(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2021-80277
(P2021-80277A)
(43)公開日　令和3年5月27日(2021.5.27)

| (51)Int.Cl. | | F I | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| C07K 14/435 | (2006.01) | C07K | 14/435 | ZNA | 4B029 |
| C12M 1/26 | (2006.01) | C12M | 1/26 | | 4H045 |

審査請求 有　請求項の数 1　OL　外国語出願　（全 129 頁）

(21)出願番号　特願2021-25963(P2021-25963)
(22)出願日　令和3年2月22日(2021.2.22)
(62)分割の表示　特願2018-143447(P2018-143447)の分割
原出願日　平成26年3月14日(2014.3.14)
(31)優先権主張番号　61/792,161
(32)優先日　平成25年3月15日(2013.3.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/830,950
(32)優先日　平成25年6月4日(2013.6.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関　米国(US)

(71)出願人　500356887
トラスティーズ　オブ　タフツ　カレッジ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０２１１１　ボストン　ハリソン　アヴェニュー　１３６
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　デイビッド　エル．　カプラン
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０１７４２，　コンコード，　ポンド　ストリート　４６

最終頁に続く

(54)【発明の名称】低分子量絹組成物および絹組成物の安定化

(57)【要約】
【課題】特定の特性および／または性質を有するある特定の絹フィブロイン組成物を提供すること。
【解決手段】一部の実施形態では、本開示は、低分子量組成物を提供する。一部の実施形態では、本開示は、活性な（例えば、生物学的な）作用物質または構成成分を含む絹フィブロイン組成物を提供する。一部の実施形態では、本開示は、活性な（例えば、生物学的な）作用物質または構成成分を含む低分子量絹フィブロイン組成物を提供する。一部の実施形態では、活性作用物質は、例えば、ある時間にわたって、かつ／またはある特定の条件もしくは事象に対して、絹組成物中で安定化される。一部の実施形態では、絹フィブロイン組成物中に存在する構成成分は、分析および／または特徴付けに供され得る。一部の実施形態では、絹フィブロイン組成物中に存在する構成成分は、組成物から回収され得る。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
本明細書および図面に記載の物、方法またはシステム。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
政府支援
本発明は、ＤＡＲＰＡによって授与された認可番号ＳＢ１１２－００５およびＮＩＨによって授与された認可番号Ｐ４１　ＥＢ００２５２０の下での政府支援によって行われた。政府は、本発明においてある特定の権利を有する。
【背景技術】
【０００２】
背景
活性作用物質および／または生体試料の安定化およびその後の回収は、多くの用途の極めて重要なフィーチャであり、理由は、活性作用物質および／または生体試料が、周囲条件、例えば、温度、湿度、および／または光の変化に対して通常不安定で感受性であるためである。活性作用物質または生体試料が所与の反応にとって有用であると同定されていても、その適用は、プロセス条件下での長期安定性の欠如によって妨害されることが多い。
【０００３】
活性作用物質（例えば、酵素、ワクチンを含めた治療用タンパク質、および／または生体試料（例えば、血液および／または血液構成成分））を安定化する様々な方法が利用および研究されており、これらとしては、コールドチェーン貯蔵、凍結乾燥、共有結合性固定化、およびセルロースベース技術がある。しかし、すべてのこれらの方法は、極度のエネルギー必要量、または活性作用物質および／もしくは生体試料の芳しくない回収率などの欠点を持つ。これらの欠点は、オンデマンドまたはポイントオブケア用途における選択肢をさらに制限する。したがって、処置、診断、検出、および／または分析のために、活性作用物質および／または生体試料（例えば、周囲条件における）を安定化し、安定化された試料から十分な量で様々な分析物を回収することを可能にすることができる改善された技術および／もしくは生成物、または新しい材料の必要性が存在する。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００４】
概要
本開示は、新規かつ／または予想外の構造的および／または機能的特性および／または性質を有するある特定の絹フィブロイン組成物を提供する。本開示は、このような組成物を作製および／または使用する方法、ならびにこれらで構成され、またはこれらから構成される物品を提供する。一部の実施形態では、提供される組成物は、活性な（例えば、生物学的な）作用物質または構成成分を含む。一部の実施形態では、活性作用物質または構成成分は、例えば、絹フィブロインならびに／または特定の構造的および／もしくは機能的特性および／もしくは性質の項目を欠くその他は同等の条件と比較して、組成物中で安定化されている。
【０００５】
とりわけ、本明細書に記載の様々な態様の実施形態は、低分子量絹フィブロインベース絹材料が、いくつかの用途に適したユニークな材料性質をもたらすという発見に端を発する。以下で詳細に記載するように、本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン組成物は、慣例的な絹フィブロインベース材料と比較して明らかに異なる、または改善されたある特定の材料特性をもたらす。したがって、一態様では、ある範囲の分子量を有する絹フィブロイン断片の集団を含む低分子量絹フィブロイン組成物であって、集団中の絹フィブロイ

ン断片の総数の１５％以下が、２００ｋＤａを超える分子量を有し、集団中の絹フィブロイン断片の総数の少なくとも５０％が、指定範囲内の分子量を有し、指定範囲は、約３．５ｋＤａから約１２０ｋＤａの間、または約５ｋＤａから約１２５ｋＤａの間であることを特徴とする、低分子量絹フィブロイン組成物が本明細書に提供されている。

【０００６】

別の言い方をすれば、本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン組成物は、ある範囲の分子量を有する絹フィブロイン断片の集団であって、集団中の絹フィブロイン断片の総モル数の１５％以下が、２００ｋＤａを超える分子量を有し、集団中の絹フィブロイン断片の総モル数の少なくとも５０％が、指定範囲内の分子量を有し、指定範囲は、約３．５ｋＤａから約１２０ｋＤａの間、または約５ｋＤａから約１２５ｋＤａの間であることを特徴とする、絹フィブロイン断片の集団を含み得る。

【０００７】

低分子量絹フィブロイン組成物は、様々な形態で存在し得る。一部の実施形態では、低分子量絹フィブロイン組成物は、水溶液である。本発明者らは、とりわけ、本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン溶液とともに組み込まれた、または混合された作用物質（例えば、それだけに限らないが、タンパク質、核酸、例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、および／もしくはこれらの修飾体など、治療剤、ワクチン）、または試料（例えば、生体試料）は、広範囲の温度下である時間にわたって安定化され得ることを意外にも発見した。一部の実施形態では、低分子絹フィブロイン溶液とともに組み込まれた、または混合された作用物質または試料は、例えば、周囲条件（例えば、室温）および／または高温条件（例えば、６０℃）を含めた様々な条件のいずれかの下で、ある時間、例えば、少なくとも２４時間またはそれ超にわたって安定化され得る。

【０００８】

一部の実施形態では、低分子量絹フィブロイン組成物は、固体状態形態、例えば、絹フィブロイン物品であり得る。絹フィブロイン物品の例として、それだけに限らないが、フィルム、シート、ゲルまたはヒドロゲル、メッシュ、マット、不織マット、布地、スキャフォールド、チューブ、スラブまたはブロック、繊維、粒子、粉末、３次元構築物、インプラント、発泡体またはスポンジ、針、凍結乾燥物品、およびこれらの任意の組合せを挙げることができる。一部の実施形態では、絹フィブロイン物品は、生体吸収性のインプラント、組織スキャフォールド、縫合糸、補強材料、医療用デバイス、コーティング、構成材料、創傷包帯材、組織シーラント、布地、織物製品、およびこれらの任意の組合せであり得る。

【０００９】

一部の実施形態では、低分子量絹フィブロイン物品は、さらなる処理のために低分子量絹フィブロイン溶液中に容易に再構成される。一部の実施形態では、本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン物品は、水溶液中で少なくとも５％またはそれ超の溶解性を有し得る。すなわち、低分子量絹フィブロイン物品の総重量または体積の少なくとも５％またはそれ超が水溶液中に溶解または再構成し得る。一部の実施形態では、本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン物品は、水溶液中で例えば、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、またはそれ超を含めた５％超またはそれ超の溶解性を有し得る。一部の実施形態では、本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン物品は、室温で可溶性であり得、または再構成され得る。一部の実施形態では、本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン物品は、室温で脱イオン水などの水中で可溶性であり得、または再構成され得る。一部の実施形態では、低分子量絹フィブロイン物品は、オンデマンド用途で使用され得る。

【００１０】

一部の実施形態では、本明細書に記載の低分子絹フィブロイン物品は、参照絹フィブロイン組成物（例えば、慣例的な絹フィブロインベース材料）と比べて、水溶液中で増強された溶解性を有し得る。一部の実施形態では、水溶液中の低分子絹フィブロイン物品の溶

解性は、参照絹フィブロイン組成物の溶解性と比較して、少なくとも約５％またはそれ超増強され得る。例えば、水溶液中の低分子絹フィブロイン物品の溶解性は、参照絹フィブロイン組成物の溶解性と比較して、例えば、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、またはそれ超を含めた５％超またはそれ超増強され得る。一部の実施形態では、水溶液中の低分子絹フィブロイン物品の溶解性は、参照絹フィブロイン組成物の溶解性と比較して、少なくとも約１．１倍またはそれ超増強され得る。例えば、水溶液中の低分子絹フィブロイン物品の溶解性は、参照絹フィブロイン組成物の溶解性と比較して、例えば、少なくとも約１．５倍、少なくとも約２倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍、少なくとも約５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約７倍、少なくとも約８倍、少なくとも約９倍、少なくとも約１０倍、またはそれ超を含めた１．１倍超またはそれ超増強され得る。一部の実施形態では、水溶液は、水であり得る。一部の実施形態では、水溶液は、緩衝液、例えば、それだけに限らないが、リン酸緩衝液であり得る。

【００１１】

一部の実施形態では、本明細書に記載の低分子絹フィブロイン物品は、その中に少なくとも１種の作用物質または試料（例えば、生体試料）をその作用物質または試料の安定化および後続のこれらの回収のために封入するのに使用することができる。一部の実施形態では、作用物質または試料の部分的な、または元の装填量は、水溶液中の低分子絹フィブロイン物品の一部分またはアリコートを溶解させることによって、低分子絹フィブロイン物品の少なくとも一部分またはアリコートから回収され得る。一部の実施形態では、低分子絹フィブロイン物品の一部分またはアリコートは、室温で水溶液（例えば、それだけに限らないが、脱イオン水などの水または緩衝液）中に溶解され得る。一部の実施形態では、本明細書に記載の低分子絹フィブロイン物品中に封入された活性作用物質または試料（例えば、生体試料）は、水溶液中で少なくとも５％またはそれ超の回収率を有し得る。すなわち、活性作用物質または試料の元の装填量の少なくとも５％またはそれ超が、溶液または液体形態で低分子絹フィブロイン物品から回収され得る。一部の実施形態では、本明細書に記載の低分子絹フィブロイン物品中に封入された活性作用物質または試料（例えば、生体試料）は、水溶液中で例えば、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、またはそれ超を含めた５％超またはそれ超の回収率を有し得る。

【００１２】

一部の実施形態では、低分子絹フィブロイン物品は、参照絹フィブロイン組成物中に封入された作用物質または試料の回収率と比べて、その中に封入された作用物質または試料の回収率を増強することができる。一部の実施形態では、低分子絹フィブロイン物品中に封入された作用物質または試料の回収率は、参照絹フィブロイン組成物中に封入された作用物質または試料の回収率と比較して、少なくとも約５％またはそれ超増強され得る。例えば、低分子絹フィブロイン物品中に封入された作用物質または試料の回収率は、参照絹フィブロイン組成物中に封入された作用物質または試料の回収率と比較して、例えば、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、またはそれ超を含めた５％超またはそれ超増強され得る。一部の実施形態では、低分子絹フィブロイン物品中に封入された作用物質または試料の回収率は、参照絹フィブロイン組成物中に封入された作用物質または試料の回収率と比較して、少なくとも約１．１倍またはそれ超増強され得る。例えば、低分子絹フィブロイン物品中に封入された作用物質または試料の回収率は、参照絹フィブロイン組成物中に封入された作用物質または試料の回収率と比較して、例えば、少なくとも約１．５倍、少なくとも約２倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍、少なくとも約５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約７倍、少なくとも約８倍、少なくとも約９倍、少なくとも約１

０倍、またはそれ超を含めた１．１倍超またはそれ超増強され得る。一部の実施形態では、水溶液は、緩衝液、例えば、それだけに限らないが、リン酸緩衝液であり得る。一部の実施形態では、本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン物品を再構成するのに緩衝液（例えば、それだけに限らないが、リン酸緩衝液）を使用すると、非緩衝液（例えば、水）を使用することと比較して、低分子量絹フィブロイン物品中に組み込まれた活性作用物質または試料の回収率を改善することができる。

【００１３】

本明細書に記載の異なる態様の様々な実施形態では、参照絹フィブロイン組成物は、大気沸点で約６０分またはそれ未満、例えば、６０分未満、５０分未満、４０分未満、３０分未満、２０分未満、１０分未満、またはそれ未満にわたって絹繭を精練する（degumming）ことによって生成される組成物または混合物であり得る。一実施形態では、参照絹フィブロイン組成物は、大気沸点で炭酸ナトリウム水溶液中で約６０分またはそれ未満、例えば、６０分未満、５０分未満、４０分未満、３０分未満、２０分未満、１０分未満、またはそれ未満にわたって絹繭を精練することによって生成される組成物または混合物であり得る。

【００１４】

本明細書に提供される別の態様は、絹フィブロイン物品を含む保存安定性（shelf-stable）組成物であって、絹フィブロイン物品は、本明細書に記載の低分子絹フィブロイン組成物の１つまたは複数の実施形態を含む、保存安定性組成物に関する。一部の実施形態では、保存安定性組成物は、絹フィブロイン物品の材料性質が少なくとも１カ月またはそれ超安定なままであるという点で保存安定性である。一部の実施形態では、保存安定性組成物は、粉末を含めた粒子の形態で存在する低分子量絹フィブロイン組成物を含み得る。

【００１５】

一般に、本開示は、ある特定の絹フィブロイン組成物が、活性（例えば、生物学的）かつ／または不安定な実体の組込みに特に有用であるという認識を包含する。一部の実施形態では、生体試料またはその構成成分などの活性かつ／または不安定な作用物質を含む絹組成物が提供される。一部の実施形態では、提供される絹組成物（例えば、低分子量絹フィブロイン組成物を含む）は、活性かつ／または不安定な作用物質を安定化させる（例えば、生体試料またはその構成成分を安定化させる）。

【００１６】

粉末を含めた低分子量絹フィブロイン粒子は、任意の当技術分野で認識されている方法によって生成され得るが、一部の実施形態では、低分子量絹フィブロイン粒子は、低分子量絹フィブロイン溶液を凍結乾燥に供し、それによって凍結乾燥低分子量絹フィブロイン材料または粒子を形成するステップを含むプロセスによって生成され得る。一部の実施形態では、凍結乾燥低分子量絹フィブロイン材料または粒子は、より小さい粒子にさらに低減することができる。一実施形態では、凍結乾燥低分子量絹フィブロイン材料または粒子は、より小さい粒子または粉末を生成するためにさらに粉砕することができる。したがって、本明細書に提供される別の態様は、低分子量絹フィブロイン粉末を含む保存安定性試薬である。一部の実施形態では、低分子量絹フィブロイン粉末は、凍結乾燥粉末であり得る。保存安定性試薬は、キットの一部として、あるいは容器、例えば、バイアル、シリンジ、もしくは試料収集容器、例えば、血液収集容器、またはマルチウェルプレート内に提供され得る。

【００１７】

本明細書に記載の様々な実施形態は、本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン組成物の１つまたは複数の実施形態、および安定化されることが望まれる作用物質を含む貯蔵に安定した組成物であって、作用物質は、低分子量絹フィブロイン組成物に付随しており、またはその中に組み込まれている、貯蔵に安定した組成物を提供する。一部の実施形態では、安定化されることが望まれる作用物質は、活性作用物質であり得る。例えば、一部の実施形態では、タンパク質、ペプチド、核酸分子、および／または修飾核酸分子を、低分子量絹フィブロイン組成物中で安定化させることができる。一部の実施形態では、安定化

されることが望まれる作用物質は、治療剤であり得る。一部の実施形態では、安定化されることが望まれる作用物質は、疾患または障害の診断マーカーであり得る。一部の実施形態では、安定化されることが望まれる作用物質は、試料中に存在する１種または複数の構成成分についてアッセイされる試料であり得る。一部の実施形態では、試料は、生体試料であり得る。

【００１８】

本明細書に提供されるさらに別の態様は、本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン組成物の１つまたは複数の実施形態、および基材を含む絹フィブロイン物品に関する。低分子量絹フィブロイン組成物は、基材中に分散させることができ、基材上に沈着させることができ、またはこれらの組合せであり得る。

【００１９】

本明細書に提供される別の態様は、絹フィブロイン溶液を形成する方法であって、本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン組成物の１つまたは複数の実施形態を液体中に溶解させるステップを含み、絹フィブロイン溶液は、均質溶液である、方法である。一実施形態では、液体は、水、例えば、それだけに限らないが、脱イオン水である。本明細書において、用語「均質溶液」は一般に、溶液全体にわたって一様な外観または組成を有する溶液を指す。例えば、均質絹フィブロイン溶液中の絹フィブロイン断片または粒子のサイズは一般に、小さすぎて例えば、肉眼で見ることができず、または検出することができない。別の言い方をすれば、均質絹フィブロイン溶液は、絹フィブロイン凝集体（例えば、不溶性の絹フィブロイン断片、絹フィブロイン粒子、および／またはクラスター）を実質的に含まない。絹フィブロイン凝集体の例として、それだけに限らないが、全長絹フィブロイン分子、より大きい絹フィブロイン断片、より小さい絹フィブロイン断片のアセンブリーまたは凝集によって形成される絹フィブロイン粒子またはクラスター、およびこれらの任意の組合せを挙げることができる。

【００２０】

本明細書に提供される別の態様は、本明細書に記載の絹フィブロイン組成物の１つまたは複数の実施形態中で、ある特定の条件下である時間にわたって作用物質を安定化させる方法に関する。一部の実施形態では、作用物質は、周囲条件下で安定化され得る。

【００２１】

本明細書に提供されるさらなる態様は、少なくとも１種の活性作用物質を回収する方法であって、（ａ）本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン組成物の１つまたは複数の実施形態、本明細書に記載の保存安定性組成物の１つまたは複数の実施形態、または本明細書に記載の貯蔵に安定した記載の組成物の１つまたは複数の実施形態を準備するステップであって、少なくとも１種の活性作用物質が組成物中で安定化される、ステップと、（ｂ）水中に組成物の少なくとも一部分を溶解させ、それによって絹フィブロインおよび検出可能または測定可能な量の少なくとも１種の活性作用物質を含む試料溶液を形成するステップとを含む、方法である。

【００２２】

本明細書に提供されるさらに別の態様は、絹フィブロイン組成物の少なくとも１つの性質をモジュレートする方法であって、絹フィブロイン組成物中で、２００ｋＤａを超える分子量を有する組成物中の絹フィブロイン断片と指定範囲内の分子量を有する組成物中の絹フィブロイン断片の重量比を変化させるステップを含み、指定範囲は、約３．５ｋＤａから約１２０ｋＤａの間、または約５ｋＤａから約１２５ｋＤａの間である、方法である。

【００２３】

本明細書に提供されるなお別の態様は、絹フィブロイン粒子のサイズを調節する方法であって、２つのステップ、すなわち、（ａ）絹フィブロイン溶液中で、２００ｋＤａを超える分子量を有する溶液中の絹フィブロイン断片と指定範囲内の分子量を有する溶液中の絹フィブロイン断片の重量比を変化させるステップであって、指定範囲が、約３．５ｋＤａから約１２０ｋＤａの間、または約５ｋＤａから約１２５ｋＤａの間である、ステップ

と、（ｂ）絹フィブロイン溶液から絹フィブロイン粒子を形成するステップとを含む、方法である。

【００２４】

絹フィブロインは、ベータシート二次構造をとり得るアミノ酸配列の１つまたは複数の部分を有するポリペプチドの一例である。例えば、絹フィブロイン構造は一般に、配列の１つまたは複数の部分が、交互するグリシンおよびアラニン、またはアラニン単独によって一般に特徴付けられる、アミノ酸の配列を含む。理論に束縛されることを望むわけではないが、このような構成は、フィブロイン分子がベータシート高次構造にセルフアセンブルすることを可能にする。したがって、さらに別の態様では、交互するグリシンおよびアラニン、またはアラニン単独によって特徴付けられるアミノ酸配列の１つまたは複数の部分を有し、約３．５ｋＤａから約１２０ｋＤａの間、または約５ｋＤａから約１２５ｋＤａの間の範囲のある範囲の分子量を有するポリペプチド断片の集団を含む組成物が本明細書に提供される。一部の実施形態では、組成物は、集団中のポリペプチド断片の総数の１５％以下が、２００ｋＤａを超える分子量を有し、集団中のポリペプチド断片の総数の少なくとも５０％が、指定範囲内の分子量を有し、指定範囲は、約３．５ｋＤａから約１２０ｋＤａの間、または約５ｋＤａから約１２５ｋＤａの間であることを特徴とする。

【００２５】

別の態様では、本明細書に記載の組成物および／または方法中の絹フィブロインは、ベータシート構造を含み、またはアミノ酸配列に基づいてこのような構造を形成する傾向を有する他の非絹ポリペプチドと置き換えることができ、またはそれと組み合わせて使用することができる。したがって、本明細書に提供されるものには、ベータシート形成ポリペプチド断片の集団を含むポリペプチド組成物も含まれる。一部の実施形態では、本明細書に記載のベータシート形成ポリペプチド断片の集団は、集団中のベータシート形成ポリペプチド断片の総数の１５％以下が、２００ｋＤａを超える分子量を有し、集団中のベータシート形成ポリペプチド断片の総数の少なくとも５０％が、指定範囲内の分子量を有し、指定範囲は、約３．５ｋＤａから約１２０ｋＤａの間、または約５ｋＤａから約１２５ｋＤａの間であることを特徴とするある範囲の分子量を有することができる。

【００２６】

本明細書において、用語「ベータシート形成ポリペプチド」は、ベータシート二次構造をとるアミノ酸配列の１つまたは複数の部分を有するポリペプチドを指す。一部の実施形態では、ベータシート形成ポリペプチドは、ベータシート構造、またはアミノ酸配列に基づいてこのような構造を形成する傾向を有することに基づいて選択され得る。

【００２７】

一部の実施形態では、ベータシート形成ポリペプチドは、両親媒性の性格を有し得る（すなわち、親水性および疎水性の両方の性質および／または部分を有する）。両親媒性ポリペプチドは、単一の源（例えば、天然に存在するタンパク質）から得ることができ、ポリペプチド内に疎水性モジュールまたはストレッチおよび親水性モジュールまたはストレッチの両方を含有することができ、その結果、単一のポリペプチド自体が天然に両親媒性である。一部の実施形態では、疎水性モジュールまたはストレッチおよび親水性モジュールまたはストレッチを一緒に融合し、またはカップリングさせて両親媒性実体を形成することができる。このような「融合」または「キメラ」ポリペプチドは、組換え技法、化学的カップリング、または両方を使用して生成され得る。

【００２８】

一部の実施形態では、ベータシート形成ポリペプチドは、以下のリストから選択されるポリペプチドのアミノ酸配列の１つまたは複数の部分を含み得る：フィブロイン、アクチン、コラーゲン、カテニン、クローディン、コイリン、エラスチン、エラウニン、エクステンシン、フィブリリン、ラミン、ラミニン、ケラチン、チューブリン（tublin）、ウイルス構造タンパク質、ゼインタンパク質（種子貯蔵タンパク質）、およびこれらの任意の組合せ。

【００２９】

一部の実施形態では、ベータシート形成ポリペプチドは、天然源由来の再生（例えば、精製）タンパク質、異種系で産生された組換えタンパク質、合成の、もしくは化学的に生成されたペプチド、またはこれらの組合せを含み得る。

【００３０】

一部の実施形態では、ベータシート形成ポリペプチドは、天然または野生型対応物と比較して、１つまたは複数の配列バリエーションの有無にかかわらず、上記に提供したリストのいずれか１つに対応するポリペプチドのアミノ酸配列の１つまたは複数の部分を含み得る。例えば、一部の実施形態では、このようなバリアントは、野生型配列と比較して少なくとも８５％の全体的な配列同一性、例えば、少なくとも８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％の全体的な配列同一性を示し得る。

【００３１】

本特許または出願ファイルは、少なくとも１つのカラー図面を含有する。カラー図面を有する本特許または特許出願公開の写しは、必要な料金を支払って要求すれば当局（ｔｈｅ　Ｏｆｆｉｃｅ）から提供されよう。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

（項目１）

ある範囲の分子量を有する絹フィブロイン断片の集団を含む低分子量絹フィブロイン組成物であって、

前記集団中の前記絹フィブロイン断片の総数の１５％以下が、２００ｋＤａを超える分子量を有し、

前記集団中の前記絹フィブロイン断片の前記総数の少なくとも５０％が、指定範囲内の分子量を有し、

前記指定範囲が、約３．５ｋＤａ以上の下限と約１２０ｋＤａ以下の上限との間であることを特徴とする低分子量絹フィブロイン組成物。

（項目２）

前記指定範囲の前記下限が、３．５、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、または１１５ｋＤａであり、

前記指定範囲の前記上限が、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、または１２０ｋＤａである、

項目１に記載の低分子量絹フィブロイン組成物。

（項目３）

前記指定範囲が、（ｉ）約５～１２０ｋＤａの間；（ｉｉ）約１０～１２０ｋＤａの間；（ｉｉｉ）約１５～１２０ｋＤａの間；（ｉｖ）２０～１２０ｋＤａの間；（ｖ）２０～１１０ｋＤａの間；（ｖｉ）約２０～１００ｋＤａの間；（ｖｉｉ）約２０～９０ｋＤａの間；（ｖｉｉｉ）約２０～８０ｋＤａの間；（ｉｘ）約３０～１２０ｋＤａの間；（ｘ）約３０～１００ｋＤａの間；（ｘｉ）約３０～９０ｋＤａの間；（ｘｉｉ）約３０～８０ｋＤａの間；（ｘｉｉｉ）約４０～１００ｋＤａの間；および（ｘｉｖ）約４０～９０ｋＤａの間である、項目１または２に記載の低分子量絹フィブロイン組成物。

