可流动状态下以少于10.0重量%的量降解。

30. 如权利要求1所述的组合物,其中所述重组蜘蛛丝蛋白在所述可流动状态下以少于6.0重量%的量降解。

31. 如权利要求1所述的组合物,其中所述重组蜘蛛丝蛋白在所述可流动状态下以少于2.0重量%的量降解。

32. 如权利要求29至31中任一项所述的组合物,其中通过测量诱导所述可流动状态之前和之后所述组合物中存在的全长重组蜘蛛丝蛋白的量来评估所述重组蜘蛛丝蛋白的降解。

33. 如权利要求32所述的组合物,其中使用尺寸排阻色谱法测量全长重组蜘蛛丝蛋白的量。

34. 一种模制体,其包含如权利要求1至33中任一项所述的组合物。

35. 如权利要求34所述的模制体,其中所述模制体为纤维。

36. 如权利要求35所述的模制体,其中所述纤维的强度在100Pa至1.2GPa的范围内。

37. 如权利要求35所述的模制体,其中如通过偏振光显微镜所测量,所述纤维的双折射率在 $5 \times 10^{-5}$ 至约0.04的范围内。

38. 一种用于制备模制体的方法,其包括以下步骤:

(a) 向包含重组蜘蛛丝蛋白和增塑剂的组合物施加压力和剪切力以将所述组合物转化为可流动状态;以及

(b) 挤出在所述可流动状态下的所述组合物以形成模制体。

39. 如权利要求38所述的方法,其中挤出所述组合物以形成模制体包括挤出所述组合物以形成纤维。

40. 如权利要求39所述的方法,其中挤出所述组合物以形成纤维包括通过喷丝头挤出所述组合物。

41. 如权利要求38所述的方法,其中挤出所述组合物以形成模制体包括将所述组合物挤出到模具中。

42. 如权利要求38所述的方法,其还包括:
- (a) 向所述模制体施加压力和剪切力以将所述模制体转化成在可流动状态下的组合物;以及
- (b) 挤出在所述可流动状态下的所述组合物以形成第二模制体。
43. 如权利要求42所述的方法,其还包括重复所述第二模制体的步骤(a)和(b)至少一次。
44. 如权利要求38至43中任一项所述的方法,其中所述剪切力为1.5至13Nm。
45. 如权利要求38至43中任一项所述的方法,其中所述压力为1MPa至300MPa。
46. 如权利要求38至45中任一项所述的方法,其中使用毛细管流变仪或双螺杆挤出机向所述组合物施加所述剪切力和压力。
47. 如权利要求46所述的方法,其中在施加所述压力和剪切力期间,所述双螺杆挤出机的螺杆转速的范围为10至300RPM。
48. 如权利要求38至45中任一项所述的方法,其中用于施加所述剪切力和压力的仪器包括混合室,其联接至挤出室并且在其近侧。
49. 如权利要求48所述的方法,其中在所述混合室中加热所述组合物。
50. 如权利要求48所述的方法,其中在所述挤出室中加热所述组合物。
51. 如权利要求49或权利要求50所述的方法,其中将所述组合物加热至低于120°C的温度。
52. 如权利要求49或权利要求50所述的方法,其中将所述组合物加热至低于80°C的温度。
53. 如权利要求49或权利要求50所述的方法,其中将所述组合物加热至低于40°C的温度。
54. 如权利要求38至53中任一项所述的方法,其中与挤出之前的所述组合物相比,挤出之后所述模制体的水含量损失少于15%。
55. 如权利要求38至53中任一项所述的方法,其中与挤出之前的所述组合物相比,挤出之后所述模制体的水含量损失少于10%。
56. 如权利要求48所述的方法,其中所述组合物在所述混合室中的停留时间的范围为3至7分钟。
57. 如权利要求48所述的方法,其中所述挤出室在挤出所述组合物的喷丝孔近侧逐渐变细。
58. 如权利要求48所述的方法,其中所述挤出室为温度受控的。
59. 如权利要求48至58中任一项所述的方法,其中所述模制体为纤维,并且对所述纤维进行手工拉伸。
60. 如权利要求48至59中任一项所述的方法,其中所述模制体为纤维,并且通过多个步骤对所述纤维进行拉伸。
61. 如权利要求48至60中任一项所述的方法,其中在所述模制体中所述重组蜘蛛丝蛋白大致上不降解。
62. 如权利要求61所述的方法,其中在所述模制体中所述重组蜘蛛丝蛋白以少于10重量%的量降解。

63. 如权利要求61所述的方法,其中在所述模制体中所述重组蜘蛛丝蛋白以少于6重量%的量降解。

64. 如权利要求61所述的方法,其中在所述模制体中所述重组蜘蛛丝蛋白以少于2重量%的量降解。

65. 如权利要求61至64中任一项所述的方法,其中通过测量挤出之前和之后所述组合物中存在的全长重组蜘蛛丝蛋白的量来评估所述重组蜘蛛丝蛋白的降解。

66. 如权利要求65所述的方法,其中使用尺寸排阻色谱法测量全长重组蜘蛛丝蛋白的量。

67. 如权利要求38至66中任一项所述的方法,其中如通过偏振光显微镜所测量,所述模制体具有最小双折射率。

## 用于模制体的组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年8月10日提交的美国临时申请号62/717,622的权益,其内容以引用的方式整体并入本文。

### 技术领域

[0003] 本公开涉及一种用于模制体的组合物,其包含重组蜘蛛丝蛋白和增塑剂。另外,本公开涉及一种包含重组蜘蛛丝蛋白和增塑剂的模制体以及一种用于制备所述模制体的方法。

### 背景技术

[0004] 作为石油基产品的替代,生物可再生和生物可降解材料日益受到关注。为此,已经进行了相当多的工作来开发由来源于植物和动物的分子制造材料和纤维的方法。由再生蛋白制成的纤维追溯到19世纪90年代并且使用各种传统的湿法纺丝技术制成。

[0005] 湿法纺丝使用溶剂和凝固浴来生产纤维。这是不利的,因为在纺丝过程之后需要从纤维提取出用作溶剂和用于凝固浴中的化学物质并进行闭环过程以提供可持续且可靠的过程。尽管熔体纺丝因为不需要溶剂和凝固浴而为湿法纺丝提供了具有吸引力的选项,但是熔体纺丝还需要:(i) 聚合物应产生均匀的熔体组合物,其可以被挤出以形成商业品质的纤维,并且(ii) 聚合物不应在熔融和挤出步骤期间降解。

### 发明内容

[0006] 根据本发明的一些实施方案,本文提供一种用于模制体的组合物,以及一种模制体,其包含重组蜘蛛丝蛋白和增塑剂,其中所述组合物可在转化成熔融或可流动状态之后为大致上均匀的;并且所述重组蜘蛛丝蛋白在其形成为模制体之后大致上不降解或者以少于6.0重量%的量降解。

[0007] 此外,本公开提供一种用于制备模制体的方法,其包括以下步骤:向包含重组蜘蛛丝蛋白和增塑剂的组合物施加压力和/或剪切力以形成大致上均匀的熔体组合物;以及模制所述均匀的熔体组合物以形成所述模制体。大致上均匀的熔体组合物通常应处于可流动状态并且可以被挤出例如以形成纤维。

[0008] 根据一些实施方案,本文提供一种用于模制体的组合物,其包含重组蜘蛛丝蛋白和增塑剂,其中所述组合物能够被诱导成可流动状态,其中所述重组蜘蛛丝蛋白在可流动状态下大致上不降解。

[0009] 在一些实施方案中,组合物能够通过施加剪切力和压力来被诱导成可流动状态。在一些实施方案中,组合物能够通过未加热的情况下施加剪切力和压力来被诱导成可流动状态。在一些实施方案中,组合物能够被诱导成可流动状态并挤压多次,其中组合物内的重组蜘蛛丝蛋白保持大致上不降解。

[0010] 在一些实施方案中,组合物为热塑性的。

[0011] 在一些实施方案中,组合物能够通过施加范围为1.5Nm至13Nm的剪切力来被诱导成可流动状态。在一些实施方案中,组合物能够通过施加范围为2Nm至6Nm的剪切力来被诱导成可流动状态。在一些实施方案中,组合物能够通过施加范围为1MPa至300MPa的压力来被诱导成可流动状态。在一些实施方案中,组合物能够通过施加范围为5MPa至75MPa的压力来被诱导成可流动状态。

[0012] 在一些实施方案中,组合物能够在低于120°C、低于80°C、低于40°C或在室温下被诱导成可流动状态。在一些实施方案中,组合物为大致上均匀的。

[0013] 在一些实施方案中,重组蜘蛛丝蛋白包含重复单元。在一些实施方案中,重组蜘蛛丝蛋白包含在2个至20个范围内的重复单元,所述重复单元的氨基酸长度的范围为60至100个氨基酸。在一些实施方案中,重组蜘蛛丝蛋白的分子量的范围为20至2000kDa。

[0014] 在一些实施方案中,重组蜘蛛丝蛋白包含出现至少两次的重复单元,所述重复单元包含:多于150个氨基酸残基并且分子量为至少10kDa;具有6个或更多个连续氨基酸的富含丙氨酸的区域,其包含至少80%的丙氨酸含量;以及具有12个或更多个连续氨基酸的富含甘氨酸的区域,其包含至少40%的甘氨酸含量和小于30%的丙氨酸含量。

[0015] 在一些实施方案中,增塑剂选自多元醇、水和/或尿素。在一些实施方案中,多元醇包括甘油。在一些实施方案中,增塑剂包括水。在一些实施方案中,重组蜘蛛丝蛋白存在于重组蜘蛛丝多肽粉末中,并且其中增塑剂与重组丝多肽粉末的重量比的范围为0.05至1.50:1。在一些实施方案中,重组蜘蛛丝蛋白存在于重组蜘蛛丝多肽粉末中,并且增塑剂与重组丝多肽粉末的重量比的范围为0.20至0.70:1。

[0016] 在一些实施方案中,重组蜘蛛丝蛋白存在于重组蜘蛛丝多肽粉末中,并且组合物中重组蜘蛛丝多肽粉末的量的范围为1至90重量%重组蜘蛛丝蛋白。在一些实施方案中,重组蜘蛛丝蛋白存在于重组蜘蛛丝多肽粉末中,并且组合物中重组蜘蛛丝多肽粉末的量的范围为20至41重量%重组蜘蛛丝蛋白。在一些实施方案中,组合物包含在1至60重量%范围内的甘油作为增塑剂。在一些实施方案中,组合物包含在15至30重量%范围内的甘油作为增塑剂。在一些实施方案中,组合物包含在5至80重量%范围内的水作为增塑剂。在一些实施方案中,组合物包含在19至27重量%范围内的水作为增塑剂。

[0017] 在一些实施方案中,重组蜘蛛丝蛋白在可流动状态下以少于10.0重量%的量降解。在一些实施方案中,重组蜘蛛丝蛋白在可流动状态下以少于6.0重量%的量降解。在一些实施方案中,重组蜘蛛丝蛋白在可流动状态下以少于2.0重量%的量降解。在一些实施方案中,通过测量诱导可流动状态之前和之后组合物中存在的全长重组蜘蛛丝蛋白的量来评估重组蜘蛛丝蛋白的降解。在一些实施方案中,使用尺寸排阻色谱法测量全长重组蜘蛛丝蛋白的量。

[0018] 根据本发明的一些实施方案,本文还提供一种模制体,其包含用于模制体的组合物,所述组合物包含重组蜘蛛丝蛋白和增塑剂,其中所述组合物能够被诱导成可流动状态,其中所述重组蜘蛛丝蛋白在可流动状态下大致上不降解。

[0019] 在一些实施方案中,模制体为纤维。在一些实施方案中,纤维的强度在100Pa至1.2GPa的范围内。在一些实施方案中,如通过偏振光显微镜所测量,纤维具有范围为 $5 \times 10^{-5}$ 至约0.04的双折射率。

[0020] 根据本发明的一些实施方案,本文还提供一种用于制备模制体的方法,其包括以

下步骤:向包含重组蜘蛛丝蛋白和增塑剂的组合物施加压力和剪切力以将所述组合物转化为可流动状态;以及挤出在所述可流动状态下的所述组合物以形成模制体。

[0021] 在一些实施方案中,挤出组合物以形成模制体包括挤出组合物以形成纤维。在一些实施方案中,挤出组合物以形成纤维包括通过喷丝头挤出组合物。在一些实施方案中,挤出组合物以形成模制体包括将组合物挤出到模具中。

[0022] 在一些实施方案中,所述用于制备模制体的方法还包括:(a)向模制体施加压力和剪切力以将模制体转化成在可流动状态下的组合物,以及(b)挤出在所述可流动状态下的所述组合物以形成第二模制体。在一些实施方案中,所述方法还包括重复第二模制体的步骤(a)和(b)至少一次。

[0023] 在一些实施方案中,剪切力为1.5至13N\*m。在一些实施方案中,压力为1MPa至300MPa。在一些实施方案中,使用毛细管流变仪或双螺杆挤出机向组合物施加剪切力和压力。在一些实施方案中,在施加所述压力和剪切力期间,双螺杆挤出机的螺杆转速的范围为10至300RPM。

[0024] 在一些实施方案中,用于施加剪切力和压力的仪器包括混合室,其连接至挤出室并且在其近侧。在一些实施方案中,在混合室中加热组合物。在一些实施方案中,在挤出室中加热组合物。在一些实施方案中,将组合物加热至低于120°C的温度。在一些实施方案中,将组合物加热至低于80°C的温度。在一些实施方案中,将组合物加热至低于40°C的温度。在一些实施方案中,挤出室在挤出组合物的喷丝孔近侧逐渐变细。在一些实施方案中,挤压室为温度受控的。在一些实施方案中,组合物在混合室中的停留时间的范围为3至7分钟。

[0025] 在一些实施方案中,与挤出之前的组合物相比,挤出之后的模制体的水含量损失少于15%。在一些实施方案中,与挤出之前的组合物相比,挤出之后的模制体的水含量损失少于10%。

[0026] 在一些实施方案中,模制体为纤维,并且对纤维进行手工拉伸。在一些实施方案中,模制体为纤维,并且通过多个步骤对纤维进行拉伸。

[0027] 在一些实施方案中,在模制体中重组蜘蛛丝蛋白大致上不降解。在一些实施方案中,在模制体中重组蜘蛛丝蛋白以少于10重量%的量降解。在一些实施方案中,在模制体中重组蜘蛛丝蛋白以少于6重量%的量降解。在一些实施方案中,在模制体中重组蜘蛛丝蛋白以少于2重量%的量降解。在一些实施方案中,通过测量挤出之前和之后组合物中存在的全长重组蜘蛛丝蛋白的量来评估重组蜘蛛丝蛋白的降解。在一些实施方案中,使用尺寸排阻色谱法测量全长重组蜘蛛丝蛋白的量。

[0028] 在一些实施方案中,如通过偏振光显微镜所测量,模制体具有最小双折射率。

## 附图说明

[0029] 前述和其他目标、特征以及优点将由本发明的具体实施方案的以下描述显而易见,如附图中所说明。

[0030] 图1示出根据本发明的各种实施方案在选定热和RPM条件下挤出的P49W21G30熔体组合物的尺寸排阻色谱法数据。

[0031] 图2示出根据本发明的各种实施方案在选定热和RPM条件下挤出的P65W20G15熔体组合物的尺寸排阻色谱法数据。

[0032] 图3示出根据本发明的各种实施方案在选定热和RPM条件下挤出的P71W19G10熔体组合物的尺寸排阻色谱法数据。

[0033] 图4示出根据本发明的各种实施方案在选定热和RPM条件下挤出的P49W21G30熔体组合物在挤出期间的失水量表,如通过热重分析(TGA)所测量。所述数据示出在挤出之前起始粒料和在挤出之后在选定条件下挤出的样品中的含水量%。

[0034] 图5示出根据本发明的各种实施方案在选定热和RPM条件下挤出的P65W20G15熔体组合物在挤出期间的失水量表,如通过热重分析(TGA)所测量。所述数据示出在挤出之前起始粒料和在挤出之后在选定条件下挤出的样品中的含水量%。

[0035] 图6示出根据本发明的各种实施方案在选定热和RPM条件下挤出的P71W19G10熔体组合物在挤出期间的失水量表,如通过热重分析(TGA)所测量。所述数据示出在挤出之前起始粉末和在挤出之后在选定条件下挤出的样品中的含水量%。

[0036] 图7示出在选定热和RPM条件下挤出的P49W21G30样品的 $\beta$ 折叠含量,如通过傅里叶变换红外光谱术(Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)所测量。将样品与起始蛋白粉末和起始粒料的参考对照相比较。

[0037] 图8示出在选定热和RPM条件下挤出的P65W20G15样品的 $\beta$ 折叠含量,如通过傅里叶变换红外光谱术(FTIR)所测量。将样品与起始蛋白粉末和起始粒料的参考对照相比较。

[0038] 图9示出在选定热和RPM条件下挤出的P71W19G10样品的 $\beta$ 折叠含量,如通过傅里叶变换红外光谱术(FTIR)所测量。将样品与起始蛋白粉末和起始粒料的参考对照相比较。

[0039] 图10示出使用偏振光显微镜捕获的在20°C下在10、100、200或300RPM下产生的选定挤出产品的图像。

[0040] 图11示出使用偏振光显微镜捕获的在95°C下在10、100、200或300RPM下产生的选定挤出产品的图像。

[0041] 图12示出根据本发明的各种实施方案在选定热和RPM条件下挤出的P49W21G30挤出物在挤出期间的甘油损失量表,如通过HPLC所测量。所述数据示出在挤出之前起始粉末或粒料和在选定条件下挤出之后样品中的甘油损失量%。

[0042] 图13示出根据本发明的各种实施方案在选定热和RPM条件下挤出的P65W20G15挤出物在挤出期间的甘油损失量表,如通过HPLC所测量。所述数据示出在挤出之前起始粉末或粒料和在选定条件下挤出之后样品中的甘油损失量%。

[0043] 图14示出根据本发明的各种实施方案在选定热和RPM条件下挤出的P71W19G10挤出物在挤出期间的甘油损失量表,如通过HPLC所测量。所述数据示出在挤出之前起始粉末或粒料和在选定条件下挤出之后样品中的甘油损失量%。

### 具体实施方式

[0044] 在以下描述中阐述了本发明的多个实施方案的详情。本发明的其他特征、目标和优点从描述来看将是显而易见的。除非本文中另外定义,否则与本发明结合使用的科学和技术术语应具有本领域中的普通技术人员通常所理解的含义。另外,除非上下文另外要求,否则单数术语应包括复数,且复数术语应包括单数。除非上下文另有规定,否则术语“一个”和“一种”包括多个引用。通常,与以下结合使用的命名法和以下技术为本领域中众所周知且常用的那些:本文所述的生物化学、酶学、分子与细胞生物学、微生物学、遗传学和蛋白质

与核酸化学以及杂交。

[0045] 定义

[0046] 除非另外指示,否则以下术语应理解成具有以下含义:

[0047] 术语“多核苷酸”或“核酸分子”是指长度为至少10个碱基的核苷酸的聚合形式。所述术语包括DNA分子(例如,cDNA、或基因组DNA、或合成DNA)和RNA分子(例如,mRNA或合成RNA),以及含有非天然核苷酸类似物、非天然核苷间键或两者的DNA或RNA的类似物。核酸可以呈任何拓扑构象。例如,核酸可为单链、双链、三链、四链、部分双链、具支链、发夹型、环状或呈挂锁(padlocked)构象。

[0048] 除非另外指示,且作为本文中以通用格式“SEQ ID NO:”描述的所有序列的实例,“包含SEQ ID NO:1的核酸”是指如下核酸,其至少一部分具有以下序列:(i)序列SEQ ID NO:1,或(ii)与SEQ ID NO:1互补的序列。两者之间的选择由上下文决定。例如,如果将核酸用作探针,那么两者之间的选择由探针与所需靶标互补的要求决定。

[0049] “分离的”RNA、DNA或混合聚合物为如下RNA、DNA或混合聚合物,其与在其天然宿主细胞中自然伴随天然多核苷酸的其他细胞组分,例如与其天然缔合的核糖体、聚合酶和基因组序列大致上分离。

[0050] “分离的”有机分子(例如丝蛋白)为如下有机分子,与其所起源的宿主细胞的细胞组分(膜脂、染色体、蛋白质)或培养所述宿主细胞的培养基大致上分离。所述术语不要求生物分子与所有其他化学物质分离,但是某些分离的生物分子可被纯化至接近均质性。

[0051] 术语“重组体”是指如下生物分子(例如基因或蛋白质),其:(1)已从其天然存在的环境中移出,(2)与在自然界中发现所述基因的多核苷酸的全部或部分不缔合,(3)与在自然界中未与其连接的多核苷酸可操作地连接,或者(4)在自然界中不存在。术语“重组体”可关于克隆的DNA分离物、化学合成的多核苷酸类似物或由异源系统生物合成的多核苷酸类似物以及由此类核酸编码的蛋白质和/或mRNA使用。

[0052] 在本文中,如果异源序列与内源核酸序列相邻放置,使得所述内源核酸序列的表达发生改变,那么将生物体基因组中所述内源核酸序列(或所述序列的编码蛋白产物)视为“重组体”。在此背景下,异源序列为与内源核酸序列天然不相邻的序列,无论所述异源序列本身为内源的(源自同一宿主细胞或其后代)亦或外源的(源自不同宿主细胞或其后代)。例如,启动子序列可取代(例如,通过同源重组)宿主细胞基因组中的基因的天然启动子,使得所述基因具有经改变的表达模式。所述基因现将变成“重组体”,因为其与自然侧接它的序列中的至少一些序列分离。

[0053] 如果核酸含有基因组中的对应核酸中不自然存在的任何修饰,那么所述核酸同样被视为“重组体”。例如,如果内源编码序列含有人工引入(例如通过人为干预引入)的插入、缺失或点突变,那么所述内源编码序列被视为“重组体”。“重组核酸”还包括在异源位点处整合到宿主细胞染色体中的核酸和作为附加体存在的核酸构建体。

[0054] 如本文所用,术语“肽”是指短多肽,例如,长度通常短于约50个氨基酸且长度更通常短于约30个氨基酸的短多肽。如本文所用的术语包括模拟结构且因此模拟生物功能的类似物和模拟物。

[0055] 术语“多肽”涵盖天然存在和非天然存在的蛋白质及其片段、突变体、衍生物和类似物。多肽可为单体或聚合的。另外,多肽可包含多个不同结构域,每个结构域均具有一种

或多种不同活性。

[0056] 术语“分离的蛋白”或“分离的多肽”为以下蛋白或多肽,由于其来源或衍生来源,所述蛋白或多肽:(1)与在其天然状态伴随其的天然缔合组分不缔合,(2)以自然界中未发现的纯度存在,其中纯度可以关于其他细胞物质的存在进行判断(例如,不含来自相同物种的其他蛋白质),(3)由来自不同物种的细胞表达,或者(4)在自然界中不存在(例如,其为自然界中发现的多肽的片段,或者其包括自然界中未发现的氨基酸类似物或衍生物或除标准肽键以外的键联)。因此,化学合成的多肽或在不同于其天然来源的细胞的细胞系统中合成的多肽将与其天然缔合组分“分离”。使用本领域中众所周知的蛋白纯化技术,还可以使多肽或蛋白大致上不含天然缔合组分。如因此所定义的,“分离的”不一定要要求如此描述的蛋白、多肽、肽或寡肽已从其天然环境中物理地移出。

[0057] 术语“多肽片段”是指与全长多肽相比具有缺失,例如氨基末端和/或羧基末端缺失的多肽。在优选实施方案中,多肽片段为连续序列,在所述连续片段中片段的氨基酸序列与天然存在的序列中的对应位置相同。片段的长度通常为至少5、6、7、8、9或10个氨基酸,优选地为至少12、14、16或18个氨基酸,更优选地为至少20个氨基酸,更优选地为至少25、30、35、40或45个氨基酸,甚至更优选地为至少50或60个氨基酸,且甚至更优选地为至少70个氨基酸。

[0058] 如果编码某种蛋白的核酸序列与编码第二蛋白的核酸序列具有相似序列,那么所述蛋白与所述第二蛋白具有“同源性”或与所述第二蛋白“同源”。替代地,如果某种蛋白与第二蛋白具有“相似”氨基酸序列,那么这两种蛋白具有同源性。(因此,术语“同源蛋白”定义为意指两种蛋白具有相似氨基酸序列。)如本文所用,氨基酸序列的两个区域之间的同源性(尤其关于预测的结构相似性)解释为暗示功能相似性。

[0059] 当关于蛋白或肽使用“同源的”时,应认识到不相同的残基位置常常因保守性氨基酸取代而不同。“保守性氨基酸取代”为如下取代,在所述取代中氨基酸残基被带有具有相似化学性质(例如,电荷或疏水性)的侧链(R基团)的另一氨基酸残基取代。一般而言,保守性氨基酸取代将大致上不改变蛋白的功能性质。在两个或更多个氨基酸序列因保守性取代而彼此不同的情况下,可以向上调整序列同一性百分比或同源性程度以校正取代的保守性质。进行这种调整的方式为本领域中的普通技术人员众所周知的。参见例如,Pearson, 1994, *Methods Mol. Biol.* 24:307-31和25:365-89(以引用的方式并入本文)。

[0060] 二十种常规氨基酸及其缩写遵循常规用法。参见 *Immunology-A Synthesis* (Golub和Gren编, *Sinauer Associates, Sunderland, Mass.*, 第2版, 1991), 其以引用的方式并入本文。二十种常规氨基酸、非天然氨基酸(例如 $\alpha$ -、 $\alpha$ -二取代的氨基酸、N-烷基氨基酸)和其他非常规氨基酸的立体异构体(例如,D-氨基酸)也可为本发明多肽的合适组分。非常规氨基酸的实例包括:4-羟基脯氨酸、 $\gamma$ -羧基谷氨酸盐、 $\epsilon$ -N,N,N-三甲基赖氨酸、 $\epsilon$ -N-乙酰基赖氨酸、0-磷酸丝氨酸、N-乙酰基丝氨酸、N-甲酰基甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟基赖氨酸、N-甲基精氨酸以及其他类似氨基酸和亚氨基酸(例如,4-羟基脯氨酸)。在本文所用的多肽符号中,根据标准用法和惯例,左手端对应于氨基末端,并且右手端对应于羧基末端。

[0061] 以下六个基团各自含有彼此为保守性取代的氨基酸:1) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T); 2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E); 3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q); 4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K); 5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V); 以及6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸

(Y)、色氨酸(W)。

[0062] 多肽的序列同源性,有时还称为序列同一性百分比,通常使用序列分析软件测量。参见例如,the Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group(GCG),University of Wisconsin Biotechnology Center,910University Avenue, Madison,Wis.53705。蛋白分析软件使用分配给各种取代、缺失和其他修饰(包括保守性氨基酸取代)的同源性的量度来匹配相似序列。例如,GCG含有诸如“Gap”和“Bestfit”的程序,它们可以用默认参数用于确定紧密相关多肽(例如来自于生物体的不同物种的同源多肽)之间或野生型蛋白与其突变蛋白之间的序列同源性或序列同一性。参见例如,GCG第6.1版。

[0063] 当将特定多肽序列与含有来自不同生物体的大量序列的数据库进行比较时,一种有用算法为计算机程序BLAST(Altschul等人,J.Mol.Biol.215:403-410(1990);Gish和 States,Nature Genet.3:266-272(1993);Madden等人,Meth.Enzymol.266:131-141(1996);Altschul等人,Nucleic Acids Res.25:3389-3402(1997);Zhang和Madden,Genome Res.7:649-656(1997)),尤其为blastp或tblastn(Altschul等人,Nucleic Acids Res.25:3389-3402(1997))。

[0064] BLASTp的优选参数为:期望值:10(默认);过滤器:seg(默认);空位开口成本(Cost to open a gap):11(默认);空位延伸成本(Cost to open a gap):1(默认);最高比对:100(默认);字长:11(默认);描述数(No.of descriptions):100(默认);罚分矩阵:BLOWSUM62。

[0065] BLASTp的优选参数为:期望值:10(默认);过滤器:seg(默认);空位开口成本:11(默认);空位延伸成本:1(默认);最高比对:100(默认);字长:11(默认);描述数:100(默认);罚分矩阵:BLOWSUM62。针对同源性进行比较的多肽序列的长度通常将为至少约16个氨基酸残基,通常至少约20个残基,更通常至少约24个残基,通常至少约28个残基,且优选地多于约35个残基。当搜索含有来自大量不同生物体的序列的数据库时,比较氨基酸序列是优选的。使用氨基酸序列进行的数据库搜索可通过本领域中已知的除blastp以外的算法进行测量。例如,可以使用FASTA(GCG第6.1版中的程序)对多肽序列进行比较。FASTA提供在查询序列与搜索序列之间最佳重迭区域的比对和序列同一性百分比。Pearson,Methods Enzymol.183:63-98(1990)(以引用的方式并入本文)。例如,氨基酸序列之间的序列同一性百分比可以使用如GCG第6.1版(以引入的方式并入本文)中提供的FASTA以其默认参数(字长为2,PAM250评分矩阵)来确定。

[0066] 在整个说明书和权利要求中,词语“包含(comprise)”或变型诸如“包含(comprises)”或“包含(comprising)”将理解为暗示包括所陈述整数或整数组,但不排除任何其他整数或整数组。

[0067] 如本文所定义,术语“模制体”是指通过使用称为模具的刚性框架的定形液体或柔韧原材料,诸如模制工艺(包括但不限于挤出模制、注射模制、压缩模制、吹出模制、层压、基质模制、旋转模制、旋转浇注、传递模制、热成形等)制成的主体。

[0068] 如本文所定义,术语“纤维”是指细长的模制体,通常纤维应具有长丝的形式。

[0069] 如本文所述,术语“熔体纺丝”是指由聚合物形成纤维的方法,其中聚合物被转化成可熔融或可流动状态,然后在从喷丝头挤出之后通过冷却而固化。

[0070] 如本文所用,关于纤维的术语“拉伸”是指在挤出纤维期间或之后施加力以使纺丝纤维沿着其纵向轴线而伸长。术语“未拉伸的纤维”是指已被挤出但尚未进行任何拉伸的纤

维。术语“拉伸比”为通常定义为收集速率与进料速率之间的比率的专门术语。在恒定体积下,其可从纤维的初始直径( $D_i$ )和最终直径( $D_f$ )的比率(即, $D_i/D_f$ )来确定。

[0071] 如本文所用,术语“玻璃化转变”是指物质或组合物从硬质、刚性或“玻璃质”状态转变成更柔韧、“似橡胶的”或“粘性”状态。

[0072] 如本文所用,术语“玻璃化转变温度”是指物质或组合物经历玻璃化转变的温度。

[0073] 如本文所用,术语“熔体转变”是指物质或组合物从似橡胶的状态转变成较无序的液相或可流动状态。

[0074] 如本文所用,术语“熔化温度”是指物质经历熔体转变的温度范围。

[0075] 如本文所用,术语“增塑剂”是指与多肽序列相互作用以预防多肽序列形成三级结构和键并且/或者增加多肽序列的迁移率的任何分子。

[0076] 如本文所用,术语“可流动状态”是指组合物具有大致上与液体相同的特性(即,从似橡胶的状态转变成更液体状态)。

[0077] 虽然下文描述了示例性方法和材料,但与本文描述的方法和材料类似或等同的方法和材料也可在本发明的实践中使用,并且对于本领域的技术人员而言将为显而易见的。本文提及的所有出版物和其他参考文献均以引用的方式整体并入本文。在出现冲突的情况下,将以包括定义在内的本说明书为准。材料、方法和实施例仅具有说明性而不意图具有限制性。

[0078] 概述

[0079] 本文提供一种用于模制体的组合物,其包含重组蜘蛛丝蛋白和增塑剂,其中所述组合物在熔融或可流动状态下为均匀或大致上均匀的;并且所述重组蜘蛛丝蛋白在其形成成为模塑体之后大致上不降解(例如,以少于10重量%或常常少于6重量%的量降解)。

[0080] 重组丝蛋白

[0081] 本公开描述了本发明的实施方案,包括由合成蛋白共聚物(即重组多肽)合成的纤维。合适的蛋白共聚物讨论于2016年8月45日公开的美国专利公开号2016/0222174、2018年4月26日公开的美国专利公开号2018/0111970和2018年3月1日公开的美国专利公开号2018/0057548中,所述公开各自以引用的方式整体并入本文。

[0082] 在一些实施方案中,合成蛋白共聚物由丝状多肽序列制成。在一些实施方案中,丝状多肽序列为1)通过混合和匹配来源于丝多肽序列的重复结构域生成的嵌段共聚物多肽组合物,和/或2)具有足够大尺寸(约40kDa)以通过自工业可放大微生物分泌来形成有用模制体的嵌段共聚物多肽的重组表达。由丝重复结构域片段工程化的大(约40kDa至约100kDa)嵌段共聚物多肽(包括来自蜘蛛丝多肽的几乎所有公开的氨基酸序列的序列)可在本文所述的修饰微生物中表达。在一些实施方案中,丝多肽序列被匹配且设计来生产能够形成模制体的高度表达且分泌的多肽。

[0083] 在一些实施方案中,嵌段共聚物由跨越丝多肽序列空间的丝多肽结构域的组合混合物工程化。在一些实施方案中,嵌段共聚物通过在可扩大生物体(例如,酵母、真菌和革兰氏阳性细菌)中表达且分泌来制成。在一些实施方案中,嵌段共聚物多肽包含0个或更多个N末端结构域(NTD)、1个或更多个重复结构域(REP)以及0个或更多个C末端结构域(CTD)。在实施方案的一些方面中,嵌段共聚物多肽为单一多肽链的>100个氨基酸。在一些实施方案中,嵌段共聚物多肽包含与国际公开号W0/2015/042164,“Methods and Compositions for

Synthesizing Improved Silk Fibers” (其以引用的方式整体并入) 中公开的嵌段共聚物多肽序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的结构域。

[0084] 已鉴定若干种类型的天然蜘蛛丝。据信,每种天然纺丝类型的力学性质与所述丝的分子组成紧密相关。参见例如, Garb, J.E. 等人, *Untangling spider silk evolution with spidroin terminal domains*, *BMC Evol. Biol.*, 10:243 (2010); Bittencourt, D. 等人, *Protein families, natural history and biotechnological aspects of spider silk*, *Genet. Mol. Res.*, 11:3 (2012); Rising, A. 等人, *Spider silk proteins: recent advances in recombinant production, structure-function relationships and biomedical applications*, *Cell. Mol. Life Sci.*, 68:2, 第169-184页 (2011); 以及 Humenik, M. 等人, *Spider silk: understanding the structure-function relationship of a natural fiber*, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 103, 第131-85页 (2011)。例如:

[0085] 葡萄状腺 (AcSp) 丝倾向于具有高韧性,这是适当高强度与适当高延展性结合的结果。AcSp丝的特征在于大嵌段(“整体重复”)尺寸,其常常掺有聚丝氨酸和GPX的基序。管状腺 (TuSp或圆柱形) 丝倾向于具有大直径,具有适度强度和高延展性。TuSp丝之特征在于其聚丝氨酸和聚苏氨酸含量,以及聚丙烯酸短束。大壶状腺 (MaSp) 丝倾向于具有高强度和适度延展性。MaSp丝可为两个亚型之一:MaSp1和MaSp2。MaSp1丝的延展性通常小于MaSp2丝,且特征在于聚丙烯酸、GX和GGX基序。MaSp2丝的特征在于聚丙烯酸、GGX和GPX基序。小壶状腺 (MiSp) 丝倾向于具有适度强度和适度延展性。MiSp丝的特征在于GGX、GA和poly A基序,且常常含有约100个氨基酸的间隔元件。鞭毛腺 (Flag) 丝倾向于具有极高延展性和适度强度。Flag丝的特征通常在于GPG、GGX和短间隔基序。

[0086] 每种丝类型的性质可因物种不同而不同,且具有不同生活方式(例如,定居纺足目 (sedentary web spinner) 对比漫游猎蛛 (vagabond hunter)) 或进化上更古老的蜘蛛可产生性质与前文描述不同的丝(关于蜘蛛多样性和分类的描述,参见Hormiga, G. 和Griswold, C.E., *Systematics, phylogeny, and evolution of orb-weaving spiders*, *Annu. Rev. Entomol.* 59, pg. 487-512 (2014); 以及Blackedge, T.A. 等人, *Reconstructing web evolution and spider diversification in the molecular era*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106:13, pg. 5229-5234 (2009))。然而,与天然丝蛋白的重复结构域具有序列相似性和/或氨基酸组成相似性的合成嵌段共聚物多肽,可以用于按商业规模生产具有重现由天然丝多肽制成的对应模制体的性质的一致性模制体。

[0087] 在一些实施方案中,可以通过在GenBank中搜索相关术语,例如“蛛丝蛋白 (spidroin)”、“丝心蛋白 (fibroin)”、“MaSp”来汇编假定丝序列的列表,且可以将那些序列与通过独立测序工作获得的额外序列汇集在一起。然后将序列翻译成氨基酸,过滤重复条目,且手动拆分成各结构域 (NTD、REP、CTD)。在一些实施方案中,候选氨基酸序列被反向翻译成被最优化以用于在毕氏 (Komagataella) 酵母中表达的DNA序列。将DNA序列各自克隆到表达载体中,且将其转化到毕氏 (Komagataella) 酵母中。在一些实施方案中,随后以组合方式组装显示出成功表达和分泌的各种丝结构域,以构筑能够形成模制体的丝分子。

[0088] 丝多肽特征性地由侧接于非重复区域(例如,C末端结构域和N末端结构域)的重复结构域 (REP) 组成。在一实施方案中,C末端结构域和N末端结构域的长度在75至350个氨基

酸之间。重复结构域表现出层次架构,如图1所示。重复结构域包含一系列嵌段(也称为重复单元)。嵌段在整个丝重复结构域中为重复的,有时完美重复,有时不完美重复(构成一个准重复结构域)。嵌段的长度和组成在不同丝类型之间以及在不同物种中有所不同。表1A列出了来自所选物种和丝类型的嵌段序列的实例,以下文献中给出其他实例: Rising, A. 等人, Spider silk proteins: recent advances in recombinant production, structure-function relationships and biomedical applications, Cell Mol. Life Sci., 68:2, 第169-184页(2011), 以及 Gatesy, J. 等人, Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences, Science, 291:5513, 第2603-2605页(2001)。在一些情况下,嵌段可以按规则模式排列,形成在丝序列的重复结构域中出现多次(通常2至8次)的较大宏观重复体(macro-repeat)。重复结构域或宏观重复体内的重复嵌段,以及重复结构域内的重复宏观重复体,可以由间隔元件分开。在一些实施方案中,嵌段序列包含富含甘氨酸的区域,随后为polyA区域。在一些实施方案中,短(约1至10)个氨基酸基序在嵌段内多次出现。出于本发明的目的,可以在不参考环状排列的情况下选择来自不同天然丝多肽的嵌段(即,丝多肽之间在其他方面相似的鉴定嵌段可能因环状排列而不能对齐)。因此,例如,出于本发明的目的,“嵌段”SGAGG (SEQ ID NO:494) 与GSGAG (SEQ ID NO:495) 相同,且与GGSGA (SEQ ID NO:496) 相同;其全部彼此都为环状排列。针对给定丝序列选择的特定排列可能尤其由方便性(通常以G开始)决定。从NCBI数据库获得的丝序列可以划分为嵌段和非重复区域。

[0089] 表1A: 嵌段序列的样品

[0090]

物种	丝类型	代表性嵌段氨基酸序列
<i>Aliatypus gulosus</i>	丝心蛋白 1	GAASSSSTIITTKSASASAAADASAAATASA ASRSSANAAASAFQSFSSILLESFYFCSIFG SSISSSYAAAIASAASRAAAESNGYTTHAYA CAKAVASAVERTSGADAYAYAQAISDAL SHALLYTGRLNTANANSLASAFAYAFANA AAQASASSASAGAASASGAASASGAGSAS
原始肉食蛛 ( <i>Plectreuryx tristis</i> )	丝心蛋白 1	GAGAGAGAGAGAGAGAGSGASTSVSTSSS SGSGAGAGAGSGAGSGAGAGSGAGAGAG AGGAGAGFGSGLGLGYGVGLSSAQAQAQA QAAAQAQAQAQAQAYAAAQAQAQAQAQ AQAAAAAAAAAAAA
原始肉食蛛	丝心蛋白 4	GAAQKQPSGESSVATASAAATSVTSGGAPV GKPGVPAPIFYPPQGPLQQGPAPGPSNVQPGT SQQGPVGGVGGSNFSSSFASALSLNRGFTF VISSASATAVASAFQKGLAPYGTAFALSAAS AAADAYNSIGSGANAFAYAQAFARVLYPL VQYGLSSSAKASAFASAIASSFSSGTSGQG PSIGQQPPVTISAASASAGASAAAVGGGQ VGQGPYGGQQQSTAASASAAAATATS
猫脸蜘蛛 ( <i>Araneus gemmoides</i> )	TuSp	GNVGYQLGLKVANSGLGNAQALASSLSQ AVSAVGVGASSNAYANAVSNAVGVLAG QGILNAANAGSLASSFASALSSSAASVASQS ASQSQAAASQSQAAASAFRQAASQSASQSDS RAGSQSSTKTTSTSTSGSQADRSASSASQ ASASAFQSSASLSSSSSFSSAFSSATSISAV
黄斑金蛛 ( <i>Argiope aurantia</i> )	TuSp	GSLASSFASALSASAASVASSAAAQAASQS QAAASAFSRAASQSASQSAARSGAQSI TTSTAGSQAASQSASSAASQASASSFARASS ASLAASSSFSSAFSSANLSALGNVGYQLGF NVANNLGIGNAAGLGNALSQAVSSVGVGA SSSTYANAVSNAVGVQFLAGQGILNAANA
食人魔脸蜘蛛 ( <i>Deinopis spinosa</i> )	TuSp	GASASAYASAINAVGPYLYGLGLFNQANA ASFASSFASAVSSAVASASASAASSAYAQSA AAQAQAASSAFSQAAAQSAAAASAGASAG AGASAGAGAVAGAGAVAGAGAVAGASAA

		AASQAAASSSASAVASAFASASYALASSS AFANAFASATSAGYLGSLAYQLGLTTAYNL GLSNAQAFASSTLSQAVTGVGL
络新妇蛛 ( <i>Nephila clavipes</i> )	TuSp	GATAASYGNALSTAAAQFFATAGLLNAGN ASALASSFARAFSASAESQSFAQSQAFQQAS AFQQAASRSASQSAAEAGSTSSSTTTTTSAA RSQAASQSASSSYSSAFAQAASSSLATSSAL SRAFSSVSSASAASSLAYSIGLSAARSLGIAD AAGLAGVLARAAGALGQ
三带金蛛 ( <i>Argiope trifasciata</i> )	Flag	GGAPGGPGGAGPGGAGFGPGGGAGFGPG GGAGFGPGAAGPGGPGGPGGPGGAGGY GPGGAGGYGPGGVGPGGAGGYGPGGAGG YGPSSGPGGAGPGGAGGEGPVTVDVDT VGPEGVGGPGGAGPGGAGFGPGGGAGFG PGGAPGAPGGPGGPGGPGGPGGVGP GAGGYGPGGAGGVGPAGTGGFGPGGAGGF GPGGAGGFPGGAGGFPGAGAGGYGPGGV GPGGAGGFPGGVGPGSSGPGGAGGEGPV TVDVDVSV
络新妇蛛	Flag	GVSYPGGAGGPYPGGPYGPGGEGPGBA GGPYGPGGVGPGSSGPGGYGPGGAGPGGY GPGSSGPGGYGPGSSGPGGYGPGSSGPGG YGPSSGPGGYGPGGYGPGSSGPGSSGPG GSGPGGYGPGGTGPGSSGPGGYGPGSSGPG GSGPGGYGPGSSGPGGFPGSSGPGGYGPG GSGPGGAGPGGVGPGGFPGGAGPGBAAP GGAGPGGAGPGGAGPGGAGPGGAGPGBA GPGGAGGAGGAGSSGAGGSSGTTIIEDLD ITIDGADGPITISEELPISGAGSSGPGGAGPG GVGPGSSGPGGVGPGSSGPGGVGPGSSGP GGVGPGGAGGPYPGGSSGPGGAGGAGGPG GAYGPGGSYGPSSGPGGAGGPYPGGE GPGGAGGPYPGGAGGPYPGGAGGPYPG GGEGGPYPG
黑寡妇蜘蛛 ( <i>Latrodectus hesperus</i> )	AcSp	GINVSDIGSVTSLILSGSTLQMTIPAGDDL SGGYPGGFPAGAQPSSGAPVDFGGPSAGGD VAAKLARSLASTLASSGVFRAAFNSRVSTP VAVQLTDALVQKIASNLGLDYATASKLRK ASQAVSKVRMGSDTNAYALAISSALAEVLS SSGKVADANINQIAPQLASGIVLGVSTTAPQ FGVDLSSINVNLDISNVARNMQASIQQGPAP ITAEGPDFGAGYPGGAPTDLGLDMGAPSD GSRGGDATAKLLQALVPALLKSDVFRAIYK RGTRKQVVQYVTNSALQQAASSLGLDASTI SQLQTKATQALSSVSADSDSTAYAKAFGLA IAQVLGTSGQVNDANVNQIGAKLATGILRG SSAVAPRLGIDLS
三带金蛛	AcSp	GAGYTGPSGPSTGPSGYPLGGGAPFGQS GFGGSAGPQGGFGATGGASAGLISRANAL ANTSTLRTVLRGTGVSQQIASSVVQRAAQL

[0091]

[0092]