（項目４）

総絹フィブロイン断片集団の約３５％以下が、約１２０ｋＤａ～約２００ｋＤａの範囲内の分子量を有する、項目１から３のいずれかに記載の低分子量絹フィブロイン組成物。

（項目５）

前記集団中の前記絹フィブロイン断片の前記総数の少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、または少なくとも８５％が、前記指定範囲の分子量を有する、項目１から４のいずれかに記載の低分子量絹フィブロイン組成物。

（項目６）

前記組成物が溶液である、項目１から５のいずれかに記載の低分子量絹フィブロイン組成物。
（項目７）
前記組成物が固体形態にある、項目１から５のいずれかに記載の低分子量絹フィブロイン組成物。
（項目８）
前記低分子量絹フィブロイン組成物が参照絹フィブロイン組成物の水溶性より高い水溶性を有することを特徴とする、項目７に記載の低分子量絹フィブロイン組成物。
（項目９）
前記低分子量絹フィブロイン組成物が約１ｍｇ／ｓ～約１００ｍｇ／ｓの溶解速度を有することを特徴とする、項目７に記載の低分子量絹フィブロイン組成物。
（項目１０）
項目１から５のいずれか一項に記載の低分子量絹フィブロイン組成物を含む絹フィブロイン水溶液。
（項目１１）
前記絹フィブロインが、約０．１％ｗｔ／ｖ～約５０％ｗｔ／ｖの濃度で前記溶液中に存在する、項目１０に記載の絹フィブロイン水溶液。
（項目１２）
前記絹フィブロイン水溶が少なくとも３日間、少なくとも７日間、または少なくとも２週間、安定なままであることを特徴とする、項目１０に記載の絹フィブロイン水溶液。
（項目１３）
項目１から５のいずれかに記載の低分子絹フィブロイン組成物を含む絹フィブロイン物品であって、フィルム、シート、ゲルまたはヒドロゲル、メッシュ、マット、不織マット、布地、スキャフォールド、チューブ、ブロック、繊維、粒子、粉末、３次元構築物、インプラント、発泡体、針、凍結乾燥物品、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される形態にある、絹フィブロイン物品。
（項目１４）
前記絹フィブロイン物品が、水中に再可溶化して絹フィブロイン凝集体を実質的に含まない絹フィブロイン溶液を形成する能力によって特徴付けられる、項目１３に記載の物品。
（項目１５）
絹フィブロイン粒子を含む組成物であって、前記絹フィブロイン粒子が、項目１から５のいずれか一項に記載の低分子量絹フィブロイン組成物を含む、組成物。
（項目１６）
前記組成物が少なくとも１カ月にわたって保存安定性であることを特徴とする、項目１５に記載の組成物。
（項目１７）
項目１から５のいずれかに記載の低分子量絹フィブロイン組成物および前記低分子量絹フィブロイン組成物中に分布した活性作用物質を含む組成物。
（項目１８）
前記組成物が溶液、フィルム、シート、ゲルまたはヒドロゲル、メッシュ、マット、不織マット、布地、スキャフォールド、チューブ、ブロック、繊維、粒子、粉末、３次元構築物、インプラント、発泡体、針、凍結乾燥物品、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される形態にある、項目１７に記載の組成物。
（項目１９）
前記組成物が溶液である、項目１７に記載の組成物。
（項目２０）
前記組成物が固体形態にある、項目１７に記載の組成物。
（項目２１）
前記組成物が、水中に再可溶化して絹フィブロイン凝集体を実質的に含まない絹フィブ

ロイン溶液を形成する能力によって特徴付けられる、項目２０に記載の組成物。
（項目２２）
検出可能な量の前記活性作用物質が、前記組成物の再可溶化の後に回収され得る、項目２１に記載の組成物。
（項目２３）
項目１から５のいずれか一項に記載の低分子量絹フィブロイン組成物、および基材を含む物品であって、前記絹フィブロイン断片が、前記基材中に分散しているか、前記基材上に沈着しているか、またはこれらの組合せである、物品。
（項目２４）
前記基材が、固体多孔質基材であるか、またはそれを含む、項目２３に記載の物品。
（項目２５）
前記固体多孔質基材が紙を含む、項目２４に記載の物品。
（項目２６）
絹フィブロイン溶液を形成する方法であって、水中に非飽和濃度で項目１４に記載の絹フィブロイン物品または項目２１に記載の組成物を溶解させ、それによって絹フィブロイン凝集体を実質的に含まない絹フィブロイン溶液を形成するステップを含む、方法。
（項目２７）
前記溶液中の溶解した絹フィブロインが、安定なままである、項目２６に記載の方法。
（項目２８）
ある時間にわたって作用物質を安定化させる方法であって、前記作用物質を項目１から５のいずれかに記載の低分子量絹フィブロイン組成物と接触させ、その結果、作用物質含有組成物が形成されるステップを含む、方法。
（項目２９）
前記低分子量絹フィブロイン組成物が、溶媒を実質的に含まず、かつ／または前記接触させるステップが、溶媒を実質的に含まない条件下で実施される、項目２８に記載の方法。
（項目３０）
前記低分子量絹フィブロイン組成物およびその中に分布した前記作用物質を含む絹フィブロイン溶液または絹フィブロイン物品を形成するステップをさらに含む、項目２９に記載の方法。
（項目３１）
室温またはそれ超で、ある時間にわたって前記絹フィブロイン溶液を維持するステップをさらに含む、項目２６に記載の方法。
（項目３２）
室温またはそれ超で、ある時間にわたって前記作用物質含有組成物を維持するステップをさらに含む、項目２８に記載の方法。
（項目３３）
ある時間にわたって水溶液中で作用物質を安定化させる方法であって、前記作用物質を項目１０から１２のいずれかに記載の絹フィブロイン水溶液と接触させるステップを含む、方法。
（項目３４）
前記低分子量絹フィブロイン組成物およびその中に分布した前記作用物質を含む絹フィブロイン物品を形成するステップをさらに含む、項目２８に記載の方法。
（項目３５）
室温またはそれ超で、ある時間にわたって前記絹フィブロイン溶液または前記絹フィブロイン物品中で前記作用物質を維持するステップをさらに含む、項目３４に記載の方法。
（項目３６）
前記時間が、約２４時間もしくはそれ超、または約１週間もしくはそれ超である、項目３１に記載の方法。
（項目３７）

前記時間が、約２４時間もしくはそれ超、または約１週間もしくはそれ超である、項目３２に記載の方法。
（項目３８）
前記時間が、約２４時間もしくはそれ超、または約１週間もしくはそれ超である、項目３５に記載の方法。
（項目３９）
少なくとも１種の活性作用物質を回収する方法であって、
組成物中に分布した少なくとも１種の活性作用物質を含む固体絹フィブロイン組成物を準備するステップと、
水中に前記組成物の少なくとも一部分を溶解させ、それによって絹フィブロインおよび検出可能な量の前記少なくとも１種の活性作用物質を含む試料溶液を形成するステップとを含む、方法。
（項目４０）
前記少なくとも１種の活性作用物質が、血液もしくは血液構成成分であるか、または血液もしくは血液構成成分を含む、項目３９に記載の方法。
（項目４１）
前記絹フィブロイン組成物が、ある範囲の分子量を有する絹フィブロイン断片の集団から構成されているという点で低分子量絹フィブロイン組成物であり、
前記集団中の前記絹フィブロイン断片の総数の１５％以下が、２００ｋＤａを超える分子量を有し、
前記集団中の前記絹フィブロイン断片の前記総数の少なくとも５０％が、指定範囲内の分子量を有し、
前記指定範囲が、約３．５ｋＤａ以上の下限と約１２０ｋＤａ以下の上限との間であることを特徴とする、項目３９または項目４０に記載の方法。
（項目４２）
前記試料溶液を少なくとも１種の流体工学ベースアッセイに供して、前記少なくとも１種の活性作用物質を検出するステップをさらに含む、項目４１に記載の方法。
（項目４３）
前記少なくとも１種の活性作用物質が、試料に由来する、項目４１に記載の方法。
（項目４４）
前記試料が、対象の生体試料に由来する、項目４３に記載の方法。
（項目４５）
絹フィブロイン組成物の少なくとも１つの性質をモジュレートする方法であって、前記絹フィブロイン組成物中で、２００ｋＤａを超える分子量を有する前記組成物中の絹フィブロイン断片と指定範囲内の分子量を有する前記組成物中の絹フィブロイン断片との重量比を変化させるステップを含み、前記指定範囲が、約３．５ｋＤａから約１２０ｋＤａの間である、方法。
（項目４６）
絹粒子のサイズを調節する方法であって、（ａ）絹フィブロイン溶液中で、２００ｋＤａを超える分子量を有する前記溶液中の絹フィブロイン断片と指定範囲内の分子量を有する前記溶液中の絹フィブロイン断片との重量比を変化させるステップであって、前記指定範囲が、約３．５ｋＤａから約１２０ｋＤａの間である、ステップと、（ｂ）前記絹フィブロイン溶液から前記絹粒子を形成するステップとを含む、方法。
（項目４７）
絹フィブロインを含む絹ベース材料および生体試料を含む組成物であって、前記生体試料の少なくとも１種の構成成分の少なくとも１つの性質が、ある時間にわたって安定化され、前記生体試料の前記少なくとも１種の構成成分が、前記時間後に検出可能である、組成物。
（項目４８）
前記少なくとも１つの性質が、活性、完全性、量、物理的もしくは構造的性質、化学的

性質、生物学的性質、またはこれらの任意の組合せを含む、項目４７に記載の組成物。
（項目４９）
前記時間が、少なくとも約２４時間、または少なくとも約１週間である、項目４７または４８に記載の組成物。
（項目５０）
前記絹ベース材料が、溶液、フィルム、繊維、粒子、ゲル、ヒドロゲル、発泡体、スポンジ、マット、メッシュ、布地、粉末、コーティング層、これらの凍結乾燥形態、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される形態にある、項目４７に記載の組成物。
（項目５１）
前記絹ベース材料が溶解可能である、項目４７に記載の組成物。
前記生体試料が、対象から収集される、項目１から６のいずれかに記載の絹ベース材料。
（項目５２）
前記生体試料が、前記絹ベース材料中に組み込まれる前に予め処理される、項目４７に記載の組成物。
（項目５３）
前記生体試料が、細胞、組織、血液（例えば、全血、血漿、臍帯血、血小板、および血清を含む）、泌乳産物（例えば、乳）、羊膜液、痰、尿、唾液、粘液、精液、脳脊髄液、気管支吸引液、汗、鼻汁、膣液、液化糞、滑液、リンパ液、涙、気管吸引液、またはこれらの画分もしくはこれらの組合せであるか、またはそれらを含む、項目４７に記載の組成物。
（項目５４）
前記少なくとも１種の構成成分が、ペプチド、タンパク質、抗体、酵素、アミノ酸、核酸（例えば、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、遺伝子、調節領域および終結領域を含む遺伝子、自己複製系、例えば、ウイルスまたはプラスミドＤＮＡなど、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ｍＲＮＡ、プレｍＲＮＡ、一本鎖および二本鎖のｓｉＲＮＡおよび他のＲＮＡ干渉試薬（ＲＮＡｉ剤またはｉＲＮＡ剤）、ｓｈＲＮＡ（ショートヘアピンＲＮＡ）、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマー、リボザイム、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、プレｍｉＲＮＡ、ならびに修飾ＲＮＡ）、ヌクレオチド、代謝産物、脂質、糖、糖タンパク質、ペプチドグリカン、微生物、細胞、ならびにこれらの任意の組合せからなる群から選択される、項目４７に記載の組成物。
（項目５５）
前記絹フィブロインと前記生体試料との比が、約１：１０００～約１０００：１、または約１：１～約１０００：１である、項目４７に記載の組成物。
（項目５６）
前記絹ベース材料が、少なくとも約５０重量％の絹フィブロインを含む、項目４７に記載の組成物。
（項目５７）
前記絹ベース材料が、約０．２５％～約５０％（ｗ／ｖ）の絹フィブロイン、または約０．５％～約１０％（ｗ／ｖ）の絹フィブロインを含む絹溶液から調製される、項目４７に記載の組成物。
（項目５８）
基材をさらに含み、前記絹ベース材料が、前記基材の表面上に層を形成する、項目４７に記載の組成物。
（項目５９）
前記基材が、ディップスティック、セルロースベース製品、マイクロタイタープレート、検体容器、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、項目５８に記載の組成物。
（項目６０）
前記生体試料の前記少なくとも１種の構成成分が、
少なくとも１回の凍結融解サイクル；

０℃超の温度；
光（例えば、ＵＶ）曝露；
少なくとも約１０％の相対湿度；または
これらの任意の組合せ
からなる群から選択される少なくとも１つの条件に供される、項目４７に記載の組成物。
（項目６１）
ａ．絹フィブロインおよび生体試料を含む混合物を準備するステップと、
ｂ．前記混合物から絹ベース材料を形成するステップであって、前記絹ベース材料が、絹フィブロインおよび生体試料を含む、ステップと
を含み、前記生体試料の少なくとも１種の構成成分の少なくとも１つの性質が、ある時間にわたって安定化され、前記試料の前記少なくとも１種の構成成分が、前記時間後に検出可能である、方法。
（項目６２）
前記生体試料を前記絹フィブロインと接触させて前記混合物を形成するステップをさらに含む、項目６１に記載の方法。
（項目６３）
ステップａの前記混合物を乾燥させるステップをさらに含む、項目６１に記載の方法。
（項目６４）
前記乾燥させるステップが、凍結乾燥を含む、項目６３に記載の方法。
（項目６５）
前記乾燥させるステップが、空気乾燥を含む、項目６３に記載の方法。
（項目６６）
前記絹ベース材料が、前記混合物に電界をかけることによって形成される、項目６１に記載の方法。
（項目６７）
前記絹ベース材料を低減して粒子にするステップをさらに含む、任意の項目６１に記載の方法。
（項目６８）
前記絹ベース材料が、溶液キャスティング、塩浸出、凍結乾燥、ガス形成、エレクトロスピニング、ゲル化、繊維のドローイング、コーティング、吹き付け、微小化、またはこれらの任意の組合せを含むプロセスを使用して調製される、項目６１に記載の方法。
（項目６９）
生体試料を収集するためのチャンバーを備える生体試料収集デバイスであって、前記チャンバーが絹フィブロインを含む、生体試料収集デバイス。
（項目７０）
絹フィブロイン材料を含む生体試料収集デバイスを含むキット。
（項目７１）
ゲル化誘導剤を含有する少なくとも１つの容器をさらに含む、項目７０に記載のキット。
（項目７２）
前記ゲル化誘導剤が、機能的に活性化されたＰＥＧ構成成分、ｐＨ低減剤、またはこれらの組合せを含む、項目７１に記載のキット。
（項目７３）
絹可溶化剤を含有する容器をさらに含む、項目７０に記載のキット。
（項目７４）
前記絹可溶化剤が、水、緩衝液、またはこれらの組合せを含む、項目７３に記載のキット。
（項目７５）
安定剤を含有する容器をさらに含み、前記安定剤が、生体試料の少なくとも１種の構成成分を安定化させる、項目７３に記載のキット。

（項目７６）
前記安定剤が、サッカリド、糖アルコール、イオン、界面活性剤、アミノ酸、ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ゼラチン、およびゼラチン誘導体、抗酸化剤、またはこれらの任意の組合せからなる群から選択される、項目７５に記載のキット。
（項目７７）
前記安定剤が、ヌクレアーゼまたはプロテイナーゼ阻害剤である、項目７５に記載のキット。
（項目７８）
前記安定剤が、ＲＮａｓｅ阻害剤である、項目７５に記載のキット。
（項目７９）
生体試料の少なくとも１種の構成成分を検出するための作用物質を含有する容器をさらに含む、項目７１のいずれかに記載のキット。
（項目８０）
前記作用物質が、構成成分精製剤、核酸増幅剤、免疫親和性ベース検出剤、またはこれらの任意の組合せからなる群から選択される、項目７９に記載のキット。
（項目８１）
項目４７に記載の組成物を準備するステップと、
前記生体試料の少なくとも１種の構成成分を少なくとも１種の分析に供するステップとを含む方法。
【図面の簡単な説明】
【００３２】
【図１】図１は、１０、２０、３０または６０分間精練した絹の溶解試験のためのプロセスフローダイヤグラムを示す。凍結乾燥条件および可溶化比も示している。
【００３３】
【図２】図２は、４つの分子量バンド（２００ｋＤａ超、２００～１１６．３ｋＤａ、１１６．３～６６．３ｋＤａおよび６６．３～３６．５ｋＤａ）の割合を計算するために使用した方法を示す。このゲルについて、溶液中に７．５μｇのタンパク質を、Ｍａｒｋ１２（商標）未着色標準品（範囲３１～２００ｋＤａ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して、ＮｕＰＡＧＥ（登録商標）Ｎｏｖｅｘ（登録商標）３～８％トリスアセテートゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）での還元条件下で実行した。図２Ａは、１０、２０、３０、６０分間精練するか、または６０分間オートクレーブ処理した絹についてのＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析の代表的な画像を示す。図２Ｂは、電気泳動ゲルについて実施した代表的なデンシオメトリック画像分析を示す。生のピクセル強度を、分子量の関数としてプロットしている。各分子量バンドの割合は、特定の分子量バンドの合計強度をすべての分子量バンドの合計強度で除することによって計算することができる。
【００３４】
【図３Ａ】図３Ａは、４℃で保存した絹発泡体から作製された絹フィブロイン溶液についてのＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの画像である。
【図３Ｂ】図３Ｂは、図３Ａのゲルデータからの、一次乾燥を施された絹フィブロインの分子量分布を示す。
【図３Ｃ】図３Ｃは、図３Ａのゲルデータからの、一次および二次乾燥を施された絹フィブロインの分子量分布を示す。
【００３５】
【図４Ａ】図４Ａは、２２℃で保存した絹発泡体から作製された絹フィブロイン溶液についてのＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの画像である。
【図４Ｂ】図４Ｂは、図４Ａのゲルデータからの、一次乾燥を施された絹フィブロインの分子量分布を示す。
【図４Ｃ】図４Ｃは、図４Ａのゲルデータからの、一次および二次乾燥を施された絹フィブロインの分子量分布を示す。
【００３６】

【図５Ａ】図５Ａは、３７℃で保存した絹発泡体から作製された絹フィブロイン溶液についてのＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの画像である。
【図５Ｂ】図５Ｂは、図５Ａのゲルデータからの、一次乾燥を施された絹フィブロインの分子量分布を示す。
【図５Ｃ】図５Ｃは、図５Ａのゲルデータからの、一次および二次乾燥を施された絹フィブロインの分子量分布を示す。
【００３７】
【図６Ａ－Ｄ】図６は、絹発泡体溶解度対ローディングを示す。様々な繭煮沸時間（１０～６０分間煮沸、ＭＢ）で作製された絹フィブロイン溶液を、図１に示したプロセスフローダイヤグラムにしたがって、精製したままの溶液（Ａ、Ｂ）およびオートクレーブ処理した溶液（Ｃ、Ｄ）を使用して凍結乾燥した。２０ｍｇか、４０ｍｇかまたは８０ｍｇの粉砕した粉末を脱イオン水に加えて１ｍＬの最終体積にした。次いでこの混合物を１０００ｒｐｍで遠心分離にかけて不溶性タンパク質をペレット化し、上清を除去し、フィルムを重量／体積（ｗ／ｖ％）濃度測定用にキャストした。図６Ａおよび図６Ｃは、様々な煮沸時間および質量ローディングについてｗ／ｖ％を示す。点線は、完全理論溶解度をもとにした可能な最大ｗ／ｖ％濃度（それぞれ２、４および８％）を示す。図６Ｂおよび図６Ｄは、凍結乾燥のために使用した対応する溶液の分子量を示す。ここでは、溶液中に７．５μｇのタンパク質を、ＨｉＭａｒｋ（商標）事前染色タンパク質標準品（範囲３０～４６０ｋＤａ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して、ＮｕＰＡＧＥ（登録商標）Ｎｏｖｅｘ（登録商標）３～８％トリスアセテートゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）での還元条件下で実行した。
【図６Ｅ】図６は、絹発泡体溶解度対ローディングを示す。様々な繭煮沸時間（１０～６０分間煮沸、ＭＢ）で作製された絹フィブロイン溶液を、図１に示したプロセスフローダイヤグラムにしたがって、精製したままの溶液（Ａ、Ｂ）およびオートクレーブ処理した溶液（Ｃ、Ｄ）を使用して凍結乾燥した。２０ｍｇか、４０ｍｇかまたは８０ｍｇの粉砕した粉末を脱イオン水に加えて１ｍＬの最終体積にした。次いでこの混合物を１０００ｒｐｍで遠心分離にかけて不溶性タンパク質をペレット化し、上清を除去し、フィルムを重量／体積（ｗ／ｖ％）濃度測定用にキャストした。図６Ｅは、異なるフォーマットでの図６Ａおよび図６Ｃにおけるデータを提示しており、これは再構成された絹フィブロイン溶液の濃度（ｍｇ／ｍＬ）および溶解度の割合を示す。
【００３８】
【図７】図７は、非晶質シートからβシートへの変換を確認するＦＴＩＲスペクトルを示す。回収された精製したままのもの（左側）またはオートクレーブ処理したもの（右側）から作製されたフィルムを、９０％メタノールで１時間処理する前後に測定した。様々な繭煮沸時間（１０～６０ＭＢ、上から下へ）により形成されたフィルムを、４セットすべてのグラフにわたって、すべて異なる質量ローディング（２０、４０、８０ｍｇ）を含めて示す。
【００３９】
【図８】図８は、６カ月の乾式保存後、一次乾燥サイクルだけを使用して形成させた、絹発泡体についての溶解度を示す。様々な繭煮沸時間（１０～６０分間煮沸、ＭＢ）で作製された絹フィブロイン溶液を、一次乾燥（だけ）のプロトコールを使用して凍結乾燥した。凍結乾燥サイクルが完了し、表示した温度（４℃、２２℃、３７℃）で６カ月保存した後、次いで各発泡体の１５ｍｇの粉砕した粉末を９８５μＬの脱イオン水に再可溶化させた。（Ａ）溶解損失が無視できると仮定して、各再構成溶液からの７．５μｇタンパク質ローディングを、ＨｉＭａｒｋ（商標）事前染色タンパク質標準品（範囲３０～４６０ｋＤａ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して、ＮｕＰＡＧＥ（登録商標）Ｎｏｖｅｘ（登録商標）３～８％トリスアセテートゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）での還元条件下で実行した。次いで、この混合物を１０００ｒｐｍで遠心分離にかけ、不溶性タンパク質をペレット化し（Ｂ）、上清を除去し、フィルムをｗ／ｖ％濃度測定用にキャストした（Ｃ）。点線は、完全理論溶解度をもとにした可能な最大ｗ／ｖ％濃度（１．５％）を示す。

【００４０】
【図９】図９は、６カ月の乾式保存後に一次乾燥サイクルと二次乾燥サイクルの両方を使用して形成させた絹発泡体についての溶解度を示す。様々な繭煮沸時間（１０～６０分間煮沸、ＭＢ）で作製された絹フィブロイン溶液を、一次＋二次乾燥プロトコールを使用して凍結乾燥した。凍結乾燥サイクルが完了し、表示した温度（４℃、２２℃、３７℃）で６カ月保存した後、次いで各発泡体の１５ｍｇの粉砕した粉末を９８５μＬの脱イオン水に再可溶化させた。（Ａ）溶解損失が無視できると仮定して、各再構成溶液からの７．５μｇタンパク質ローディングを、ＨｉＭａｒｋ（商標）事前染色タンパク質標準品（範囲３０～４６０ｋＤａ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して、ＮｕＰＡＧＥ（登録商標）Ｎｏｖｅｘ（登録商標）３～８％トリスアセテートゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）での還元条件下で実行した。次いで、この混合物を１０００ｒｐｍで遠心分離にかけ、不溶性タンパク質をペレット化し（Ｂ）、上清を除去し、フィルムをｗ／ｖ％濃度測定用にキャストした（Ｃ）。点線は、完全理論溶解度をもとにした可能な最大ｗ／ｖ％濃度（１．５％）を示す。
【００４１】
【図１０】図１０は、（Ａ）厚肉フィルムおよび（Ｂ）薄肉フィルムについて、模擬的な老化条件における絹フィルム溶解度を示す。様々な煮沸時間のフィルム（オートクレーブ処理した溶液から形成させた６０ＭＢフィルムも）を、０日目と比較して、４０ｍｇの試料を超純水に溶解する前に、４℃、２２℃および３７℃で６カ月保持した。点線は、完全理論溶解度をもとにした可能な最大ｗ／ｖ％濃度（４％）を示す。
【００４２】
【図１１】図１１は、溶液およびフィルム設計をもとにした絹の回収率の調整を示す。表１に示すＥＬＩＳＡキットを使用して、４０ｍｇの重量の絹フィルムを１ｍＬ（最終体積）のＰＢＳに溶解し、フィルムからの試料回収率を、凍結血漿アリコートをもとにして最大理論ローディング値に対して正規化した。異なる煮沸時間（１０～６０分間煮沸、ＭＢ）を使用して形成させた絹溶液を血漿かまたは血液と混合し、フィルムをいずれか２つの厚さ（厚肉ｖｓ．薄肉）にキャストした。線は、２元配置ＡＮＯＶＡ試験の中からのα＝０．０５レベルの有意性での群の間の有意差を示す。図１１Ａおよび図１１Ｂは、（Ａ）絹－血漿フィルムおよび（Ｂ）絹－血液フィルムからのフィブリノゲン回収率を示す。図１１Ｃおよび図１１Ｄは、（Ｃ）絹－血漿フィルムおよび（Ｄ）絹－血液フィルムからのＣ反応性タンパク質（ＣＲＰ）回収率を示す。
【００４３】
【図１２】図１２は、（Ａ）精製したままの絹フィブロイン溶液、および（Ｂ）オートクレーブ処理した絹フィブロイン溶液からのｂＦＧＦ回収率を示す。ＰＢＳの添加は、煮沸時間、濃度または精製したまま対オートクレーブ処理に関係なく、ｂＦＧＦを改善した。ＰＢＳの添加によって溶液を７．２の最終ＰＨに緩衝化させた。ｂＦＧＦは、４％溶液より１％溶液において安定であった。６０ＭＢ絹溶液は、精製したままの条件とオートクレーブ処理した条件の両方について、最高のｂＦＧＦの回収率を有していた。点線は、対照条件としてのＰＢＳ単独の場合を示す。精製したままの絹、３７℃での改善されたｂＦＧＦ回収率は、ゲル化した１０ＭＢ群が全体としてより劣るｂＦＧＦ回収率を有している点で、図１３Ａの吸光度データと関連付けることができる。
【００４４】
【図１３】図１３Ａおよび図１３Ｂは、それぞれ３７℃で１週間保存した、精製したままの絹フィブロイン溶液およびオートクレーブ処理した絹フィブロイン溶液についてのゲル化結果を示す。図１３Ａの星印はゲル化を示しており、これは、１％および４％１０ＭＢ溶液だけがゲル化していることを示している。図１３Ｂでは、６０ＭＢ群からのシグナルは、試料における白みがかった着色の結果であり、吸光度の読み取りにおいてゲル化についての誤陽性をもたらすが、これらの試料はゲル化しなかった。図１３は、オートクレーブ処理した試料のどれも１週間後、ゲル化しておらず、６０ＭＢ群のどれも１週間後、ゲル化していなかったことを示す。

【００４５】
【図１４Ａ】図１４Ａは、それぞれ４℃、２２℃および３７℃で２週間にわたる、精製したままの絹フィブロイン溶液についてのゲル化状態を示す。星印はゲル化を示す。星印はついていないがベースラインを上回って上昇している試料は、まだプレゲル化状の溶液である。１０ＭＢ群からの試料は、より長い煮沸時間での試料より、急速にゲル化する傾向がある。４％濃度での群は、１％の群より、急速にゲル化する傾向がある。ＰＢＳ含有群は、未緩衝化試料よりゲル化が遅い。
【図１４Ｂ】図１４Ｂは、それぞれ４℃、２２℃および３７℃で２週間にわたってオートクレーブ処理した絹フィブロイン溶液についてのゲル化状態を示す。星印はゲル化を示す。６０ＭＢ群からのシグナルは、試料における白みがかった着色の結果であり、吸光度の読み取りにおいてゲル化についての誤陽性をもたらすが、これらの試料はゲル化しなかった。１０ＭＢ群からの試料は、より長い煮沸時間での試料より、急速にゲル化する傾向がある。４％濃度での群は、１％の群より、急速にゲル化する傾向がある。ＰＢＳ含有群は、未緩衝化試料よりゲル化が遅い。
【００４６】
【図１５】図１５は、厚肉および薄肉の絹フィルムの調製を示す概略図である。様々な繭煮沸時間（１０～６０分間煮沸、ＭＢ）により作製された絹フィブロイン溶液を並行して精製し、それぞれを４％ｗｔ／ｖの濃度に希釈し、１．５ｍＬを、厚肉フィルム（３×２．５ｃｍ直径のキャスティング表面）かまたは薄肉フィルム（３×表面上に７．５ｃｍ直径のキャスティング）としてキャストした。１．５ｍＬの体積を、ピペット先端を使用してできるだけ広く拡げて、薄肉フィルムを作製した。
【００４７】
【図１６】図１６は、完全溶解のための絹フィルムの最適化を示す棒グラフである。様々な繭煮沸時間（１０～６０分間煮沸、ＭＢ）で作製した絹フィブロイン溶液を、厚肉フィルム（２．５ｃｍ直径キャスティング表面）かまたは薄肉フィルム（７．５ｃｍ直径キャスティング表面）としてキャストした。終夜空気乾燥させた後、次いで各フィルムの４０ｍｇクーポンを１ｍＬの脱イオン水に再可溶化させ、得られた溶液のｗｔ％を測定した。点線は、完全理論溶解度をもとにした可能な最大ｗ／ｖ％濃度（４％）を示す。
【００４８】
【図１７】図１７は、完全溶解のための絹発泡体の最適化を示す棒グラフである。様々な繭煮沸時間（１０～６０分間煮沸、ＭＢ）で作製した絹フィブロイン溶液を、一次乾燥プロトコールまたは一次＋二次乾燥プロトコールを使用して凍結乾燥した。凍結乾燥サイクルが完了した後、次いで各発泡体の１５ｍｇの粉砕した粉末を１ｍＬの脱イオン水に再可溶化させ、得られた溶液のｗｔ％を測定した。点線は、完全理論溶解度をもとにした可能な最大ｗ／ｖ％濃度（１．５％）を示す。
【００４９】
【図１８】図１８は、模擬的な老化条件での厚肉絹フィルム溶解度を示す棒グラフである。４０ｍｇの試料を超純水（ＵＰＷ）に溶解する前に、図１６（０日目）からのデータと比較して、変動させた煮沸時間のフィルム（オートクレーブ処理した溶液から形成させた６０ＭＢフィルムも）を、４℃、２２℃および３７℃で６カ月保持した。点線は、完全理論溶解度をもとにした可能な最大ｗ／ｖ％濃度（４％）を示す。
【００５０】
【図１９】図１９は、模擬的な老化条件での薄肉絹フィルム溶解度を示す棒グラフである。４０ｍｇの試料をＵＰＷ水に溶解する前に、図２（０日目）からのデータと比較して、変動させた煮沸時間の薄肉フィルム（オートクレーブ処理した溶液から形成させた６０ＭＢフィルムも）を、４℃、２２℃および３７℃で６カ月間保持した。点線は、完全理論溶解度をもとにした可能な最大ｗ／ｖ％濃度（４％）を示す。
【００５１】
【図２０】図２０は、本明細書で説明する一実施形態にしたがったフィルム調製およびフィルム溶解を示す一組の写真である。

【００５２】
【図２１】図２１は、血液安定化絹フィルムから回収されたＥＬＩＳＡによる、バイオマーカーの測定を示す一組のデータグラフである。３０ＭＢフィブロインから作製された絹溶液を、全血と混合した後、フィルムに成形し、その後「薄肉」の試料で空気乾燥した。１０ｍｇまたは４０ｍｇの重量のクーポンを１ｍＬのＰＢＳ（それぞれ１％および４％ｗ／ｖローディング）に溶解し、濃度変換は理論ローディング量（１ｍＬ血液：絹比中に５０μＬ）をもとにした。アッセイ標準曲線を右側に示した。ブランク（ロードしていない）絹フィルムも、陰性アッセイ対照として使用した。
【００５３】
【図２２】図２２は、血液および血漿安定化絹フィルムから回収したＬｕｍｉｎｅｘＴＭによる種々のバイオマーカーの測定値を示す一組のデータグラフである。２０ｍｇの重量の絹フィルムクーポンを１ｍＬのＰＢＳに溶解し、２５μＬアリコートを、３つの別個のＣＶＤバイオマーカーキットを使用して、Ｌｕｍｉｎｅｘ２００ＴＭ機器で実行した。試料（測定される血漿クーポンおよび血液クーポン）を、１：２００および１：２０００希釈した後にとり、１：２，０００希釈した後の凍結したドナーに適合させた（ｄｏｎｏｒ-ｍａｔｃｈｅｄ）血漿アリコートと比較した。内部標準によって絶対的定量化が提供され、血漿および血液クーポンの理論ローディング量を計算するのに必要な変換は、上記計算をもとにした。ブランク（ロードしていない）絹フィルムも可溶化し、陰性アッセイ対照として使用した。すべての試料を３連で実行し、平均±ＳＤを示した。＊は、ドナー２＆３（ｐ＜０．０５レベルで）と比較した場合に検出された有意差を示す。バーは、凍結血漿アリコートをもとにして計算されたローディング値と適合させたクーポン回収率とが一致していることを示す。
【００５４】
【図２３】図２３は、ＬｕｍｉｎｅｘおよびＥＬＩＳＡアッセイフォーマットで決定された血漿濃度を比較する一組の棒グラフである。絶対的検出レベルを比較するために、凍結血漿アリコートをＬｕｍｉｎｅｘ２００システムおよびＭｉｌｌｉｐｏｒｅ　ＥＭＤ　ＣＶＤ１パネルを用いて１：２００×希釈（表５を参照されたい）で実行し、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ製のＥＬＩＳＡキット（表２を参照されたい）を用いて１：１０×希釈で実行した。ＣＲＰアッセイには対数軸（左側）を使用し、ＰＡＩ－１アッセイには線形軸（右側）を使用していることに留意されたい。
【００５５】
【図２４】図２４は、異なる温度に曝露させた後３０日目での血液および血漿安定化絹フィルムからの、ＬｕｍｉｎｅｘＴＭで判定した種々のバイオマーカーの回収率パーセントを示す一組の棒グラフである。２０ｍｇの重量の絹フィルムクーポンを１ｍＬのＰＢＳに溶解し、２５μＬアリコートを、Ｎ＝３のドナーについて、Ｌｕｍｉｎｅｘ２００ＴＭ機器で実行した。同じ条件で保存した液体血漿アリコートを、同様にして分析した。内部標準によって絶対的定量化が提供され、血漿および血液クーポン理論ローディング量を計算するのに必要な変換は、以前の計算をもとにした（４月の報告）。３ドナーの回収率％の値を平均し、±ＳＤを示した。回収率％を、分析物レベルを０日目の血漿レベルで除したもの×１００％と定義した。バーは群間の有意差（ｐ＜０．０５レベルで）を示す。点線は、－２０℃保存、３０日目の値を示す。＄は１００％から逸脱したクーポンレベルを示す。＊は、Ｌｕｍｉｎｅｘシステムから２０～３０％の範囲の％ＣＶ値を示す。
【００５６】
【図２５】図２５は、異なる温度に曝露させた後４カ月での血液および血漿安定化絹フィルムからの、ＬｕｍｉｎｅｘＴＭで判定した種々のバイオマーカーの回収率パーセントを示す一組の棒グラフである。２０ｍｇの重量の絹フィルムクーポンを１ｍＬのＰＢＳに溶解し、２５μＬアリコートをＮ＝３のドナーについてＬｕｍｉｎｅｘ２００ＴＭ機器で実行した。すべての条件は３０日目の場合と同じである。同じ条件で保存した液体血漿アリコートを、同様にして分析した。内部標準によって絶対的定量化が提供された。３ドナーの回収率％の値を平均し、±ＳＤを示した。回収率％を、分析物レベルを０日目の血漿レ

ベルで除したもの×１００％と定義した。バーは群間の有意差（ｐ＜０．０５レベルで）を示す。点線は、－２０℃保存、３０日目の値を示す。＄は１００％から逸脱したクーポンレベルを示す。＊は、Ｌｕｍｉｎｅｘシステムから２０～３０％の範囲の％ＣＶ値を示す。

【００５７】

【図２６】図２６は、凍結乾燥絹溶液の形態および可溶化を示す一組の写真である。（上部）ＴＥ緩衝液（ＥＤＴＡ）を含むか含まないで、６％～１％の濃度で２０ＭＢ絹フィブロインから形成された絹溶液に、一次および二次乾燥を使用して凍結乾燥を施した。溶液は、それらの１．５ｍＬの保存円錐形に適合した形状プロファイルをもたらした。（下部）凍結乾燥された溶液に水を加え、渦巻き混合させた後、絹を再可溶化させ、小さな残留発泡体断片が後に残った。その質量は絹ローディングの質量に依存した。

【００５８】

【図２７】図２７は、ＲｉｂｏＧｒｅｅｎＴＭアッセイで測定した、様々な濃度での凍結乾燥絹溶液からのｍＲＮＡ回収率を示す棒グラフである。２％～０．０５％の濃度範囲ならびに非絹ロード群（０％）で２０ＭＢ絹フィブロインから形成させた絹溶液を、一次および二次乾燥を使用して凍結乾燥させ、超純水に再可溶化し、次いでＲｉｂｏＧｒｅｅｎ試薬と混合し蛍光分析にかけた。回収した試料をｍＲＮＡの凍結したストック溶液（－８０℃）と比較した。２連のアッセイの読み取りを、すべての試料について実施した。絶対的定量化を、リボソームＲＮＡ（製造業者から供給されたもの）で作製した標準曲線に対して実施した。データはＮ＝３の試料の平均±標準偏差（ｓｔ　ｄｅｖ）を表す。

【００５９】

【図２８】図２８は、ＲｉｂｏＧｒｅｅｎＴＭアッセイで測定した、様々な濃度のＲＮＡｓｅ阻害剤含有凍結乾燥絹溶液からのｍＲＮＡ回収率を示す棒グラフである。２％～０．０５％の濃度範囲ならびに非絹ロード群（０％）で２０ＭＢ絹フィブロインから形成させた絹溶液を、ＳＵＰＥＲａｓｅ・ＩｎＴＭ　ＲＮａｓｅ阻害剤と混合し、一次および二次乾燥を使用して凍結乾燥し、超純水に再可溶化し、次いでＲｉｂｏＧｒｅｅｎ試薬と混合し蛍光分析にかけた。回収した試料をｍＲＮＡの凍結ストック溶液（－８０℃）と比較した。２連のアッセイ読み取りを、すべての試料について実施した。絶対的定量化を、リボソームＲＮＡ（製造業者から供給されたもの）で作製した標準曲線に対して実施した。データはＮ＝３の試料の平均±標準偏差を表す。

【００６０】

【図２９】図２９は、ＳｔｅｍｆｅｃｔＴＭトランスフェクションキットで凍結し回収したｍＲＮＡを使用した線維芽細胞トランスフェクションを示す一組の蛍光画像である。図２８のために使用した絹溶液を、ＳｔｅｍｆｅｃｔＴＭトランスフェクションキットの試薬とも混合した。トランスフェクション試薬を、凍結したストック（－８０℃）かまたは回収したｍＲＮＡと一緒にし、１２ｈｒ処理のために細胞に加え、次いでＧＦＰフィルターでの蛍光画像化にかけた。白い矢印は陽性ＧＦＰ発現を示す。

【００６１】

【図３０】図３０は、本明細書で説明するような診断のための絹タンパク質ベースの安定化の実施形態のまとめを提示する。

【発明を実施するための形態】

【００６２】

ある特定の定義

別段に述べられていない限り、または文脈から暗黙でない限り、以下の用語および語句は、以下に提供される意味を含む。別段に明示的に述べられていない限り、または文脈から明らかでない限り、以下の用語および語句は、その用語または語句が、それが属する技術分野で得られた意味を除外しない。定義は、特定の実施形態を説明するのに役立つように提供されており、特許請求に係る発明を限定するように意図されていない。理由は、本発明の範囲は、特許請求の範囲によってのみ限定されるためである。さらに、文脈によって別段に要求されていない限り、単数形の用語は、複数のものを含むものとし、複数形の

用語は、単数形を含むものとする。
【００６３】
１つの（ａ）：単数形の用語「ａ（１つの）」、「ａｎ（１つの）」、および「ｔｈｅ（その）」は、文脈により別段に明らかに示されていない限り複数形の指示対象を含む。同様に、単語「または」は、文脈により別段に明らかに示されていない限り、「および」を含むように意図されている。
【００６４】
約：操作例におけるもの、または別段に示されている場合以外で、本明細書で使用される成分または反応条件の量を表すすべての数値は、すべての場合において、用語「約」によって修飾されているものと理解されるべきである。用語「約」は、百分率に関連して使用される場合、参照されている値の±５％を意味し得る。例えば、約１００は、９５～１０５を意味する。
【００６５】
周囲の：本明細書において、「周囲」条件は、能動冷却、加熱などを伴わない周辺条件である。典型的には、この用語は室温を指し、室温は一般に、一般的な室内温度を記述し、２０～２５℃（６８～７７°Ｆ）の間であることが多い。一部の実施形態では、周囲温度は、０℃から６０℃の間、０℃から５０℃の間、または０℃から４０℃の間である。一部の実施形態では、周囲温度は、冷蔵庫温度（例えば、０℃から１５℃の間（両端を含む））である。一部の実施形態では、周囲温度は、室温、例えば、２０℃から３５℃の間であり、これは、地理的条件によって変化し得る。例えば、温暖気候地域、例えば、アフリカにおける室温は、冷涼気候地域、例えば、米国または英国におけるものより一般に温かくなり得る。一部の実施形態では、貯蔵温度は、少なくとも約３７℃または３７℃超であり得る。
【００６６】
抗原：本明細書において、用語「抗原」は、抗体などの選択的結合剤によって結合され得、さらに、その抗原のエピトープに結合することができる抗体の産生を誘発するのに動物において使用され得る分子または分子の一部分を指す。抗原は、１つまたは複数のエピトープを有し得る。用語「抗原」は、抗体、またはＭＨＣ分子によって提示される場合、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）によって結合され得る分子も指すことができる。用語「抗原」は、本明細書において、Ｔ細胞エピトープも包含する。抗原はさらに、免疫系によって認識され得、かつ／または体液性免疫応答および／もしくは細胞性免疫応答を誘導することができ、Ｂならびに／またはＴリンパ球の活性化をもたらす。しかしこれは、少なくともある特定の場合では、抗原がＴｈ細胞エピトープを含有し、またはこれに連結されており、アジュバントで与えられることを必要とし得る。抗原は、１つまたは複数のエピトープ（ＢおよびＴエピトープ）を有し得る。上記に参照した特異反応は、抗原が好ましくは、対応する抗体またはＴＣＲと、典型的には高度に選択的な様式で反応し、他の抗原によって誘起され得る多数の他の抗体またはＴＣＲと反応しないことを示すことを意味する。抗原は、本明細書において、いくつかの個々の抗原の混合物でもあり得る。
【００６７】
生物活性：用語「生物活性」は、活性作用物質を参照して本明細書で使用する場合、一般に、生物学的標的と相互作用し、かつ／または生物学的標的に対して効果を生じさせる、活性作用物質の能力を指す。例えば、生物活性として、限定することなく、生物学的標的における刺激性、阻害性、制御性、毒性、または致死性応答の誘発を挙げることができる。生物学的標的は、分子または細胞であり得る。例えば、生物活性は、酵素の効果／活性をモジュレートし、受容体をブロックし、受容体を刺激し、１つもしくは複数の遺伝子の発現レベルをモジュレートし、細胞増殖をモジュレートし、細胞分裂をモジュレートし、細胞モルフォロジーをモジュレートする、またはこれらの任意の組合せを行う、活性作用物質の能力を指すことができる。一部の場合では、生物活性は、細胞内に毒性効果を生じさせる、化合物の能力を指すことができる。例示的な細胞応答としては、それだけに限らないが、溶解、アポトーシス、増殖阻害、および増殖促進；細胞による目的のタンパク

質または他の分子の産生、分泌、および表面発現；受容体活性化を含めた膜表面分子活性化；膜貫通イオン輸送；転写制御；細胞の生存能の変化；細胞モルフォロジーの変化；細胞の細胞内構成成分の存在または発現の変化；遺伝子発現または転写物の変化；細胞内で産生される酵素の活性の変化；ならびにリガンドおよび／または受容体の存在または発現（例えば、タンパク質発現および／または結合活性）の変化がある。様々な細胞応答をアッセイするための方法、例えば、細胞の内因性タンパク質の存在もしくは発現の変化を判定するためのウエスタンブロット、または活性作用物質に応答した細胞モルフォロジーを監視するための顕微鏡観察、または核酸の変化を検出および定量化するためのＦＩＳＨおよび／もしくはｑＰＣＲが、当業者に周知である。生物活性は、一部の実施形態では、例えば、細胞応答をアッセイすることによって判定され得る。

【００６８】

抗体への言及において、用語「生物活性」は、それだけに限らないが、例えば、ヒト対象に投与される場合、エピトープもしくは抗原結合親和性、抗体のｉｎ　ｖｉｖｏおよび／もしくはｉｎ　ｖｉｔｒｏ安定性、抗体の免疫原性、ならびに／またはｉｎ　ｖｉｖｏもしくはｉｎ　ｖｉｔｒｏで標的分子の生物活性を中和もしくはアンタゴナイズする能力を含む。上述の性質または特性は、当技術分野で認識されている技法を使用して観察および測定することができ、この技法としては、それだけに限らないが、シンチレーション近接アッセイ、ＥＬＩＳＡ、ＯＲＩＧＥＮイムノアッセイ（ＩＧＥＮ）、蛍光消光、蛍光ＥＬＩＳＡ、競合ＥＬＩＳＡ、それだけに限らないが、ＢＩＡｃｏｒｅバイオセンサーを使用するＳＰＲ分析を含めたＳＰＲ分析、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏ中和アッセイ（例えば、国際公開第ＷＯ２００６／０６２６８５号を参照）、受容体結合、ならびにヒト、霊長類、または必要に応じて任意の他の源を含めた様々な源に由来する組織切片を用いた免疫素組織化学検査がある。免疫原への言及において、「生物活性」は、免疫原性を含み、その定義は、後に詳細に論じられている。ウイルスへの言及において、「生物活性」は、感染力を含み、その定義は、後に詳細に論じられている。造影剤、例えば、色素への言及において、「生物活性」は、対象に投与される場合、対象の体内の構造または流体のコントラストを増強する、造影剤の能力を指す。造影剤の生物活性には、それだけに限らないが、生物環境と相互作用し、かつ／またはある特定の条件下で別の分子の応答に影響するその能力も含まれる。

【００６９】

コールドチェーン：語句「コールドチェーン」は、温度調節されたサプライチェーンを指す。切れ目のないコールドチェーンは、所与の温度範囲を維持する連続した一連の貯蔵および流通活動である。これは、製品、例えば、化学物質、生物製剤、および医薬品などの有効期間を延長および保証するのを助けるのに使用される。コールドチェーンは、食物および医薬産業、ならびにまたいくつかの化学物質出荷において一般的である。医薬産業におけるコールドチェーンの典型的な温度範囲は、２～８℃である。一部の場合では、具体的な温度（および温度での時間）トレランスは、貯蔵および／または出荷されている実際の製品に依存する。

【００７０】

構成成分：本明細書において、語句の試料の「構成成分」は、検出または分析され得る試料中に存在する物理的、化学的、または生物学的な実体（例えば、それだけに限らないが、タンパク質、ペプチド、核酸、細胞、増殖因子、および／または治療剤）を指す。

【００７１】

含む（comprises）：本明細書に記載のものと同様のまたは等価な方法および材料を、本開示の実行または試験で使用することができるが、適当な方法および材料が以下に記載されている。用語「含む（comprises）」は、「含む（includes）」を意味する。略語「例えば（e.g.）」は、ラテン語のｅｘｅｍｐｌｉ　ｇｒａｔｉａに由来し、非限定例を示すのに本明細書で使用される。したがって、略語「例えば（e.g.）」は、用語「例えば（for example）」と同義である。

【００７２】

含む（comprising）：本明細書において、用語「含む（comprising）」または「含む（comprises）」は、一実施形態に有用である組成物、方法、およびこれらのそれぞれの構成成分（複数可）を参照して使用され、しかもなお、有用であるか否かにかかわらず不特定の要素を含めることを受け入れる。

【００７３】

減少する（decrease）：用語「減少する（decrease）」、「低減された」、「低減」、「減少（decrease）」または「阻害する」はすべて、一般に、統計的に有意な量による減少（decrease）を意味するように本明細書で使用される。しかし、疑念を避けるために、「低減された」、「低減」、あるいは「減少する」、あるいは「阻害する」は、参照レベルと比較して少なくとも１０％の減少、例えば、少なくとも約２０％、もしくは少なくとも約３０％、もしくは少なくとも約４０％、もしくは少なくとも約５０％、もしくは少なくとも約６０％、もしくは少なくとも約７０％、もしくは少なくとも約８０％、もしくは少なくとも約９０％、または最大で１００％の減少およびそれを含む減少（例えば、参照試料と比較して非存在レベル）、あるいは参照レベルと比較して１０～１００％の間の任意の減少を意味する。

【００７４】

本質的に：本明細書で互換的に使用されるように、用語「本質的に」および「実質的に」は、少なくとも約６０％、もしくは好ましくは少なくとも約７０％、もしくは少なくとも約８０％、もしくは少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９７％、もしくは少なくとも約９９％、またはそれ超、あるいは７０％から１００％の間の任意の整数の比率を意味する。一部の実施形態では、用語「本質的に」は、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、もしくはそれ超、または９０％から１００％の間の任意の整数の比率を意味する。一部の実施形態では、用語「本質的に」は、１００％を含み得る。

【００７５】

フィブロイン：本明細書において、用語「フィブロイン」は、カイコ絹フィブロインおよび昆虫またはクモの絹タンパク質を含む（Lucasら、Adv. Protein Chem、１３巻：１０７～２４２頁（１９５８年））。任意のタイプの絹フィブロインを、本発明の態様によって使用することができる。多種多様な種によって産生される多くの異なるタイプの絹が存在し、この種としては、限定することなく：Antheraea mylitta；Antheraea pernyi；Antheraea yamamai；Galleria mellonella；Bombyx mori；Bombyx mandarina；Galleria mellonella；Nephila clavipes；Nephila senegalensis；Gasteracantha mammosa；Argiope aurantia；Araneus diadematus；Latrodectus geometricus；Araneus bicentenarius；Tetragnatha versicolor；Araneus ventricosus；Dolomedes tenebrosus；Euagrus chisoseus；Plectreurys tristis；Argiope trifasciata；およびNephila madagascariensisがある。一部の実施形態では、フィブロインは、溶解したカイコ絹またはクモ絹を含有する溶液から得られる。カイコ絹タンパク質は、例えば、Ｂｏｍｂｙｘ ｍｏｒｉから得られ、クモ絹は、Ｎｅｐｈｉｌａ ｃｌａｖｉｐｅｓから得られる。他の絹としては、トランスジェニック絹、遺伝子操作された絹（組換え絹）、例えば、細菌、酵母、哺乳動物細胞、トランスジェニック動物、またはトランスジェニック植物に由来する絹など、およびこれらのバリアントがある。例えば、ＷＯ９７／０８３１５および米国特許第５，２４５，０１２号を参照。これらの両方の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。一部の実施形態では、絹フィブロインは、他の源、例えば、クモ、他のカイコ、ミツバチ、合成絹様ペプチド、これらのバイオ工学処理バリアントなどに由来し得る。一部の実施形態では、絹フィブロインは、カイコまたはトランスジェニックカイコの腺から抽出され得る。例えば、ＷＯ２００７／０９８９５１を参照。その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。異なる種の絹産生生物、および異なるタイプの絹は、異なるアミノ酸組成を有するが、様々なフィブロインタンパク質は、ある特定の構造的フィーチャを共有する。絹フィブロイン構造における一般的な傾向は、交互するグリシンおよびアラニン、またはアラニン単独によって特徴付けられるア