		ASTLGV DGNL ARFAVQAVSRLPAGSDTSA YAQAFSSALFNAGVLNASNIDTLGSRVLSA LLNGVSSAAQGLGINVDSGSVQSDISSSSSFL STSSSSASYSQASASSTS
全异妩蛛 ( <i>Uloborus diversus</i> )	AcSp	GASAADIATAIAASVATSLQSNGLTASNVS QLSNQLASYVSSGLSSTASSLGIQLGASLGA GFGASAGLSASTDISSSVEATSASTLSSSASS TSVVSSINAQLVPALAQTAVLNAAFSNINTQ NAIRIAELLTQQVGRQYGLSGSDVATASSQI RSALYSVQQGSASSAYVSAIVGPLITALSSR GVVNASNSSQIASSLATAILQFTANVAPQFG ISIPTSAVQSDLSTISQSLTAISSQTSSSVDSST SAFGGISGPSGPSYGPQPSGPTFGPGPSLSG LTGFTATFASSFKSTLASSTQFQLIAQSNLDV QTRSSLISKVLINALSSLGISASVASSIAASSS QSLLSVSA
苗圃网络蜘蛛 ( <i>Euprosthena australis</i> )	MaSp1	GGQGGQGGRYGQGAGSSAAAAAAAAAAAA AAAA
长爪绿色突 光蜘蛛 ( <i>Tetragnath a kauaiensis</i> )	MaSp1	GGLGGGQAGQGGQAGQGGYGSGLGG AGQGASAAAAAAAA
黄斑金蛛	MaSp2	GGYGPAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGLG PYGPSAAAAAAAA
食人魔脸蜘蛛	MaSp2	GPGGYGGPQQGPGQQYGPQTGQQGQGP SGQQGPAGAAAAAAAA
棒络新妇蛛 ( <i>Nephila clavata</i> )	MaSp2	GPGGYGLGQQGPGQQGPGQQGPAGYGPSG LSGPGGAAAAAAAA
食人魔脸蜘蛛	MiSp	GAGYGAGAGAGGGAGAGTGYGGGAGYGT GSGAGYGAGVGYGAGAGAGGGAGAGAGG GTGAGAGGGAGAGYGAGTGYGAGAGAGG GAGAGAGAGAGAGAGAGSGAGAGYGA GYGAGAGAGGVAGAGAAGGAGAAGGAG AAGGAGAAGGAGAGAGAGSGAGAGAGGG ARAGAGG [SEQ ID NO: 1115]
黑寡妇蜘蛛	MiSp	GGYGRGQAGAGVAGAGAAAGAAIA RAGGYGQAGAGGYGQAGAAAGAAAG AGAGGYGQAGAGGYGRGQAGAGAGAGA GARGYGQAGAGAAAGAAASAGAGGYGQ GAGGYGQAGAGAAAGAAASAGAGGYGQ GAGGYGQQGA [SEQ ID NO: 1226]
络新妇蛛	MiSp	GAGAGGAGYGRGAGAGAGAAAGAGAGA

[0093]

		AAGAGAGAGGYGGQGGYGAGAGAGAAA AAGAGAGGAAGYSRGGRAGAAGAGAGAA AGAGAGAGGYGGQGGYGAGAGAGAAAA AGAGSSGAGGYGRGAGAGAAAGAGAAAG AGAGAGGYGGQGGYGAGAGAAAAA [SEQ ID NO: 1234]
<i>Nephilengys cruentata</i>	MiSp	GAGAGVGGAGGYGSGAGAGAGAGAGAAS GAAAGAAAGAGAGGAGGYGTGQGYGAG AGAGAGAGAGGAGGYGRGAGAGAGAGA GGAGGYGAGQGYGAGAGAGAAAAAGDG AGAGGAGGYGRGAGAGAGAGAAAGAGA GGAGGYGAGQGYGAGAGAGAAAGAGAG GAGGYGAGQGYGAGAGAGAAAAA [SEQ ID NO: 1239]
全异妩蛛	MiSp	GSGAGAGSGYGAGAGAGAGSGYGAGSSAS AGSAINTQTVTSSTTTSSQSSAAATGAGYGT GAGTGASAGAAASGAGAGYGGQAGYGG AGASARAAGSGYGAGAGAAAAAGSGYGA GAGAGAGSGYGAGAAA [SEQ ID NO: 1246]
全异妩蛛	MiSp	GAGAGYRGQAGYIQGAGASAGAAAAGAG VGYGGQAGYGGQAGASAGAAAAAGAGAG RQAGYGGQAGASAGAAAAGAGAGRQAGY GQAGASAGAAAAGADAGYGGQAGYGG AGASAGAAASGAGAGYGGQAGYGGGAGA SAGAAAAGAGAGYLGQAGYGGQAGASAG AAAGAGAGYGGQAGYGGQGTGAAASAAAS SA [SEQ ID NO: 1249]
大腹园蛛	MaSp1	GGQGGQGGYGGLGSQGAGQGGYGAGQGA AAAAAAAGGAGGAGRGLGAGGAGQGYG AGLGGQGGAGQAAAAAAAGGAGGARQGG LGAGGAGQGYGAGLGGQGGAGQGGAAAA AAAAGGQGGQGGYGGLGSQGAGQGGYGA GQGGAAAAAAAGGQGGQGGYGGLGSQG AGQGGYGGRQGGAGAAAAAA [SEQ ID NO: 1312]
黑捕鱼蛛 ( <i>Dolomedes tenebrosus</i> )	MaSp1	GGAGAGQGSYGGQGGYGQGGAGAATATA AAAGGAGSGQGGYGGQGGGLGGYGGGAGA GAAAAAAAAGGAGAGQGGYGGQGGQ GYGQAGAGAAAAAAGGAGAGQGGYGG QGGYGGGAGAAAAAAAASGSSGSGQG GYGGQGGGLGGYGGQAGAGAGAAASAAAA [SEQ ID NO: 1345]
<i>Nephilengys cruentata</i>	MaSp	GGAGQGGYGGLGGQAGAAAAAAGGAG QGGYGGQAGQGAAAAAASGAGQGGYEG PGAGQGAGAAAAAAGGAGQGGYGGGLGGQ GAGQGAGAAAAAAGGAGQGGYGGGLGGQ GAGQGAGAAAAAAGGAGQGGYGGQAG QGAAAAAAGGAGQGGYGGGLGSGQGGYGR

		QGAGAAAAAAAAA [SEQ ID NO: 1382]
[0094]	<i>Nephilengys cruentata</i> MaSp	GGAGQGGYGGGLGGQGAGAAAAAAGGAG QGGYGGQGAGQGAAAAAASGAGQGGYGG PGAGQGAGAAAAAAGGAGQGGYGGGLGGQ GAGQGAGAAAAAAGGAGQGGYGGQGAG QAAAAAAGGAGQGGYGGGLGSGQGGYGG QGAGAAAAAAGGAGQGGYGGGLGGQGAGQ GAGAAAAA [SEQ ID NO: 1383]

[0095] 根据本发明的某些实施方案,来自嵌段和/或宏观重复结构域的纤维形成嵌段共聚物多肽描述于国际公开号W0/2015/042164(以引用的方式并入)中。按照结构域(N末端结构域、重复结构域和C末端结构域)对自蛋白质数据库(例如GenBank)或透过从头测序获得的天然丝序列进行分解。出于合成和组装成纤维或模制体的目的而选择的N末端结构域和C末端结构域序列包括天然氨基酸序列信息和本文所述的其他修饰。重复结构域被分解成重复序列,所述重复序列含有代表性嵌段,所述嵌段根据丝的类型,通常为1至8个,所述嵌段捕获关键性氨基酸信息,同时将编码氨基酸的DNA的尺寸减小成容易合成的片段。在一些实施方案中,适当形成的嵌段共聚物多肽包含至少一个含有至少1个重复序列的重复结构域,且视情况侧接N末端结构域和/或C末端结构域。

[0096] 在一些实施方案中,重复结构域包含至少一个重复序列。在一些实施方案中,重复序列为150至300个氨基酸残基。在一些实施方案中,重复序列包含多个嵌段。在一些实施方案中,重复序列包含多个宏观重复体。在一些实施方案中,嵌段或宏观重复体被分割成多个重复序列。

[0097] 在一些实施方案中,重复序列以甘氨酸开始,且不能以苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)、半胱氨酸(C)、组氨酸(H)、天冬酰胺(N)、甲硫氨酸(M)或天冬氨酸(D)结束,以满足DNA组装要求。在一些实施方案中,一些重复序列与天然序列相比可以改变。在一些实施方案中,可例如通过向多肽的C末端添加丝氨酸(以避免终止于F、Y、W、C、H、N、M或D)来改变重复序列。在一些实施方案中,可通过在不完全嵌段中填充自另一个嵌段的同源序列来修饰重复序列。在一些实施方案中,可通过重排嵌段或宏观重复体的顺序来修饰重复序列。

[0098] 在一些实施方案中,可以选择非重复性N末端结构域和C末端结构域用于合成。在一些实施方案中,N末端结构域可以通过去除,例如,如通过SignalP(Peterson,T.N.等人,SignalP 4.0:discriminating signal peptides from transmembrane regions,Nat.Methods,8:10,第785-786页(2011)所鉴定的前导信号序列来获得。

[0099] 在一些实施方案中,N末端结构域、重复序列或C末端结构域序列可以来自漏斗网蜘蛛(*Agelenopsis aperta*)、*Aliatypus gulosus*、哥斯大黎加斑马脚(*Aphonopelma seemanni*)、短牙蛛种AS217、短牙蛛种AS220、十字园蛛(*Araneus diadematus*)、猫脸蜘蛛、大腹圆蛛(*Araneus ventricosus*)、悦目金蛛(*Argiope amoena*)、银色金蛛(*Argiope argentata*)、横纹金蛛(*Argiope bruennichi*)、三带金蛛、*Atypoides riversi*、巴西黄斑粉趾(*Avicularia juruensis*)、加州陷门蛛(*Bothriocyrtum californicum*)、食人魔脸蜘蛛、灰色迪格蛛(*Diguetia canities*)、黑捕鱼蛛、*Euagrus chisoseus*、苗圃网络蜘蛛、乳突棘旗蛛(*Gasteracantha mammosa*)、*Hypochilus thorelli*、*Kukulcania hibernalis*、黑寡妇

蜘蛛、*Megahehexura fulva*、*Metepeira grandiosa*、金圆网蛛 (*Nephila antipodiana*)、棒络新妇蛛、络新妇蛛、马达加斯加新妇 (*Nephila madagascariensis*)、斑络新妇 (*Nephila pilipes*)、*Nephilengys cruentata*、帕拉威夏双条纹蛛 (*Parawixia bistrata*)、绿色猗猗蜘蛛 (*Peucetia viridans*)、原始肉食蛛、印度华丽雨林蛛 (*Poecilotheria regalis*)、长爪绿色突光蜘蛛或全异妖蛛。

[0100] 在一些实施方案中,丝多肽核苷酸编码序列可以与 $\alpha$ 交配因子核苷酸编码序列操作性地连接。在一些实施方案中,丝多肽核苷酸编码序列可以与另一种内源或异源分泌信号编码序列操作性地连接。在一些实施方案中,丝多肽核苷酸编码序列可以与3X FLAG核苷酸编码序列操作性地连接。在一些实施方案中,丝多肽核苷酸编码序列与其他亲和标记诸如6至8个His残基操作性地连接。

[0101] 在一些实施方案中,重组蜘蛛丝多肽基于源自例如来自物种横纹金蛛的MaSp2的重组蛛丝蛋白片段序列。在一些实施方案中,合成纤维含有包括两个至二十个重复单元的蛋白分子,其中每个重复单元的分子量大于约20kDa。在共聚物的每个重复单元内有超过约60个被组织成许多“准重复单元”的氨基酸残基,通常范围为60至100个氨基酸。在一些实施方案中,本公开中描述的多肽的重复单元与MaSp2拖丝蛋白序列具有至少95%序列同一性。

[0102] 形成具有良好力学性质的蛋白嵌段共聚物的重复单元可使用一部分丝多肽合成。这些多肽重复单元含有富含丙氨酸的区域和富含甘氨酸的区域,且长度为150个氨基酸或更长。可用作本公开的蛋白嵌段共聚物中的重复序列的一些示例性序列提供于共同拥有的PCT公开W0 2015/042164中,其以引用的方式整体并入,且被证实使用毕赤酵母表达系统来表达。

[0103] 在一些实施方案中,蜘蛛丝蛋白包含:出现至少两次的重复单元,所述重复单元包含:多于150个氨基酸残基,且分子量为至少10kDa;具有6个或更多个连续氨基酸的富含丙氨酸的区域,其包含至少80%的丙氨酸含量;具有12个或更多个连续氨基酸的富含甘氨酸的区域,其包含至少40%的甘氨酸含量和小于30%的丙氨酸含量;并且其中所述纤维包含至少一种选自以下组成的组的性质:大于550cN/tex的弹性模量、至少10%的延展性和至少15cN/tex的极限拉伸强度。

[0104] 在一些实施方案中,其中重组蜘蛛丝蛋白包含重复单元,其中每个重复单元与包含2至20个准重复单元的序列具有至少95%序列同一性;每个准重复单元包含{GGY-[GPG-X<sub>1</sub>]<sub>n1</sub>-GPS-(A)<sub>n2</sub>} ,其中对于每个准重复单元;X<sub>1</sub>独立地选自SGGQQ、GAGQQ、GQGOPY、AGQQ和SQ组成的组;且n1为4至8,且n2为6至10。重复单元由多个准重复单元组成。

[0105] 在一些实施方案中,3个“长”准重复单元之后为3个“短”准重复单元。如上文所提及,短准重复单元为其中n1=4或5的那些准重复单元。长准重复单元定义为其中n1=6、7或8的那些准重复单元。在一些实施方案中,所有短准重复体在重复单元的每个准重复单元内的相同位置处具有相同X<sub>1</sub>基序。在一些实施方案中,6个准重复单元中不超过3个具有相同X<sub>1</sub>基序。

[0106] 在额外实施方案中,重复单元由准重复单元组成,所述准重复单元在重复单元内的行中使用相同X<sub>1</sub>不超过两次。在额外实施方案中,重复单元由准重复单元组成,其中至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个准重复单元在重复单元的单个准重复单元中使用相同X<sub>1</sub>不超过2次。

[0107] 在一些实施方案中,重组蜘蛛丝多肽包含多肽序列SEQ ID NO:1(即,18B)。在一些实施方案中,重复单元为包含SEQ ID NO:2的多肽。这些序列提供于表1B中:

[0108] 表1B-重组蛋白和重复单元的示例性多肽序列

SEQ ID	多肽序列
SEQ ID NO: 1	GGYGPAGQQGPGSGGQQGPGGQGPYGSQQGPGAGQQGPGGQGPYGPAAAAAAAG GYGPAGQQGPGAGQQGPGSQGPGGQGPYGPAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGP SAAAAAAAGGYGPGAGQRSQGPGGQGPYGPAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGP SAAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPAAAAAAAVGGYGPAGQ QGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGG QGPYGPSAAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSGGQQGPGGQGPYGSQQGPGGAGQQGPGGQGP YGPAAAAAAAGGYGPGAGQQGPGAGQQGPGSQGPGGQGPYGPAGQQGPGSQGPG SGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAAGGYGPGAGQRSQGPGGQGPYGPAGQQGPGSQGPG SGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPAA AAAAAVGGYGPAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAAGGYGPGAGQQGP GSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSGGQQGPGGQGPYGSQ QPGGAGQQGPGGQGPYGPAAAAAAAGGYGPGAGQQGPGGAGQQGPGSQGPGGQGPY GPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAAGGYGPGAGQRSQGPGGQGPY GPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSQGPGSGG QQGPGGQGPYGPAAAAAAAVGGYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPSAAAA AAAGGYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAA
SEQ ID NO: 2	GGYGPAGQQGPGSGGQQGPGGQGPYGSQQGPGAGQQGPGGQGPYGPAAAAAAAG GYGPAGQQGPGAGQQGPGSQGPGGQGPYGPAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGP SAAAAAAAGGYGPGAGQRSQGPGGQGPYGPAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGP SAAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPAAAAAAAVGGYGPAGQ QGPGSQGPGSGGQQGPGGQGPYGPSAAAAAAAGGYGPGAGQQGPGSQGPGSGGQQGPGG QGPYGPSAAAAAA

[0109] [0110] 在一些实施方案中,由所述重组蜘蛛丝多肽形成的纤维的结构形成β-折叠结构、β-转折结构或α螺旋结构。在一些实施方案中,形成的纤维的二级、三级和四级蛋白结构被描述为具有纳米结晶β-折叠区域、非晶质β-转折区域、非晶质α螺旋区域、嵌入非结晶基质中的随机空间分布的纳米结晶区域或嵌入非结晶基质中的随机取向的纳米结晶区域。虽然不希望受到理论约束,蜘蛛丝内蛋白质的结构性理论上与纤维力学性质相关。纤维中的结晶区域已与纤维的拉伸强度相关,而非晶质区域已与纤维的延伸性相关。主壶腹腺(MA)丝倾向于与鞭毛腺丝相比具有更高的强度和更低的延伸性,且同样MA丝与鞭毛腺丝相比具有更高结晶区域体积分数。此外,基于蜘蛛丝蛋白的结晶和非晶质区域的分子动力学的理论模型支持以下判定,结晶区域已与纤维拉伸强度相关,而非晶质区域已与纤维延伸性相关。另外,理论模型支持二级、三级和四级结构对于RPF的力学性质的重要性。例如,随机、平行及串联空间分布的组装和非晶质区域内缠结链之间和非晶质区域与纳米结晶区域之间的相互作用力的强度都影响所得纤维的理论力学性质。

[0111] 在一些实施方案中,丝蛋白的分子量的范围可为20kDa至2000kDa、或大于20kDa、或大于10kDa、或大于5kDa、或5至400kDa、或5至300kDa、或5至200kDa、或5至100kDa、或5至50kDa、或5至500kDa、或5至1000kDa、或5至2000kDa、或10至400kDa、或10至300kDa、或10至200kDa、或10至100kDa、或10至50kDa、或10至500kDa、或10至1000kDa、或10至2000kDa、或20至400kDa、或20至300kDa、或20至200kDa、或40至300kDa、或40至500kDa、或20至100kDa、或20至50kDa、或20至500kDa、或20至1000kDa、或20至2000kDa。

[0112] 重组蜘蛛丝多肽粉末纯度和降解的表征

[0113] 基于由蛋白形成的二级结构和三级结构的强度和稳定性,不同重组蜘蛛丝多肽具有不同生理化学性质诸如熔化温度和玻璃化转变温度。丝多肽形成单体形式的β折叠结构。在其他单体存在下,丝多肽形成β折叠结构的三维晶格。β折叠结构与多肽序列的非晶质区

域分离且与其穿插。

[0114]  $\beta$ 折叠结构在高温下极端稳定, $\beta$ 折叠的熔化温度为约257°C,如通过快速扫描量热法测量。参见Cebe等人,Beating the Heat-Fast Scanning Melts Silk Beta Sheet Crystals,Nature Scientific Reports3:1130(2013)。由于 $\beta$ 折叠结构被认为在高于丝多肽的玻璃化转变温度下保持完整,所以假设在重组丝多肽的玻璃转变温度下可见的结构转化是由于 $\beta$ 折叠之间的非晶质区域的迁移率增加。

[0115] 增塑剂通过增加非晶质区域的迁移率且潜在破坏 $\beta$ 折叠形成来降低丝蛋白的玻璃化转变温度和熔化温度。出于此目的使用的合适的增塑剂包括但不限于水和多元醇(多元醇类)诸如甘油、三甘油、六甘油和十甘油。其他合适的增塑剂包括但不限于:二甲基异山梨糖醇;二甲氨基丙胺和己二酸的双酰胺;2,2,2-三氟乙醇;二甲氨基丙胺和辛酸/癸酸的酰胺;DEA乙酰胺;及其任何组合。其他合适的增塑剂讨论于Ullsten等人,第5章:Plasticizers for Protein Based Materials Viscoelastic and Viscoplastic Materials(2016)(可通过访问<https://www.intechopen.com/books/viscoelastic-and-viscoplastic-materials/plasticizers-for-protein-based-materials>获得)以及Vierra等人,Natural-based plasticizers and polymer films:A review,European Polymer Journal 47(3):254-63(2011),这些参考文献以引用的方式整体并入本文。

[0116] 由于丝多肽的亲水性部分可结合空气中作为湿度存在的环境水,水将几乎一直存在,结合的环境水可使丝多肽成为可塑。在一些实施方案中,合适的增塑剂可为单独存在或与水或其他增塑剂组合存在的甘油。上文讨论了其他合适的增塑剂。

[0117] 另外,在重组蜘蛛丝多肽通过发酵产生且作为重组蜘蛛丝多肽粉末自其回收的情况下,在重组蜘蛛丝多肽粉末中可能存在用作增塑剂或以其他方式抑制三级结构形成的杂质。例如,残余脂质和糖可充当增塑剂且因此通过干预三级结构的形成来影响蛋白的玻璃化转变温度。

[0118] 各种良好确立的方法可用于评估重组蜘蛛丝多肽粉末或组合物的纯度和相对组成。尺寸排阻色谱法基于分子的相对尺寸分离每个分子且可用于分析全长聚合物和单体形成的重组蜘蛛丝多肽的相对量以及重组蜘蛛丝多肽粉末中高分子量、低分子量和中等分子量杂质的量。类似地,快速高效液相色谱法可用于测量溶液中存在的各种化合物,诸如单体形式的重组蜘蛛丝多肽。离子交换液相色谱法可用于评估各种痕量分子在溶液中的浓度,包括杂质诸如脂质和糖。各种分子的其他色谱和量化方法诸如质谱法为本领域中良好确立的。

[0119] 根据实施方案,重组蜘蛛丝多肽可具有基于呈单体形式的重组蜘蛛丝多肽相对于重组蜘蛛丝多肽粉末的其他组分按重量计的量来计算的纯度。在各种情况下,根据重组蜘蛛丝多肽的类型和用于回收、分离且后加工重组蜘蛛丝多肽粉末的技术,纯度的范围可为50重量%至90重量%。

[0120] 尺寸排阻色谱法和反相高效液相色谱法可用于测量全长重组蜘蛛丝多肽,这使得其成为用于通过比较组合物中的全长蜘蛛丝多肽在加工之前和之后的量来确定加工步骤是否降解重组蜘蛛丝多肽的有用技术。在本发明的各种实施方案中,在处理之前和之后存在于组合物中的全长重组蜘蛛丝多肽的量可经历最小降解。降解量的范围可为0.001重量%至10重量%、或0.01重量%至6重量%,例如小于10重量%或8重量%或6重量%、或小

于5重量%、小于3重量%或小于1重量%。

[0121] 熔体流变学、二级和三级结构

[0122] 流变学通常在纤维纺丝中用于分析纺丝成纤维的材料(诸如聚合物)的物理化学特性。不同流变学特性可影响将材料纺丝成纤维的能力以及纺丝纤维的力学特性。流变学还可用于间接研究在不同压力、温度和条件下通过重组蜘蛛丝多肽和/或增塑剂形成的二级和三级结构。根据实施方案,可使用剪切流变仪和/或拉伸流变仪来通过振荡流变学和拉伸流变学分析不同流变学性质。

[0123] 在一些实施方案中,使用毛细管流变仪表征包含重组蜘蛛丝多肽粉末和增塑剂的组合物的玻璃化转变和/或熔体转变。转化成熔融或可流动状态之前的这些组合物在本文中称为“重组蜘蛛丝组合物”。此外,当重组蜘蛛丝组合物处于熔融或可流动状态时,这些组合物在本文中称为“重组蜘蛛丝熔体组合物”。

[0124] 在一些实施方案中,重组蜘蛛丝组合物的熔体转变和/或玻璃化转变可使用毛细管流变仪通过在不同压力范围和通过增加剪切速率所产生的“斜坡”下挤出重组蜘蛛丝组合物来表征。根据实施方案和实例,斜坡可在大约300m/s至1500m/s下开始。根据实施方案,压力可从1MPa变化至125MPa,常常从6MPa变化至50MPa。

[0125] 在一些实施方案中,使用差示扫描量热法确定重组蜘蛛丝多肽和/或含有所述重组蜘蛛丝多肽的纤维的玻璃化转变和/或熔化转变温度。在具体实施方案中,使用调节的差示扫描量热法测量玻璃化转变和/或熔化转变温度。

[0126] 根据重组蜘蛛丝多肽的实施方案和类型,玻璃化转变和/或熔化转变温度可具有各种值范围。然而,测量的玻璃化转变和/或熔化转变温度远低于通常对于呈固体形式的重组蜘蛛丝多肽观测到的温度,这可指示杂质或其他增塑剂的存在。

[0127] 另外,傅里叶变换红外 (FTIR) 光谱术数据可与流变学数据组合以提供重组丝粉末和/或含有所述重组丝粉末的组合物中的三级结构的直接表征。FTIR可用于定量丝多肽和/或包含丝多肽的组合物中的二级结构,如下文题为“傅里叶变换红外 (FTIR) 光谱术”之部分中所讨论。

[0128] 根据所述实施方案,FTIR可用于定量存在于重组蜘蛛丝多肽粉末和/或含有所述重组蜘蛛丝多肽粉末的组合物中的 $\beta$ 折叠结构。另外,在一些实施方案中,FTIR可用于定量存在于重组蜘蛛丝多肽粉末中的杂质诸如糖和脂质。然而,不同蛋白预加工方法中所用的各种离液剂和增溶剂可减少重组蜘蛛丝多肽粉末或含有所述重组蜘蛛丝多肽粉末的组合物中的三级结构的数目。因此,在将重组蜘蛛丝多肽粉末模制或纺丝成纤维之前和之后,重组蜘蛛丝多肽粉末中的 $\beta$ 折叠结构的量之间可无对应性。类似地,在将其模制或纺丝成纤维之前和之后,粉末的玻璃化转变温度之间几乎无对应性。

[0129] 在一些实施方案中,表征重组蜘蛛丝多肽的流变学数据可与FTIR组合来分析多肽中形成的二级和三级结构。在具体实施方案中,流变学数据可结合FTIR光谱来捕获。将流变学和FTIR组合的示例性方法,参见Boulet-Audet等人,Silk protein aggregation kinetics revealed by Rheo-IR,Acta Biomaterialia 10:776-784(2014),其以引用的方式整体并入本文。

[0130] 傅里叶变换红外 (FTIR) 光谱可用于评估存在于多肽粉末和/或纤维中的蛋白的三级结构。具体地,FTIR光谱可用于确定存在于纤维中的 $\beta$ 折叠的量,所述纤维经历不同纺丝

和后加工条件。因此,FTIR光谱可用于基于不同技术确定 $\beta$ 折叠结构的相对量。或者,FTIR光谱可与天然昆虫丝相比较。

[0131] 根据实施方案,在不同波数下的FTIR光谱可用于评估存在于纤维中的不同三级结构。在各种实施方案中,对应于酰胺I和酰胺II条带的波数可用于评估各种蛋白结构,诸如转折、 $\beta$ 折叠、 $\alpha$ 螺旋和侧链。对应于所述结构的波数为本领域中众所周知的。

[0132] 在大部分实施方案中,在对应于 $\beta$ 折叠的波数下的FTIR光谱将用于评估多肽粉末和/或纤维中的 $\beta$ 折叠结构的量。在具体实施方案中,在 $982-949\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ 摇摆振动(A)<sub>n</sub>)、 $1695-1690\text{cm}^{-1}$  (酰胺I)、 $1620-1625\text{cm}^{-1}$  (酰胺I)、 $1440-1445\text{cm}^{-1}$  (不对称 $\text{CH}_3$ 弯曲)和/或 $1508\text{cm}^{-1}$  (酰胺II)下的FTIR光谱用于确定所存在的 $\beta$ 折叠的量。根据实施方案,可测量不同波数和范围以确定所存在的 $\beta$ 折叠的量。在一些实施方案中,使用在 $982-949\text{cm}^{-1}$ 下的FTIR光谱以便消除来自对应峰的干扰。获得所述波数下的光谱的示例性方法详细讨论于Boudet-Audet等人, *Identification and classification of silks using infrared spectroscopy*, *Journal of Experimental Biology*, 218:3138-3149 (2015), 其整体以引用的方式并入本文。

[0133] 类似地,各种表征重组丝粉末中的杂质的方法可与流变学和/或FTIR数据组合,以分析杂质的存在与二级结构和/或三级结构的形成之间的关系。

[0134] 重组蜘蛛丝熔体组合物

[0135] 本发明的目标在于根据本文所述的方法制成能够转化成熔化或可流动状态(即,能够转化成重组蜘蛛丝熔体组合物)的各种重组蜘蛛丝组合物。在各种实施方案中,组合物中重组蜘蛛丝多肽粉末和增塑剂的浓度可基于重组蜘蛛丝多肽粉末的性质(例如,重组蜘蛛丝多肽粉末的纯度)、所用增塑剂的类型和所需的纤维性质来改变。在一些实施方案中,浓度可基于流变学数据诸如来自毛细管流变仪的数据来调节。

[0136] 在一些实施方案中,使用熔体流动指数来确定重组蜘蛛丝熔体组合物是否能够被拉伸成纤维。具体地,可使用熔体流动指数来测量重组蜘蛛丝熔体组合物的‘熔体强度’或在挤出重组蜘蛛丝熔体组合物时对其进行拉伸的能力。在各种实施方案中,重组蜘蛛丝多肽和增塑剂的浓度可基于所需熔体强度而有所变化。

[0137] 在一些实施方案中,可向重组蜘蛛丝组合物中加入各种剂来改变重组蜘蛛丝组合物的流变学特性,诸如伸长粘度、剪切粘度和线性粘弹性。用于改变伸长粘度的合适的剂包括聚乙二醇(PEG)、Tween(聚山梨醇酯)、十二烷基硫酸钠、聚乙烯或其任何组合。其他合适的剂为本领域中众所周知的。

[0138] 在一些实施方案中,可加入第二聚合物以与重组蜘蛛丝组合物产生聚合物共混物或双成分纤维。在这些情况下,可能有用的是包含以下第二聚合物,其熔融温度使其适于与重组蜘蛛丝组合物本身先后熔融而不使重组蜘蛛丝多肽的无定形区域降解。在各种实施方案中,适于与重组蜘蛛丝多肽共混的聚合物的熔融温度( $T_m$ )应低于 $200^\circ\text{C}$ 、 $180^\circ\text{C}$ 、 $160^\circ\text{C}$ 、 $140^\circ\text{C}$ 、 $120^\circ\text{C}$ 或 $100^\circ\text{C}$ 。常常,重组蜘蛛丝多肽的熔融温度应高于 $20^\circ\text{C}$ 或 $25^\circ\text{C}$ 或 $50^\circ\text{C}$ 。下表中包括了示例性聚合物和熔融温度的非限制性列表。

[0139] 表1C-聚合物

聚合物	Tm °C
LLDPE, 线性低密度聚乙烯	120-130
LDPE, 低密度聚乙烯	105-120
MDPE, 中密度聚乙烯	120-180
HDPE, 高密度聚乙烯	130+
PP, 聚丙烯	130+
PLA, 聚乳酸	125-175
[0140] EVA, 乙烯乙酸乙酯	70-85
PBAT, 聚(己二酸丁二酯-共-对苯二甲酸酯)	110-120
PBSA, 聚琥珀酸己二酸丁二酯(Polybutylene Succinate Adipate)	116
PBS, 聚琥珀酸丁二酯	84-115
DuPont™ 离聚物(例如 Surlyn® 离聚物)	80-100
EPE, 发泡聚乙烯	126
PC, 聚碳酸酯	155
PCL, 聚己内酯	60

[0141] 根据实施方案,重组蜘蛛丝组合物中重组蜘蛛丝多肽粉末按重量计的合适浓度的范围为:1至90重量%、3至80重量%、5至70重量%、10至60重量%、15至50重量%、18至45重量%或20至41重量%。

[0142] 在将甘油用作增塑剂的情况下,重组蜘蛛丝组合物中甘油按重量计的合适浓度的范围为:1至60重量%、10至60重量%、10至50重量%、10至40重量%、15至40重量%、10至30重量%或15至30重量%。

[0143] 在将水用作增塑剂的情况下,重组蜘蛛丝组合物中水按重量计的合适的浓度的范围为:5至80重量%、15至70重量%、20至60重量%、25至50重量%、19至43重量%或19至27重量%。在将水与另一种增塑剂组合使用时,其可存在的范围为5至50重量%、15至43重量%或19至27重量%。

[0144] 在一些实施方案中,水可根据所使用的处理和/或模头尺寸在挤出机和/或冷却过程期间蒸发。在一些实施方案中,基于总水量,模制后的失水量的范围可为1至50重量%、3至40重量%、5至30重量%、7至20重量%、8至18重量%或10至15重量%。通常损失将小于15%,在一些情况下小于10%,例如1至10重量%。蒸发可为故意的或由于所施加的处理。蒸发程度可容易例如通过选择操作温度、流速和所施加的压力来控制,如本领域中理解的。

[0145] 在一些实施方案中,合适的增塑剂可包括多元醇(例如,甘油)、水、乳酸、甲基过氧化氢、抗坏血酸、1,4-二羟基苯(1,4-苯二酚)苯-1,4-二酚、磷酸、乙二醇、丙二醇、三乙醇胺、酸性乙酸酯(acid acetate)、丙-1,3-二醇或其任何组合。

[0146] 在各种实施方案中,增塑剂的量可根据重组蜘蛛丝多肽粉末的纯度和相对组成而有所变化。例如,较高纯度粉末可具有较少杂质,诸如可用作增塑剂的低分子量化合物,且因此要求添加更高重量百分比的增塑剂。

[0147] 在具体实施方案中,增塑剂(例如,甘油和水的组合)与重组蜘蛛丝多肽粉末的各种比率(重量比)的范围可为0.5或0.75至350重量%的增塑剂:重组蜘蛛丝多肽粉末、1或5至300重量%的增塑剂:重组蜘蛛丝多肽粉末、10至300重量%的增塑剂:重组蜘蛛丝多肽粉

末、30至250重量%的增塑剂:重组蜘蛛丝多肽粉末、50至220重量%的增塑剂:重组蜘蛛丝蛋白、70至200重量%增塑剂:重组蜘蛛丝多肽粉末或90至180重量%增塑剂:重组蜘蛛丝多肽粉末。如本文所用,对0.5至350重量%的增塑剂:重组蜘蛛丝多肽粉末的提及对应于比率0.5:1至350:1。

[0148] 不意图受理论限制,在本发明的各种实施方案中,诱导重组蜘蛛丝组合物转变成可流动状态(例如,诱导重组蜘蛛丝熔体组合物)在包括单体形式的重组蜘蛛丝多肽为有利的情况下可用作任何制剂中的预加工步骤。更具体地,诱导重组蜘蛛丝熔体组合物可在期望预防单体重组蜘蛛丝多肽聚集成其结晶聚合形式或期望在加工后期阶段控制重组蜘蛛丝多肽转变成其结晶聚合物形式的应用中使用。在一个具体实施方案中,可使用重组蜘蛛丝熔体组合物来防止重组蜘蛛丝多肽在将重组蜘蛛丝多肽与第二聚合物共混之前聚集。在另一具体实施方案中,可使用重组蜘蛛丝熔体组合物来产生化妆品或护肤产品的基料,在所述产品中,重组蜘蛛丝多肽以单体形式存在于基料中。在这个实施方案中,基料中具有以单体形式的重组蜘蛛丝多肽允许在与皮肤接触时或通过其他各种化学反应,单体可控聚集成其结晶聚合形式。

[0149] 诱导熔体或可流动状态

[0150] 根据本发明的一些实施方案,重组蜘蛛丝组合物透过施加剪力和/或压力(通常为两者)转化成熔化或可流动状态。用于生成剪力和压力的组合的合适装置包括但不限于:单螺杆挤出机、双螺杆挤出机、熔体流挤出机和毛细管流变仪。

[0151] 在一些实施方案中,使用双螺杆挤出机来提供必需压力和剪力以将重组蜘蛛丝组合物转化成熔化或可流动组合物。在一些实施方案中,双螺杆挤出机被配置成提供以下范围的剪力:1.5牛顿米(Nm)至13牛顿米、2牛顿米至10牛顿米、2牛顿米至8牛顿米或2牛顿米至6牛顿米。在一些实施方案中,由双螺杆挤出机提供的剪力部分取决于双螺杆挤出机的每分钟转数。在各种实施方案和配置中,双螺杆挤出机的每分钟转数(RPM)的范围可为10RPM至300RPM。在各种实施方案中,双螺杆挤出机被配置成提供范围为1MPa至300MPa的压力以及剪力。

[0152] 在任选的实施方案中,双螺杆挤出机被配置成在将重组蜘蛛丝组合物转化成重组蜘蛛丝熔体组合物之前和/或之后将热施加至重组蜘蛛丝组合物。在一些实施方案中,双螺杆挤出机的筒(即,双螺杆将组合物混合的圆筒)经历加热。在其他实施方案中,双螺杆挤出机的邻近喷丝头(即,挤出重组蜘蛛丝熔体组合物所通过的喷丝孔)的部分经历加热。替代地,不施加热,熔体/可流动状态整体透过双螺杆挤出机中由施加至重组蜘蛛丝组合物的剪切力所生成的热诱导。例如,在一些实施方案中,获得熔体/可流动状态所施加的热量的量将类似于等于周围室温(例如,约大于20°C)。

[0153] 在各种实施方案中,将使加热重组蜘蛛丝熔体组合物的温度最小化,以便最小化或完整预防重组蜘蛛丝多肽的降解。在具体实施方案中,将重组蜘蛛丝熔体加热至低于120°C、低于100°C、低于80°C、低于60°C、低于40°C或低于20°C的温度。在加工期间,熔体的温度常常在10°C至120°C、10°C至100°C、15°C至80°C、15°C至60°C、18°C至40°C或20±2°C的范围内。

[0154] 在其他实施方案中,其他装置可用于提供将重组蜘蛛丝组合物转化成熔化或可流动状态所必需的压力和剪力。如上文所讨论,还可使用毛细管流变仪来提供将重组蜘蛛丝

组合物转化成可流动或熔化状态所必需的剪力和压力。

[0155] 在一些实施方案中,在重组蜘蛛丝组合物呈熔化或可流动状态之后和/或在挤出熔化或可流动重组蜘蛛丝熔体组合物之前,任选地加热重组蜘蛛丝组合物。在需要加热时,可能因为重组蜘蛛丝组合物具有高玻璃化转变温度,所以用于提供剪力和压力以将重组蜘蛛丝组合物转化成熔化或可流动状态之的装置可直接或间接偶接至加热的挤出装置。在具体实施方案中,双螺杆挤出机被偶接(直接或间接)至加热的挤出装置。根据加热的挤出装置的实施方案和配置,加热的挤出装置可维持在以下范围的温度下:20至120℃、80至110℃、85至100℃、85至95℃和/或90至95℃。

[0156] 挤出的重组蜘蛛丝熔体组合物在本文中称为“重组蜘蛛丝挤出物”。根据重组蜘蛛丝挤出物的应用,挤出挤出物的喷丝头的直径可有所变化。例如,在将重组蜘蛛丝挤出物挤出到模具中以形成模制品的实施方案中,喷丝头的直径可大于200mm、大于150mm、大于100mm、大于50mm,例如范围为100mm至500mm、150mm至400mm或200mm至300mm。如下文所述,在一些实施方案中,重组蜘蛛丝挤出物可被加工成粒料,所述粒料可通过使所述粒料再次经历足以将蜘蛛丝挤出物转化成重组蜘蛛丝熔体组合物的剪力和压力来重新加工。在重组蜘蛛丝挤出物被加工成粒料的实施方案中,喷丝头的直径可大于2mm、大于1.5mm或大于1mm,例如直径的范围可为1mm至5mm、1.5mm至4mm或2mm至3mm。

[0157] 在将重组蜘蛛丝挤出物制成纤维的实施方案中,喷丝头可具有小于500 $\mu\text{m}$ (例如在10 $\mu\text{m}$ 至500 $\mu\text{m}$ 的范围内)的喷丝孔。根据挤出纤维的所需初始旦尼尔,可通过具有不同喷丝孔大小的喷丝头挤出重组蜘蛛丝蛋白熔体组合物。在具体实施方案中,喷丝孔的范围可为25 $\mu\text{m}$ 至500 $\mu\text{m}$ 、50 $\mu\text{m}$ 至250 $\mu\text{m}$ 或75 $\mu\text{m}$ 至125 $\mu\text{m}$ 。在一些实施方案中,理想的喷丝孔大小应基于纤维的最终拉伸比。例如,较高初始旦尼尔的挤出纤维可经历较高拉伸比。

[0158] 在本发明的大部分实施方案中,重组蜘蛛丝熔体组合物和重组蜘蛛丝挤出物将为大致上均匀的,意指如通过光学显微镜所检查,材料不具有任何包含物或沉淀物。在一些实施方案中,可使用光学显微镜来测量双折射率,其可用作将重组蜘蛛丝对齐到三维晶格中的替代物。双折射率为折射率取决于光的偏振和传播的材料的光学性质。具体地,如通过双折射率测量的高轴向有序度可与高拉伸强度相关。在一些实施方案中,重组蜘蛛丝熔体挤出物将具有最小双折射率。

[0159] 根据本发明,均匀的可流动状态可透过仅施加剪力和压力来诱导,但是任选地可施加热。在未施加热或在任选的热度的情况下,已发现单独剪力和压力的组合提供在重组蜘蛛丝熔体组合物和重组蜘蛛丝挤出物中的重组蜘蛛丝多肽的加工期间并未降解的组合物。这是期望且有利的,因为在挤出物组合物中保留全长重组蜘蛛丝多肽产生最优化材料性质,诸如结晶度,从而产生更高品质产品。在本发明的实施方案中,自施加剪力和压力(以及视情况地热)实现的重组蜘蛛丝熔体挤出物具有最小或可忽略的降解。

[0160] 重组蜘蛛丝多肽的降解量可使用各种技术测量。如上文所讨论,重组蜘蛛丝多肽的降解量可使用尺寸排阻色谱法测量以测量所存在的全长重组蜘蛛丝多肽的量。在各种实施方案中,在组合物形成为模制品之后,组合物以小于6.0重量%的量降解。在另一实施方案中,在模制之后,组合物以小于4.0重量%、小于3.0重量%、小于2.0重量%或小于1.0重量%的量降解(使得降解量的范围可为0.001重量%至10重量%、8重量%、6重量%、4重量%、3重量%、2重量%、或1重量%,或0.01重量%至6重量%、4重量%、3重量%、2重量%

或1重量%)。在另一实施方案中,挤出物和/或熔体组合物中的重组蜘蛛丝蛋白大致上不降解。

#### [0161] 拉伸纤维

[0162] 在挤出物用于纤维形成的情况下,可以拉伸前体纤维以增加纤维的取向并促进三维结晶结构。在拉伸中施加力促进分子在纤维轴线上的对齐。当强制流动通过喷丝头孔时,聚合物分子(诸如多肽)是部分对齐的。可对纤维进行手工拉伸或机器拉伸。手工拉伸常常提供双折射率低且纤维直径减小最小的良好对齐纤维。

[0163] 在本发明中,可通过在拉伸纤维的同时使前体纤维在均匀的热表面上通过来使对齐最优化。如本文所用,术语“热表面”是指提供大致上均匀的热和大致上均匀的表面的表面。使用热表面作为热源消除了使用环境热源所看到的变化性,导致结果的较大均匀性以及因此用于商业上大量生产纤维的工艺的可扩大性。在一些实施方案中,热表面将为金属棒或其他金属表面。在其他实施方案中,热表面可由陶瓷或其他材料制成。根据实施方案,热表面可被弯曲或以其他方式被配置成有利于纤维在热表面上移动。

[0164] 在本发明的实施方案中,未拉伸的挤出纤维可在其拉伸的同时在热表面上移动。根据实施方案,热表面的温度的范围可为160至210°C、180至210°C、190至210°C、195至210°C、195至205°C或200至205°C。

[0165] 根据实施方案,未拉伸的挤出纤维可在其热表面上拉伸的同时经历不同的拉伸比。根据实施方案,拉伸比的范围可为2至7。在一些实施方案中,最大稳定拉伸比可取决于热表面的温度。

[0166] 在一些实施方案中,将热表面的温度计算为未拉伸的挤出纤维的玻璃化转变温度的函数。例如,热表面的温度可计算为比重组丝蛋白粉末和/或未拉伸的挤出纤维的玻璃化转变温度高高于5°C、10°C、15°C、20°C或25°C。换句话讲,在比重组丝蛋白粉末的玻璃化转变温度高0或0.1°C至25°C的范围内,经常在高0至10°C、15°C、20°C的范围内。

[0167] 根据实施方案以及纤维在均匀热表面上通过的速率(在本文中称为“卷轴速率(reel rate)”),热表面的长度可不同(即,在其上拉伸纤维的热表面的以cm为单位的大小),因此改变了未拉伸的挤出纤维经历热和变形的持续时间。在大多数实施方案中,热棒的宽度不小于1cm。然而,在各种实施方案中,热表面的宽度的范围可为1至50cm、1至2cm、1至3cm、1至5cm、5至38cm、38至50cm。根据实施方案,卷轴速率的范围可为每分钟1至60分钟。

[0168] 根据卷轴速率和热表面的长度,在热表面上的总停留时间可有所不同。在大多数实施方案中,总停留时间的范围可为0.2秒至3秒。

[0169] 此外,未拉伸的纤维可经历不同的力,所述力提供了不同的拉伸比。在大多数实施方案中,张力将由导丝辊提供。在一些实施方案中,将放置导丝辊,以使得在热表面上通过的纤维相对于热表面成角度。例如,在热表面为弯曲的情况下,可放置导丝辊,以使得在热表面上通过的纤维相对于热表面成10至40度的角度。