ミノ酸の配列である。このような構成は、フィブロイン分子がベータシート高次構造にセルフアセンブルすることを可能にする。これらの「Ａｌａリッチ」および「Ｇｌｙリッチ」疎水性ブロックは、嵩高い側基を有するアミノ酸のセグメント（例えば、親水性スペーサー）によって典型的には分離される。一部の実施形態では、フィブロインの疎水性ブロックのコア反復配列は、以下のアミノ酸配列および／または式によって表すことができる：(GAGAGS)5-15(配列番号1);(GX)5-15(X=V,I,A)(配列番号2);GAAS(配列番号3);(S1-2A11-13)(配列番号4);GX1-4　GGX(配列番号5);GGGX(X=A,S,Y,R,D　V,W,R,D)(配列番号6);(S1-2A1-4)1-2(配列番号7);GLGGLG(配列番号8);GXGGXG(X=L,I,V,P)(配列番号9);GPX(X=L,Y,I);(GP(GGX)1-4　Y)n(X=Y,V,S,A)(配列番号10);GRGGAn(配列番号11);GGXn(X=A,T,V,S);GAG(A)6-7GGA(配列番号12);およびGGX　GX　GXX(X=Q,Y,L,A,S,R)(配列番号13)。一部の実施形態では、フィブロインペプチドは、ペプチド内に複数の疎水性ブロック、例えば、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、および２０個の疎水性ブロックを含有し得る。一部の実施形態では、フィブロインペプチドは、４～１７個の間の疎水性ブロックを含有し得る。本発明の一部の実施形態では、フィブロインペプチドは、長さが約４～５０アミノ酸である少なくとも１つの親水性スペーサー配列（「親水性ブロック」）を含む。親水性スペーサー配列の非限定例としては、TGSSGFGPYVNGGYSG(配列番号14);YEYAWSSE(配列番号15);SDFGTGS(配列番号16);RRAGYDR(配列番号17);EVIVIDDR(配列番号18);TTIIEDLDITIDGADGPI(配列番号19)およびTISEELTI(配列番号20)がある。ある特定の実施形態では、フィブロインペプチドは、上記に列挙した代表的なスペーサー配列の任意の１つの誘導体である親水性スペーサー配列を含有し得る。このような誘導体は、親水性スペーサー配列の任意の１つと少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％同一である。一部の実施形態では、本発明に適したフィブロインペプチドは、スペーサーをまったく含有しない。絹は一般に、繊維性タンパク質であり、高分子量の反復性の高いタンパク質を形成するのに一緒に連結されたモジュラーユニットによって特徴付けられる。これらのモジュラーユニットまたはドメインは、それぞれ特定のアミノ酸配列および化学的性質を有し、特定の機能をもたらすと考えられている。例えば、ポリ－アラニン（ポリＡ）およびポリ－アラニン－グリシン（ポリ－ＡＧ）などの配列モチーフは、ベータシート形成性である傾向があり；ＧＸＸモチーフは、３１ヘリックス形成に寄与し；ＧＸＧモチーフは、剛性をもたらし；ＧＰＧＸＸ（配列番号２２）は、ベータらせん形成に寄与する。これらは、様々な絹構造中の異なる構成成分の例であり、この構成成分のポジショニングおよび配置は、絹ベース材料の最終材料性質につながっている（OmenettoおよびKaplan（２０１０年）、Science、３２９巻：５２８～５３１頁に総説されている）。ＷＯ２０１１／１３０３３５（ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０３２１９５）も参照。これらの内容は、参照により本明細書に組み込まれている。

【００７６】

増大する：用語「増大した」、「増大する」、または「増強する」、または「活性化する」はすべて、一般に統計的に有意な量の増大を意味するように本明細書で使用され、いずれの疑念も避けるために、用語「増大した」、「増大する」、あるいは「増強する」、あるいは「活性化する」は、参照レベルと比較して少なくとも１０％の増大、例えば、参照レベルと比較して少なくとも約２０％、もしくは少なくとも約３０％、もしくは少なくとも約４０％、もしくは少なくとも約５０％、もしくは少なくとも約６０％、もしくは少なくとも約７０％、もしくは少なくとも約８０％、もしくは少なくとも約９０％、または最大で１００％の増大、およびこれを含めた増大、あるいは１０～１００％の間の任意の増大、あるいは参照レベルと比較して少なくとも約２倍、もしくは少なくとも約３倍、もしくは少なくとも約４倍、もしくは少なくとも約５倍、もしくは少なくとも約１０倍の増大、または２倍から１０倍の間、もしくはそれ超の任意の増大を意味する。

【００７７】

阻害する：本明細書において、用語「阻害する」は、何かが起こることを防止すること、何かが起こる出現を遅延させること、および／または何かが起こる程度もしくは可能性

を低減することを意味する。

【００７８】

維持する：本明細書において、用語「維持する（maintaining）」、「維持する（maintain）」、および「維持」は、組成物または活性作用物質に言及している場合、活性作用物質がある特定の条件に供されるとき、絹フィブロインマトリックス中の少なくとも１種の活性作用物質の生物活性を保ち、持続させ、または保持することを意味する。一部の実施形態では、絹フィブロインマトリックス中に分布した１種または複数の活性作用物質は、その元の生物活性の少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％またはそれ超を含めた、その元の生物活性の少なくとも約３０％を保持する。

【００７９】

ナノパターン：用語「ナノパターン」または「ナノパターン化された」は、本明細書において、絹フィブロインベースマトリックス、例えば、フィルムもしくは発泡体中にもたらされる小さいパターニング、またはこのような絹フィブロインベースマトリックスを含む組成物を指す。一般に、ナノメートルスケール（すなわち、$10^{-9}$メートル）で適切に測定され得るサイズ、例えば、１ナノメートル～数ミリメートル（両端を含む）の範囲のサイズの構造的フィーチャを有するパターニング。

【００８０】

核酸：本明細書において、用語「核酸」もしくは「オリゴヌクレオチド」、または本明細書での文法的な同義語は、一緒に共有結合的に連結された、その類似体または誘導体を含めた少なくとも２つのヌクレオチドを意味する。例示的な核酸としては、それだけに限らないが、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、遺伝子、調節領域および終結領域を含む遺伝子、自己複製系、例えば、ウイルスまたはプラスミドＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ｍＲＮＡ、プレｍＲＮＡ、一本鎖および二本鎖のｓｉＲＮＡおよび他のＲＮＡ干渉試薬（ＲＮＡｉ剤またはｉＲＮＡ剤）、ｓｈＲＮＡ（ショートヘアピンＲＮＡ）、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマー、リボザイム、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、プレｍｉＲＮＡ、ならびに修飾ＲＮＡ（例えば、ロックされた核酸）などがある。核酸は、一本鎖または二本鎖であり得る。核酸は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、またはハイブリッドであり得、この場合、核酸は、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドの任意の組合せ、ならびにウラシル、アデニン、チミン、シトシン、およびグアニンの任意の組合せを含有する。核酸は、１つまたは複数の主鎖修飾、例えば、ホスホルアミド（Beaucageら、Tetrahedron、４９巻（１０号）：１９２５頁（１９９３年）およびその中の参考文献；Letsinger、J. Org. Chem.、３５巻：３８００頁（１９７０年））、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、Ｏ－メチルホスホラミダイト（O-methylphophoroamidite）連結（Eckstein、Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach、Oxford University Pressを参照）、またはペプチド核酸連結（Egholm、J. Am. Chem. Soc.、１１４巻：１８９５頁（１９９２年）；Meierら、Chem. Int. Ed. Engl.、３１巻：１００８頁（１９９２年）；およびNielsen、Nature、３６５巻：５６６頁（１９９３年）を参照）を含み得る。これらの文献のすべての内容は、参照により本明細書に組み込まれている。核酸は、ヌクレオチドの核酸塩基および／または糖部分への修飾も含み得る。糖部分における例示的な糖修飾としては、２’－ＯＨのハロゲン（例えば、フルオロ）、Ｏ－メチル（O-mehtyl）、Ｏ－メトキシエチル、$NH_2$、ＳＨ、およびＳ－メチルとの置き換えがある。

【００８１】

ポリエチレングリコール：「ＰＥＧ」は、約２０～約２０００００００の連結モノマー、典型的には約５０～１０００の連結モノマー、通常約１００～３００を含有するエチレングリコールポリマーを意味する。ポリエチレングリコールとしては、様々な数の連結モノマーを含有するＰＥＧ、例えば、PEG20、PEG30、PEG40、PEG60、PEG80、PEG100、PEG115、PEG200、PEG 300、PEG400、PEG500、PEG600、PEG1000、PEG1500、PEG2000、PEG3350、PEG4000、PEG4600、PEG5000、PEG6000、PEG8000、PEG11000、PEG12000、PEG2000000、お

よびこれらの任意の混合物がある。

【００８２】

防止する（prevent）：本明細書において、用語「防止する（preventing）」は、プロセス（例えば、病因、疾患進行など）に対する作用物質の作用を指すのに使用される場合、作用物質（例えば、治療剤）がプロセスに関連した１つまたは複数の症状または特質を発症する前に投与されるとき、このようなプロセスの程度を低減すること、および／またはその開始を遅延させることを意味する。

【００８３】

レディトゥユーズ：「レディトゥユーズ製剤」にあるような語句「レディトゥユーズ」は、エンドユーザーが使用する前にさらなる処理（例えば、製造中のステップ）を必要としない組成物または製品を指す。一部の実施形態では、レディトゥユーズ製剤は、注射準備済み製剤（すなわち、注射可能医薬品）を含む。本発明との関連で、レディトゥユーズ製剤は、投与前に希釈されるように設計されたストック製剤などの濃縮された製剤を包含する。

【００８４】

参照：用語「参照」は、例えば、参照の組成物または条件のセットなどを指すのに本明細書で使用される。当業者は、文脈から、何が特定の局面における適切な「参照」であり得るかを理解するであろう。一般に、「参照」は、意味のある比較を許容するのに、目的の組成物または条件のセットと十分な類似性を共有する。多くの実施形態では、本明細書での「参照組成物」は、慣例的な絹フィブロイン組成物（例えば、低分子量絹フィブロイン組成物でない）である。

【００８５】

ショートヘアピンＲＮＡ：用語「ｓｈＲＮＡ」は、本明細書において、ＲＮＡｉおよび／またはｓｉＲＮＡ種として機能するが、ｓｈＲＮＡ種は、安定性の増大のために二本鎖ヘアピン様構造である点で異なるショートヘアピンＲＮＡを指す。用語「ＲＮＡｉ」は、本明細書において、干渉ＲＮＡ、または遺伝子発現を阻害する核酸分子またはこれらの類似体、例えば、ＲＮＡベース分子であるＲＮＡ干渉分子を指す。ＲＮＡｉは、選択的転写後遺伝子サイレンシングの手段を指す。ＲＮＡｉは、特定のｍＲＮＡを破壊することができ、またはｍＲＮＡなどのＲＮＡのプロセシングまたは翻訳を防止する。

【００８６】

短鎖干渉ＲＮＡ：用語「短鎖干渉ＲＮＡ」（ｓｉＲＮＡ）は、「低分子干渉ＲＮＡ」とも本明細書で呼ばれ、例えば、ＲＮＡｉによって標的遺伝子の発現を阻害するように機能する作用物質として定義される。ｓｉＲＮＡは、化学合成され得、これは、ｉｎ ｖｉｔｒｏ転写によって生成され得、またはこれは、宿主細胞内で産生され得る。ｓｉＲＮＡ分子は、一方の鎖が不活化されるメッセージと同一である二本鎖ＲＮＡの切断によっても生成され得る。用語「ｓｉＲＮＡ」は、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）経路を誘導する小さい阻害性ＲＮＡデュプレックスを指す。これらの分子は、長さが様々となり得（一般に１８～３０塩基対）、アンチセンス鎖中にこれらの標的ｍＲＮＡに対する様々な程度の相補性を含有し得る。すべてではないがいくつかのｓｉＲＮＡは、センス６０鎖および／またはアンチセンス鎖の５’または３’末端に対になっていない突出塩基を有する。用語「ｓｉＲＮＡ」は、２つの別個の鎖のデュプレックス、およびデュプレックス領域を含むヘアピン構造を形成し得る一本鎖を含む。

【００８７】

溶液：用語「溶液」は、１つの相から構成される均質な混合物を広く指す。典型的には、溶液は、１種または複数の溶媒中に溶解した１種または複数の溶質を含む。これは、混合物の性質（濃度、温度、および密度など）が、体積全体にわたって均一に分布され得ることを特徴とする。したがって、本願との関連で、「絹フィブロイン溶液」は、水などの溶媒中に溶解した可溶性形態での絹フィブロインタンパク質を指す。一部の実施形態では、絹フィブロイン溶液は、固体状態絹フィブロイン材料（すなわち、絹マトリックス）、例えば、絹フィルムおよび他のスキャフォールドなどから調製され得る。典型的には、固

体状態絹フィブロイン材料は、水および緩衝液などの水溶液で再構成されて絹フィブロイン溶液になる。均質でない液体混合物、例えば、コロイド、懸濁液、エマルジョンは、溶液と見なされないことに留意されるべきである。ほんの一例だけを示すと、溶液中に懸濁された絹フィブロインミクロスフェアまたは粒子は、それ自体で絹フィブロイン溶液を構成しない。

【００８８】

安定化：本明細書において、可溶性絹フィブロインによってもたらされる作用物質の「安定化」は、作用物質が、分解、ミスフォールディング、変性、凝集、および／または不活化に対して感受性が低いように、作用物質の構造（例えば、高次構造）の完全性および対応する機能または活性を支持、促進、助長、および／または維持する絹フィブロインポリペプチドの任意の効果を指す。絹フィブロインマトリックスの安定化効果に対するより詳細な考察は、ＰＣＴ／ＵＳ１２／３４６４３（２０１２年４月２３日出願）およびZhangら、（２０１２年）、Proc. Nat’l. Acad. Sci. U.S.A.、１０９巻（３０号）：１９８１～６頁に提供されており、これらのそれぞれの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。本明細書に記載の様々な態様の実施形態によれば、生体試料の１種または複数の構成成分の少なくとも１つの性質が、任意の時間にわたって低分子量絹フィブロイン組成物内で安定化され得る。本明細書において、用語「安定化させる（stabilize）」、「安定化させる（stabilizing）」、または「安定化」は、ある時間にわたって低分子量絹ベース材料中で部分的または完全に維持または保持されている生体試料の構成成分の少なくとも１つの性質（例えば、活性、完全性、および／または量）を指す。活性の安定化に関して、一部の実施形態では、生体試料中に元来存在する構成成分の少なくとも約３０％またはそれ超（少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または最大１００％を含む）が、ある時間にわたって少なくとも部分的または完全な活性を保持することができる。別の言い方をすれば、構成成分は、ある時間にわたってその元の活性の少なくとも約３０％またはそれ超（少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または最大１００％を含む）を保持することができる。完全性の安定化に関して、生体試料中に元来存在する構成成分の少なくとも約３０％またはそれ超（少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または最大１００％を含む）が、ある時間にわたって完全性を保持することができる。量の安定化に関して、生体試料中に元来存在する構成成分の少なくとも約３０％またはそれ超（少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または最大１００％を含む）が、構成成分が活性であるか、不活性であるか、またはインタクトであるか、インタクトでないかにかかわらず、ある時間にわたって保持され得る。本明細書において、用語「元来」または「元の」は、構成成分の元の存在または元の活性を参照して使用される場合、生体試料が対象から得られた直後に測定される、または代わりに、生体試料が絹ベース材料内に混合もしくは封入される直前もしくは直後に測定される構成成分のレベルを指す。一部の実施形態では、構成成分の元の存在または元の活性は、対照、例えば、非絹手法によって安定化された対照、例えば、凍結対照中の構成成分のレベルを指す。

【００８９】

統計的に有意な：用語「統計的に有意な」または「有意に」は、統計的有意性を指し、一般に、参照レベルから離れた少なくとも２標準偏差（２ＳＤ）を意味する。この用語は、差異があるという統計的証拠を指す。これは、帰無仮説が実際に真である場合に帰無仮説を棄却する決定をする確率として定義される。

【００９０】

対象：本明細書において、「対象」は、ヒトまたは動物を意味する。通常、動物は、脊椎動物、例えば、霊長類、げっ歯類、家庭動物、または狩猟動物などである。霊長類としては、チンパンジー、カニクイザル、クモザル、およびマカク、例えば、アカゲザルがあ

る。げっ歯類としては、マウス、ラット、マーモット、フェレット、ウサギ、およびハムスターがある。家庭動物ならびに狩猟動物としては、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、バッファロー、ネコ（feline）種、例えば、飼いネコ（domestic cat）、イヌ（canine）種、例えば、イヌ（dog）、キツネ、オオカミ、トリ種、例えば、ニワトリ、エミュー、ダチョウ、ならびに魚、例えば、マス、ナマズ、およびサケがある。患者または対象は、上記の任意のサブセット、例えば、１つまたは複数の群または種、例えば、ヒト、霊長類、またはげっ歯類などを除外する上記のすべて含む。ある特定の実施形態では、対象は、哺乳動物、例えば、霊長類、例えば、ヒトである。用語「患者」および「対象」は、本明細書で互換的に使用される。

【００９１】

感受性の：本明細書において、用語「感受性の」は、全体として一般的な集団において観察されるより、何か、例えば、疾患、障害、または状態（例えば、がんなど）のリスクの増大および／または傾向（典型的には、遺伝性素因、環境要因、個人歴、またはこれらの組合せに基づいて）を有することを意味する。この用語は、ある状態について「感受性の」個体は、その状態と決して診断される場合がないことを考慮する。

【００９２】

チューブ：用語「チューブ」はここで、その中に管腔を有する細長いシャフトを指す。チューブは典型的には、細長い中空の円筒であり得るが、他の断面形状の中空シャフトであってもよい。

【００９３】

好適な実施形態を、本明細書に詳細に表し、記載してきたが、様々な改変、付加、置換などを、本発明の趣旨から逸脱することなく行うことができ、したがってこれらは、以下に続く特許請求の範囲で定義される本発明の範囲内であると見なされることが当業者に明らかとなるであろう。さらに、既に示されていない程度に、記載および例示した本明細書の様々な実施形態のいずれか１つが、本明細書に開示の他の実施形態のいずれかに示したフィーチャを組み込むようにさらに改変され得ることが当業者によって理解されるであろう。

【００９４】

本開示を、限定的であると解釈されるべきでない以下の実施例によってさらに例示する。実施例は、例示的であるだけであり、本明細書に記載の態様のいずれをも、いずれの様式においても限定するように意図されていない。以下の実施例は、本発明を決して限定しない。

【００９５】

ある特定の実施形態の詳細な説明

本発明は、本明細書に記載の特定の方法論、プロトコール、および試薬などに限定されず、したがって、様々となり得ることが理解されるべきである。本明細書で使用する専門用語は、特定の実施形態を記載する目的のためだけであり、特許請求の範囲によってもっぱら定義される本発明の範囲を限定するように意図されていない。

【００９６】

本明細書および特許請求の範囲において使用する場合、文脈により別段に明らかに示されていない限り、単数形は、複数形の参照を含み、逆の場合も同様である。操作例におけるもの、または別段に示されている場合以外で、本明細書で使用される成分または反応条件の量を表すすべての数値は、すべての場合において、用語「約」によって修飾されているものと理解されるべきである。

【００９７】

特定したすべての特許および他の刊行物は、例えば、本発明に関連して使用され得るこのような刊行物に記載された方法論を記載および開示する目的のために、参照により本明細書に明白に組み込まれている。これらの刊行物は、もっぱら本願の出願日の前にこれらが開示されているために提供されている。この点において何も、本発明者らが、先行発明によって、または任意の他の理由のためにこのような開示に先行する権利を有さないこと

を承認するものとして解釈されるべきでない。これらの文書の内容に関する日付または表現に関するすべての陳述は、出願人に利用可能な情報に基づいており、これらの文書の日付または内容の正確さに関するいずれの承認も構成しない。

【００９８】

別段に定義されていない限り、本明細書で使用するすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する当技術分野の当業者に一般に理解されるものと同じ意味を有する。任意の公知の方法、デバイス、および材料を本発明の実行または試験で使用することができるが、この点における方法、デバイス、および材料が、本明細書に記載されている。

【００９９】

低分子量組成物

本明細書に提供される一態様は、低分子量絹フィブロイン組成物に関する。本発明の一態様によれば、低分子量絹フィブロイン組成物は、ある範囲の分子量を有する絹フィブロイン断片の集団であって、集団中の絹フィブロイン断片の総数の１５％以下が、２００ｋＤａを超える分子量を有し、集団中の絹フィブロイン断片の総数の少なくとも５０％が、指定範囲内の分子量を有し、指定範囲は、約３．５ｋＤａから約１２０ｋＤａの間、または約５ｋＤａから約１２５ｋＤａの間であることを特徴とする、絹フィブロイン断片の集団を含む。

【０１００】

別の言い方をすれば、一部の実施形態では、低分子量絹フィブロイン組成物は、ある範囲の分子量を有する絹フィブロイン断片の集団であって、集団中の絹フィブロイン断片の総モル数の１５％以下が、２００ｋＤａを超える分子量を有し、集団中の絹フィブロイン断片の総モル数の少なくとも５０％が、指定範囲内の分子量を有し、指定範囲は、約３．５ｋＤａから約１２０ｋＤａの間、または約５ｋＤａから約１２５ｋＤａの間であることを特徴とする、絹フィブロイン断片の集団を含む。

【０１０１】

一部の実施形態では、低分子量絹フィブロイン組成物は、ある範囲の分子量を有する絹フィブロイン断片の集団であって、集団中の絹フィブロイン断片の総重量の１５％以下が、２００ｋＤａを超える分子量を有し、集団中の絹フィブロイン断片の総重量の少なくとも５０％が、指定範囲内の分子量を有し、指定範囲は、約３．５ｋＤａから約１２０ｋＤａの間、または約５ｋＤａから約１２５ｋＤａの間であることを特徴とする、絹フィブロイン断片の集団を含む。

【０１０２】

本明細書において、語句「絹フィブロイン断片」は、絹フィブロインタンパク質またはそのバリアントに由来する断片に対応するアミノ酸配列を有するペプチド鎖またはポリペプチドを指す。本開示との関連で、絹フィブロイン断片は一般に、集団または組成物内の絹フィブロイン断片の１つまたは複数が、300kDa未満、250kDa未満、200kDa未満、175kDa未満、150kDa未満、120kDa未満、100kDa未満、90kDa未満、80kDa未満、70kDa未満、60kDa未満、50kDa未満、40kDa未満、30kDa未満、25kDa未満、20kDa未満、15kDa未満、12kDa未満、10kDa未満、9kDa未満、8kDa未満、7kDa未満、6kDa未満、5kDa未満、4kDa未満、3.5kDaなどであるように、天然に存在する全長絹フィブロイン対応物より小さい絹フィブロインペプチド鎖またはポリペプチドを指す。

【０１０３】

一部の実施形態では、「絹フィブロイン断片の集団を含む組成物」は、絹フィブロインポリペプチドのより短い断片に加えて、断片化されていない（すなわち、全長の）絹フィブロインポリペプチドを含む組成物を包含し得る。本明細書に記載の絹フィブロイン断片は、組換えタンパク質として生成することができ、または天然の絹フィブロインタンパク質もしくは絹繭に由来し、もしくはそれから単離（例えば、精製）することができる。

【０１０４】

一部の実施形態では、絹フィブロイン断片は、所望の範囲の分子量を有する絹フィブロイン断片を生成するように選択された指定条件下で絹繭を精練することによって得ること

ができる。

【０１０５】

一部の実施形態では、絹フィブロイン断片は、大気沸点で、またはそれに近い（例えば、５％前後以内の）温度で、例えば、少なくとも７０分、少なくとも８０分、少なくとも９０分、少なくとも１００分、少なくとも１１０分、少なくとも約１２０分、またはそれ超を含めた少なくとも約６０分またはそれ超にわたって絹繭を精練することによって得ることができる。本明細書において、用語「大気沸点」は、液体が大気圧下で沸騰する温度を指す。

【０１０６】

一部の実施形態では、絹フィブロイン断片は、約９０℃～約１１０℃で、例えば、少なくとも７０分またはそれ超を含めた少なくとも６０分またはそれ超にわたって水溶液中で絹繭を精練することによって生成され得る。一部の実施形態では、絹フィブロイン断片は、大気沸点未満で、より長い時間、例えば、６０分超またはそれ超、例えば、７０分超、８０分超、９０分超、１００分超、１１０分超、１２０分超、１３０分超、１４０分超、１５０分超、またはそれ超にわたって絹繭を精練することによって得ることができる。

【０１０７】

理論に束縛されることを望むわけではないが、絹フィブロイン断片は、約７０℃の温度で、例えば、少なくとも７０分、少なくとも８０分、少なくとも９０分、少なくとも１００分、またはそれ超を含めた少なくとも６０分またはそれ超にわたって絹繭を精練することによって生成され得る。一部の実施形態では、絹フィブロイン断片は、指定条件下で絹繭を精練するステップと、結果として生じる絹フィブロイン溶液を高温および／または高圧にさらに曝すステップとを含むプロセスによって生成され得る。例えば、絹フィブロイン断片は、沸点前後で約１０分間絹繭を精練するステップと、次いで結果として生じる絹フィブロイン溶液を高温および／または高圧（例えば、オートクレーブ処理）に供するステップとを含むプロセスによって生成され得る。

【０１０８】

一実施形態では、低分子絹フィブロイン組成物の一例は、以下の通り生成され得る：絹フィブロイン調製物中に存在する全絹フィブロインの少なくとも５０ｗｔ％が、例えば、ＳＤＳゲル電気泳動によって判定される場合に、分子量の低減を示す、すなわち全長絹フィブロインより小さい（例えば、絹フィブロイン断片）ことを特徴とする絹フィブロインポリペプチドの断片化を実現するのに十分な量で、絹フィブロイン調製物が処理される（例えば、加熱および／または煮沸される）。例示するために、例えば、出発材料として合計で１．０グラムの全長絹フィブロインを含有する絹フィブロイン調製物について、加熱および／または煮沸のステップ後に、絹フィブロインの少なくとも０．５グラムは、その時点で、出発材料（例えば、全長ポリペプチド）と比較して低減された形態（より小さい断片）にある。結果として、調製物内の絹フィブロインポリペプチドの平均分子量は、低分子量絹フィブロイン組成物が形成されると減少することになる。

【０１０９】

一部の実施形態では、本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン組成物中の絹フィブロイン断片は、セリシンを実質的に含まないことができる。一部の実施形態では、絹フィブロイン断片は、絹タンパク質組成物の総重量の５ｗｔ％以下またはそれ未満のセリシンを含有し得る。例えば、絹フィブロイン断片は、絹タンパク質組成物の総重量の４ｗｔ％以下、３ｗｔ％以下、２ｗｔ％以下、１ｗｔ％以下、０．５ｗｔ％以下のセリシンを含有し得る。

【０１１０】

一部の実施形態では、絹フィブロイン断片は、修飾され得る。例えば、一部の実施形態では、絹フィブロイン断片は、官能基を含むように修飾され得る。一部の実施形態では、絹フィブロイン断片は、例えば、それだけに限らないが、ペプチド、タンパク質、核酸分子、造影剤、治療剤、標的結合リガンド、細胞結合リガンド、両親媒性ペプチド、またはこれらの任意の組合せを含めた作用物質に共有結合的または非共有結合的に連結または融

合され得る。一部の実施形態では、絹フィブロイン断片のアミノ酸配列は、細胞結合リガンドおよび／または両親媒性ペプチドを含み得る。一実施形態では、絹フィブロイン断片のアミノ酸配列は、ＲＧＤ配列を含み得る。

【０１１１】

本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン組成物の実施形態では、集団中の絹フィブロイン断片の総数（もしくは総モル数）または総重量の１５％以下が、２００ｋＤａを超える分子量を有する。本明細書において、語句「２００ｋＤａを超える」は、２００ｋＤａより大きい絹フィブロイン断片の分子量を指す。一部の実施形態では、語句「２００ｋＤａを超える」は、約２００ｋＤａである絹フィブロイン断片の分子量を包含し得る。一部の実施形態では、２００ｋＤａを超える分子量を有する絹フィブロイン断片は、例えば、絹フィブロイン断片の総数（もしくは総モル数）または総重量の９％以下、８％以下、７％以下、６％以下、５％以下、４％以下、３％以下、２％以下、１％以下を含めた、絹フィブロイン断片の総数（もしくは総モル数）または総重量の１０％以下の量で集団中に存在する。一実施形態では、低分子量絹フィブロイン組成物は、２００ｋＤａを超える分子量を有する絹フィブロイン断片を実質的に含まない。

【０１１２】

本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン組成物では、絹フィブロイン断片の総数（もしくは総モル数）または総重量の少なくとも５０％が指定範囲内の分子量を有し、ここで指定範囲は、約３．５ｋＤａから約１２０ｋＤａの間、または約５ｋＤａから約１２５ｋＤａの間である。一部の実施形態では、絹フィブロイン断片の総数（もしくは総モル数）または総重量の、例えば、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、またはそれ超を含めた５０％超が、指定範囲内の分子量を有し得る。一実施形態では、低分子量絹フィブロイン組成物は、約３．５ｋＤａから約１２０ｋＤａの間、または約５ｋＤａから約１２５ｋＤａの間の分子量を実質的に有する絹フィブロイン断片の集団を有し得る。

【０１１３】

集団中の絹フィブロイン断片の総数（もしくは総モル数）または総重量の少なくとも５０％において存在する絹フィブロイン断片の分子量分布の指定範囲は、約３．５ｋＤａから約１２０ｋＤａの間、または約５ｋＤａから約１２５ｋＤａの間で変化し得る。一部の実施形態では、絹フィブロイン断片の総数（もしくは総モル数）または総重量の少なくとも約５０％の分子量分布は、３．５ｋＤａまたはそれ超であるが、１２０ｋＤａ未満の下限を有し得る。例えば、指定範囲の下限は、３．５、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、または１１５ｋＤａであり得る。一部の実施形態では、絹フィブロイン断片の総数（もしくは総モル数）または総重量の少なくとも約５０％の分子量分布の指定範囲は、１０ｋＤａまたはそれ超（１２０ｋＤａを含み、最大で１２０ｋＤａ）の上限を有し得る。単なる例として、指定範囲の上限は、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、または１２０ｋＤａであり得る。指定範囲の例として、限定することなく、（ｉ）約５～１２０ｋＤａの間；（ｉｉ）約１０～１２０ｋＤａの間；（ｉｉｉ）約１５～１２０ｋＤａの間；（ｉｖ）２０～１２０ｋＤａの間；（ｖ）２０～１１０ｋＤａの間；（ｖｉ）約２０～１００ｋＤａの間；（ｖｉｉ）約２０～９０ｋＤａの間；（ｖｉｉｉ）約２０～８０ｋＤａの間；（ｉｘ）約３０～１２０ｋＤａの間；（ｘ）約３０～１００ｋＤａの間；（ｘｉ）約３０～９０ｋＤａの間；（ｘｉｉ）約３０～８０ｋＤａの間；（ｘｉｉｉ）約４０～１２０ｋＤａの間；（ｘｉｖ）約４０～１１０ｋＤａの間；（ｘｖ）約４０～１００ｋＤａの間；（ｘｖｉ）約４０～９０ｋＤａの間、および（ｘｖｉｉ）約４０～８０ｋＤａの間を挙げることができる。

【０１１４】

上述した指定範囲を伴った分子量分布を有する絹フィブロイン断片は、連続的または不

連続な分子量分布を呈し得る。本明細書において、用語「連続的な分子量分布」は、指定範囲の間で任意のサブ範囲を有する分子量の分布を指す。本明細書において、用語「不連続な分子量分布」は、指定範囲の間である特定のサブ範囲を有する分子量の分布を指す。単なる例として、約３．５ｋＤａから約１２０ｋＤａの間、または約５ｋＤａから約１２５ｋＤａの間の指定範囲を伴った不連続な分子量分布を有する絹フィブロイン断片は、絹フィブロイン断片の一部が、約３．５ｋＤａから１０ｋＤａの間の分子量を有し、絹フィブロイン断片の少なくとも一部または残りが、約１１０ｋＤａから約１２０ｋＤａの間の分子量を有する絹フィブロイン断片の集団を指すことができる。

【０１１５】

したがって、一部の実施形態では、３．５ｋＤａから１２０ｋＤａの間、または約５ｋＤａから約１２５ｋＤａの間の特定の範囲内の分子量を有する集団中の絹フィブロイン断片の総数（もしくは総モル数）または総重量の少なくとも約５０％またはそれ超は、特定の範囲内の分子量を有する集団中の絹フィブロイン断片の総数（もしくは総モル数）または総重量の少なくとも約５０％が、以下のサブ範囲（ｉ）～（ｘ）の１つまたは複数（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０）によって構成される絹フィブロイン断片の集団として特徴付けることができ、このサブ範囲は、（ｉ）２０ｋＤａ～３０ｋＤａの分子量分布を有する絹フィブロイン；（ｉｉ）３０ｋＤａ～４０ｋＤａの分子量分布を有する絹フィブロイン；（ｉｉｉ）４０ｋＤａ～５０ｋＤａの分子量分布を有する絹フィブロイン；（ｉｖ）５０ｋＤａ～６０ｋＤａの分子量分布を有する絹フィブロイン；（ｖ）６０ｋＤａ～７０ｋＤａの分子量分布を有する絹フィブロイン；（ｖｉ）７０ｋＤａ～８０ｋＤａの分子量分布を有する絹フィブロイン；（ｖｉｉ）８０ｋＤａ～９０ｋＤａの分子量分布を有する絹フィブロイン；（ｖｉｉｉ）９０ｋＤａ～１００ｋＤａの分子量分布を有する絹フィブロイン；（ｉｘ）１００ｋＤａ～１１０ｋＤａの分子量分布を有する絹フィブロイン；および（ｘ）１１０ｋＤａ～１２０ｋＤａの分子量分布を有する絹フィブロインを含む。

【０１１６】

分子量サブ範囲（ｉ）～（ｘ）を有する絹フィブロイン断片の量は、本明細書に記載の組成物中の絹フィブロイン断片のすべての総数（もしくは総モル数）または総重量の０％～１００％で変化し得、ただし、分子量サブ範囲（ｉ）～（ｘ）を有する絹フィブロイン断片の合計重量は、組成物中の絹フィブロイン断片のすべての総数（もしくは総モル数）または総重量の少なくとも５０％またはそれ超を構成する。したがって、本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン組成物は、分子量サブ範囲（ｉ）～（ｘ）を有する絹フィブロイン断片の任意の組合せを有するように構成することができる。一部の実施形態では、低分子量絹フィブロイン組成物は、本明細書に定義した１つの特定の分子量サブ範囲に対応する絹フィブロイン断片を有し得る。他の実施形態では、低分子量絹フィブロイン組成物は、本明細書に定義した２つまたはそれ超の特定の分子量サブ範囲に対応する絹フィブロイン断片の混合物を有し得る。

【０１１７】

一部の実施形態では、７６ｋＤａの分子量を有する絹フィブロイン断片と１８ｋＤａの分子量を有する絹フィブロイン断片の比は、５：１～１．５：１でない。したがって、一部の実施形態では、低分子量絹フィブロイン組成物は、ある範囲の分子量を有する絹フィブロイン断片の集団であって、集団中の絹フィブロイン断片の総数（もしくは総モル数）または総重量の１５％以下が、２００ｋＤａを超える分子量を有し、集団中の絹フィブロイン断片の総数（もしくは総モル数）または総重量の少なくとも５０％が、指定範囲内の分子量を有し、指定範囲は、約３．５ｋＤａから約１２０ｋＤａの間、または約５ｋＤａから約１２５ｋＤａの間であり、ただし、７６ｋＤａの分子量を有する絹フィブロイン断片と１８ｋＤａの分子量を有する絹フィブロイン断片の比は、５：１～１．５：１でないことを特徴とする、絹フィブロイン断片の集団を含み得る。

【０１１８】

一部の実施形態では、低分子量絹フィブロイン組成物は、１２０ｋＤａから２００ｋＤ

ａの間の分子量分布を有する絹フィブロイン断片の総数（もしくは総モル数）または総重量の３５％以下をさらに含み得る。例えば、一部の実施形態では、１２０ｋＤａから２００ｋＤａの間の分子量分布を有する絹フィブロインの総数（もしくは総モル数）または総重量の、例えば、３０％以下、２５％以下、２０％以下、１５％以下、１０％以下、５％以下、３％以下、１％以下を含めた３５％未満が、本明細書に記載の組成物中に存在し得る。一実施形態では、本明細書に記載の組成物は、１２０ｋＤａから２００ｋＤａの間の分子量分布を有する絹フィブロイン断片を実質的に含まないことができる。

【０１１９】

一部の実施形態では、組成物が１２０ｋＤａから２００ｋＤａの間の分子量分布を有する絹フィブロイン断片を含む場合、これらの絹フィブロイン断片は、以下のサブ範囲（ｘｉ）～（ｘｖｉｉｉ）の１つまたは複数（例えば、１、２、３、４、５、６、７、または８）によって構成され得、このサブ範囲は、（ｘｉ）１２０ｋＤａ～１３０ｋＤａの分子量分布を有する絹フィブロイン；（ｘｉｉ）１３０ｋＤａ～１４０ｋＤａの分子量分布を有する絹フィブロイン；（ｘｉｉｉ）１４０ｋＤａ～１５０ｋＤａの分子量分布を有する絹フィブロイン；（ｘｉｖ）１５０ｋＤａ～１６０ｋＤａの分子量分布を有する絹フィブロイン；（ｘｖ）１６０ｋＤａ～１７０ｋＤａの分子量分布を有する絹フィブロイン；（ｘｖｉ）１７０ｋＤａ～１８０ｋＤａの分子量分布を有する絹フィブロイン；（ｘｖｉｉ）１８０ｋＤａ～１９０ｋＤａの分子量分布を有する絹フィブロイン；および（ｘｖｉｉｉ）１９０ｋＤａ～２００ｋＤａの分子量分布を有する絹フィブロインを含む。

【０１２０】

一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、参照絹フィブロイン組成物と比べて、本明細書に定義した特定のサブ範囲（ｉ）～（ｘｖｉｉｉ）内の絹フィブロイン断片の少なくとも１種または複数に富んでいることができる。一部の実施形態では、参照絹フィブロイン組成物は、大気沸点で約６０分間絹繭を精練することによって生成される組成物または混合物であり得る。一実施形態では、参照絹フィブロイン組成物は、大気沸点で、炭酸ナトリウム水溶液中で約６０分間絹繭を精練することによって生成される組成物または混合物であり得る。一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、参照絹フィブロイン組成物と比べて、本明細書に定義した特定のサブ範囲（ｉ）～（ｘｖｉｉｉ）内の絹フィブロイン断片の少なくとも２種またはそれ超（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれ超）に富んでいることができる。一部の実施形態では、絹フィブロイン断片の少なくとも１種または複数は、参照絹フィブロイン組成物と比べて、例えば、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、またはそれ超を含めた少なくとも約１０％またはそれ超組成物中で富んでいることができる。一部の実施形態では、絹フィブロイン断片の少なくとも１種または複数は、参照絹フィブロイン組成物と比べて、例えば、少なくとも約１．５倍、少なくとも約２倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍、少なくとも約５倍、またはそれ超を含めた少なくとも約１．１倍またはそれ超組成物中で富んでいることができる。

【０１２１】

本明細書に記載の様々な実施形態によれば、低分子量絹フィブロイン組成物は、いわゆる「加水分解絹」と異なる。加水分解絹は、一般に、絹タンパク質を加水分解または分解して、例えば、１ｋＤａ以下の分子量を有するより小さいペプチド鎖、および／または構成アミノ酸、例えば、グリシン、アラニン、およびセリンなどにすることによって生成される。したがって、用語「加水分解絹」は、本明細書において、２ｋＤａ未満、１ｋＤａ未満、５００Ｄａ未満、またはそれ未満の分子量を有する絹ペプチド鎖またはアミノ酸を指す。別の言い方をすれば、加水分解絹は一般に、例えば、少なくとも５ｋＤａ、少なくとも１０ｋＤａ、少なくとも１５ｋＤａ、少なくとも２０ｋＤａ、少なくとも２５ｋＤａ、少なくとも３０ｋＤａ、少なくとも４０ｋＤａ、少なくとも５０ｋＤａ、少なくとも６０ｋＤａ、少なくとも７０ｋＤａ、少なくとも８０ｋＤａ、少なくとも９０ｋＤａ、少なくとも１００ｋＤａ、またはそれ超を含めた少なくとも３．５ｋＤａまたはそれ超の分子

量を有する絹フィブロインペプチド鎖を含まない。

【０１２２】

本明細書に記載の絹フィブロイン断片の分子量は、例えば、それだけに限らないが、ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル、サイズ排除ゲルクロマトグラフィー、質量分析、またはこれらの任意の組合せを含めた当技術分野における任意の公知の方法によって判定することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン組成物中の本明細書で言及した絹フィブロイン断片の分子量は、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）によって判定することができる。単なる例として、各低分子量絹フィブロイン組成物について、適切な量（例えば、約７．５μｇ）の組成物または絹フィブロインタンパク質を溶液中で調製し、次いで３～８％トリス－酢酸ゲル（例えば、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎから得られるＮｕＰＡＧＥ（登録商標）Ｎｏｖｅｘ（登録商標）３～８％トリス－酢酸ゲル）などのゲル中に装填することができる。タンパク質スタンダードまたはラダーも、参照分子量をもたらすためにゲル中に装填される。タンパク質スタンダードの例として、それだけに限らないが、ＨｉＭａｒｋ（商標）未染色タンパク質スタンダード（３０～４６０ｋＤａの範囲、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）およびＭａｒｋ１２（商標）タンパク質スタンダード（３０～２００ｋＤａの範囲、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を挙げることができる。ゲルは、製造者の指示に従って還元条件下で実行され得る。例えば、一実施形態では、ゲルは、約２００Ｖで約４５分間実行され、次いでタンパク質バンドを可視化するために染色され得る。一部の実施形態では、ゲルは、例えば、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎから得られるコロイダルブルー染色キットで染色することができる。次いで低分子量絹フィブロイン組成物中に存在する絹フィブロイン断片の分子量分布を、任意の当技術分野で認識されている方法を使用して、例えば、ゲルの試料レーンの長さにそってタンパク質バンドのデンシトメトリー測定を行うことによって定量化することができる。一実施形態では、ＩｍａｇｅＪ（ＮＩＨ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ）を使用して、ゲル上のタンパク質バンドのデンシトメトリー測定を判定することができる。一実施形態では、ＩｍａｇｅＪソフトウェア内の「Ｇｅｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒ」ツールを使用して、デンシトメトリー分析を実施することができる。

【０１２３】

限定することなく、分子量は、本明細書において、ピーク平均分子量（$M_p$）、数平均分子量（$M_n$）、または重量平均分子量（$M_w$）であり得る。

【０１２４】

一部の実施形態では、低分子量絹フィブロイン組成物は、少なくとも１種または複数の活性作用物質をさらに含み得、これらの例は以下に記載されている。活性作用物質は、当技術分野における任意の公知の方法によって本明細書に記載の組成物中に分散され得る。例えば、活性作用物質は、本明細書に記載の組成物中に均質または不均質に（例えば、活性作用物質の勾配を形成して）分散され得る。米国出願公開第ＵＳ２００７０２１２７３０Ａ１号を参照。その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。一部の実施形態では、低分子量絹フィブロイン組成物中に含まれる作用物質は、液体であっても固体形態であってもこのような組成物中に貯蔵し、かつ／またはそれから放出もしくは回収することができる。一部の実施形態では、含められた作用物質は、例えば、このような放出または回収の前、その最中、またはその後に分析することができる。

【０１２５】

低分子量溶液

一部の実施形態では、本明細書に提供される低分子量絹フィブロイン組成物は、溶液（本明細書に記載するように安定化および／または分析される作用物質などの作用物質を任意選択で含む）であり得る。したがって、別の態様では、本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン組成物の１つまたは複数の実施形態を含む絹フィブロイン水溶液が本明細書に提供される。一部の実施形態では、絹フィブロイン水溶液は、水中で配合され得る。一部の実施形態では、絹フィブロイン水溶液は、緩衝液中で配合され得る。緩衝液の例としては、それだけに限らないが、リン酸緩衝液がある。

【０１２６】
絹フィブロインは、必要性、例えば、絹フィブロイン溶液の注射可能性に適した任意の濃度で溶液中に存在し得る。一部の実施形態では、絹フィブロイン水溶液は、約０．１％ｗｔ／ｖ～約９０％ｗｔ／ｖ、０．１％ｗｔ／ｖ～約７５％ｗｔ／ｖ、または０．１％ｗｔ／ｖ～約５０％ｗｔ／ｖの濃度で絹フィブロインを有し得る。一部の実施形態では、絹フィブロイン水溶液は、約０．１％ｗｔ／ｖ～約１０％ｗｔ／ｖ、約０．１％ｗｔ／ｖ～約５％ｗｔ／ｖ、約０．１％ｗｔ／ｖ～約２％ｗｔ／ｖ、または約０．１％ｗｔ／ｖ～約１％ｗｔ／ｖの濃度で絹フィブロインを有し得る。一部の実施形態では、絹フィブロイン溶液は、約１０％ｗｔ／ｖ～約５０％ｗｔ／ｖ、約２０％ｗｔ／ｖ～約５０％ｗｔ／ｖ、約２５％ｗｔ／ｖ～約５０％ｗｔ／ｖ、または約３０％ｗｔ／ｖ～約５０％ｗｔ／ｖの濃度で絹フィブロインを有し得る。

【０１２７】
一部の実施形態では、絹水溶液は、例えば、少なくとも約４日、少なくとも約５日、少なくとも約６日、少なくとも約７日、少なくとも約２週間、少なくとも約３週間、少なくとも約４週間、またはそれ超を含めた少なくとも約３日またはそれ超にわたって特定の条件下で安定なままであり得る。特定の条件は、それだけに限らないが、温度、光、湿度、圧力、およびこれらの任意の組合せを含めた環境パラメーターの１つまたは複数によって特徴付けることができる。一部の実施形態では、絹水溶液は、約室温～少なくとも約３７℃またはそれ超で、例えば、少なくとも約４日、少なくとも約５日、少なくとも約６日、少なくとも約７日、少なくとも約２週間、またはそれ超を含めた少なくとも約３日またはそれ超にわたって安定なままであり得る。一部の実施形態では、絹水溶液は、例えば、少なくとも約４日、少なくとも約５日、少なくとも約６日、少なくとも約７日、少なくとも約２週間、少なくとも約３週間、少なくとも約４週間、またはそれ超を含めた少なくとも約３日またはそれ超にわたって、ある特定の条件に絹フィブロイン水溶液を曝露した際、ゲル化しない。一部の実施形態では、絹水溶液は、少なくとも室温またはそれ超の温度（例えば、約１５℃、約２０℃、約２５℃、約３０℃、約３５℃、約４０℃、またはそれ超）に、例えば、少なくとも約４日、少なくとも約５日、少なくとも約６日、少なくとも約７日、少なくとも約２週間、少なくとも約３週間、少なくとも約４週間、またはそれ超を含めた少なくとも約３日またはそれ超にわたって、絹フィブロイン水溶液を曝露した際、ゲル化しない。

【０１２８】
一部の実施形態では、本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン溶液は、本明細書に定義した参照絹フィブロイン溶液より遅くゲル化する。一部の実施形態では、本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン溶液は、慣例的な絹フィブロイン溶液より遅くゲル化する。

【０１２９】
本明細書において、用語「安定なままである」は、ある時間にわたって特定の条件に曝露した際、実質的に同じままである絹フィブロイン水溶液の材料性質を指す。材料性質の例として、それだけに限らないが、粘度、粒径、不透明度、およびこれらの任意の組合せを挙げることができる。一部の実施形態では、安定な絹水溶液は、ある時間にわたって特定の条件に曝露した際、粘度の実質的な変化がないことによって特徴付けることができる。一部の実施形態では、安定な絹水溶液は、本明細書に定義した均質溶液として特徴付けることができる。例えば、均質絹フィブロイン水溶液は、ある時間にわたって指定条件に曝露した際、絹フィブロイン凝集体（例えば、肉眼で見える不溶性の絹フィブロイン断片、絹フィブロイン粒子、および／またはクラスター）を実質的に含まない絹フィブロイン水溶液として特徴付けることができる。絹フィブロイン凝集体の例として、それだけに限らないが、全長絹フィブロイン分子、より大きい絹フィブロイン断片、より小さい絹フィブロイン断片のアセンブリーまたは凝集によって形成される絹フィブロイン粒子またはクラスター、およびこれらの任意の組合せを挙げることができる。一部の実施形態では、絹フィブロイン凝集体は、それだけに限らないが、沈殿、ゲル化、および／またはクランピングを含めたプロセスによって形成される絹フィブロイン粒子またはクラスターを含み得

る。一部の実施形態では、絹フィブロイン凝集体は、約１ｍｍまたはそれ超のサイズを有する絹フィブロイン粒子またはクラスターであり得る。一実施形態では、絹フィブロイン粒子またはクラスターは、溶液中に存在する絹フィブロイン断片のアセンブリーまたは凝集によって形成され得る。

【０１３０】

低分子量物品：

一部の実施形態では、本明細書に提供される低分子量絹フィブロイン組成物は、固体絹フィブロイン物品を形成することができる。このような固体絹フィブロイン物品の例として、それだけに限らないが、フィルム、シート、ゲルまたはヒドロゲル、メッシュ、マット、不織マット、布地、スキャフォールド、チューブ、ブロック、繊維、粒子、粉末、３次元構築物、インプラント、発泡体、針、凍結乾燥物品、およびこれらの任意の組合せを挙げることができる。様々な形態の固体絹フィブロイン物品を形成するための方法は、当技術分野で公知であり、いくつかの例示的な方法が、本明細書に以下で記載されている。

【０１３１】

一部の実施形態では、低分子量絹フィブロイン物品は、少なくとも１カ月間保存安定性であり得る。用語「保存安定性」は、本明細書において、ある時間にわたって貯蔵した際、実質的に同じままである絹フィブロイン粒子の材料性質を指す。絹フィブロイン物品の材料性質として、それだけに限らないが、硬度、多孔度、溶解性、粒径、乾燥度、およびこれらの任意の組合せを挙げることができる。

【０１３２】

一部の実施形態では、低分子量絹フィブロイン物品は、水中に再可溶化して絹フィブロイン凝集体を実質的に含まない絹フィブロイン溶液を形成し得る。一部の実施形態では、低分子量絹フィブロイン物品の少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、またはそれ超が、水中に再可溶化して絹フィブロイン凝集体を実質的に含まない絹フィブロイン溶液を形成し得る。

【０１３３】

一部の実施形態では、本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン組成物の１つまたは複数の実施形態を使用して製作される低分子量絹フィブロイン物品を溶解させるのに、加熱および／または塩添加を必要としない。したがって、一部の実施形態では、絹フィブロイン物品は、室温で水溶液中に再可溶化して絹フィブロイン溶液を形成し得る。一部の実施形態では、低分子量絹フィブロイン物品は、室温で水（例えば、脱イオン水）中に完全に溶解することができ、ただし、溶解した絹フィブロインの濃度は、飽和未満である。一部の実施形態では、水溶液（例えば、水）中の低分子絹フィブロイン組成物の飽和点は、少なくとも３０％ｗ／ｖ、少なくとも４０％ｗ／ｖ、少なくとも５０％ｗ／ｖ、少なくとも６０％ｗ／ｖ、少なくとも７０％ｗ／ｖ、少なくとも８０％ｗ／ｖ、またはそれ超であり得る。

【０１３４】

一部の実施形態では、水溶液（例えば、水）中の低分子量絹フィブロイン組成物の飽和点は、約３０％ｗ／ｖ～約８０％ｗ／ｖ、約４０％ｗ／ｖ～約７０％ｗ／ｖ、約５０％ｗ／ｖ～約６０％ｗ／ｖの範囲であり得る。したがって、一部の実施形態では、低分子量絹フィブロイン物品は、例えば、少なくとも約２０ｍｇ／ｍＬ、少なくとも約３０ｍｇ／ｍＬ、少なくとも約４０ｍｇ／ｍＬ、少なくとも約５０ｍｇ／ｍＬ、少なくとも約６０ｍｇ／ｍＬ、少なくとも約７０ｍｇ／ｍＬ、少なくとも約８０ｍｇ／ｍＬ、少なくとも約９０ｍｇ／ｍＬ、少なくとも約１００ｍｇ／ｍＬ、少なくとも約２００ｍｇ／ｍＬ、少なくとも約４００ｍｇ／ｍＬ、少なくとも約６００ｍｇ／ｍＬ、少なくとも約８００ｍｇ／ｍＬ、少なくとも約１０００ｍｇ／ｍＬ、またはそれ超を含めた少なくとも約１０ｍｇ／ｍＬまたはそれ超の水溶性を有し得る。

【０１３５】

一部の実施形態では、低分子量絹フィブロイン物品は、少なくとも０．０１ｍｇ／ｓ～

約１００ｍｇ／ｓ、または約０．１ｍｇ／ｓ～約９０ｍｇ／ｓ、または約１ｍｇ／ｓ～約８０ｍｇ／ｓの溶解速度を有し得る。一部の実施形態では、低分子量絹フィブロイン物品は、室温で、約０．０１ｍｇ／ｓ～約１００ｍｇ／ｓ、または約０．１ｍｇ／ｓ～約９０ｍｇ／ｓ、または約１ｍｇ／ｓ～約８０ｍｇ／ｓの速度で水溶液（例えば、脱イオン水などの水）中に溶解し得る。