[0170] 在各种实施方案中,未拉伸的纤维的变形速率(即,纤维因热和拉伸而经历变形的量)可基于以上因素而有所变化。变形速率可以基于未拉伸的纤维进料至热表面的速率和从热表面收集纤维的速率来计算。例如,纤维可以在1米/分钟的速率下进料至热表面并且在5米/分钟的速率下从热表面收集。在具体实施方案中,使用以下等式计算变形速率,在所述等式中,纤维进料至热表面的速率表示为 $v_1$ ,从热表面收集纤维的速率为 $v_2$ ,并且变形发

生的长度为 $L_0$ :

[0171] 等式1:

$$[0172] \quad \dot{\epsilon}(t) = \frac{v_2 - v_1}{L_0}$$

[0173] 根据实施方案,在热表面上拉伸可以一个步骤或多个(即两个、三个或四个)步骤进行。在每个步骤,参数,诸如应变速率、变形速率、卷轴速率、热表面的温度和热表面的长度,可改变或以其他方式不同。在多个步骤上进行拉伸可影响纤维的总体应变速率,其可增强结晶 $\beta$ -折叠结构的形成,经常改善纤维强度。

[0174] 后加工纤维

[0175] 可采用各种后加工方法以改善纤维的分子对齐。根据纤维中存在的增塑剂和/或重组蜘蛛丝的量,可对纤维进行热处理(例如,使用水蒸气或热退火)。在其他情况下,可用各种溶剂处理纤维以对纤维进行退火并改善纤维中蛋白(例如18B蛋白)的结晶度。在一些情况下,可使用醇(诸如甲醇)对纤维进行退火。在具体实施方案中,可使用醇蒸气来对纤维进行退火。

[0176] 在一些情况下,在用水处理纤维之前,用一种或多种调理剂、润滑剂、表面活性剂、乳化剂、抗胶粘剂或退火剂处理纤维或纺织物将在用水进行处理之后改变纺织物的手感或悬垂性。在具体实施方案中,将环戊硅氧烷或PDMS用作调理剂。在具体实施方案中,用醇对纤维或由纤维形成的纺织物进行退火改善水处理的纤维或纺织物的手感和悬垂性。

[0177] 重新熔融和重新挤出挤出物

[0178] 在本发明的一些实施方案中,用于制备重组蜘蛛丝挤出物的方法可还包括重新加工包含重组蜘蛛丝挤出物的模制品(例如,由重组蜘蛛丝挤出物形成的粒料、纤维或其他模制品)。在这些实施方案中,重组蜘蛛丝挤出物经历足以使重组蜘蛛丝挤出物转化成熔融或可流动状态的剪切力和压力。

[0179] 不意图受理论限制,在诸如甘油的增塑剂的存在下使重组蜘蛛丝多肽经历剪切力和压力使重组蜘蛛丝多肽变成其中重组蜘蛛丝多肽展开且与甘油形成相互作用的“开放形式重组蜘蛛丝多肽”。由于与甘油的相互作用,这种“开放形式重组蜘蛛丝多肽”形成较少的分子间和分子内 $\beta$ -折叠相互作用。具体地,防止了开放形式重组蜘蛛丝多肽形成分子间相互作用以形成不可逆的三维晶格。

[0180] 因为在熔融和挤出过程期间重组蜘蛛丝多肽具有最小的降解(如果有的话),所以可以将重组蜘蛛丝挤出物转化回重组蜘蛛丝熔体组合物中并重新挤出任何次数。从这个意义上讲,组合物是“热塑性的”,因为它可以被加热、冷却和硬化许多次而无蛋白或组合物的显著降解。在各种实施方案中,重组蜘蛛丝挤出物可以被重新熔融和重新挤出至少20次、至少10次或至少5次。在这些实施方案中,在多个重新熔融和重新挤出步骤中所见的降解可以低至10%。重新挤出而无降解的选择允许生产大致上均匀的组合物,并且还允许重新规划或重新设计由所述组合物形成的产品。例如,可以对品质不佳的模制品进行重新挤出和重新模制。寿命终结产品回收也是可能的。

[0181] 实施例

[0182] 实施例1:重组18B多肽粉末的纯度

[0183] 通过各种批次大规模发酵产生重组蜘蛛丝,即包含FLAG标签的18B多肽序列(SEQ

ID NO:1),回收且干燥成粉末(“18B粉末”)。使用反相高效液相色谱法(“RP-HPLC”)测量粉末中18B多肽单体按重量计的量。使用5M硫氰酸胍(GdSCN)试剂溶解样品且将其注入到Agilent Poroshell 300SB C3 2.1x75mm 5 $\mu$ m管柱中以基于疏水性分离各成分。检测模态为肽键在215nm下的UV吸光度(360nm参考)。18B-FLAG单体的样品浓度通过与18B-FLAG粉末标准物相比较来确定,所述18B-FLAG单体浓度先前已使用尺寸排阻色谱法(SEC-HPLC)测量

[0184] 发现样品粉末包括57.964质量%的18B单体。

[0185] 实施例2:生成重组丝粉末挤出物

[0186] 使用家用香料研磨器混合实施例1的重组丝粉末。将一定比率的水和甘油添加到重组丝粉末(“18B粉末”)中,以生成具有不同的蛋白粉末与增塑剂之比的重组蜘蛛丝组合物,如下表2中列出。

[0187] 使用Xceptional Instruments双螺杆挤出机(TSE)(项目编号TT-ZE5-MSMS-3HT)混合下表2中列出的多批10至100克重组蜘蛛丝组合物(即“制剂”),所述双螺杆挤出机用于所有TSE实验。不锈钢(S316)挤出机筒具有3个各自长度为约5cm的加热区。所用螺杆为长度为180mm且直径为9mm的一对标准不锈钢(S316)共旋转螺杆且(L/D比率为20:1)。螺杆的螺距为9mm。

[0188] 对于下文所列出的P25W05G70、P49W21G30和P65W20G15制剂,首先将重组蜘蛛丝组合物挤出成粒料,在以下实验中通过重新挤出所述粒料来重新加工所述粒料。为了制成粒料,使用金属漏斗将包含18B/水/甘油混合物的重组蜘蛛丝组合物引入到TSE中并使用捣固装置推动其与双螺杆连续接触若干分钟,同时在300RPM下以约90 $^{\circ}$ C至95 $^{\circ}$ C的温度跨越所有三个筒区域(包括起始筒区域、中间筒区域和最后筒区域)运行TSE。通过0.5mm模头挤出在熔化状态下(即,作为重组蜘蛛丝熔体组合物)的材料,所述模头的喷丝孔与螺杆轴成180 $^{\circ}$ 角以形成重组蜘蛛丝挤出物。

[0189] 0.5mm重组蜘蛛丝挤出物以长度约>10米的连续弹性“面条”形式自模头出现。通过将5至10g量的对应挤出物组合物置于厨房香料研磨器中且使其经历5秒脉冲达总计6次脉冲(总计30秒)来生成粒料。检查所述粒料以确保其长度不超过5mm,其中粒料的平均长度为约2.5mm。

[0190] 对于下文列出的P71W19G10制剂,在实施例2中所述的条件下预先混合18B/水/甘油重组蜘蛛丝混合物(即,未首先挤出为粒料),以形成重组蜘蛛丝挤出物。

[0191] 表2-按重量计的重组蜘蛛丝制剂组合物

[0192]

制剂	18B粉末重量%	水重量%	甘油重量%
P25W05G70	25%	5%	70%
P49W21G30	49%	21%	30%
P65W20G15	65%	20%	15%
P71W19G10	71%	19%	10%

[0193] 实施例3:生成具有微量降解的重组丝挤出物

[0194] 为了评估在多种不同条件下的降解,使实施例2中所列出的重组蜘蛛丝制剂在挤出期间经历各种温度且经历各种量的压力和剪力。具体地,改变双螺杆挤出粒料的每分钟转数以提供可变量的扭矩和剪力。下文包括用于将重组蜘蛛丝制剂转化成熔体状态且挤出不同样品的各种温度和RPM组合。

[0195] 使表1中列出的P49W21G30和P65W20G15制剂的挤出粒料再次经历在各种RPM和温度下使用Xceptional Instruments TSE进行的挤出。用于操作Xceptional Instruments TSE的其他参数与上文关于实施例2所述的参数相同。

[0196] 如实施例2所述,还在各种RPM和温度下使用Xceptional Instruments TSE挤出P71W19G10制剂。用于操作Xceptional Instruments TSE的其他参数与上文关于实施例2所述的参数相同。

[0197] 使用尺寸排阻色谱法 (SEC) 如下收集表征相对量的高分子量、低分子量和中等分子量杂质、单体18B和聚集物18B的数据:将18B粉末溶解于5M硫氰酸胍中且将其注入到Yarra SEC-3000SEC-HPLC管柱中以基于分子量分离各成分。使用折射率作为检测模态。定量18B聚集物、18B单体、低分子量(1-8kDa)杂质、中等分子量杂质(8-50kDa)和高分子量杂质(110-150kDa)。将相关组成报告为质量%和面积%。使用BSA作为普通蛋白标准物,假设所有蛋白的>90%证实在彼此约7%内的 $dn/dc$ 值(折射率的响应因子)。使用聚(环氧乙烷)作为保留时间标准物,且使用BSA校准物作为检查标准物以确保所述方法的一致性能。

[0198] 下表3至5列出在各种RPM和温度下产生的挤出物的各种SEC分析。第五管柱包括在起始粒料和挤出物(P49W21G30和P65W20G15)中报告的18B单体的差异(面积%)和在起始粉末和挤出物(P71W19G10)中报告的18B单体的差异(面积%)。图1至3详细描述于下文中且包括分别对应于表3至5的图表。由所述情况可以看出,在测试的所有温度和RPM下降解最小,指示加工条件的灵活性和对使用挤出方法进行加工的一般稳健性。

[0199] 表3-对于P49W21G30的SEC分析

[0200]

样品 ID	温度	RPM	18B 单体%	起始粒料与样品的18B单体%之间的差异	高 MW	中等 MW	低 MW
P49W21G30-1	20℃	10	48.4	10.91	1.55	33.17	10.88
P49W21G30-2	20℃	100	42.53	16.78	1.81	35.82	14.14
P49W21G30-3	20℃	200	47.77	11.54	3.55	31.28	10.73
P49W21G30-4	20℃	300	43.52	15.79	1.46	35.46	14.75
P49W21G30-5	40℃	10	54.78	4.53	4.69	27.53	4.2
P49W21G30-6	40℃	100	56.87	2.44	4.82	26.18	3.07
P49W21G30-7	40℃	200	53.65	5.66	4.11	27.83	6
P49W21G30-8	40℃	300	55.15	4.16	4.70	26.75	5.66
P49W21G30-9	60℃	10	52.06	7.25	4.32	28.68	7.08
P49W21G30-10	60℃	100	54.46	4.85	4.27	28.65	4.93
P49W21G30-11	60℃	200	55.74	3.57	4.31	27.61	4.18
P49W21G30-12	60℃	300	54.21	5.1	3.71	28.56	4.72
P49W21G30-13	80℃	10	53.78	5.53	3.73	29.2	5.19
P49W21G30-14	80℃	100	55.97	3.34	3.53	26.32	6.36
P49W21G30-15	80℃	200	53.94	5.37	3.77	28.69	5.58
P49W21G30-16	80℃	300	54.02	5.29	3.50	27.65	6.99
P49W21G30-17	95℃	10	45.16	14.15	3.58	34.9	8.18
P49W21G30-18	95℃	100	55.76	3.55	2.25	28.98	5.4
P49W21G30-19	95℃	200	50.2	9.11	2.17	30.64	10.53
P49W21G30-20	95℃	300	46.31	13	2.72	32.65	11.55
P49W21G30-21	120℃	10	53.91	5.4	3.68	28.35	5.88
P49W21G30-22	120℃	100	52.11	7.2	3.97	31.65	6.19
P49W21G30-23	120℃	200	48.85	10.46	2.89	31.83	10.15
P49W21G30-24	120℃	300	51.09	8.22	3.51	31.37	7.8

[0201]

表4-对于P65W20G15的SEC分析

[0202]

样品 ID	温度	RPM	18B 单体%	样品与起始粒料的18B单体%之间的差异	高 MW	中等 MW	低 MW

[0203]	P65W20G15-1	20℃	10	53.58	5.73	3.368	30.29	4.23
	P65W20G15-2	20℃	100	53.76	5.55	3.514	28.89	6.17
	P65W20G15-3	20℃	200	53	6.31	3.272	30.55	5.3
	P65W20G15-4	20℃	300	52.62	6.69	3.558	30.28	5.63
	P65W20G15-5	40℃	10	54.35	4.96	3.186	30.3	4.88
	P65W20G15-6	40℃	100	53.68	5.63	4.279	27.96	4.32
	P65W20G15-7	40℃	200	54.13	5.18	3.462	28.44	5.48
	P65W20G15-8	40℃	300	52.01	7.3	3.933	30.01	6.11
	P65W20G15-9	60℃	10	55.78	3.53	3.332	27.92	5.03
	P65W20G15-10	60℃	100	58.05	1.26	3.814	26.08	3.55
	P65W20G15-11	60℃	200	57.47	1.84	3.308	27.06	4.25
	P65W20G15-12	60℃	300	58.55	0.76	2.874	26.54	3.9
	P65W20G15-13	95℃	10	52.02	7.29	2.47	29.51	8.32
	P65W20G15-14	95℃	100	49.92	9.39	2.48	29.3	11.24
	P65W20G15-15	95℃	200	44.02	15.29	1.96	32.37	15
	P65W20G15-16	95℃	300	51.31	8	1.84	31.52	8.22
	P65W20G15-17	140℃	10	50.49	8.82	5.53	28.04	4.6
	P65W20G15-18	140℃	100	59.4	-0.09	3.241	24.7	3.4
	P65W20G15-19	140℃	200	54.96	4.35	4.245	27.17	3.78
	P65W20G15-20	140℃	300	54.85	4.46	4.353	26.14	5.12

[0204] 表5-对于P71W19G10的SEC分析

样品 ID	温度	RPM	18B 单体%	样品与起始粉末的18B 单体%之间的差异	高 MW	中等 MW	低 MW	
[0205]	P71W19G10-1	90℃	10	48.61	10.7	2.90	29.95	11.01
	P71W19G10-2	90℃	100	55.17	4.14	2.47	28.87	5.64
	P71W19G10.5-3	90℃	200	42.27	17.04	3.44	34.84	11.89
	P71W19G10-4	90℃	300	31.41	27.9	4.02	39.24	17.53
	P71W19G10-5	120℃	10	37.23	22.08	4.32	38.32	7.73
	P71W19G10-6	120℃	100	33.1	26.21	5.42	38.23	8.74
	P71W19G10-7	120℃	200	32.61	26.7	5.01	38.46	11.38
	P71W19G10-8	120℃	300	49.58	9.73	2.20	32.5	8.72

[0206] 图1示出在20℃、40℃、60℃、80℃、95℃或120℃的挤出条件下以上表3中所列出的P49W21G30样品的SEC数据,其中使用10、100、200或300RPM的操作参数获得各温度的挤出物。18B单体(黑色条)、中等分子量杂质(灰色条)和低分子量杂质(交叉阴影线条)示出为面积%。

[0207] 图2示出在20℃、40℃、60℃、95℃或140℃的挤出条件下以上表4中所列出的P65W20G15样品的SEC数据,其中使用10、100、200或300RPM的操作参数获得各温度的挤出物。18B单体(黑色条)、中等分子量杂质(灰色条)和低分子量杂质(交叉阴影线条)示出为面

积%。

[0208] 图3示出在90℃或120℃的挤出条件下以上表5中所列出的P71W19G10样品的SEC数据,其中使用10、100、200或300RPM的操作参数获得各温度的挤出物。18B单体(黑色条)、中等分子量杂质(灰色条)和低分子量杂质(交叉阴影线条)示出为面积%。

[0209] 实施例4:热重分析-P49W21G30

[0210] 为了分析在挤出期间的失水量,通过TGA(热重分析)使用TA品牌TGA Q500仪器分析在挤出前的重组蜘蛛丝组合物和在挤出后的重组蜘蛛丝挤出物的水含量。对于P49W21G30和P65W20G15样品,使用用于实施例3所述的挤出实验的粒料的水含量作为测量失水量的参考样品。对于P71W19G10样品,使用用于实施例3所述的挤出实验的重组蜘蛛丝组合物的水含量作为测量失水量的参考样品。

[0211] 对于每种样品,分析包含上文列出的制剂的10mg+/-1mg粉末或粒料。为了测量水含量,“在空气中”运行样品,与“在氮气中”相比。使用配备的自动取样器将样品连续引入到TGA炉中。使用TA品牌软件程序组将温度编程以便以20℃/分钟的速率从室温开始增加,直至其达到110℃。然后将样品在所述温度下保持45分钟。然后从炉移出样品,且用空气冲洗所述炉15分钟,之后开始下一次运行。

[0212] 以下表6至8列出参考样品(即,起始粒料或粉末)和挤出样品的各种测量值。图4至6包括表6至8中分别包括的数据的图。由这个数据可以看出,在挤出期间失水量较低,且正处于挤出过程的可接受限度内,通常,失水量在2%至18%的范围内。

[0213] 表6-P49W21G30中的失水量

[0214]

样品 ID	温度	RPM	起始粒料中的水	挤出物中的水	$\Delta$ 水
P49W21G30-1	20℃	10	17.95%	16.32%	1.63%
P49W21G30-2	20℃	100	17.95%	17.46%	0.49%
P49W21G30-4	20℃	300	17.95%	16.38%	1.57%
P49W21G30-5	40℃	10	17.95%	16.10%	1.85%
P49W21G30-6	40℃	100	17.95%	16.45%	1.50%
P49W21G30-7	40℃	200	17.95%	16.24%	1.71%
P49W21G30-8	40℃	300	17.95%	16.85%	1.10%
P49W21G30-9	60℃	10	17.95%	8.22%	9.73%
P49W21G30-10	60℃	100	17.95%	11.93%	6.02%
P49W21G30-11	60℃	200	17.95%	10.59%	7.36%
P49W21G30-12	60℃	300	17.95%	9.92%	8.04%
P49W21G30-13	80℃	10	17.95%	9.18%	8.77%
P49W21G30-14	80℃	100	17.95%	9.08%	8.87%
P49W21G30-15	80℃	200	17.95%	8.63%	9.32%
P49W21G30-16	80℃	300	17.95%	8.82%	9.14%
P49W21G30-17	95℃	10	17.95%	15.32%	2.63%
P49W21G30-18	95℃	100	17.95%	14.46%	3.49%
P49W21G30-19	95℃	200	17.95%	14.59%	3.36%
P49W21G30-20	95℃	300	17.95%	13.40%	4.55%
P49W21G30-21	120℃	10	17.95%	10.84%	7.11%
P49W21G30-22	120℃	100	17.95%	10.01%	7.94%
P49W21G30-23	120℃	200	17.95%	9.95%	8.00%
P49W21G30-24	120℃	300	17.95%	4.85%	13.10%

[0215] 表7-P65W20G15中的失水量

[0216]

样品 ID	温度	RPM	起始粒料中的水	挤出物中的水	$\Delta$ 水
P65W20G15-1	20℃	10	11.63%	8.79%	2.84%
P65W20G15-2	20℃	100	11.63%	8.08%	3.55%
P65W20G15-3	20℃	200	11.63%	7.78%	3.85%
P65W20G15-4	20℃	300	11.63%	7.43%	4.20%
P65W20G15-5	40℃	10	11.63%	7.34%	4.30%
P65W20G15-6	40℃	100	11.63%	7.07%	4.56%
P65W20G15-7	40℃	200	11.63%	7.20%	4.43%
P65W20G15-8	40℃	300	11.63%	7.10%	4.53%

[0217]	P65W20G15-9	60°C	10	11.63%	7.17%	4.46%
	P65W20G15-10	60°C	100	11.63%	6.82%	4.81%
	P65W20G15-11	60°C	200	11.63%	6.81%	4.82%
	P65W20G15-12	60°C	300	11.63%	6.47%	5.16%
	P65W20G15-16	95°C	300	11.63%	11.43%	0.20%
	P65W20G15-17	140°C	10	11.63%	6.83%	4.80%
	P65W20G15-18	140°C	100	11.63%	6.22%	5.41%

[0218] 表8-P71W19G10中的失水量

样品 ID	温度	RPM	起始粉末中的水	挤出物中的水	$\Delta$ 水
P71W19G10-1	90°C	10	7.22%	7.16%	0.06%
P71W19G10-2	90°C	100	7.22%	6.84%	0.38%
P71W19G10-3	90°C	200	7.22%	6.81%	0.41%
P71W19G10-4	90°C	300	7.22%	6.79%	0.43%
P71W19G10-5	120°C	10	7.22%	6.21%	1.01%
P71W19G10-6	120°C	100	7.22%	6.08%	1.15%
P71W19G10-7	120°C	200	7.22%	5.94%	1.28%

[0220] 图4示出在20°C、40°C、95°C及120°C的挤出条件下生成的以上表6中列出的样品的TGA数据,其中使用10、100、200和300RPM操作参数获得各温度的挤出物。图4还示出用于生成所述样品的起始粒料的参考样品的TGA数据。所述数据示出跨越所有处理的样品的水含量%,其中当与起始粒料相比较时失水量的范围为约1%至13%。

[0221] 图5示出在20°C、40°C、60°C和140°C的挤出条件下生成的以上表7中列出的样品的TGA数据,其中使用10、100、200和300RPM操作参数获得各温度的挤出物。图5还示出用于生成所述样品的起始粒料的参考样品的TGA数据。所述数据示出跨越所有处理的样品的水含量%,其中当与起始粒料相比较时失水量的范围为约1%至8%。

[0222] 图6示出在90°C和120°C的挤出条件下生成的以上表8中列出的样品的TGA数据,其中使用10、100、200和300RPM操作参数获得各温度的挤出物。图5还示出用于生成所述样品的起始粉末的参考样品的TGA数据。所述数据示出跨越所有处理的样品的水含量%,其中当与起始粉末相比较时失水量的范围为约1.5%至4%。

[0223] 实施例5:使用傅里叶变换红外光谱术进行 $\beta$ 折叠含量分析

[0224] 为了评估挤出物中二级结构和三级结构的形成,通过FTIR(傅里叶变换红外光谱术)测量 $\beta$ 折叠含量。使用配备有钻石衰减总反射附件、后有主要选择S(垂直)偏振光的线栅偏光镜的Bruker Alpha光谱仪对挤出物进行FTIR。包括重组多肽粉末和前体纤维作为对照。为了定量分子对准,在4000至600 $\text{cm}^{-1}$ 的4 $\text{cm}^{-1}$ 分辨率下以32次扫描收集每个取向(相对于极化电场呈0及90°)的三光谱。

[0225] 基于以下步骤计算对应于982-949 $\text{cm}^{-1}$ 的峰的平均值。在无条带的情况下通过减去1900与1800 $\text{cm}^{-1}$ 之间的平均值来抵消吸光度值。然后通过除去对应于各向同性(未取向)侧链振动条带的1350与1315 $\text{cm}^{-1}$ 之间的平均值来使光谱归一化。将 $\beta$ 折叠含量度量视为982与949 $\text{cm}^{-1}$ 之间的取积分吸光度值的平均值。