【０１３６】

一部の実施形態では、低分子量絹フィブロイン物品は、オンデマンドまたはポイントオブケア用途で使用され得る。例えば、ユーザー（例えば、対象または医療提供者）は、任意の場所（例えば、住居、僻村、および戦場）で絹フィブロイン物品を適用または自己投与することができる。診断について、一部の実施形態では、ユーザーは、絹フィブロイン物品を病院、診療所、または任意の分析施設に送ることができる。代替としてまたは追加的に、一部の実施形態では、低分子量絹フィブロイン物品は、貯蔵された試料（例えば、貯蔵された血液試料）を作り出すのに使用することができ、この貯蔵された試料は、一部の実施形態では、少なくとも指定時間（例えば、数日、数週間、数カ月、数年など）にわたって安定であり得、かつ／または経時的に再試験またはサンプリングされ得る（例えば、後に得られる試料との比較などを可能にするために）。

【０１３７】

理論に束縛されることを望むわけではないが、一部の実施形態では、絹フィブロイン物品の再可溶化性（すなわち、固体形態の低分子量絹フィブロイン組成物の溶液または液体形態中に溶解または再構成される能力）は、絹繭を精練するための時間の長さおよび／または温度によって判定され得る。例えば、一部の実施形態では、溶解可能な絹フィブロイン物品は、大気沸点で、またはそれに近い温度で、少なくとも６０分またはそれ超、例えば、少なくとも９０分またはそれ超にわたって絹繭を精練することによって得られる低分子量絹フィブロイン溶液から形成され得る。他の実施形態では、溶解可能な絹フィブロイン物品は、より低い温度、例えば、約６０～９０℃で、少なくとも９０分またはそれ超、例えば、少なくとも１２０分またはそれ超にわたって絹繭を精練することによって得られる低分子量絹フィブロイン溶液から形成され得る。

【０１３８】

一部の実施形態では、固体形態の本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン組成物は、高度に溶解可能である。したがって、一態様では、本発明は、低分子量絹フィブロイン断片を含む、高度に溶解可能な形態の固体絹フィブロイン組成物を提供する。以前に記載した慣例的な絹フィブロイン組成物と比較して、高度に溶解可能な形態の本明細書に記載の固体絹フィブロイン組成物は、これらの高い水溶性、高い溶解速度、および広範囲の作用物質（例えば、それだけに限らないが、生物剤）との生体適合性によって特徴付けられる。材料科学の観点から、本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン組成物は、液体－固体または固体－液体転移をより良好に調節する能力に部分的に起因して、より大きい取扱いの融通性、調整力、および容易さ、ならびに多様性をもたらす。これは、組成物が絹フィブロインのより小さい断片（すなわち、低分子量絹フィブロイン断片）から主に構成されている場合、絹フィブロインの溶解性を精密に調整することができるという知見に少なくとも部分的に基づく。この追加された融通性により、より高い分子量の絹フィブロインを含み、またはそれから構成される慣例的な絹材料で可能でない方法で絹ベース材料を利用することが可能になる。したがって、ユニークな材料性質の低分子量絹フィブロイン材料には、それだけに限らないが、水溶液中に容易に溶解され得る固体形態絹フィブロイン組成物；および中に組み込まれ、または付随される作用物質に望ましい安定化効果をもたらしながら、望まれないセルフアセンブリーまたはゲル化に耐える液体形態絹フィブロイン組成物（例えば、絹フィブロイン溶液）が含まれる。

【０１３９】

したがって、一部の実施形態では、低分子量絹フィブロイン組成物は、水（例えば、純水もしくは脱イオン水）、または緩衝液などの特定の使用に適した任意の他の水ベース溶液中に容易かつ急速に再構成され得る十分に溶解可能な形態として挙動するように特に配

合することができる。これらの実施形態では、本明細書に記載の固体形態での低分子量絹フィブロイン組成物は、水溶液中に容易に溶解可能であるので、中に組み込まれている１種または複数の作用物質は、可溶性形態の固体低分子量絹フィブロイン組成物から容易に回収され得る。例えば、生体試料などの生物剤は、固体形態での低分子量絹フィブロイン組成物に伴って「貯蔵する」ことができ、次いでこれは、水溶液中に放出されて作用物質の殆ど完全な回収を実現することができる。放出されると、このような作用物質は、分析用ツールなどの任意の適当な手段によって容易に分析（例えば、検出、測定、アッセイ、同定、単離など）され得る。代替としてまたは追加的に、一部の実施形態では、含められた作用物質（例えば、生物剤）は、絹フィブロイン組成物から放出されることなく分析され得る。

【０１４０】

組成物の安定化

安定化されることが望まれる作用物質（例えば、活性作用物質および／または生体試料）の安定化および後続の回収は、多くの用途の極めて重要なフィーチャであり、理由は、活性作用物質および／または生体試料は通常、周辺条件、例えば、温度、湿度、および／または光の変化に対して不安定かつ感受性であるためである。いくつかの以前に記載された方法では、活性作用物質または生体試料が所与の反応にとって有用であると同定されていても、その適用は、プロセス条件下での長期安定性の欠如および／または低回収率によって妨害されることが多い。以下にさらに記載するように、本明細書に記載の本発明の様々な実施形態は、先行技術に存在したこれらの短所に対処する。

【０１４１】

例えば、有害な温度プロファイルに対して安定化試料を保護することができる技術は、集中型の試験システムの範囲を包括的スケールに拡張することができる。この目的を達成するために、本発明者らは、とりわけ、ある特定の絹ベース材料は、活性作用物質（例えば、生体試料またはその構成成分、治療試薬および／または診断試薬など）を構造的および／または機能的フィーチャの劣化から保護することができることを発見した。用語「活性作用物質」は、生体試料（例えば、組織、もしくは例えば、血液などの流体の試料）またはその構成成分を、かつ／あるいは生物学的に活性な実体または化合物を、かつ／あるいは構造的または機能的に不安定な実体を指すのに本明細書で使用される。

【０１４２】

一部の実施形態では、活性作用物質／生体試料の生物活性の安定化は、極めて重要である。他の実施形態では、活性または生物活性の安定化は、常に要求されるわけではない。例えば、生物活性の維持は、安定化された生体試料をアッセイおよび定量化するための要件でないことが多い。

【０１４３】

いくつかの特定の実施形態では、本開示は、とりわけ、絹ベース材料が、ヒト全血およびＲＮＡなどの血液構成成分を、長い継続時間にわたって、かつ有害な環境条件の状況において保護することができることを実証する。本開示は、例えば、全血および／またはドナーとマッチした血漿を、絹ベース材料、例えば、フィルム中で、キャスティングおよび空気乾燥によって安定化することができ、それぞれの血漿タンパク質を水との単純な混合プロトコールによって回収することができることを実証する。

【０１４４】

本開示はまた、本明細書に記載するように、含められた作用物質を安定化させるのに使用するための低分子量絹組成物の様々な特定の有利なフィーチャを特に実証する。例えば、とりわけ、本開示は、低分子量絹組成物が、より高い分子量の絹組成物より緩やかにゲル化する傾向があることを実証する。とりわけ、このような遅延したゲル化特質は、一部の実施形態では、有効期間の延長に寄与し得る。さらに、本開示は、低分子量絹組成物は、オートクレーブ処理を用いても、試料損失を保護することを実証する。一部の実施形態では、本発明は、例えば、含められた作用物質を含むオートクレーブ処理された低分子量絹組成物を提供する。一部の実施形態では、本発明は、オートクレーブ処理されたこのよ

うな組成物を含む低分子量絹組成物（例えば、固体形態低分子量絹組成物）を再構成するためのシステムであって、組成物は、含められた作用物質の高い回収率によって特徴付けられる、システムを提供する。ある特定の実施形態では、このような組成物および／またはシステムは、組成物の大規模製造および／または処理（例えば、出荷）に適切である。

【０１４５】

本明細書に実証される絹フィブロイン組成物の安定化効果は、例えば、現場で得られる試料（例えば、血液試料）の維持、貯蔵、および／または輸送のためを含めた広い暗示を有する。したがって、多くの実施形態では、提供される技術は、試料（例えば、採血物）が限られた資源で得られる設定において、かつ／または下流分析がポイントオブケース（point-of-case）技術の範囲を超えている状況において特に有用である。

【０１４６】

本開示は特に、絹ベース材料から回収された後、ある範囲のドナーに由来する血液分析物（または血液構成成分）の絶対存在量を測定するのに使用され得る臨床的に関連した分析用ツールの幅を実証する。本明細書に報告した研究は、本明細書に記載の様々な実施形態の組成物および方法を使用することによって、回収される分析物レベル（または回収される構成成分レベル）が、臨床精密検査の至適基準として現在使用されているフォーマットであるドナーとマッチした新鮮な、または凍結した血漿に対して実施される測定と一致することを実証する。一部の実施形態では、絹で安定化された分析物レベル（または絹で安定化された構成成分レベル）は、その凍結された対応物より高く、絹ベース材料がある特定の用途についての現在の至適基準をしのぎ得ることを示した。本発明者らは、凍結乾燥などの異なる技法を、同じ絹配合物の存在下で使用して生体試料、例えば、ＲＮＡを安定化させ、単純な水性再構成方法を使用して引き続いて回収することができることも実証した。回収されたＲＮＡは、凍結対照と一致するレベルで利用可能であったと同時に、モデル細胞株をトランスフェクトすることができる。

【０１４７】

様々な形態の絹ベース材料が、広く変動する温度プロファイルに対して、かつ出荷中に遭遇する機械的な摂動に対して生体試料を保護することができる。絹ベース材料は、水中（例えば、純水または試料相互作用に適した緩衝液中）での再構成による十分に可溶化したシステムとして挙動し、いくつかの臨床的に関連した分析用ツールによって分析される封入された構成成分またはバイオマーカーが十分に回収されるように特に配合することができる。本開示の前には、これらのユニークな特質、すなわち、ｉ）試料調達の容易さ、ｉｉ）素晴らしい熱／機械的安定性プロファイル、ｉｉｉ）再構成／回収の単純性を組み合わせる技術は、当技術分野において存在しない。しかし、本明細書で実証するように、本開示は、とりわけ、ｉ）試料調達の容易さ、ｉｉ）素晴らしい熱／機械的安定性プロファイル、ｉｉｉ）再構成／回収の単純性をもたらす組成物および方法を提供する。

【０１４８】

絹フィブロインは、酵素／熱／ＵＶ劣化に対して高度に耐性であるので、封入された生体試料は、母集団全体の時系列データセットを収集し、または個別化された薬を増強するために、冷蔵／凍結の必要なく、集中型の施設において長期貯蔵（すなわち、継続時間において数カ月～数年）用にバンキングすることができると考えられる。

【０１４９】

したがって、一態様では、本開示は、絹溶液（例えば、望ましい溶解性を有する絹ベース材料を生成するように調整された）、ならびに生体試料、例えば、全血および血液構成成分を封入および安定化するためのこれらの溶液から作製される絹ベース材料の使用を提供する。この絹精製および封入スキームにより、封入された血液構成成分（例えば、細胞、および／または核酸、例えば、循環ＤＮＡもしくはＲＮＡなど）を十分に再構成する能力がもたらされる。一実施形態では、指プリック体積と等価な採血物を、例えば、本明細書の実施例セクションに記載したように、絹溶液と混合することができ、その後、安定化された血液構成成分を含有する少なくとも部分的に乾燥された絹ベース材料を容易に調達することができる。

【０１５０】
本明細書に記載の絹封入／安定化プラットホームは、基本的なものである。例えば、液体絹フィブロイン組成物は、組成物中の生体試料の日常的な液体アッセイに直ちに適用可能となり得、新鮮な全血または凍結試料に使用される同じ検証および品質管理（ＱＣ）手順に供することができる。溶液組成物は、少なくとも部分的に乾燥させ、または成形して絹フィブロイン物品にすることができる。乾燥組成物または物品中の絹フィブロインは、再可溶化し、それによって生体試料またはその構成成分を検出するための日常的な液体アッセイに適用可能である溶液をもたらすことができる。
【０１５１】
反対に、ＤＢＳ分析物は、保護されるために乾燥後に紙基材との何らかのレベルの化学的相互作用を必要とするので、マトリックス中の部分的な試料保持および／または分析物の損傷が、標準的なＤＢＳ回収手順を使用すると予期される。ひいてはこれは、抽出間の損失および不均一性を監視するために、ＤＢＳ精密検査に対してユニークな検証プロトコールおよびＱＣ測定基準を課す。第２に、紙基材にわたるかつ紙基材の厚さを通じた両方でのスポットの不均一性（ユーザー間のばらつきおよびヘマトクリット試料－試料ばらつきからの）に起因して、試料体積を定義し、次いでそれに応じて紙ベースＤＢＳ試料をアリコートすることが困難になり得る。これは、年齢が広く変化し、かつ異常ヘマトクリットレベル（腎臓機能障害、腫瘍患者など）を被っている患者集団で特に問題となる。反対に、本明細書に記載の絹ベース材料（例えば、低分子量絹フィブロイン組成物）は、必要に応じて完全に回収することができ（例えば、５０μＬの体積全体などの体積全体が再構成され得る）、またはアリコートは、絹／血液複合体が均質に混合および乾燥されるので、重量によって容易に調製され得る。
【０１５２】
したがって、本明細書に記載の様々な態様の実施形態は、絹ベース材料であって、それと混合された、またはそれに封入された生体試料の少なくとも１種の構成成分の安定化のための、後の時間に構成成分の検出を可能にする、絹ベース材料、ならびにこの絹ベース材料を作製する方法および使用する方法にも関する。
【０１５３】
一態様では、絹フィブロイン（例えば、低分子量絹フィブロイン組成物）および生体試料／活性作用物質を含む絹ベース材料であって、生体試料の少なくとも１種の構成成分の少なくとも１つの性質が、ある時間にわたって安定化され、かつ／または生体試料／活性作用物質の少なくとも１種の構成成分が、その時間後に検出可能である、絹ベース材料が本明細書に提供される。
【０１５４】
絹ベース材料中で安定化される少なくとも１種の活性作用物質（例えば、生体試料もしくは構成成分）の性質は、物理的もしくは構造的性質、化学的性質、および／または生物学的性質であり得る。一部の実施形態では、前記少なくとも１つの性質は、活性もしくは生物活性、構造的完全性、構造的高次構造、および／または作用物質の量を含み得る。異なる用途（例えば、診断目的対治療目的）に応じて、絹フィブロインおよび／または絹ベース材料を、生体試料の少なくとも１種の構成成分の１つまたは複数の性質を安定化するように処理することができる。
【０１５５】
一部の実施形態では、生体試料の構成成分の活性または生物活性を安定化させることは、常に要求されるわけではない。例えば、診断的適用について、検出される構成成分の活性は、生体試料中で安定化された構成成分の完全性および／または量ほど重要でない場合がある。これらの実施形態では、検出される構成成分は、構成成分がインタクトなままであり、かつ／または構成成分の量が維持される限り不活性であり得る。本明細書で互換的に使用されるように、用語「活性」および「生物活性」は、構成成分の１つまたは複数の構造的および／または機能的特性、例えば、生物学的標的と相互作用し、かつ／または生物学的標的に対して効果を生じさせるその能力などを指す。例えば、生物活性として、限

定することなく、生物学的標的における刺激性、阻害性、制御性、毒性、または致死性の応答の誘発を挙げることができる。生物学的標的は、分子または細胞であり得る。例えば、生物活性は、細胞もしくは酵素の効果／活性をモジュレートし、受容体をブロックし、受容体を刺激し、１つまたは複数の遺伝子の発現レベルをモジュレートし、細胞増殖をモジュレートし、細胞分裂をモジュレートし、細胞モルフォロジーをモジュレートし、細胞に感染し、もしくはトランスフェクトし、またはこれらの任意の組合せを行う構成成分（例えば、タンパク質または核酸分子）の能力を指すことができる。一部の場合では、生物活性は、細胞内に毒性効果を生じさせる構成成分の能力を指すことができる。

【０１５６】

一部の実施形態では、生体試料の構成成分の活性をさらに安定化させることが望ましい場合がある。単なる例として、生体試料中に存在するタンパク質は、活性または不活性状態にあり得る。この実施形態では、絹ベース材料は、自己の活性型または天然型において生体試料中に存在するタンパク質、例えば、リン酸化タンパク質または糖化タンパク質を安定化させることができる。この実施形態は、構成成分の活性が疾患または障害の診断において役割を果たす場合、有用であり得る。

【０１５７】

本明細書に記載の様々な態様の実施形態によれば、生体試料の１種または複数の構成成分の少なくとも１つの性質を、任意の時間にわたって絹ベース材料内で安定化させることができる。本明細書において、用語「安定化させる（stabilize）」、「安定化させる（stabilizing）」、または「安定化」は、ある時間にわたって絹ベース材料中で部分的または完全に維持または保持されている生体試料の構成成分の少なくとも１つの性質（例えば、活性、完全性、および／または量）を指す。活性の安定化に関して、一部の実施形態では、生体試料中に元来存在する構成成分の少なくとも約３０％またはそれ超（少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または最大１００％を含む）が、ある時間にわたって少なくとも部分的または完全な活性を保持することができる。別の言い方をすれば、構成成分は、その元の活性の少なくとも約３０％またはそれ超（少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または最大１００％を含む）をある時間にわたって保持することができる。完全性の安定化に関して、生体試料中に元来存在する構成成分の少なくとも約３０％またはそれ超（少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または最大１００％を含む）が、ある時間にわたって完全性を保持することができる。量の安定化に関して、生体試料中に元来存在する構成成分の少なくとも約３０％またはそれ超（少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または最大１００％を含む）が、構成成分が活性であるか、不活性であるか、またはインタクトであるか、インタクトでないかにかかわらず、ある時間にわたって保持され得る。本明細書において、用語「元来」または「元の」は、構成成分の元の存在または元の活性を参照して使用される場合、生体試料が対象から得られた直後に測定される、または代わりに、生体試料が絹ベース材料内に混合もしくは封入される直前もしくは直後に測定される構成成分のレベルを指す。一部の実施形態では、構成成分の元の存在または元の活性は、対照、例えば、非絹手法によって安定化された対照、例えば、凍結された対照中の構成成分のレベルを指す。

【０１５８】

１種または複数の活性作用物質／生体試料／これらの構成成分の少なくとも１つの性質が、ある時間にわたって、例えば、構成成分が検出のために抽出または回収されるまで、絹ベース材料内で安定化され得る。一部の実施形態では、少なくとも１つの性質は、少なくとも約３時間、少なくとも約６時間、少なくとも約１２時間、少なくとも約１８時間、少なくとも約２４時間、またはそれ超にわたって安定化され得る。一部の実施形態では、少なくとも１つの性質は、少なくとも約１日、少なくとも約２日、少なくとも約３日、少

なくとも約４日、少なくとも約５日、少なくとも約６日、少なくとも約７日、またはそれ超にわたって安定化され得る。一部の実施形態では、少なくとも１つの性質は、少なくとも約１週間、少なくとも約２週間、少なくとも約３週間、少なくとも約４週間、少なくとも約２カ月、少なくとも約３カ月、少なくとも約６カ月、少なくとも約９カ月、少なくとも約１年、少なくとも約２年、少なくとも約３年、少なくとも約６年、またはそれ超にわたって安定化され得る。

【０１５９】

以下でさらに論じるように、本明細書に記載の絹ベース材料は、任意の形態で存在し得る。例えば、絹ベース材料は、溶液、フィルム、繊維、粒子、ゲル、ヒドロゲル、発泡体、スポンジ、マット、メッシュ、布地、粉末、コーティング層、これらの凍結乾燥形態、またはこれらの任意の組合せの形態にあり得る。一部の実施形態では、絹ベース材料は、薄膜であり得る。一部の実施形態では、絹ベース材料は、凍結乾燥され得る。

【０１６０】

生体試料の１種または複数の構成成分を、絹ベース材料からそれ／これらを単離することなく検出することができるが、測定可能または検出可能なレベルの構成成分（複数可）を、後続の処理、分析および／または特徴付けのために絹ベース材料から代わりに抽出または回収することができる。本明細書において、用語「測定可能または検出可能なレベル」は、検出の下限を指し、これは一般に、特定の構成成分のために選択される検出および／または特徴付けの方法またはアッセイの検出感度に依存する。例えば、検出される構成成分が核酸分子（例えば、ＲＮＡまたはＤＮＡ）であり、増幅ベース検出法（例えば、それだけに限らないが、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ））が構成成分を検出するのに選択される場合、核酸分子の約０．０００１％（例えば、１コピーのＲＮＡ分子）を増幅および検出のために絹ベース材料から抽出または回収することができる。

【０１６１】

一部の実施形態では、絹ベース材料は、測定可能または検出可能なレベルの構成成分（複数可）が、後続の処理、分析、および／または特徴付けのためにアクセス可能または利用可能になり得るように溶解可能であり得る。本明細書において、用語「溶解可能な」は一般に、流体中の絹ベース材料の溶解性、溶解、または分解を指す。溶解可能な絹ベース材料は、ある時間にわたって流体中で部分的または完全に溶解または分解し得る。例えば、絹ベース材料の例えば、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、または最大１００％を含めた絹ベース材料の少なくとも約５％またはそれ超が、数秒、数分、数時間～数日の範囲の時間にわたって流体（例えば、水性流体）中で溶解または分解し得る。一部の実施形態では、絹ベース材料は、少なくとも約１０秒、少なくとも約２０秒、少なくとも約３０秒、少なくとも約４０秒、少なくとも約５０秒、少なくとも約６０秒、またはそれ超以内に流体（例えば、水性流体）中で部分的または完全に（例えば、絹ベース材料の少なくとも約５％またはそれ超）溶解または分解し得る。一部の実施形態では、絹ベース材料は、少なくとも約１分、少なくとも約５分、少なくとも約１０分、少なくとも約１５分、少なくとも約３０分、少なくとも約１時間、またはそれ超以内に流体（例えば、水性流体）中で部分的または完全に（例えば、絹ベース材料の少なくとも約５％またはそれ超）溶解または分解し得る。別の言い方をすれば、溶解可能な絹ベース材料は、少なくとも１種の活性作用物質／試料／その中に存在する構成成分を回収または抽出するのに十分な自己の部分を流体（例えば、水性流体）中で溶解または分解し得る絹ベース材料である。

【０１６２】

絹ベース材料の溶解度または溶解性は、いくつかの要因に依存し得、この要因としては、例えば、それだけに限らないが、絹ベース材料の組成（例えば、生体試料と絹フィブロインの比）、絹フィブロインで混合または封入される生体試料のタイプ（例えば、それだけに限らないが、尿、血液、および／もしくは耳垢）、ならびに／または生体試料および／もしくはその少なくとも１種もしくは複数の構成成分の安定化を助けるのに使用される

緩衝液／賦形剤のタイプ、絹精製法（例えば、煮沸時間などの精練条件）、本明細書に記載の絹ベース材料を形成するための方法、滅菌方法、ならびにこれらの任意の組合せがある。

【０１６３】

一部の実施形態では、絹ベース材料の溶解度または溶解性は、絹の分子量／鎖長によって調節され得る。一般に、より低い分子量／鎖長の絹フィブロインを含む絹ベース材料は、より高い分子量／鎖長の絹フィブロインを含むものより水性溶媒中で高い溶解性を有し得る。一実施形態では、絹フィブロインの分子量／鎖長は、精練条件によって調節され得る。例えば、絹繭を、例えば、約１分～約３時間、約５分～約２時間、約１０分～約１．５時間、または約１５分～約１時間の範囲の所定時間にわたって塩溶液（例えば、$Na_2CO_3$）中で煮沸することができる。一部の実施形態では、絹繭を、少なくとも約１分、少なくとも約１０分、少なくとも約２０分、少なくとも約３０分、少なくとも約４５分、少なくとも約１時間、少なくとも約２時間、またはそれ超にわたって塩溶液（例えば、$Na_2CO_3$）中で煮沸することができる。理論に束縛されることを望むわけではないが、煮沸時間がより長いと、より低い分子量／鎖長の絹フィブロインを生じ得る。分子量、粘度、拡散性、および分解挙動を含めた絹材料性質に対する精練の効果の詳細については、例えば、Pritchard EMら、「Effect of Silk Protein Processing on Drug Delivery from Silk Films」、Macromol Biosci.、２０１３年１月２４日電子出版を参照。安定化される生体試料およびこれらの構成成分（複数可）のタイプに応じて、最適精練時間を、例えば、実施例に記載されているように、絹ベース材料の所望の溶解性、およびしたがって構成成分の回収率について決定することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載の絹ベース安定化組成物は、低分子量絹組成物である。

【０１６４】

実際に、本発明者らは、様々な形態の低分子量絹フィブロイン組成物が、その中に付随し、または組み込まれる作用物質（例えば、生体試料）を保護および／または安定化するのに特に有利な性質を提供することを発見した。例えば、本明細書に記載の低分子量絹組成物は、変動する温度プロファイルなどの広く変動する環境要因に対して、かつ／または例えば、輸送、貯蔵、および／または取扱い中に遭遇する機械的な摂動に対して、生体試料を保護する「分子安定剤」として作用することができる。また、本発明者らは、本明細書に開示の低分子量絹フィブロインを含む組成物は、水中で完全に再構成され得ることを発見した。対照的に、高分子量絹フィブロインは、同様の条件下で水中で十分に再構成されない。高分子量形態は、同様の条件下で水中で再構成される場合、凝集体を形成する。

【０１６５】

これまで、これらのユニークな特質、すなわち、ｉ）試料調達の容易さ、ｉｉ）素晴らしい熱／機械的安定性プロファイル、ｉｉｉ）再構成／回収の単純性および収率を組み合わせる技術は、当技術分野において記載されていない。しかし、本明細書で実証するように、本開示は、ｉ）試料調達の容易さ、ｉｉ）素晴らしい熱／機械的安定性プロファイル、ｉｉｉ）再構成／回収の単純性および収率をもたらす組成物および方法を提供する。理論に束縛されることを望むわけではないが、絹フィブロインは、酵素／熱／ＵＶ劣化に対して高度に耐性であり、絹フィブロイン組成物中の封入された作用物質（例えば、活性作用物質および／または生体試料）は、冷蔵／凍結の必要なく、集中型の施設において長期貯蔵（すなわち、継続時間において数カ月～数年）用にバンキングすることができ、作用物質が使用および／または分析される状態であるときいつでも、後に容易に回収され得ると考えられる。したがって、本明細書に提供される絹フィブロイン組成物、特に低分子量絹フィブロイン組成物は、母集団全体の時系列データセットの収集または個別化された薬の増強を可能にすることができる。