[0226] 将重组蜘蛛丝挤出物的 $\beta$ 折叠(即,“样品 $\beta$ 折叠”)含量与以下相比较:i)用于生成重组蜘蛛丝组合物的起始重组蜘蛛丝多肽粉末(即,“参考预水合粉末”)中的 $\beta$ 折叠含量,以及ii)起始粒料(P49W21G30和P65W20G15)(即,“参考粒料”)中的 $\beta$ 折叠含量。以下表9至11列出了参考样品和在下表所列出的条件下产生的挤出物的测量值。图7至9包括表9至11中所示出的数据的图表。如可看出,从起始重组丝多肽粉末至重组蜘蛛丝挤出物的材料的 $\beta$ 折叠含量不存在显著改变,指示所述方法能够使非晶质蛋白结构域极化且迁移而不会破坏 $\beta$ 折叠,若使用溶剂加工也将为如此情况。

[0227] 表9-P49W21G30中的 $\beta$ 折叠形成

样品 ID	温度	RPM	参考预水合粉末 $\beta$ 折叠约982-949nm	参考粒料 $\beta$ 折叠约982-949nm	样品 $\beta$ 折叠约982-949nm
[0228] P49W21G30-1	20°C	10	0.01194	.01229	0.009923
P49W21G30-2	20°C	100	0.01194	.01229	0.006975
P49W21G30-3	20°C	200	0.01194	.01229	0.010909
P49W21G30-4	20°C	300	0.01194	.01229	0.003502
P49W21G30-5	40°C	10	0.01194	.01229	0.014843
P49W21G30-6	40°C	100	0.01194	.01229	0.015117
P49W21G30-7	40°C	200	0.01194	.01229	0.015277
P49W21G30-8	40°C	300	0.01194	.01229	0.014973
P49W21G30-9	60°C	10	0.01194	.01229	0.016206
P49W21G30-10	60°C	100	0.01194	.01229	0.016281
P49W21G30-11	60°C	200	0.01194	.01229	0.015997
P49W21G30-12	60°C	300	0.01194	.01229	0.016674
P49W21G30-13	80°C	10	0.01194	.01229	0.018788
[0229] P49W21G30-14	80°C	100	0.01194	.01229	0.014512
P49W21G30-15	80°C	200	0.01194	.01229	0.017957
P49W21G30-16	80°C	300	0.01194	.01229	0.018933
P49W21G30-17	95°C	10	0.01194	.01229	0.012738
P49W21G30-18	95°C	100	0.01194	.01229	0.014334
P49W21G30-19	95°C	200	0.01194	.01229	0.014475
P49W21G30-20	95°C	300	0.01194	.01229	0.013899
P49W21G30-21	120°C	10	0.01194	.01229	0.012653
P49W21G30-22	120°C	100	0.01194	.01229	0.010467
P49W21G30-23	120°C	200	0.01194	.01229	0.012384
P49W21G30-24	120°C	300	0.01194	.01229	0.009402

[0230] 表10-P65W20G15中的 $\beta$ 折叠形成

样品 ID	温度	RPM	参考粉末 $\beta$ 折叠约 982-949nm	参考粒料 $\beta$ 折叠约 982-949nm	样品 $\beta$ 折叠约 982-949nm
P65W20G15-1	20°C	10	0.02411	.01719	0.01802
P65W20G15-2	20°C	100	0.02411	.01719	0.02023
P65W20G15-3	20°C	200	0.02411	.01719	0.02022
P65W20G15-4	20°C	300	0.02411	.01719	0.01838
P65W20G15-5	40°C	10	0.02411	.01719	0.02021
P65W20G15-6	40°C	100	0.02411	.01719	0.01945
P65W20G15-7	40°C	200	0.02411	.01719	0.01955
P65W20G15-8	40°C	300	0.02411	.01719	0.02083
P65W20G15-9	60°C	10	0.02411	.01719	0.02292
P65W20G15-10	60°C	100	0.02411	.01719	0.01776
P65W20G15-11	60°C	200	0.02411	.01719	0.01926
P65W20G15-12	60°C	300	0.02411	.01719	0.01924
P65W20G15-13	95°C	10	0.02411	.01719	0.01971
P65W20G15-14	95°C	100	0.02411	.01719	0.01905
P65W20G15-15	95°C	200	0.02411	.01719	0.01980
P65W20G15-16	95°C	300	0.02411	.01719	0.02094
P65W20G15-17	140°C	10	0.02411	.01719	0.01956
P65W20G15-18	140°C	100	0.02411	.01719	0.01936
P65W20G15-19	140°C	200	0.02411	.01719	0.01914
P65W20G15-20	140°C	300	0.02411	.01719	0.01863

[0233] 表11-P71W19G10中的 $\beta$ 折叠形成

样品 ID	温度	RPM	参考粉末 $\beta$ 折叠约 982-949nm	样品 $\beta$ 折叠约 982-949nm
P71W19G10-1	90°C	10	0.02411	0.02174
P71W19G10-2	90°C	100	0.02411	0.01889
P71W19G10-3	90°C	200	0.02411	0.02161
P71W19G10-4	90°C	300	0.02411	0.01925
P71W19G10-5	120°C	10	0.02411	0.02113
P71W19G10-6	120°C	100	0.02411	0.02329
P71W19G10-7	120°C	200	0.02411	0.02258
P71W19G10-8	120°C	300	0.02411	0.02107

[0235] 图7示出在20°C、40°C、60°C、80°C、95°C或120°C的挤出条件下生成的以上表9中所列出的样品的FTIR数据,其中使用10、100、200或300RPM的操作参数获得各温度的挤出物。从949-982求出所述数据且所述数据与起始粒料相比未显示明确趋势。

[0236] 图8示出在20°C、40°C、60°C、95°C或140°C的挤出条件下生成的以上表10中所列出的样品的FTIR数据,其中使用10、100、200或300RPM的操作参数获得各温度的挤出物。从949-982条带求出所述数据且所述数据与起始粒料相比未显示明确趋势。

[0237] 图9示出在90°C或120°C的挤出条件下生成的以上表11中所列出的样品的FTIR数

据,其中使用10、100、200或300RPM的操作参数获得各温度的挤出物。从949-982求出所述数据以避免因水的存在造成的假影,且所述数据与起始粒料相比未显示明确趋势。

[0238] 实施例6:偏振光显微镜

[0239] 使用偏振光显微镜(PL)检查各种挤出物的光滑度和均匀度。使用Leica DM750P偏振光显微镜、使用4X PL物镜获得光和偏振光(PL)图像。将显微镜偶接至互补基于PC的图像分析Leica Application Suite,LAS V4.9。沿着标准显微镜载玻片的长轴小心放置长约20至30mm的TSE挤出物且水平放置于(东西向;即0°)显微镜孔上方。最初将样品边缘置于焦点,随后总体聚焦所述样品。最初在白光下查看所述样品,通过照射控制按钮控制,且使用所包括的适当标尺捕获图像。在所有情况下,将LAS V4.9软件的自动亮度特征关闭。

[0240] 接着,通过将分析器/勃氏镜模块的下臂翻转至右侧(“A”位置/分析器内)来接合所述模块,同时确保将分析器/勃氏镜模块的上臂翻转至左侧(“O”位置/勃氏镜外)。所述设置允许以“交叉偏振模式”进行分析,所述模式为穿过偏光器和分析器的光的被允许振动方向以90°取向的光学对齐状态。

[0241] 为了控制光强度值背景波动,最初查看所有样品,且使用照射控制按钮减小背景的亮度,直至其正好达到完全黑暗。然后在图像捕获序列期间用目镜光阻附件覆盖每个目镜以防止周围光穿过。使用LAS V4.9软件包以0°和45°取向捕获图像。通过使用此显微镜所配备的圆形旋转台将玻璃侧旋转至45°角来获得45°图像。

[0242] 图10和图11为使用偏振光显微镜捕获的示例性样品的图像。所述图像显示具有低熔体破裂的平滑纤维可使用所要求的过程获得。因此,条件明确适合于熔体流动和挤出。另外,在许多条件下,观测到定性双折射率,与轴向对齐一样。

[0243] 图10示出由样品P49W21G30-1、P49W21G30-2、P49W21G30-3和P49W21G30-4产生的图片,所有样品都在20°C下以不同RPMS产生。在这些条件下,挤出物为具有低熔体破裂的平滑物。偏振光显微镜根据条件(检查45°差异)显示优选轴向对齐,其中100RPM产生最大轴向对齐。

[0244] 图11示出由样品P49W21G30-17、P49W21G30-18、P49W21G30-19和P49W21G30-20产生的图片,所有样品都在95°C下以不同RPMS产生。挤出物示出适度熔体破裂/表面缺陷。偏振光显微镜显示轴向对齐从10-100RPM的增加。当在0和45°下检查时,从100-300RPM,样品示出彼此类似的差别。

[0245] 实施例7:甘油含量的代谢物分析

[0246] 为了确定在挤出期间从重组蜘蛛丝组合物的甘油损失,使用配备有Phenomenex Security Guard Carbo H+保护管柱的Benson Polymeric150x7.8 mm H+7110-0HPLC管柱,使用0.004M硫酸的流动相来分析甘油含量。最初运行甘油校准物以进行定量。为了测量基于18B的样品中的甘油的量,在挤出之前(即呈粒料或粉末)和之后测量存在于组合物中的甘油。对于各样品,将25mg粉末或粒料溶解于1ml0.004M硫酸中且超声处理1h。然后涡旋所述样品且将其置于HPLC小瓶中以用于每个条件/处理的后续运行。

[0247] 下表12至14列出在下文列出的条件下产生的挤出物的各种测量值。图12至图14包括相同样品的图。由所述图可看出,组合物中的甘油含量跨越所测试条件范围为稳定的,如通过测试期间的最小损失证明。

[0248] 表12-挤出物中的甘油损失-P49W21G30

样品 ID	温度	RPM	称量的甘油重量%	甘油浓度, 针对失水量进行校正	测量的甘油浓度	Δ甘油
P49W21G30-1	20℃	10	30%	31.15%	38.99%	1.15%
P49W21G30-2	20℃	100	30%	30.78%	39.14%	0.78%
P49W21G30-3	20℃	200	30%	30.31%	39.28%	0.31%
P49W21G30-4	20℃	300	30%	31.13%	39.37%	1.13%
P49W21G30-5	40℃	10	30%	31.22%	32.74%	1.22%
P49W21G30-6	40℃	100	30%	31.10%	33.16%	1.10%
P49W21G30-7	40℃	200	30%	31.17%	32.90%	1.17%
P49W21G30-8	40℃	300	30%	30.98%	32.90%	0.98%
P49W21G30-9	60℃	10	30%	34.01%	32.87%	4.01%
P49W21G30-10	60℃	100	30%	32.63%	33.36%	2.63%
P49W21G30-11	60℃	200	30%	33.12%	32.90%	3.12%
P49W21G30-12	60℃	300	30%	33.36%	33.23%	3.36%
P49W21G30-13	80℃	10	30%	33.64%	33.29%	3.64%
P49W21G30-14	80℃	100	30%	33.68%	33.65%	3.68%
P49W21G30-15	80℃	200	30%	33.85%	34.24%	3.85%
P49W21G30-16	80℃	300	30%	33.78%	33.44%	3.78%
P49W21G30-17	95℃	10	30%	31.47%	39.85%	1.47%
P49W21G30-18	95℃	100	30%	31.76%	39.99%	1.76%
P49W21G30-19	95℃	200	30%	31.72%	39.65%	1.72%
P49W21G30-20	95℃	300	30%	32.12%	40.28%	2.12%
P49W21G30-21	100℃	10	30%	33.03%	33.44%	3.03%
P49W21G30-22	100℃	100	30%	33.33%	34.22%	3.33%
P49W21G30-23	100℃	200	30%	33.35%	34.94%	3.35%
P49W21G30-24	100℃	300	30%	35.36%	34.72%	5.36%

[0251] 表13-挤出物中的甘油损失-P65W20G15

样品 ID	温度	RPM	称量的甘油重量%	甘油浓度, 针对失水量进行校正	测量的甘油浓度	$\Delta$ 甘油
P65W20G15-1	20℃	10	15%	16.89%	16.88%	1.89%
P65W20G15-2	20℃	100	15%	17.03%	16.77%	2.03%
P65W20G15-3	20℃	200	15%	17.09%	16.97%	2.09%
P65W20G15-4	20℃	300	15%	17.16%	16.88%	2.16%
P65W20G15-5	40℃	10	15%	17.18%	17.26%	2.18%
P65W20G15-6	40℃	100	15%	17.23%	17.17%	2.23%
P65W20G15-7	40℃	200	15%	17.20%	17.44%	2.20%
P65W20G15-8	40℃	300	15%	17.22%	17.55%	2.22%
[0252] P65W20G15-9	60℃	10	15%	17.21%	17.61%	2.21%
P65W20G15-10	60℃	100	15%	17.28%	17.48%	2.28%
P65W20G15-11	60℃	200	15%	17.28%	17.69%	2.28%
P65W20G15-12	60℃	300	15%	17.35%	17.57%	2.35%
P65W20G15-13	95℃	10	15%	15.66%	21.73%	0.66%
P65W20G15-14	95℃	100	15%	15.66%	20.53%	0.66%
P65W20G15-15	95℃	200	15%	15.72%	20.29%	0.72%
P65W20G15-16	95℃	300	15%	16.41%	21.43%	1.41%
P65W20G15-17	140℃	10	15%	17.27%	18.06%	2.27%
P65W20G15-18	140℃	100	15%	17.40%	18.00%	2.40%
P65W20G15-19	140℃	200	15%	16.04%	18.04%	1.04%
P65W20G15-20	140℃	300	15%	16.13%	18.37%	1.13%

[0253] 表14-挤出物中的甘油损失-P71W19G10

样品 ID	温度	RPM	称量的甘油重量%	甘油浓度, 针对失水	测量的甘油浓度	$\Delta$ 甘油
			量%	量进行校正	度	
P71W19G10-1	90℃	10	10%	10.82%	13.86%	0.82%
P71W19G10-2	90℃	100	10%	10.76%	13.83%	0.76%
P71W19G10-3	90℃	200	10%	10.87%	14.07%	0.87%
[0255] P71W19G10-4	90℃	300	10%	9.58%	14.09%	-0.42%*
P71W19G10-5	120℃	10	10%	9.63%	13.62%	-0.37%*
P71W19G10-6	120℃	100	10%	9.58%	13.64%	-0.42%*
P71W19G10-7	120℃	200	10%	10.14%	13.68%	0.14%
P71W19G10-8	120℃	300	10%	10.91%	14.44%	0.91%

[0256] \*结果在测试仪器的误差范围内

[0257] 图12示出在20℃、40℃、60℃、80℃、95℃和120℃的挤出条件下生成的以上表12中所列出的样品的代谢物数据,其中使用10、100、200及300RPM的操作参数获得每个温度的挤出物。所有处理中的甘油损失都为可忽略的。

[0258] 图13示出在20℃、40℃、60℃、95℃和140℃的挤出条件下生成的以上表13中所列

出的样品的代谢物数据,其中使用10、100、200和300RPM的操作参数获得每个温度的挤出物。所有处理中的甘油损失都为可忽略的。

[0259] 图14示出在90℃和120℃的挤出条件下生成的上表14中所列出的样品的代谢物数据,其中使用10、100、200或300RPM的操作参数获得各温度的挤出物。所有处理中的甘油损失都为可忽略的。

[0260] 实施例8:甘油含量的代谢物分析

[0261] 将P49W21G30和P25W05G70丝粉末组合物混合并如实施例2中所述进行双螺杆挤出。将挤出物切成粒料并进行熔体流动指数化(MFI)。在Goettfert熔体指数仪,型号MI-40,序号10005563上进行MFI。筒直径为9.5320mm,模头长度为8.015mm,孔口直径为2.09mm。利用两分钟预热。根据ASTM D1238标准测试方法,通过挤出式塑性计对热塑性塑料的流速进行测试。在95℃下进行测试,负荷为2.16kg或21.6kg。

[0262] 表15显示了从相应材料组合物获得的熔体流动指数值。分别在2.1和21.1Kg下测试,对于P49W21G30,n=3,并且对于P25W05G70,n=6。‘+/-’指示n个样本之间的标准偏差。数据指示,基于蛋白/甘油/水的粒料表现出在与例如聚丙烯类似的范围内的MFI值(20g/10min)。在较低的蛋白组成下获得较高的流速。

[0263] 表15-熔体流动指数

[0264]