【０１６６】

本発明者らは特に、本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン組成物の１つまたは複数の実施形態中に生体試料を組み込むと、ある特定の条件下である時間にわたって、生体試料中に存在する検出可能部分を安定化させることができ、これはひいては、慣例的な絹フ

ィブロインベース材料からの検出可能部分の回収率と比較して、例えば、構成成分の後続の分析および／または特徴付けのための、その後の検出可能部分のより高い回収率を可能にし得ることを発見した。

【０１６７】

一部の実施形態では、本開示は、試料の封入、安定化、および後続の回収のための、本明細書に開示の低分子量絹フィブロイン組成物（例えば、望ましい性質、例えば、溶解性の増強（慣例的な絹フィブロインベース材料と比べた）、添加剤の回収率の増強（慣例的な絹フィブロインベース材料と比べた）などを伴った様々な可溶性形態または固体形態の低分子量絹フィブロインベース材料、例えば、溶液、フィルム、粒子もしくは粉末、スキャフォールド、メッシュ、および／または繊維などを生成するように調整された）の使用を提供する。一部の実施形態では、試料は、生体試料である。

【０１６８】

本明細書に記載の絹フィブロイン組成物中の活性作用物質／生体試料に対する絹フィブロインの量は、いくつかの要因について調整することができ、この要因としては、例えば、それだけに限らないが、生体試料の体積および／またはタイプ、絹フィブロイン濃度、結果として生じる絹ベース材料の溶解性、安定化および／または検出される標的構成成分の存在量、生体試料中に存在する構成成分の回収効率、特定の構成成分について選択される検出／特徴付け方法の検出感度がある。

【０１６９】

一部の実施形態では、絹フィブロインと活性作用物質／試料／構成成分の比（例えば、質量比、体積比、またはモル比）は、約１：１００００～約１００００：１または約１：１０００～約１０００：１の範囲内である。一部の実施形態では、比（例えば、質量比、体積比、またはモル比）は、約１：１～約１０００：１である。一部の実施形態では、比は、約１：１０００～約１０００：１、約１：５００～約５００：１、約１：２５０～約２５０：１、約１：１２５～約１２５：１、約１：１００～約１００：１、約１：５０～約５０：１、約１：２５～約２５：１、約１：１０～約１０：１、約１：５～約５：１、約１：３～約３：１、または約１：１である。単なる例として、一部の実施形態では、絹フィブロインと血液試料の体積比は、約１：１～約１０００：１、または約１：１～約１００：１、または約１：１～約５０：１、または約１：１～約２５：１の範囲内にあり得る。

【０１７０】

絹フィブロインマトリックスと活性作用物質／試料／構成成分の比は、いくつかの要因によって変化し得、この要因としては、活性作用物質の選択、貯蔵の条件および継続時間、絹フィブロインマトリックスの濃度、ならびに絹マトリックスの形態がある。当業者は、例えば、規定された条件下で、例えば、０℃超の温度で、所定の量の時間にわたって本明細書に記載の様々な比で保持される活性作用物質の生物活性を測定することによって、絹フィブロインマトリックスと活性作用物質の適切な比を判定することができる。本明細書に記載の様々な活性作用物質、例えば、酵素、ワクチン、タンパク質、抗体、および核酸の生物活性を測定するための方法は、当技術分野で周知である。例として、絹フィブロイン中の所与の活性作用物質の安定性または生物活性は、時間と温度の組合せに基づいて判定され得る。例えば、安定化試験を６カ月にわたって行うことができる。活性アッセイは、例えば、２週間後、４週間後、次いで毎月行うことができる。試料は、各時点についてＮ＝３をもたらすように調製され得る。評価される温度貯蔵条件の範囲として、４℃（冷蔵）、２５℃（室温）、３７℃（体温）、４５℃、および／または５０℃（一切を含む）がある。代替としてまたは追加的に、活性は、１回、２回、３回、またはそれ超の凍結解凍サイクル後にアッセイすることができる。これらの変数は、活性作用物質（複数可）の長期安定性のための最適な配合を十分に特徴付けるように網羅的に組み合わせることができる。一部の実施形態では、絹関連活性作用物質安定性の結果は、例えば、凍結乾燥活性作用物質調製物の製造に推奨される貯蔵条件（例えば、４℃）の安定性を改善する目的で、同じ貯蔵条件を用いた凍結乾燥活性作用物質調製物と比較され得る。

【０１７１】
本明細書に記載の安定化絹フィブロイン組成物は、任意の量の絹フィブロインを有することができ、ただしその量は、ある時間にわたって生体試料の少なくとも１種の構成成分の少なくとも１つの性質を安定化し、その時間後に活性作用物質／試料／構成成分の検出を可能にするのに十分である。一部の実施形態では、組成物中の絹フィブロインの量は、例えば、本明細書に記載の作用物質／試料／構成成分のタイプおよび／もしくは体積サイズ、絹ベース材料の形態（例えば、フィルム対発泡体）、形成される任意の絹ベース材料の製作方法（例えば、空気乾燥対凍結乾燥）、ならびに／または最初の絹フィブロイン組成物を形成するのに使用される絹フィブロイン濃度によって変化する。

【０１７２】
ほんの数例を与えると、絹ベース安定化材料は、約０．２５％～約５０％（ｗ／ｖ）の絹フィブロイン、または約０．５％～約３０％（ｗ／ｖ）、または約０．５％～約１５％（ｗ／ｖ）、または約０．５％～約１０％（ｗ／ｖ）を含む作用物質含有絹溶液から調製され得る。一部の実施形態では、絹ベース材料は、生体試料を含む絹溶液であり得る。例えば、一実施形態では、絹ベースフィルムは、約１％～約１５％（ｗ／ｖ）の絹フィブロインおよび活性作用物質または生体試料／構成成分を含む絹溶液から調製され得る。別の実施形態では、絹ベース発泡体は、約０．１％～約５％（ｗ／ｖ）の絹フィブロインおよび活性作用物質／生体試料／構成成分を含む絹溶液から調製され得る。

【０１７３】
一部の実施形態では、絹ベース材料は、生体試料を含む絹溶液から形成される固体状態絹ベース材料であり得る。

【０１７４】
一部の実施形態では、作用物質／試料／構成成分は、本明細書に記載の時間にわたって、ある範囲の貯蔵温度にわたって絹組成物（例えば、低分子量ベース組成物）中に安定化され得、分析のための生体試料の少なくとも１種の構成成分の回収および／または検出を可能にし得る。生体試料に要求される典型的な零度未満の貯蔵温度（例えば、－８０℃のフリーザー中または液体窒素中）と異なり、本明細書に記載の絹ベース材料は、０℃超またはそれ超の貯蔵温度で生体試料がその中で安定化されるのを可能にし得る。一部の実施形態では、貯蔵温度は、約０℃～約周囲温度の範囲であり得る。一部の実施形態では、貯蔵温度は、少なくとも約４０℃、または４０℃超であり得る。一部の実施形態では、貯蔵温度は、少なくとも約４５℃、または４５℃超であり得る。

【０１７５】
一部の実施形態では、作用物質／試料／構成成分は、本明細書に記載の時間にわたって、光曝露下で本明細書に記載の絹フィブロイン組成物中に安定化され得、分析のための生体試料の少なくとも１種の構成成分の回収および／または検出を可能にし得る。例えば、一部の実施形態では、組成物中に存在する作用物質／試料／構成成分は、光、例えば、異なる波長の、かつ／または異なる源からの光に曝露され得る。一部の実施形態では、絹ベース材料中に存在する作用物質／試料／構成成分は、ＵＶまたは赤外線照射に曝露され得る。一部の実施形態では、絹ベース材料中に存在する作用物質／試料／構成成分は、可視光下に曝露され得る。

【０１７６】
一部の実施形態では、生体試料は、本明細書に記載の時間にわたって、ある範囲の相対湿度にわたって、提供される絹フィブロイン組成物中に安定化され得、分析のための生体試料の少なくとも１種の構成成分の回収および／または検出を可能にし得る。一部の実施形態では、相対湿度は、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、またはそれ超であり得る。

【０１７７】
用語「相対湿度」は、本明細書において、空気と水蒸気の混合物中の水蒸気の量の測定値である。これは一般に、空気－水混合物中の水蒸気の分圧として定義され、これらの条

件下での飽和蒸気圧の百分率として与えられる。

【０１７８】

一部の実施形態では、記載した安定化絹フィブロイン組成物は、例えば、貯蔵中の残留水分を減少させるために凍結乾燥され得る。一部の実施形態では、残留水分は、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または少なくとも約９５％減少する。

【０１７９】

一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、任意の空気圧下で維持することができ、または任意の空気圧に曝すことができる。一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、約大気圧またはそれ超、例えば、約１気圧、約２気圧、約３気圧、約４気圧、約５気圧、約６気圧、約７気圧、約８気圧、約９気圧、または約１０気圧下で維持することができ、またはその気圧に曝すことができる。一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、真空下で維持することができ、または真空に曝すことができる。

【０１８０】

一部の実施形態では、必ずしもではないが、絹フィブロイン組成物（例えば、絹ベース溶液）が零度未満の温度で貯蔵される場合、作用物質／試料／構成成分は、少なくとも１回または複数の凍結解凍サイクル（例えば、凍結された絹ベース溶液から解凍された凍結絹ベース溶液）の後に組成物中に安定化され得、分析のための生体試料の少なくとも１種の構成成分の回収および／または検出を可能にし得る。用語「凍結解凍サイクル」は、一連の交互する凍結および解凍を記述するのに本明細書で使用され、一連の交互する凍結（固体）状態および流体状態も包含する。例えば、１回の凍結解凍サイクルは、凍結（固体）状態と流体状態との間の状態の変化を伴う。凍結と解凍との間、または凍結状態と流体状態との間の時間間隔は、任意の時間、例えば、数時間、数日、数週間、または数カ月であり得る。例えば、絹ベース溶液が凍結された、または凍結状態になった後、これは、これが再び使用するために解凍される必要があるまで、零度未満の温度で、例えば、約－２０℃から－８０℃の間で凍結状態で連続して貯蔵され得る。組成物の凍結は、例えば、液体窒素中で急速に、または例えば、凍結温度中で、例えば、約－２０℃から－８０℃の間で徐々に実施され得る。凍結組成物の解凍は、０℃超の任意の温度で急速に、例えば、室温で、または例えば、氷上で徐々に実施され得る。典型的には、非絹フィブロインマトリックス中の生体試料の構成成分、例えば、タンパク質および／または核酸は、１回または複数の凍結解凍サイクルにわたってその活性または完全性を失い得る。本明細書に記載するように、絹フィブロインマトリックス中に生体試料を分布させると、その少なくとも１種の構成成分の安定性を増大させ、したがって、１回または複数の凍結解凍サイクル中にその活性または完全性を保持することができる。

【０１８１】

一実施形態では、作用物質／試料／構成成分は、上述した２つまたはそれ超の条件下で、本明細書に記載の時間にわたって、提供される絹フィブロイン組成物中に安定化され得、分析のための作用物質／試料／構成成分の少なくとも１種の構成成分の回収および／または検出を可能にし得る。

【０１８２】

本明細書に提供される別の態様は、活性作用物質の生物活性を維持し、または安定化させる方法および組成物に関する。本方法は、組成物を維持するステップを含み、組成物は、絹フィブロインマトリックス、およびその中に分布、混合、または包埋された少なくとも１種の活性作用物質を含み、少なくとも１種の活性作用物質は、組成物がある時間にわたって活性作用物質の生物活性を阻害または低減する指定条件に供されているとき、その元の生物活性の少なくとも約３０％を保持し、または安定化させる。このような条件として、それだけに限らないが、状態変化サイクル、温度、空気圧、湿度、および光曝露を挙げることができる。

【０１８３】

用語「状態変化サイクル」は、本明細書において、それだけに限らないが、固体状態から流体状態、または流体状態から固体状態を含めた材料状態の変化を指す。流体状態として、それだけに限らないが、液体、気体、スラリー、流動性を有するペースト、プラズマ、およびこれらの任意の組合せを挙げることができる。固体状態は、流動性を有さない状態を指し、これは、半固体、例えば、ゲルも包含し得る。本明細書に記載の組成物は、別の状態に変化する前に、任意の時間、例えば、数秒、数分、数時間、数週間、数カ月、または数年にわたってある特定の状態で維持され得る。状態変化サイクルは、本明細書に記載の環境条件の少なくとも１つの変化、例えば、温度変化、周囲空気圧、光条件、湿度の変化、またはこれらの任意の組合せから生じ得る。

【０１８４】

一実施形態では、状態変化サイクルは、凍結解凍サイクルを指す。このような実施形態では、本明細書に記載の組成物は、貯蔵または輸送されるとき、少なくとも１回の凍結解凍サイクル、少なくとも２回の凍結解凍サイクル、少なくとも３回の凍結解凍サイクル、少なくとも４回の凍結解凍サイクル、少なくとも５回の凍結解凍サイクル、少なくとも６回の凍結解凍サイクル、少なくとも７回の凍結解凍サイクル、少なくとも８回の凍結解凍サイクル、少なくとも９回の凍結解凍サイクル、少なくとも１０回の凍結解凍サイクル、またはそれ超に供され得る。用語「凍結解凍サイクル」は、一連の交互する凍結および解凍を記述するのに本明細書で使用され、一連の交互する凍結（固体）状態および流体状態も包含する。例えば、１回の凍結解凍サイクルは、凍結（固体）状態と流体状態との間の状態の変化を伴う。凍結と解凍との間、または凍結状態と流体状態との間の時間間隔は、任意の時間、例えば、数時間、数日、数週間、または数カ月であり得る。例えば、活性作用物質組成物が凍結された、または凍結状態になった後、これは、これが再び使用するために解凍される必要があるまで、零度未満の温度で、例えば、約－２０℃から－８０℃の間で凍結状態で連続して貯蔵され得る。組成物の凍結は、例えば、液体窒素中で急速に、または例えば、凍結温度中で、例えば、約－２０℃から－８０℃の間で徐々に実施され得る。凍結組成物の解凍は、０℃超の任意の温度で急速に、例えば、室温で、または例えば、氷上で徐々に実施され得る。典型的には、非絹フィブロインマトリックス中の活性作用物質は、１回または複数の凍結解凍サイクルにわたってその生物活性を失い得る。本明細書に記載するように、絹フィブロインマトリックス中に活性作用物質を分布させると、活性作用物質の安定性を増大させ、したがって、１回または複数の凍結解凍サイクル中にその生物活性を保持することができる。

【０１８５】

本明細書に記載の様々な態様の実施形態は、安定化された活性作用物質をもたらし、ここで活性作用物質の安定化は、本明細書に開示の絹フィブロイン組成物中に活性作用物質を分布させ、混合し、または包埋することによって実現される。絹フィブロインは、絹フィブロイン溶液、または固体状態絹フィブロインマトリックス、例えば、絹フィブロイン物品であり得る。この手法は、活性作用物質が貯蔵および／または輸送されるコールドチェーンおよび／または環境条件にかかわらず、活性作用物質が生物活性を保持することをもたらす。例示的な環境条件としては、それだけに限らないが、温度、空気圧、湿度、および光曝露がある。例えば、コールドチェーンは、医薬産業における活性作用物質を安定化させるための標準的な習慣であり、コールドチェーンを維持すると、活性作用物質が、使用の時間まで製造者が推奨する温度範囲（例えば、２℃～８℃、または零度未満の温度）に従って輸送および貯蔵されるのが保証される。

【０１８６】

一部の実施形態では、活性作用物質を含む絹フィブロイン組成物は、インプラント、またはインプラント可能薬物送達デバイスの形態にある。このような組成物中の活性作用物質は、ある時間にわたって、その元の生物活性の少なくとも３０％（少なくとも約４０％、少なくとも約６０％、少なくとも約８０％、もしくはそれ超を含む）、またはそれ超を保持し得る。一部の実施形態では、インプラント可能薬物デバイスの形態にある絹フィブロイン組成物中の活性作用物質は、インプラントした後、少なくとも約６時間、少なくと

も約１２時間、少なくとも約２４時間、少なくとも約３６時間、少なくとも約４８時間、少なくとも３日、少なくとも約４日、少なくとも約５日、少なくとも約６日、少なくとも約１週間、少なくとも約２週間、少なくとも約３週間、少なくとも約４週間、少なくとも約２カ月、少なくとも約３カ月、少なくとも約４カ月、少なくとも約５カ月、少なくとも約６カ月、もしくは少なくとも１年後、またはそれ超にわたって、その元の生物活性の少なくとも約３０％、またはそれ超を保持し得る。

【０１８７】

一部の実施形態では、注射用絹フィブロイン組成物中に被包された１種または複数の活性作用物質は、活性作用物質のデポー（例えば、ワクチンデポー）として対象に投与することができ（例えば、皮下注射などの注射によって）、その結果、活性作用物質（例えば、ワクチン）は、長期間にわたって、例えば、数時間、数日、数週間、または数カ月の期間にわたってデポーから連続的または断続的に放出され得る。一部の実施形態では、活性作用物質（例えば、ワクチン）は、被包された活性作用物質の少なくとも約１％（少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、またはそれ超を含む）が、少なくとも１時間、少なくとも２時間、少なくとも３時間、少なくとも約４時間、少なくとも約５時間、少なくとも約６時間、少なくとも約１２時間、少なくとも約２４時間、またはそれ超の期間にわたって放出される速度で放出され得る。一部の実施形態では、活性作用物質（例えば、ワクチン）は、被包された活性作用物質の少なくとも約１０％（少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、またはそれ超を含む）が、５日の期間、１週間、少なくとも約２週間、少なくとも約３週間、少なくとも約１カ月、少なくとも約２カ月、少なくとも約３カ月、またはそれ超の期間にわたって放出される速度で放出され得る。

【０１８８】

一部の実施形態では、絹フィブロイン組成物中の活性作用物質は、約４℃、約２５℃、約３７℃、約４５℃、またはそれ超で、少なくとも最大６カ月にわたって、その元の生物活性の少なくとも約３０％、例えば、元の生物活性の例えば、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、またはそれ超の活性を保持する。一部の実施形態では、活性作用物質は、約３７℃またはそれ超の温度で、少なくとも６カ月にわたって元の生物活性の少なくとも約８％を保持する。

【０１８９】

本明細書に記載の特定の態様は、貯蔵に安定した組成物であって、絹フィブロイン組成物（例えば、低分子量絹フィブロイン組成物）、およびその中に分布、混合、または包埋された活性作用物質を含み、活性作用物質は、組成物が少なくとも１回の状態変化サイクルに供され、かつ／または本明細書に指定した１つまたは複数の条件下である時間にわたって維持される場合、その元の生物活性の少なくとも約３０％（例えば、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％など）を保持する、組成物である。一部の実施形態では、活性作用物質は、組成物中の絹フィブロイン断片に共有結合的または非共有結合的に融合または連結され得る。一実施形態では、状態変化サイクルは、凍結解凍サイクルである。一実施形態では、活性作用物質を維持するための時間は、少なくとも約２４時間である。一部の実施形態では、指定条件は、活性作用物質が貯蔵および／または輸送される環境条件であり得る。環境条件の非限定例は、温度、空気圧、湿度、および光曝露がある。一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、免疫原性であり得る。一部のそのような実施形態では、活性作用物質は、免疫原である。一部の実施形態では、活性作用物質は、ワクチンである。

【０１９０】
一部の態様では、本明細書に記載するように、本発明は、生体試料または活性作用物質を安定化させる方法を提供する。一般に、本方法は、生体試料または活性作用物質を本明細書に開示の絹フィブロイン組成物と接触させ、組み合わせ、または混合し、それによって、絹フィブロインおよび生体試料または活性作用物質を含む混合物を準備するステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、混合物から絹ベース材料（例えば、絹フィブロイン物品）を形成するステップをさらに含む。したがって、一部の実施形態では、生体試料または活性作用物質を安定化させるための方法は、生体試料または活性作用物質を含む低分子量絹フィブロイン組成物を準備するステップと、組成物から絹ベース物品を形成するステップとを含む。一部の実施形態では、活性作用物質／試料／構成成分を含む絹フィブロイン組成物が固体状態にあるとき、これは、絹フィブロイン中にベータシート二次構造の形成を誘導するためにさらに処理され得る。
【０１９１】
一部の実施形態では、提供される方法は、生体試料または活性作用物質を絹フィブロイン組成物と接触させるステップを含み、組成物は、粉末の形態にある。これの一部のさらなる実施形態では、本方法は、組成物から溶液を形成するステップをさらに含む。
【０１９２】
一部の実施形態では、本方法は、生体試料または活性作用物質を絹フィブロイン組成物と接触させるステップを含み、組成物は、溶液の形態にある。
【０１９３】
一部の実施形態では、生体試料または活性作用物質を含む溶液組成物は、成形されて絹フィブロイン物品にされ得る。結果として生じる物品は、水溶液（例えば、水、緩衝液、またはこれらの組合せ）中に可溶性であり得る。
【０１９４】
本明細書に記載の組成物内の生体試料に対する絹フィブロインの量は、いくつかの要因について調整することができ、この要因として、例えば、それだけに限らないが、生体試料の体積および／またはタイプ、絹フィブロイン濃度、結果として生じる絹ベース材料の溶解性、安定化および／または検出される標的構成成分の存在量、生体試料中に存在する構成成分の回収効率、特定の構成成分について選択される検出／特徴付け方法の検出感度がある。例えば、既に記載したように、一部の実施形態では、絹フィブロインと生体試料の比（例えば、質量比、体積比、またはモル比）は、約１：１００００～約１００００：１または約１：１０００～約１０００：１の範囲であり得る。一部の実施形態では、絹フィブロインと生体試料の比（例えば、質量比、体積比、またはモル比）は、約１：１～約１０００：１である。単なる例として、一部の実施形態では、絹フィブロインと血液試料の体積比は、約１：１～約１０００：１、または約１：１～約１００：１、または約１：１～約５０：１、または約１：１～約２５：１の範囲であり得る。
【０１９５】
活性作用物質／構成成分
絹組成物（例えば、本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン組成物）は、様々な活性かつ／または不安定な作用物質のいずれも含み／組み込み得る。
【０１９６】
本明細書に記載の絹フィブロイン組成物から貯蔵、安定化、分析、および／または回収され得る生体試料の非限定例としては、それだけに限らないが、例えば、全血試料、血漿試料、および血清試料を含めた血液試料などの体液試料；尿試料；脳脊髄液試料、唾液試料、ならびにこれらの任意の組合せがある。一部の実施形態では、このような試料は、医療目的または臨床目的のために患者から収集され得る。一部の実施形態では、このような試料は、法医学的目的のために収集され得る。
【０１９７】
一部の実施形態では、例えば、作用物質の組込み、安定化、および回収との関連で、本明細書に記載の提供される絹フィブロイン組成物（例えば、低分子量絹組成物）のユニー

クな性質は、様々な封入された血液構成成分（例えば、細胞、循環因子、例えば、ホルモン、増殖因子、サイトカイン、抗体、および他のタンパク質など、ＤＮＡまたはＲＮＡなどの核酸など）の十分な再構成を可能にする。例えば、指プリック体積と等価な採血物を、絹フィブロイン溶液と混合して少なくとも部分的に乾燥された絹ベース材料を形成することができ、その後、安定化された血液構成成分を含有する少なくとも部分的に乾燥された絹ベース材料を容易に調達することができ、これは、使用および／または分析される状態になるまで貯蔵することができる。

【０１９８】

血液試料に加えて、例えば、それだけに限らないが、尿、血液、糞便、耳垢、核酸（例えば、ＤＮＡ／ＲＮＡ、修飾核酸）、抗体、全細胞、治療剤を含めた、診断目的で使用される他の生体試料も、性能の必要性および試料の利用可能性に応じて、同様の様式で絹フィブロインと結び付けることができる。生体試料を含む提供される絹フィブロイン組成物は、ある時間にわたって生体試料の１種または複数の構成成分を安定化させることができ、それにより、生体試料またはその構成成分の後続の分析および／または特徴付けが可能になる。したがって、本明細書に記載の様々な態様の実施形態は、絹フィブロインベース組成物であって、それと混合された、またはそれに封入された生体試料の少なくとも１種の構成成分の安定化のための、後の時間に構成成分の検出を可能にする、絹フィブロインベース組成物、ならびにこの絹フィブロインベース組成物を作製する方法および使用する方法にも関する。

【０１９９】

本明細書に記載の様々な実施形態によれば、低分子絹フィブロイン内に混合または封入される生体試料は、その少なくとも１種の構成成分について安定化され、かつ／または構成成分の存在について評価されることが意図されている任意の流体または検体（処理済みまたは未処理の）を含む。生体試料は、液体、超臨界流体、溶液、懸濁液、気体、ゲル、スラリー、固体、およびこれらの組合せであり得る。

【０２００】

一部の実施形態では、生体試料は、水性流体を含み得る。本明細書において、用語「水性流体」は、任意の流動性を有する水含有材料を指す。

【０２０１】

一部の実施形態では、生体試料は、対象、例えば、ヒト対象などの哺乳動物対象から得ることができる。対象から得られる例示的な生体試料として、それだけに限らないが、生体細胞、組織、血液（全血、血漿、臍帯血、および血清を含む）、泌乳産物（lactation product）（例えば、乳）、羊膜液、痰、唾液、尿、精液、脳脊髄液、気管支吸引液、汗、粘液、液化糞、滑液、リンパ液、涙、気管吸引液、ならびにこれらの画分を挙げることができる。一部の実施形態では、生体試料は、対象に由来する組織検体（例えば、生検）のホモジネートを含み得る。一実施形態では、生体試料は、固形臓器またはその断片から得られる固体試料のホモジナイゼーションから得られる懸濁液を含み得る。生体試料は、生体試料タイプによって様々となり得る当技術分野で公知の任意の手段によって対象から得ることができる。単なる例として、血液試料は、例えば、指プリック、微細針、静脈採血、または血液試料を収集するための任意の公知の方法によって対象から得ることができる。

【０２０２】

一部の実施形態では、生体試料は、生細胞または死細胞（原核生物、および哺乳動物を含めた真核生物）、ウイルス、細菌、真菌、酵母、原生動物、微生物、ならびに寄生虫からなる群から選択される生体細胞を含み得る。生体細胞は、正常細胞、または疾患細胞、例えば、がん細胞であり得る。哺乳動物細胞としては、限定することなく、霊長類、ヒト、ならびに限定することなく、マウス、ハムスター、ウサギ、イヌ（dog）、ネコ（cat）、トリ、家庭動物、例えば、ウマ、ウシ、マウス、ヒツジ、イヌ（canine）、およびネコ（feline）などを含めた目的の任意の動物に由来する細胞がある。一部の実施形態では、細胞は、ヒト対象に由来し得る。他の実施形態では、細胞は、飼いならされた動物、例え