	2.1Kg	21.1Kg
P49W21G30	-	7.10+/-2.58
P25W05G70	14.18+/-3.07	-

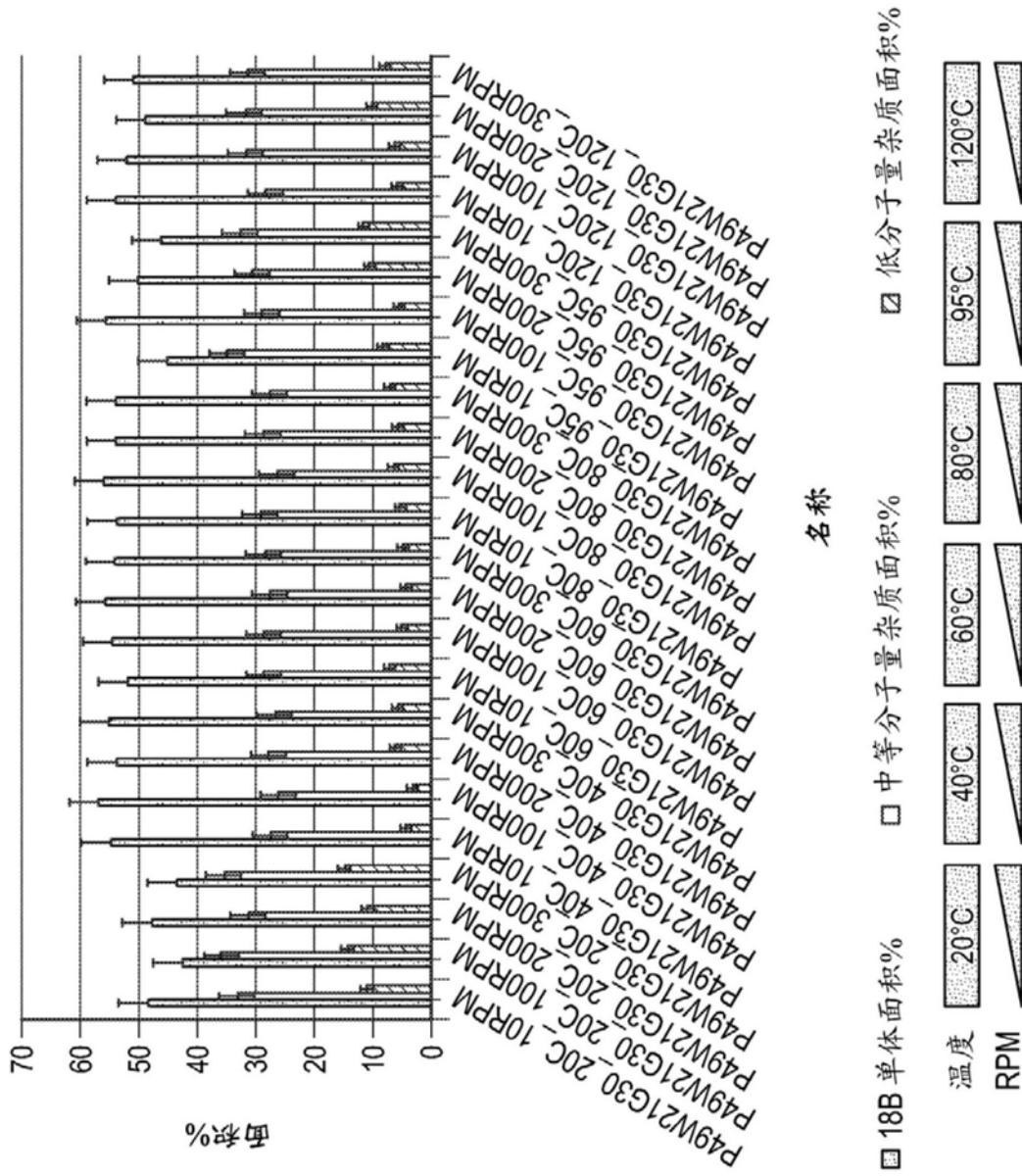


图1

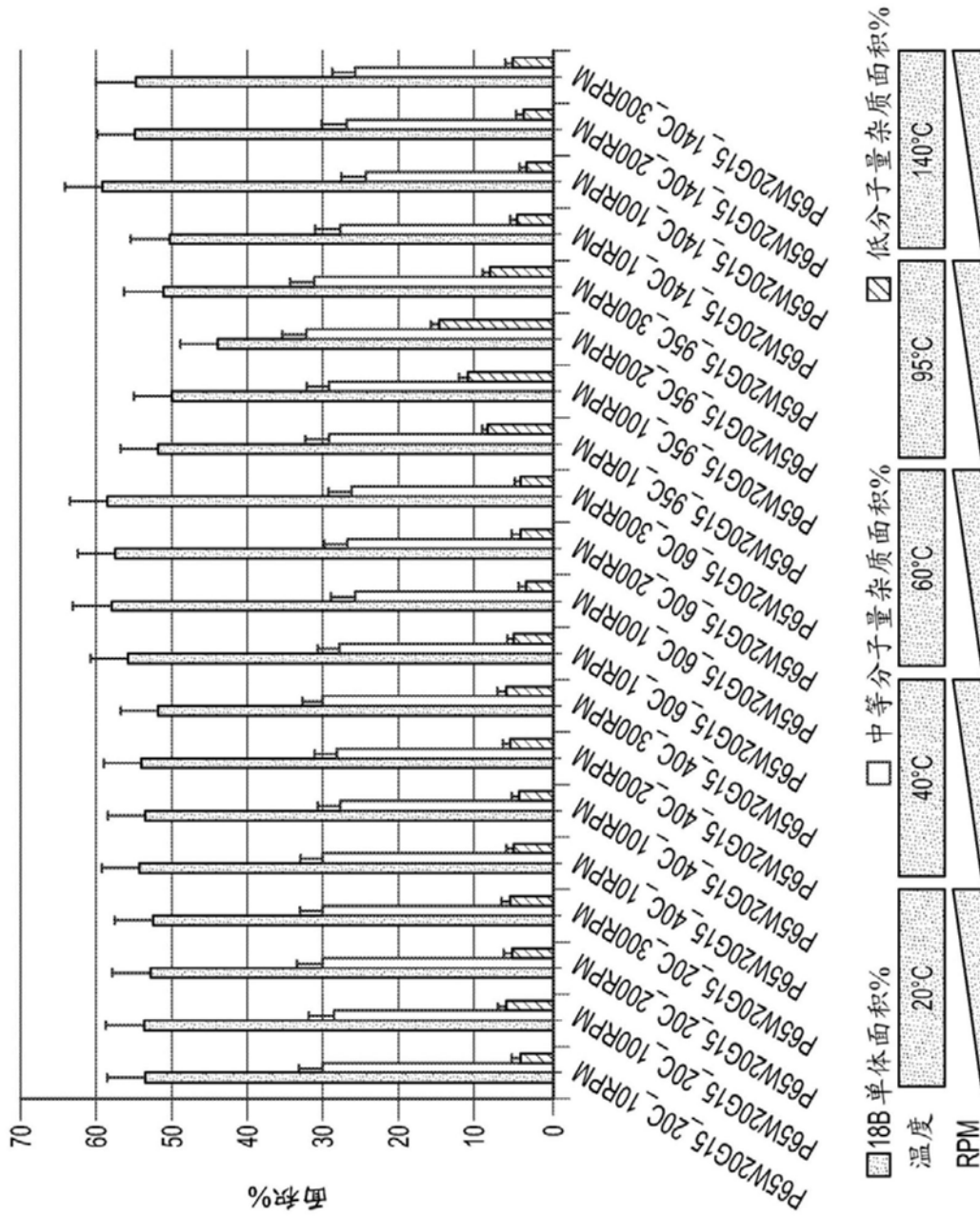


图2

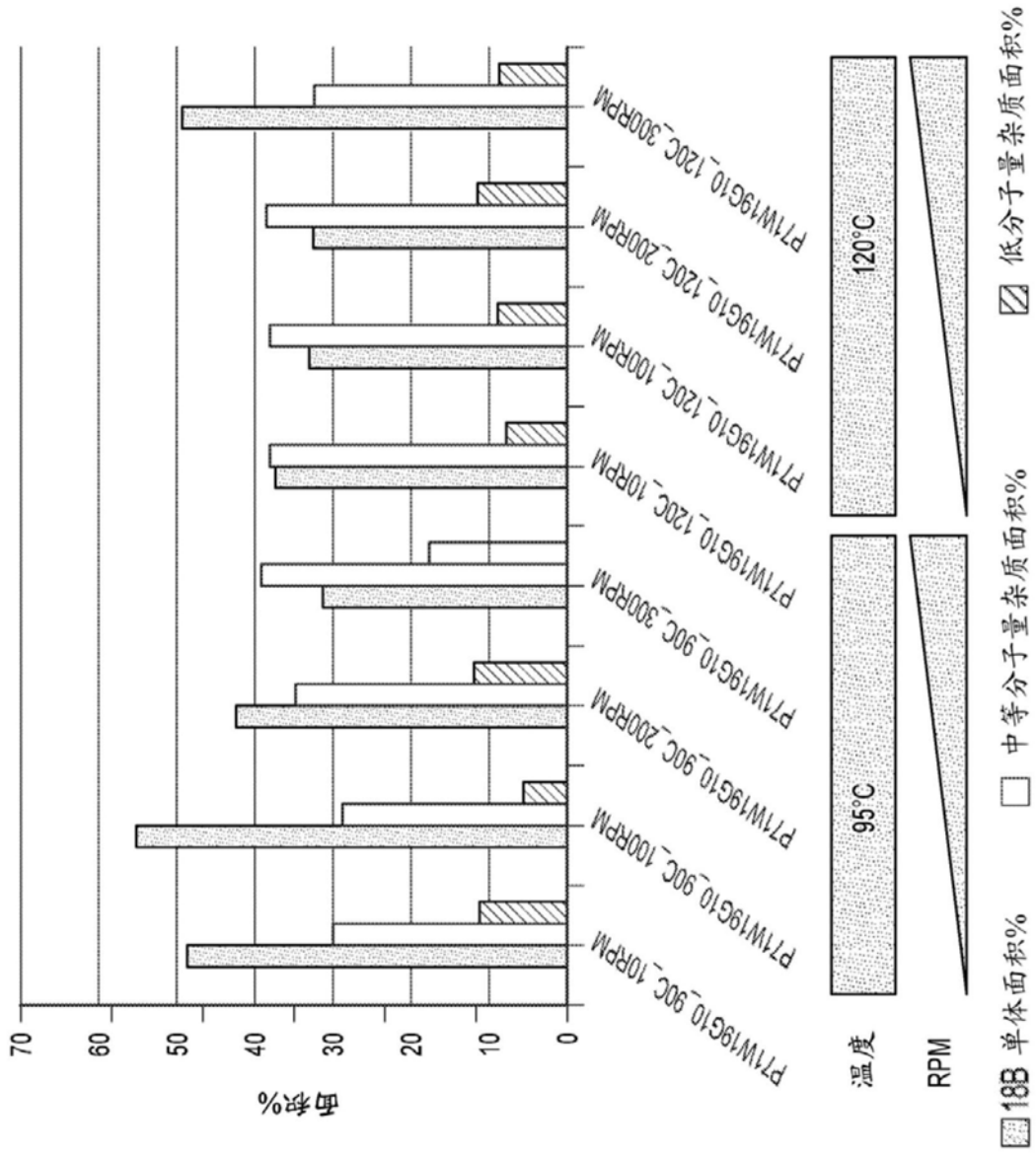


图3

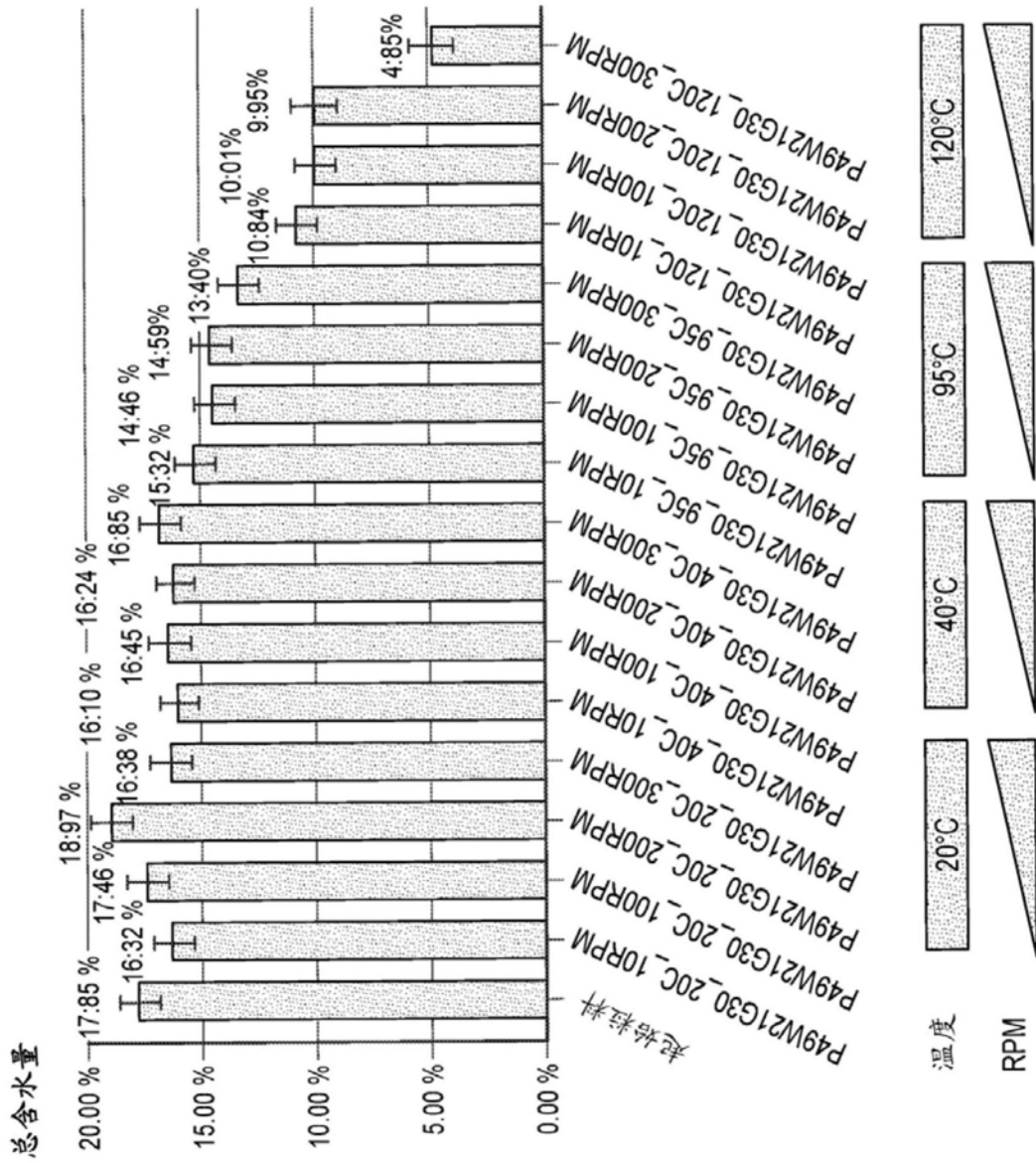


图4

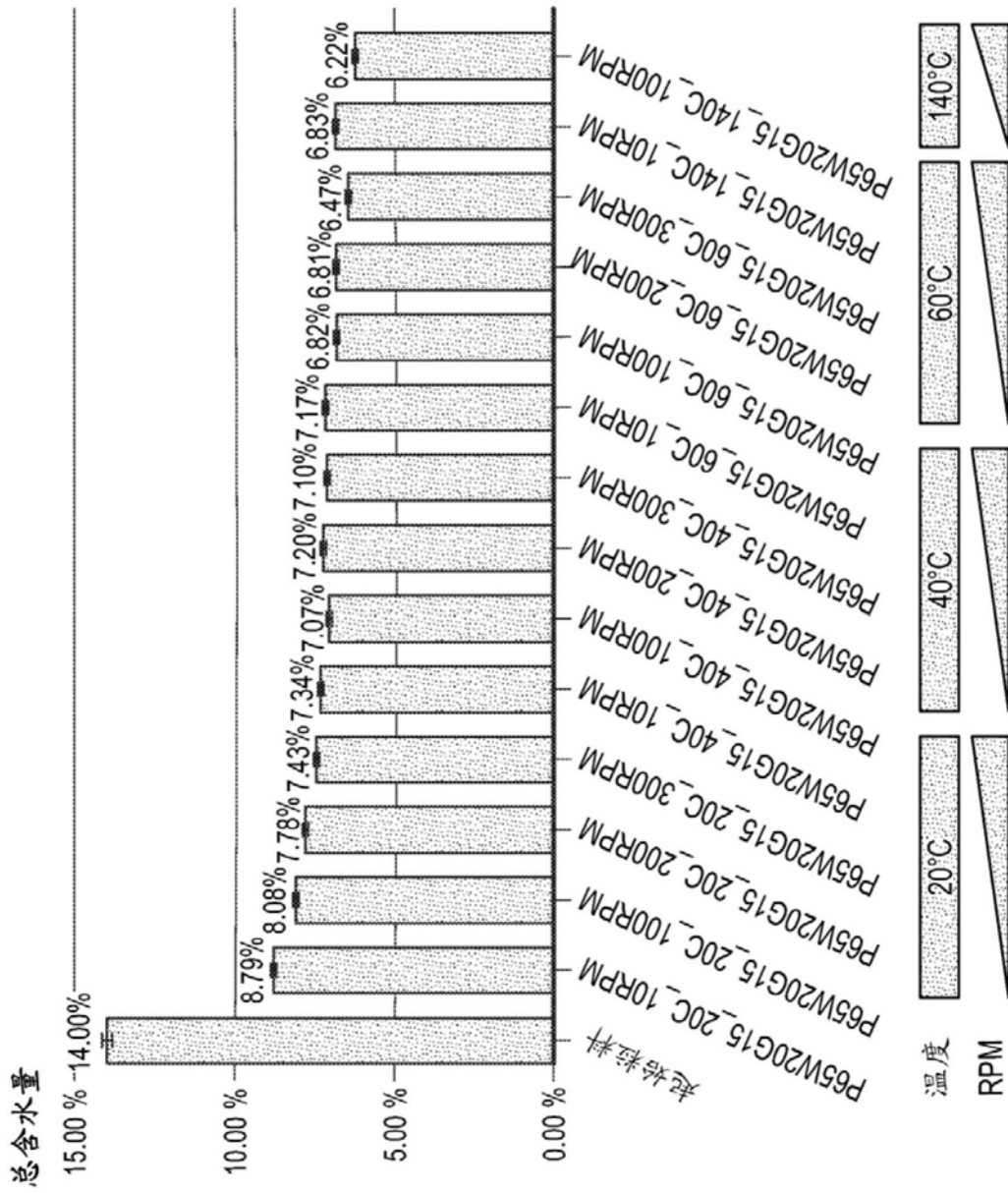


图5

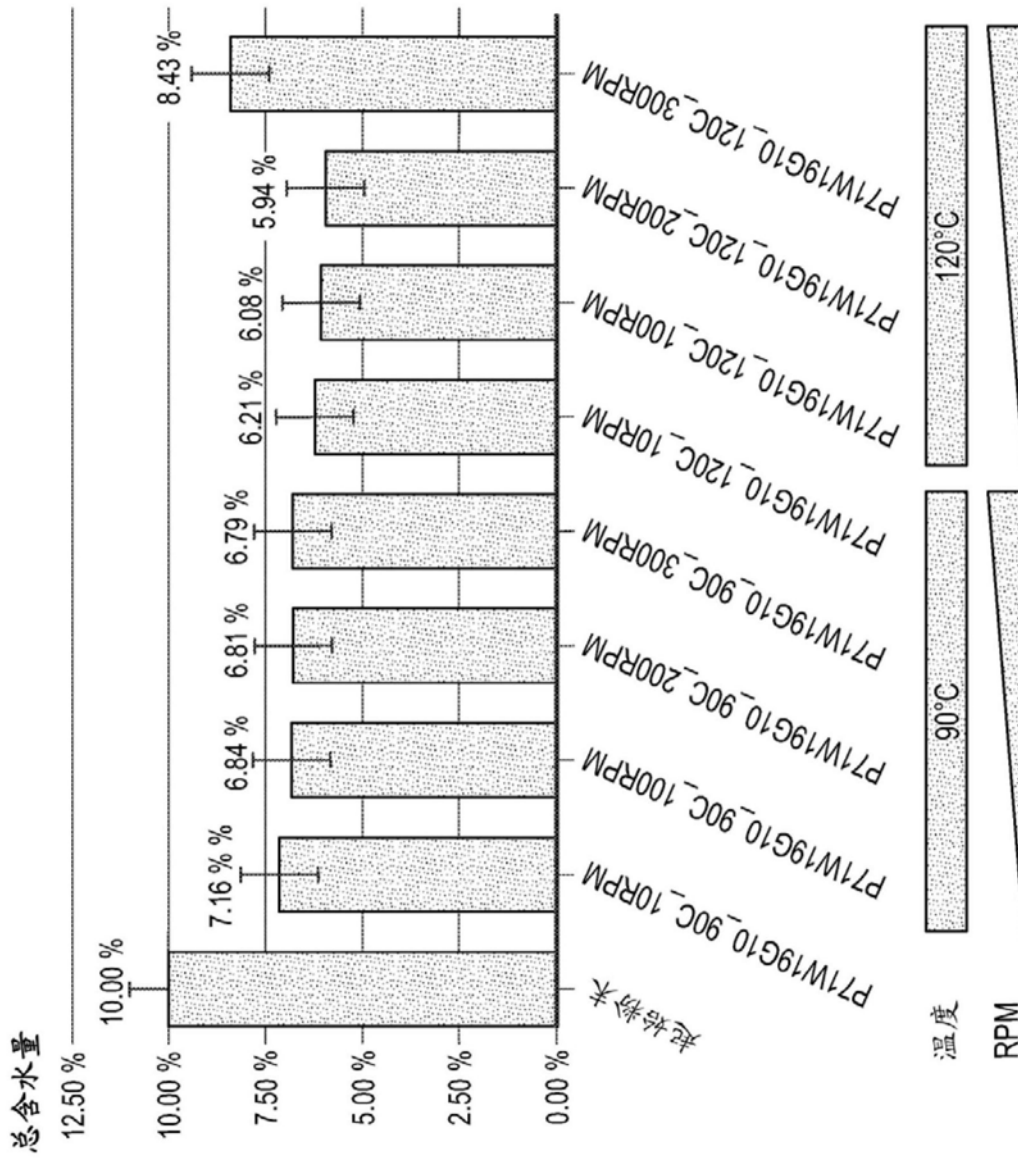


图6

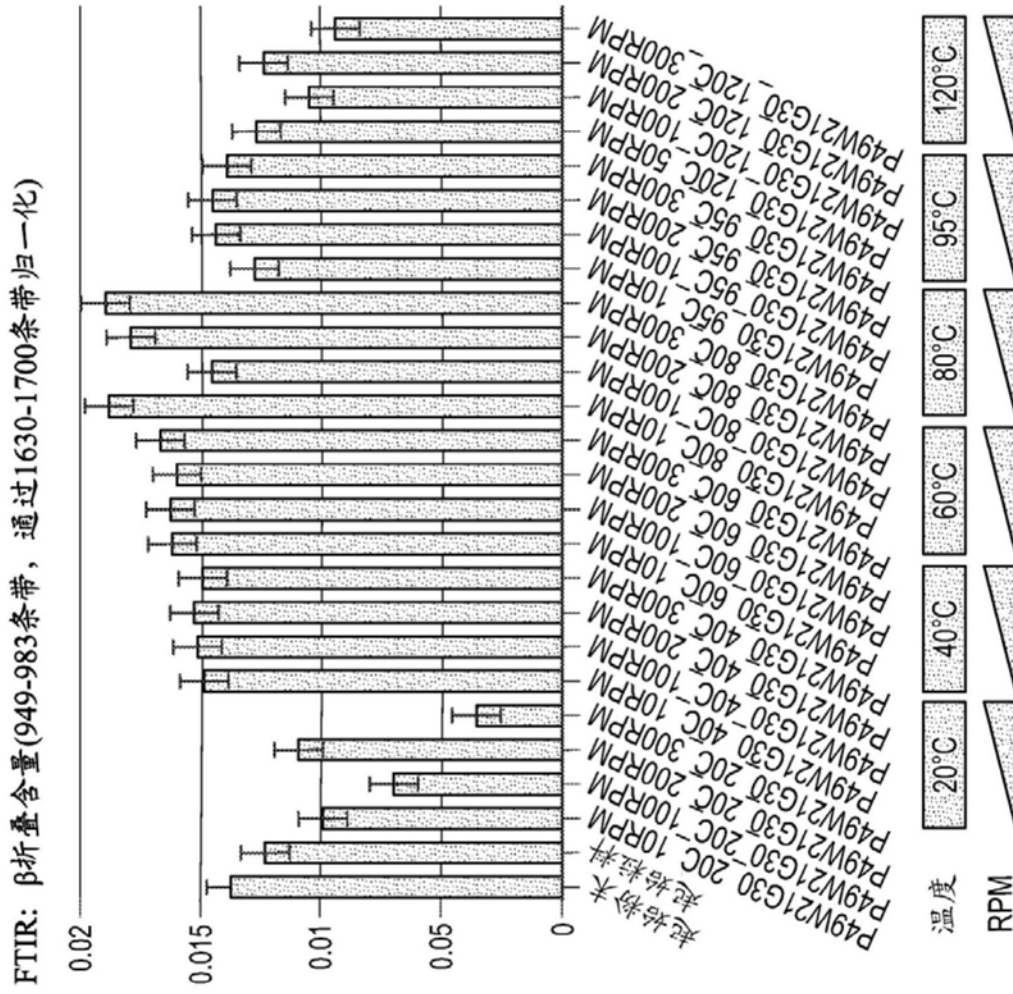


图7

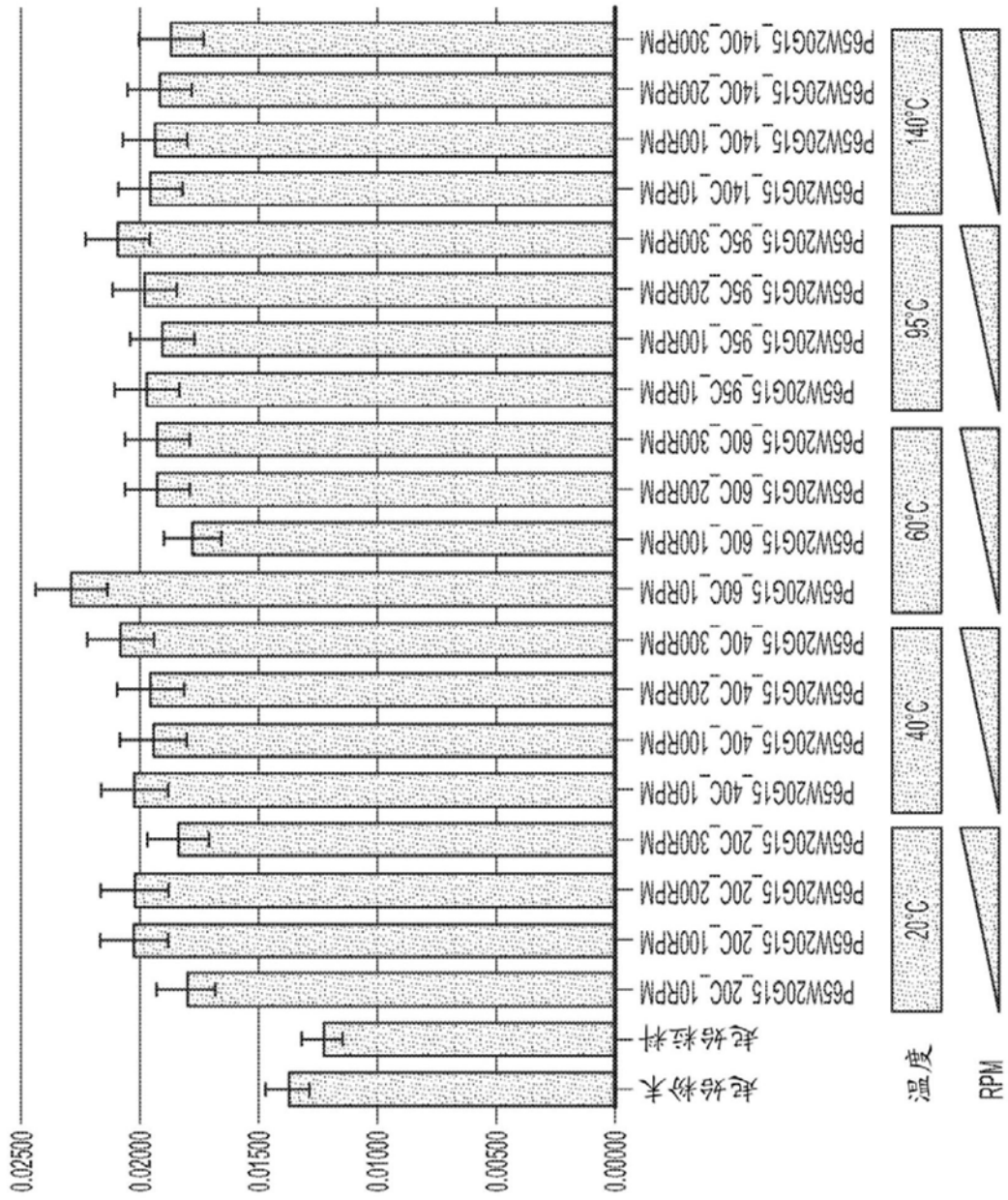


图8

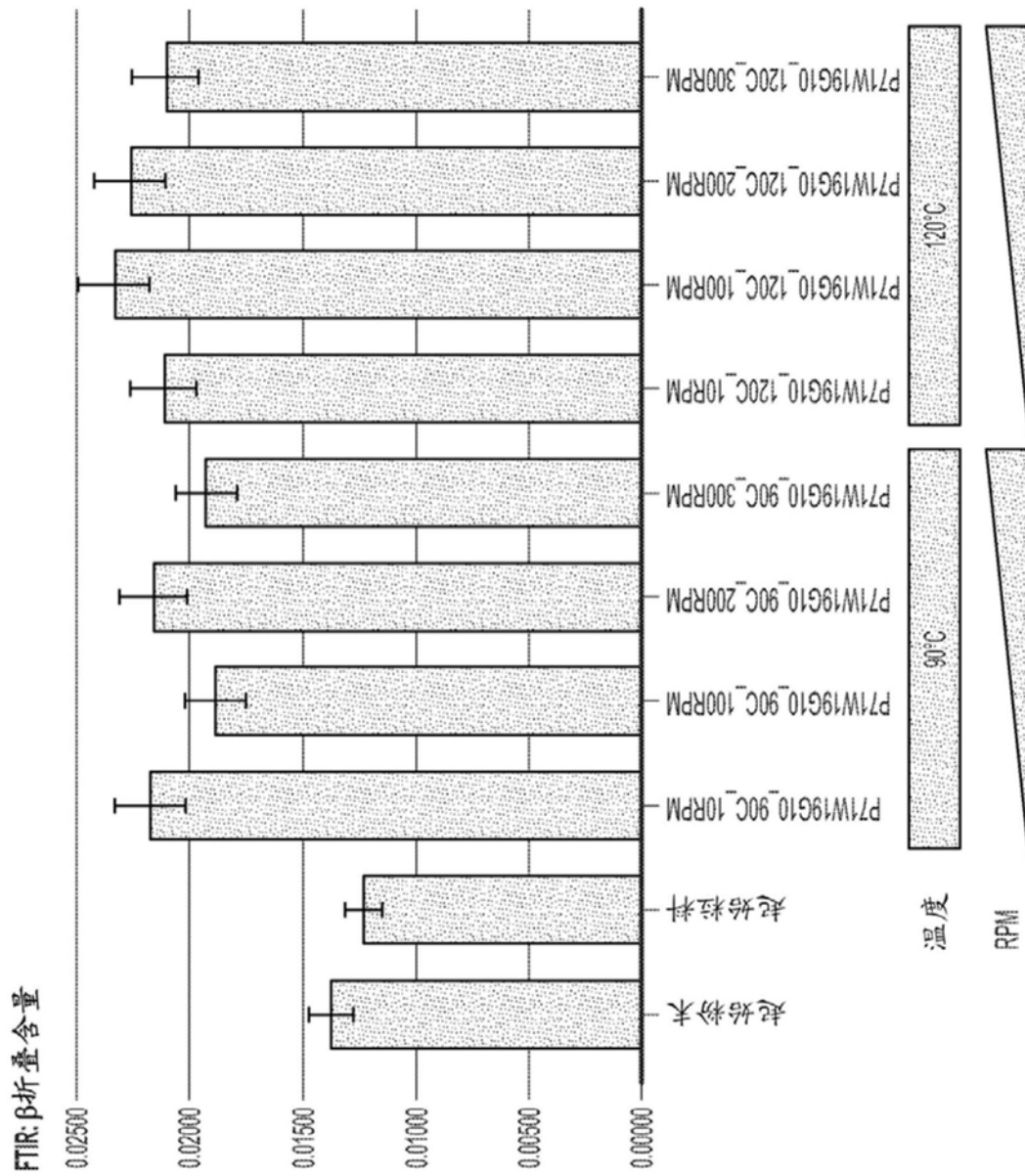


图9

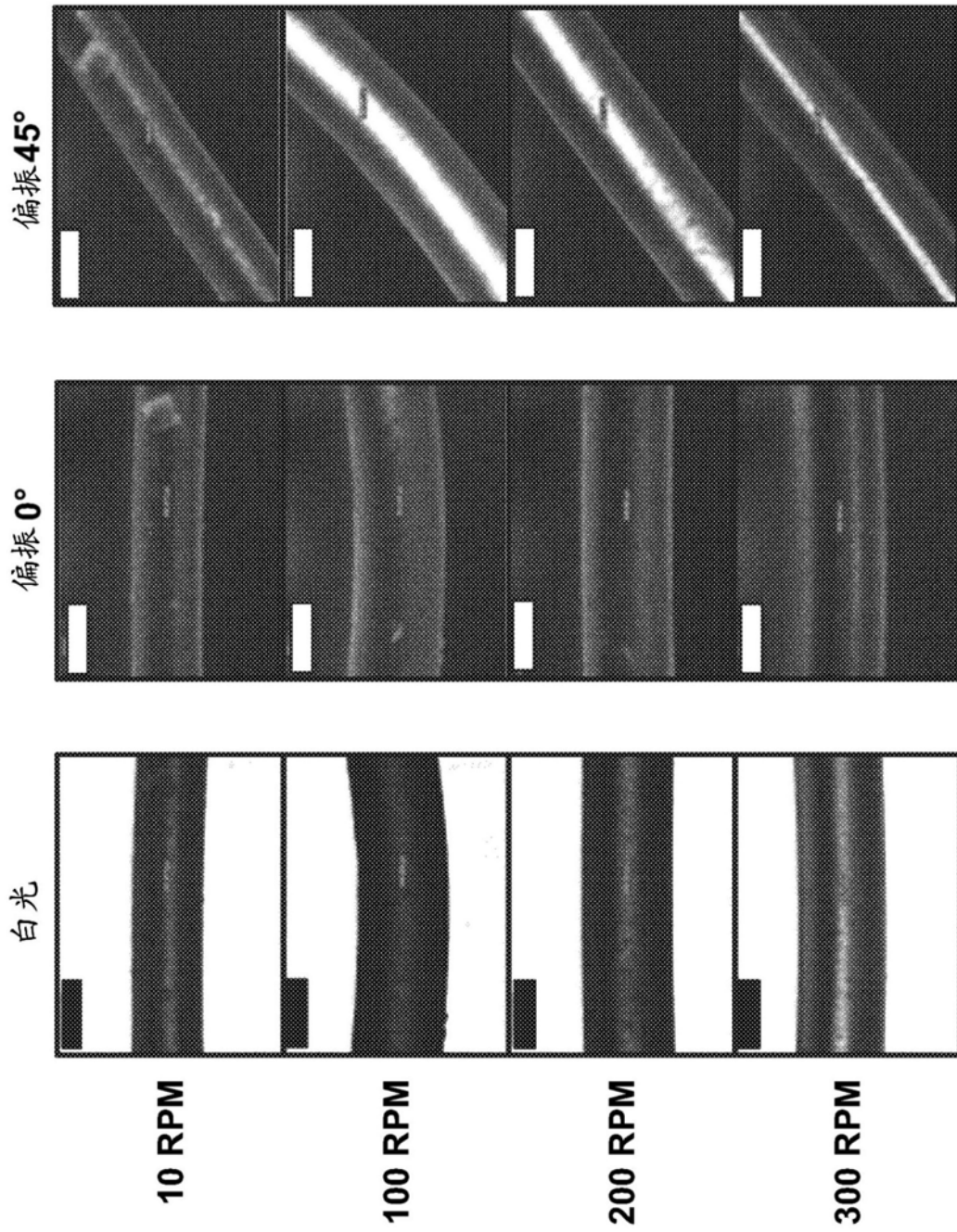


图10

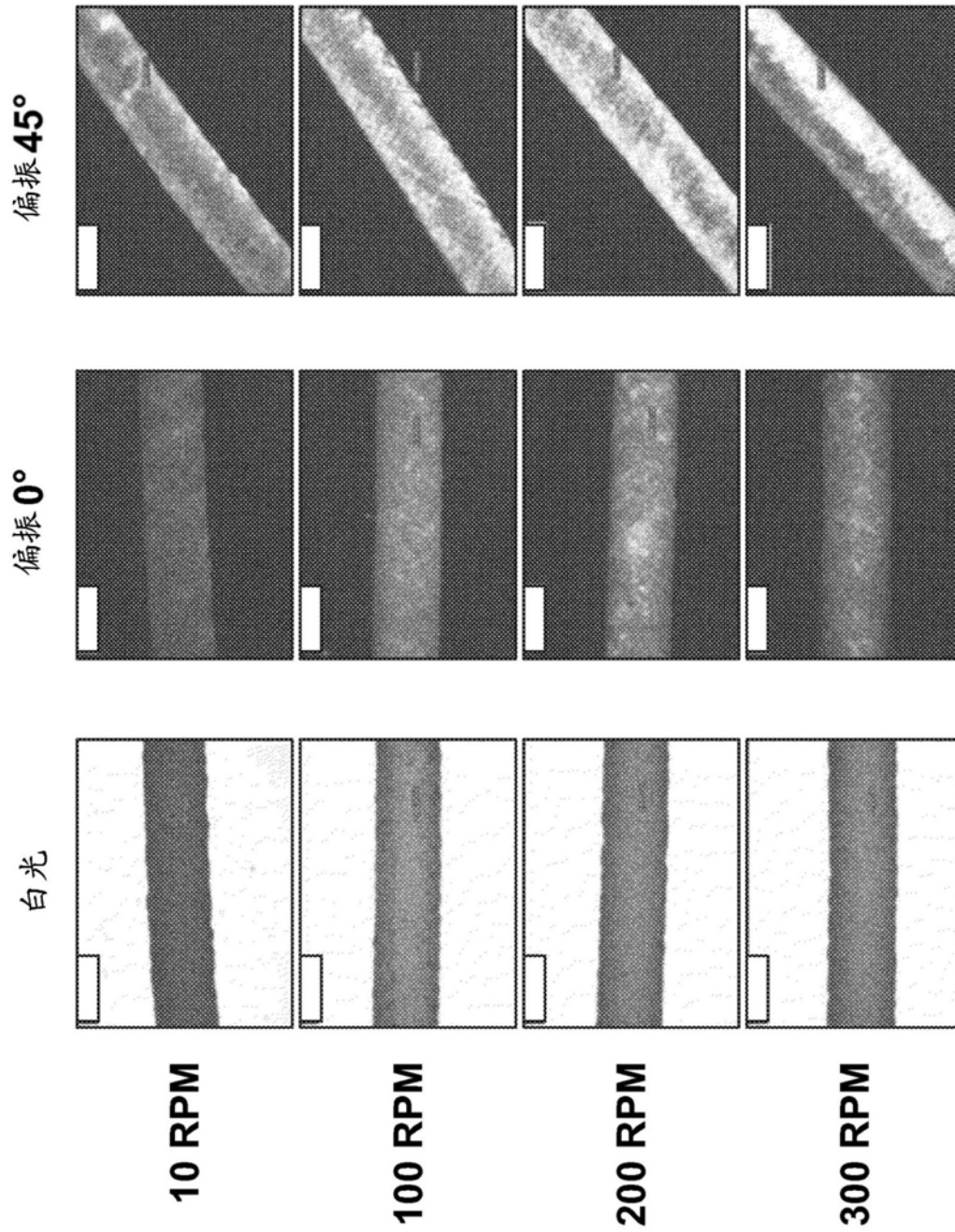


图11

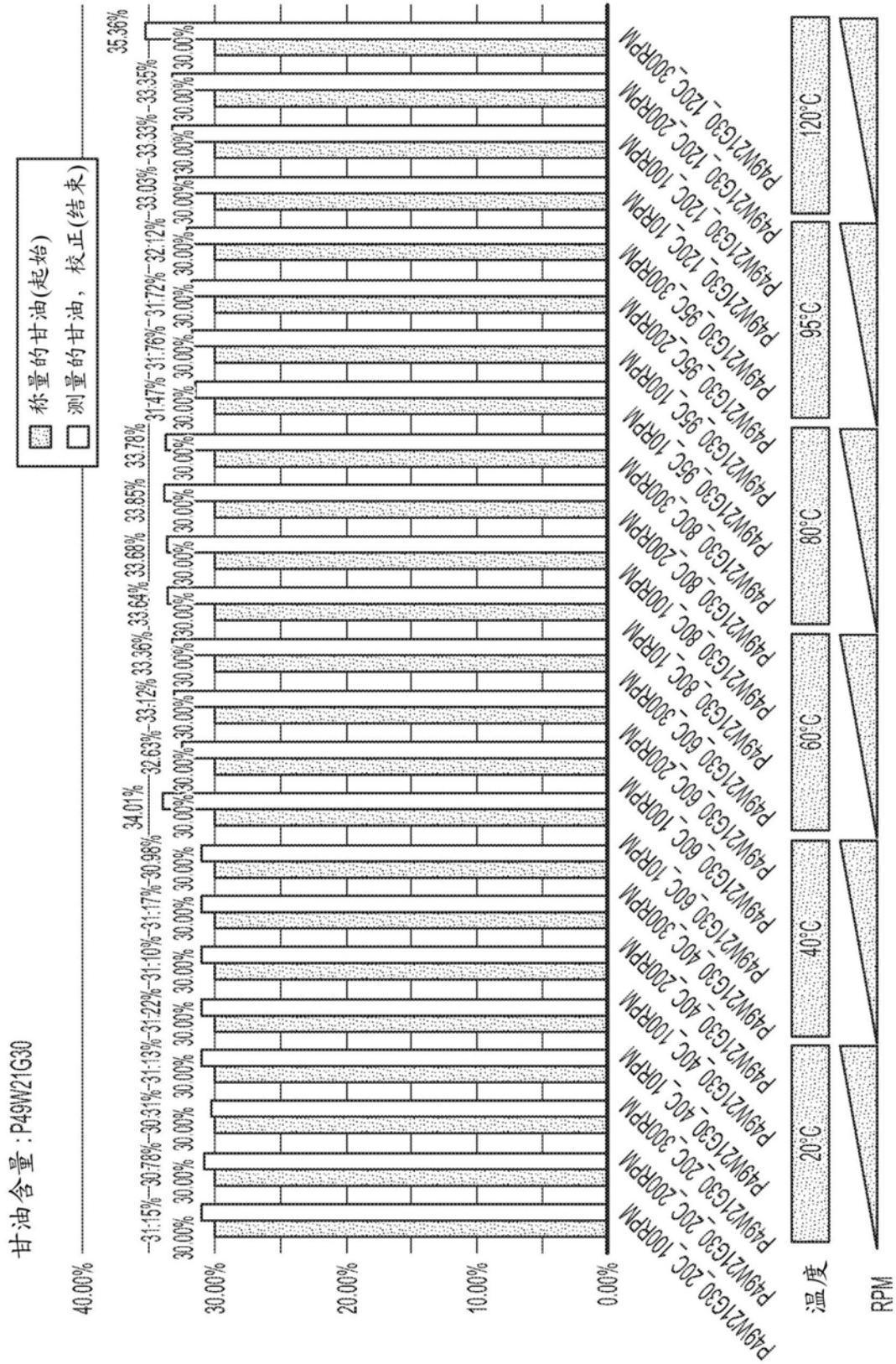


图12

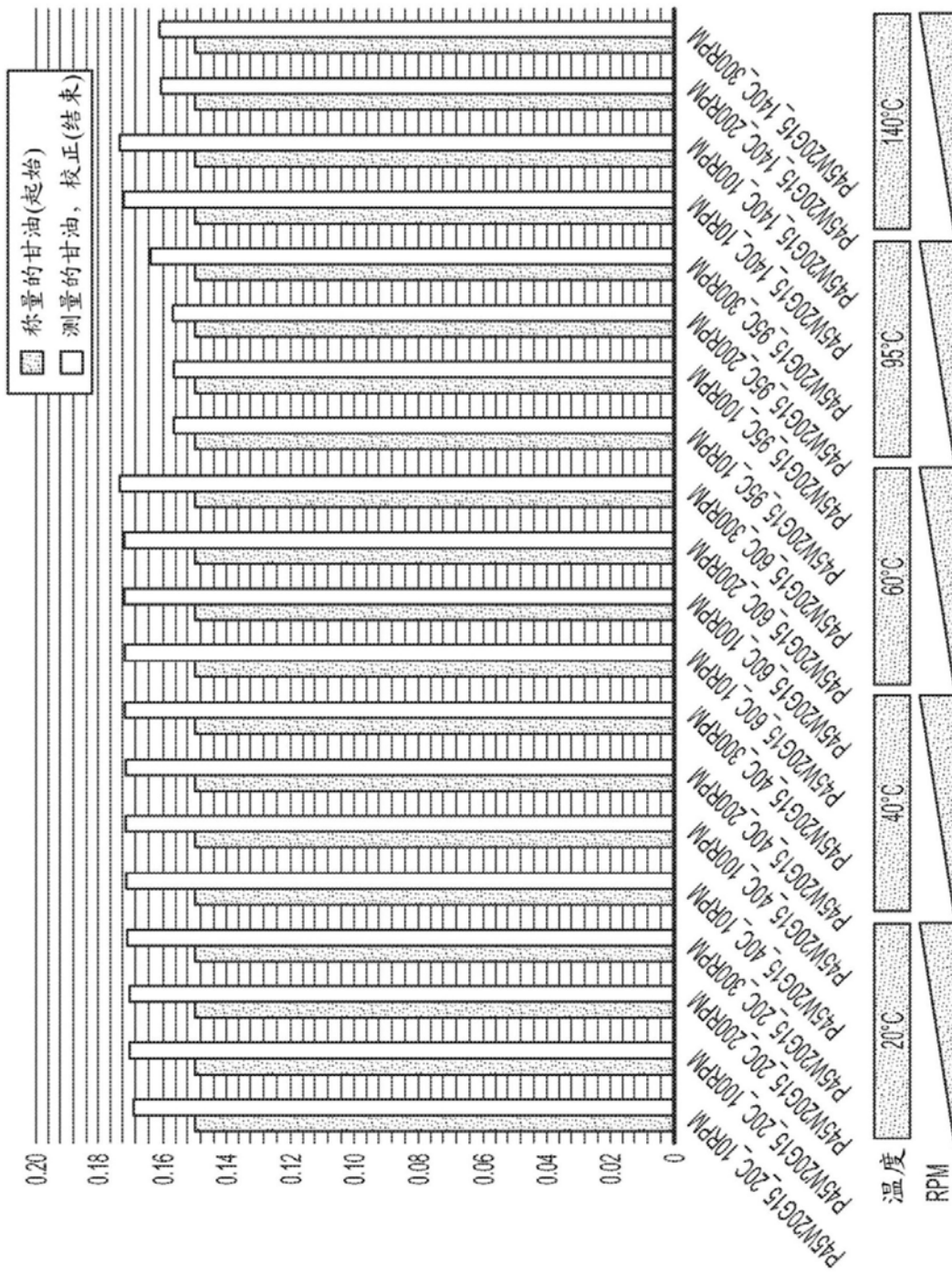


图13

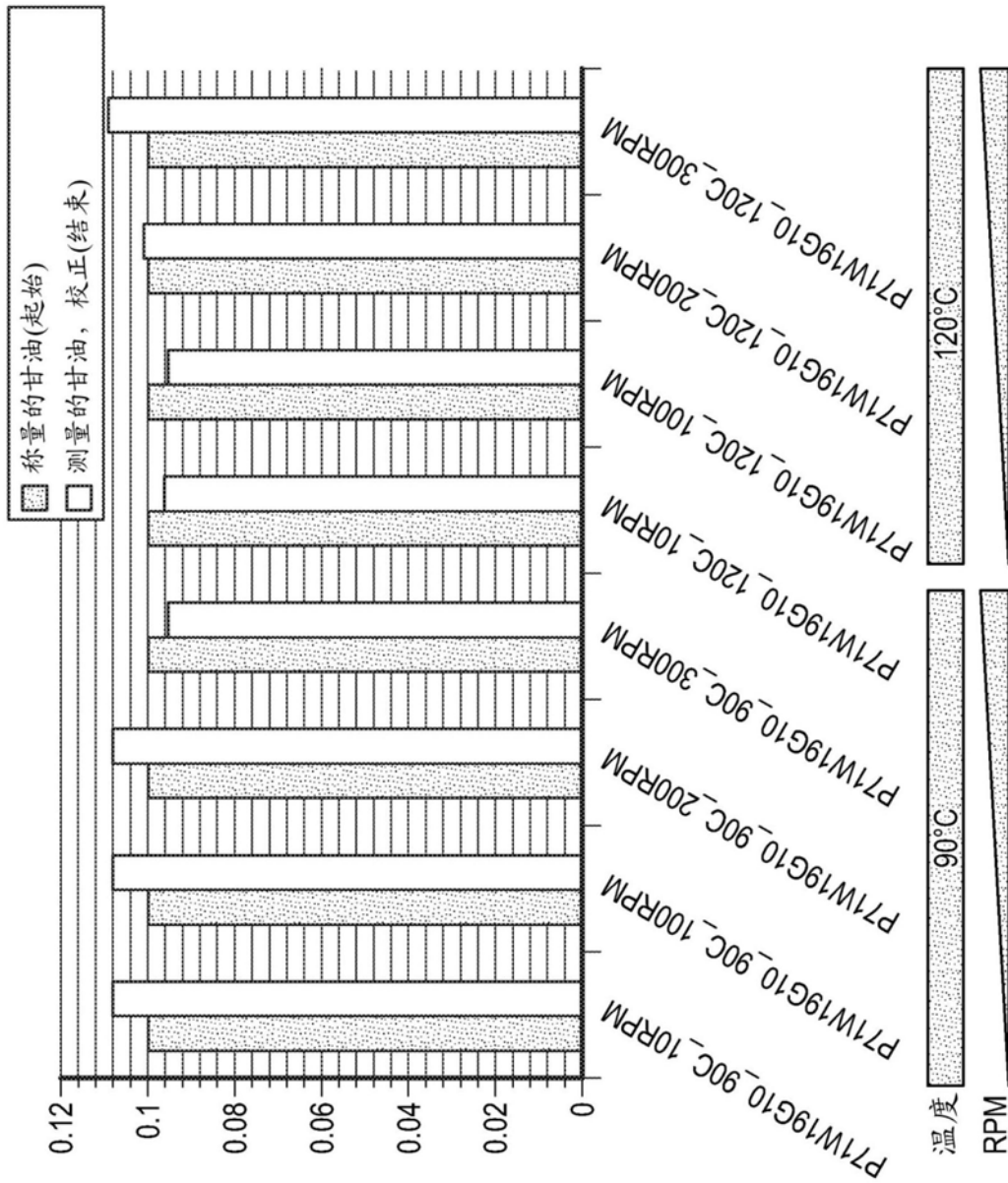


图14