ば、イヌまたはネコに由来する。例示的な哺乳動物細胞としては、それだけに限らないが、幹細胞、がん細胞、前駆細胞、免疫細胞、血液細胞、胎児細胞、およびこれらの任意の組合せがある。細胞は、限定することなく多種多様な組織型、例えば、造血、神経、間葉、皮膚、粘膜、間質、筋肉、脾臓、細網内皮、上皮、内皮、肝臓、腎臓、胃腸、肺、心血管、Ｔ細胞、および胎児などに由来し得る。限定することなく、造血、神経、間質、筋肉、心血管、肝臓、肺、および胃腸の幹細胞を含めた、幹細胞、胚性幹（ＥＳ）細胞、ＥＳ由来細胞、人工多能性幹細胞、および幹細胞前駆細胞も含まれる。酵母細胞も、本明細書に記載の一部の実施形態において細胞として使用され得る。一部の実施形態では、細胞は、ｅｘ　ｖｉｖｏ、または培養細胞、例えば、ｉｎ　ｖｉｔｒｏであり得る。例えば、ｅｘ　ｖｉｖｏ細胞について、細胞は、対象から得ることができ、この場合、対象は、健康であり、かつ／または疾患を罹患している。

【０２０３】

一部の実施形態では、生体試料は、動物の部分、例えば、それだけに限らないが、１つまたは複数の臓器（皮膚を含む）、筋肉、くちばし、鉤爪、羽毛、翼、および／または尾に由来する組織を含み得る。

【０２０４】

一部の実施形態では、生体試料は、供給源、例えば、それだけに限らないが、研究室、動物群体、犯罪現場、細胞バンクもしくは受託機関、血液バンク、組織バンク、生物検体受託機関、診断検査施設、臨床現場、および／またはこれらの任意の組合せに由来する流体または検体を含み得る。

【０２０５】

一部の実施形態では、生体試料は、生物培養からの流体（例えば、培養培地）および／または細胞を含み得る。生物培養から得られる流体（例えば、培養培地）および／または細胞の例には、例えば、原核生物（例えば、細菌）、および真核生物（例えば、動物細胞、植物細胞、酵母、真菌）を含め、かつこれらの画分を含めた単細胞または多細胞生物の培養または発酵から得られるものが含まれる。

【０２０６】

一部の実施形態では、生体試料は、少なくとも１種の構成成分、または構成成分の混合物を含む。例えば、後続の検出および／または特徴付けのために安定化され得る構成成分の例として、それだけに限らないが、ペプチド、タンパク質、抗体、酵素、抗原、アミノ酸、核酸（例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、非コードＲＮＡ、または対象において内因的に見出され得るＲＮＡの任意のバリアント）、ヌクレオチド、代謝産物、脂質、糖、糖タンパク質、ペプチドグリカン、微生物、細胞、およびこれらの任意の組合せを挙げることができる。本明細書に記載の組成物および／または方法を使用して、例えば、少なくとも２種の構成成分、少なくとも３種の構成成分、少なくとも４種の構成成分、少なくとも５種の構成成分、またはそれ超を含めた少なくとも１種の構成成分を、ある時間にわたって安定化させることができ、その時間後に検出することもできる。一部の実施形態では、絹ベース材料は、生体試料（例えば、血液試料中の血漿または血清タンパク質）中の少なくとも１種または複数（例えば、１、２、３、４、５、またはそれ超）のタンパク質を安定化させることができ、このタンパク質は、後の時間に検出することができる。一部の実施形態では、絹ベース材料は、血液試料中の少なくとも１種または複数（例えば、１、２、３、４、５、またはそれ超）の無細胞または循環ＤＮＡまたはＲＮＡを安定化させることができる。一部の実施形態では、絹ベース材料は、生体試料中に存在する少なくとも１種または複数（例えば、１、２、３、４、５、またはそれ超）の診断用バイオマーカーを安定化させることができる。

【０２０７】

一部の実施形態では、絹ベース材料は、ＲＮＡの活性および／または完全性を安定化させることができ、本明細書に記載の絹フィブロイン組成物および方法は、それだけに限らないが、ＤＮＡ、ＲＮＡ、および修飾ＤＮＡまたはＲＮＡを含めた任意の核酸を安定化させるのに使用され得ることが企図されている。いくつかの例示的な核酸としては、ペプチ

ドプラスミドＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、ｍＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、プレｍｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ｓｈＲＮＡ、活性化ＲＮＡ、デコイオリゴヌクレオチド、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、オリゴヌクレオチド、および／または治療目的で対象に投与され得る任意の核酸がある。

【０２０８】

一部の実施形態では、本明細書に記載の絹フィブロイン組成物の１つまたは複数の実施形態中に生体試料を組み込んだ際、生体試料の少なくとも１種の構成成分（例えば、少なくとも１種の検出可能な実体）の状態を安定化させることが望ましい場合がある。単なる例として、生体試料中に存在するタンパク質は、活性または不活性状態にあり得る。一部の実施形態では、生体試料のタンパク質の活性または天然の状態、例えば、リン酸化タンパク質、または糖化タンパク質が、絹フィブロイン材料中で安定化または維持され得る。これらの実施形態は、例えば、構成成分の活性または状態が疾患または障害の診断において役割を果たす場合、有用であり得る。例えば、翻訳後修飾のある特定の状態またはレベルは、疾患状態と相関し、その結果、診断において役立つ。一部の実施形態では、翻訳後修飾としては、それだけに限らないが、リン酸化、ミリストイル化、パルミトイル化、イソプレニル化またはプレニル化、ファルネシル化、ゲラニルゲラニル化、グリピエーション、グリコシルホスファチジルイノシトール（glycosylphosphotidylinositol）アンカー形成、リポイル化、フラビン部分の付着、ヘムＣの付着、ホスホパンテテイニル化、レチニリデンシッフ塩基形成、ジフタミド形成、エタノールアミンホスホグリセロール付着、ヒプシン形成、アシル化、アセチル化、ホルミル化、アルキル化、メチル化、アミド結合形成、Ｃ末端におけるアミド化、アミノ酸付加、アルギニル化、ポリグルタミル化、ポリグリシル化、ブチリル化、ガンマーカルボキシル化、グリコシル化、ポリシアリル化、マロニル化、ヒドロキシル化、ヨード化、ヌクレオチド付加、酸化、リン酸エステルまたはホスホラミデート形成、リン酸化、アデニリル化、プロピオニル化、ピログルタミン酸形成、Ｓ－グルタチオニル化、Ｓ－ニトロシル化、スクシニル化、硫酸化、セレノイル化、糖化、ビオチン化、ペグ化、ＩＳＧ化、ＳＵＭＯ化、ユビキチン化、Ｎｅｄｄ化、Ｐｕｐ化、シトルリン化、アミド分解、エリミニレーション（eliminylation）、カルバミル化、ジスルフィド架橋、タンパク質分解的切断、およびプロリンのラセミ化がある。

【０２０９】

一般に、絹フィブロイン物品中に生体試料または作用物質を組み込むために、生体試料または活性作用物質を、絹フィブロイン物品を生産するのに使用される絹フィブロイン溶液中に含めることができる。代替としてまたは追加的に、予め形成された絹フィブロイン物品を、生体試料または活性作用物質を含む溶液に添加し、生体試料（もしくはその構成成分）または活性作用物質を絹フィブロイン物品中／上に吸収させることができる。

【０２１０】

一部の実施形態では、生体試料／作用物質は、絹ベース材料中に均質的または非均質的に（例えば、勾配中に）分布され得る。一部の実施形態では、生体試料は、絹ベース材料中の絹フィブロインによって被包または封入され得る。一部の実施形態では、生体試料は、絹ベース材料中の絹フィブロインと混合またはブレンドされ得る。

【０２１１】

絹ベース材料を形成した後、例えば、絹フィブロイン中のベータシート二次構造の形成を誘導するために、材料を処置することができる。絹フィブロイン中のベータシート二次構造の形成を誘導する方法は、本明細書の他の場所に記載されている。

【０２１２】

本明細書に記載の様々な態様の実施形態によれば、生体試料を含む絹フィブロイン組成物は、生体試料の少なくとも１種の構成成分を安定化させることができ、それにより、後の時間における構成成分の検出および／または分析が可能になる。一部の実施形態では、生体試料を含むこれらの絹ベース材料は、ヒトの健康の診断評価用に試料品質を維持／保持するために生体試料を現在貯蔵し、取り扱う典型的な方法である、冷蔵または凍結の必要なく貯蔵および／または輸送することができる。したがって、一部の実施形態では、本

明細書に記載の絹ベース材料および方法は、診断的適用に有用であり得る。例えば、絹ベース材料および方法は、貯蔵および／または輸送中に生体試料の品質を維持および／もしくは保持するために、または連続的な低温貯蔵をサポートする最低限のインフラが存在しないいくつかの発展途上国もしくは遠隔現場条件において使用することができ、その結果、生体試料の少なくとも１種の構成成分が診断的適用のためにアッセイされ得る。一部の実施形態では、本明細書に記載の絹ベース材料および方法は、先に述べた以下の条件の少なくとも１つまたは任意の組合せ、すなわち：（ａ）貯蔵および／または輸送中の０℃超の温度（例えば、少なくとも約室温またはそれ超）；（ｂ）貯蔵および／または輸送中の光曝露（例えば、ＵＶ、赤外線、および／または可視光）；ならびに（ｃ）貯蔵および／または輸送中の少なくとも約１０％またはそれ超の相対湿度の下で生体試料の品質を維持ならびに／または保持するのに使用され得る。

【０２１３】

したがって、本明細書に提供されるさらに別の態様は、本明細書に記載の絹ベース材料を使用するための方法に関する。本方法は、（ａ）活性作用物質／試料／構成成分を含む絹フィブロイン（例えば、低分子量絹フィブロイン）組成物の１つまたは複数の実施形態を準備するステップと、（ｂ）水中に組成物の少なくとも一部分を溶解させ、それによって絹フィブロインおよび検出可能な量の少なくとも１種の活性作用物質を含む試料溶液を形成するステップとを含む。

【０２１４】

一部の実施形態では、疾患または障害を診断する必要のある対象または患者は、生体試料を提供し、その生体試料を絹フィブロイン組成物と接触させることができ、次いでそれは、分析のために診断試験所に送られる。一部の実施形態では、生体試料は、臨床現場で熟練した開業医が対象から収集することができ、次いでそこで生体試料を絹フィブロイン（例えば、低分子量絹フィブロイン）と接触させ、分析のために診断試験所に送ることができる。

【０２１５】

一部の実施形態では、生体試料の少なくとも１種の構成成分を、生体試料から構成成分を単離することなく検出および／または分析することができるが、代替の実施形態では、構成成分は、当技術分野で公知の任意の方法を使用して、検出および／または分析の前に絹フィブロイン組成物の少なくとも一部分から抽出または回収することができる。本明細書に記載の絹ベース材料の一部の実施形態によれば、組成物は、水溶液（例えば、水、緩衝液、またはこれらの組合せ）中で可溶性であり得る。血液が濾紙上に吸収され、その後回収することが困難であるセルロースベース技術、例えば、乾燥血液スポットと異なり、本明細書に記載の絹フィブロイン組成物の少なくとも一部分は、水溶液（例えば、水、緩衝液、またはこれらの組合せ）中に可溶化し得る。このとき、最終的な絹／生体試料溶液は、追加の精製をすることなく、日常的な液体アッセイ、例えば、実施例に記載したＥＬＩＳＡおよびＬｕｍｉｎｅｘ（商標）アッセイに適用できるものとなり得る。したがって、一部の実施形態では、本方法は、生体試料の前記少なくとも１種の構成成分を少なくとも１種の分析に供する前に、絹フィブロイン組成物の少なくとも一部分を水溶液（例えば、水、緩衝液、またはこれらの組合せ）に接触させるステップをさらに含み得る。

【０２１６】

様々なタイプの分析を、例えば、標的構成成分の性格に応じて、生体試料の標的構成成分に対して実施することができる。分析の非限定例として、それだけに限らないが、遺伝子型判定、核酸配列決定、発現解析（例えば、タンパク質レベル、または転写レベル）、結合親和性、酵素活性、トランスフェクション効率、細胞計数、細胞同定、細胞生存能、免疫原性、感染力、代謝産物プロファイリング、およびこれらの任意の組合せを挙げることができる。一部の実施形態では、生体試料の少なくとも１種の構成成分を、少なくとも１種の遺伝子型判定もしくは核酸配列決定分析、発現解析（例えば、タンパク質レベルおよび／もしくは転写レベル）、代謝産物プロファイリング、またはこれらの任意の組合せに供することができる。これらの分析を実施するための様々な方法として、それだけに限

らないが、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、リアルタイム定量的ＰＣＲ、マイクロアレイ、ウエスタンブロット、免疫組織化学的分析、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、質量分析法、核酸配列決定、フローサイトメトリー、ガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、核磁気共鳴（ＮＭＲ）分光法、またはこれらの任意の組合せを挙げることができる。核酸配列決定の技法は、当技術分野で公知であり、核酸または遺伝子発現測定を判定するために構成成分をアッセイするのに使用することができ、例えば、それだけに限らないが、ＤＮＡ配列決定、ＲＮＡ配列決定、デノボ配列決定、超並列シグネチャー配列決定（ＭＰＳＳ）などの次世代配列決定、ポロニー配列決定、ピロシーケンシング、Ｉｌｌｕｍｉｎａ（Ｓｏｌｅｘａ）配列決定、ＳＯＬｉＤ配列決定、イオン半導体配列決定、ＤＮＡナノボール配列決定、Ｈｅｌｉｓｃｏｐｅ単一分子配列決定、単一分子リアルタイム（ＳＭＲＴ）配列決定、ナノ孔ＤＮＡ配列決定、ハイブリダイゼーションによる配列決定、質量分析法を用いた配列決定、マイクロ流体サンガー配列決定、顕微鏡観察ベース配列決定技法、ＲＮＡポリメラーゼ（ＲＮＡＰ）配列決定、またはこれらの任意の組合せがある。

【０２１７】

一部の実施形態では、少なくとも１種の分析は、読み取り機器またはシステムとインターフェースをとることができるフォーマットで実施され得る。一部の実施形態では、少なくとも１種の分析は、システム上で実施され得る。

【０２１８】

一部の実施形態では、分析の前、または生体試料を含む組成物を水溶液と接触させる前に、組成物をより小さい部分に低減またはアリコートすることができ、例えば、これらのいくつかを、後の分析のためにセーブすることができ、かつ／または異なる標的構成成分（例えば、タンパク質、核酸、および／または代謝産物）について分析することができる。より小さい部分へのアリコーティングは、重量または体積によるものであり得る。

【０２１９】

絹フィブロイン組成物からの少なくとも１種の作用物質の回収率は一般に、作用物質が被包されている絹フィブロイン組成物の溶解性、絹フィブロイン組成物中に存在しているときの作用物質の安定性、および／または後続の分析のために作用物質含有絹フィブロイン溶液を処理する容易さに部分的に依存する。本明細書に述べたように、本発明者らは、２００ｋＤａを超える分子量を有する絹フィブロイン断片のより大きい部分が存在する他の絹組成物（例えば、３０分未満にわたって絹繭を精練することによって得られる絹溶液から生成される絹組成物）と異なり、本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン組成物は、絹フィブロイン溶液を形成するのにいずれの添加剤（例えば、塩）または加熱も用いることなく、周囲温度で水中に容易に溶解または再可溶化することを意外にも発見した。例えば、一部の実施形態では、本明細書に記載の絹フィブロイン粒子（粉末を含む）およびフィルムは、脱イオン水中で、室温で容易に溶解または再可溶化し得る。したがって、一部の実施形態では、結果として生じる絹フィブロイン溶液は、他の方法では通常必要とされるいずれの後続の透析も用いることなく、使用される状態にあり得る。一部の実施形態では、本発明者らは、本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン組成物から再構成される絹フィブロイン溶液が、後続の分析のために流体工学ベース分析機内に直接注入され得ることを示した。さらに、結果として生じる絹フィブロイン溶液は、本明細書に記載の他の低分子量絹フィブロイン組成物を再形成するのに使用することもできる。

【０２２０】

再可溶化性および結果として生じる絹溶液から物品を再形成する能力というそのユニークなフィーチャに加えて、本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン組成物は、絹フィブロイン組成物の非存在下での作用物質の安定性と比較した場合、例えば、国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ１２／３４６４３号ならびに米国仮出願第６１／７９２，１６１号および同第６１／８３０，９５０号に記載されているように、長期間にわたって試料中の少なくとも１種または複数の作用物質を安定化させることもできる。したがって、一部の実施形態では、本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン組成物は、作用物質または試料が、将来の使

用および／または分析用に回収され、または取り戻されるために、ある時間にわたって安定化されることが望まれる任意の用途に適している。単なる例として、一部の実施形態では、低分子量絹フィブロイン物品の１つまたは複数の実施形態、例えば、低分子絹フィブロインフィルムまたは粉末中に被包された作用物質または試料は、それが使用および／または分析される状態になるまで、ある時間にわたって冷蔵することなく室温で貯蔵され得る。これらの実施形態では、作用物質または試料を含む低分子量絹フィブロイン物品の少なくとも一部分を、室温で水中に溶解させて使用可能な形態で作用物質または試料を回収することができる一方、試料の残りを、後の使用および／または他の分析のためにセーブすることができる。

【０２２１】

一部の実施形態では、本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン組成物中に被包された少なくとも望ましい、または検出可能な量の作用物質または試料を、使用可能な形態で回収することができる。本明細書において、用語「使用可能な形態」は、特定の用途に適用できる作用物質または試料の一形態を指す。例えば、作用物質または試料は、アッセイ分析のために溶液中に回収することができる。一部の実施形態では、用語「使用可能な形態」は、例えば、任意の当技術分野で認識されている精製法によって溶液から単離される作用物質または試料を包含し得る。低分子量絹フィブロイン組成物は、作用物質を安定化させることができ、容易に溶解可能であり得るので、非絹フィブロイン組成物からの作用物質または試料の回収と比較した場合、より小さいアリコートの低分子量絹フィブロイン組成物が一般に、望ましい、または検出可能な量の作用物質または試料をもたらすのに十分であり得る。別の言い方をすれば、同じ装填量の作用物質または試料を含有するアリコートで、本明細書に記載の低分子絹フィブロイン組成物からの作用物質または試料の回収率は、非絹フィブロイン組成物からの回収率と比較して、例えば、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、またはそれ超を含めた少なくとも約１０％またはそれ超増大し得る。

【０２２２】

一部の実施形態では、絹フィブロイン組成物（例えば、低分子量組成物）中の作用物質または試料の元の装填量の少なくとも約５０％またはそれ超が回収され得る。一部の実施形態では、低分子絹フィブロイン組成物中の作用物質または試料の元の装填量の、例えば、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、またはそれ超を含めた５０％超が回収され得る。一部の実施形態では、作用物質または試料は、室温で水（例えば、脱イオン水）中にこれらを被包している低分子量絹フィブロイン物品を溶解させることによって回収され得る。一部の実施形態では、作用物質または試料を含む溶解した絹フィブロイン物品は、さらなる処理、例えば、作用物質の分析、および／または絹フィブロイン溶液からの作用物質の精製に供することができる。

【０２２３】

本明細書に記載の低分子量絹フィブロイン組成物の操作および／または取扱いの容易さに起因して、本明細書に記載の組成物は、戦場設定で、診療所設定で、救急輸送中に、かつ／または家庭での使用に適用され得る。単なる例として、例えば、家庭または遠隔現場範囲から実験室施設への輸送用に血液試料を安定化させるために、家庭ユーザーまたは軍人は、保存安定性低分子量絹フィブロイン粉末を再構成して絹フィブロイン溶液を作製することができ、次いでそれとともに血液試料を一緒に混合することができる。次いで、血液試料の構成成分が絹フィブロインの存在下で安定化されている試料溶液混合物を実験室施設に送ることができる。一部の実施形態では、血液試料を含む絹フィブロイン溶液は、空気乾燥させて、物品、例えば、フィルムを形成することができ、この中で血液試料中の構成成分は、周囲温度でより長い時間、例えば、少なくとも１週間、少なくとも２週間、少なくとも３週間、少なくとも４週間、またはそれ超にわたって安定化され得る。本明細書に記載の低分子絹フィブロイン組成物および／または方法を使用して試料中の１種または複数の望ましい構成成分の活性および／またはレベルを保全すると、疾患もしくは障害

の新しいバイオマーカーの発見に役立つことができ、診断検査の感度を増大させることができ、かつ／またはより正確な診断検査読み取りをもたらすことができる。

【０２２４】

絹フィブロインを使用して生体試料を安定化させるための組成物および方法は、本発明者らの、２０１３年３月１５日に出願された米国仮出願第６１／７９２，１６１号、および２０１３年６月４日に出願された同第６１／８３０，９５０号に記載されており、これらの両方の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【０２２５】

例示的な組成物フォーマット

これらに限定されないが、本明細書に記載のような絹フィブロイン組成物（例えば、低分子量絹フィブロイン組成物、および／または生体試料もしくは安定化のための活性作用物質を含む絹フィブロイン組成物）は、任意の形態、形状またはサイズでよい。例えば、組成物は、溶液、繊維、フィルム、シート、繊維、マット、不織マット、メッシュ、布地、スポンジ、発泡体、ゲル、ヒドロゲル、チューブ、粒子（例えば、ナノもしくはマイクロ粒子、ゲル様粒子）、粉末、スキャフォールド、３次元構築物、基材上のコーティング層、または任意のこれらの組合せでよい。

【０２２６】

異なるフォーマットの絹をベースとする材料を生成する方法は、例えば、これらに限定されないが、乾燥、溶液キャスティング、塩浸出、凍結乾燥、ガス形成、エレクトロスピニング、ゲル化（例えば、電気的ゲル化）、剪断応力、超音波処理、ｐＨ低減、水アニーリング、水蒸気アニーリング、アルコール浸漬、繊維のドローイング、コーティング、吹き付け、微小化、または任意のこれらの組合せを含めて当技術分野において公知である。いくつかの特定の実施形態では、絹フィブロイン組成物（例えば、低分子量組成物および／または安定化組成物）は、任意選択で活性作用物質／試料／構成成分と共に、絹フィブロインの溶液を乾燥させることを伴う方法によって生成される。一部の実施形態では、乾燥は、凍結乾燥または空気乾燥を含む。

【０２２７】

一部の実施形態では、例えば、絹をベースとする材料中に残存する水分含有量によって、一部の実施形態では、絹をベースとする材料（例えば、固体状態の）は、少なくとも約１０重量％またはそれ超の絹フィブロインを含むことができる。例えば、絹をベースとする材料（例えば、固体状態の）は、重量で少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％またはそれ超の絹フィブロインを含むことができる。

【０２２８】

一部の実施形態では、本明細書に記載のような絹フィブロイン組成物（例えば、低分子量絹フィブロイン組成物および／または安定化絹組成物）は、粒子の形態である。例えば、絹フィブロイン物品は、絹ナノ球体または絹マイクロ球体の形態でよい。本明細書において使用する場合、「粒子」という用語は、球体；ロッド；シェル；プリズム；および粉末を含む。一部の実施形態では、これらの粒子は、ネットワークまたは凝集体の部分でよい。これらに限定されないが、粒子は、ナノメートル（ｎｍ）からミリメートル（ｍｍ）の任意のサイズを有することができる。一部の実施形態では、粒子は、約０．０１μｍ～約１０００μｍ、約０．０５μｍ～約５００μｍ、約０．１μｍ～約２５０μｍ、約０．２５μｍ～約２００μｍ、または約０．５μｍ～約１００μｍの範囲のサイズを有することができる。本明細書において使用する場合、「ナノ粒子」という用語は、約０．１ｎｍ～約１０００ｎｍの粒径を有する粒子を指す。マイクロスケールからナノスケールの絹フィブロイン粒子のある特定の実施形態および関連する技術はまた、「SYNTHESIS OF SILK FIBROIN MICRO- AND SUBMICRON SPHERES USING A CO-FLOW METHOD」という名称の本明細書と同時に出願した米国仮出願に提供されている。

【０２２９】

粒子は通常、示した「サイズ」の周りの粒径分布を示すと当業者は理解する。特に明記しない限り、「粒径」という用語は、本明細書において使用する場合、粒子のサイズ分布のモード、すなわち、サイズ分布において最も頻繁に出現する値を指す。動的光散乱（例えば、光子相関分光法、レーザー回折、小角レーザー光散乱（ＬＡＬＬＳ）、および中角レーザー光散乱（ＭＡＬＬＳ）、光遮断方法（例えば、コールター分析方法）、または他の技術（例えば、レオロジー、および光学もしくは電子顕微鏡観察）によるなど、粒径を測定するための方法は、当業者には公知である。

【０２３０】

一部の実施形態では、粒子は、実質的に球状でよい。「実質的に球状」とは、粒子断面の最も長い垂直軸と最も短い垂直軸の長さの比が、約１．５と等しい、もしくはこれ未満であることを意味する。実質的に球状であることは、対称中心線を必要としない。さらに、粒子は、粒子の全体的なサイズと比較したときスケールが小さい表面模様付け、例えば、ラインまたは切れ込みまたは隆起を有することができ、かつまだ実質的に球状である。一部の実施形態では、粒子の最も長い軸および最も短い軸の間の長さの比は、約１．５と等しい、もしくはこれ未満、約１．４５と等しい、もしくはこれ未満、約１．４と等しい、もしくはこれ未満、約１．３５と等しい、もしくはこれ未満、約１．３０と等しい、もしくはこれ未満、約１．２５と等しい、もしくはこれ未満、約１．２０と等しい、もしくはこれ未満、約１．１５と等しい、もしくはこれ未満、約１．１と等しい、もしくはこれ未満である。理論に束縛されるものではないが、表面接触は、実質的に球状である粒子において最小化され、これによって貯蔵時の粒子の望ましくない集塊は最小化する。多くの結晶またはフレークは、大きな表面接触面積を可能とし得る平らな表面を有し、そこでは集塊はイオン性または非イオン性相互作用によって起こり得る。球体は、非常により小さな面積に亘る接触を可能とする。

【０２３１】

一部の実施形態では、粒子は、実質的に同じ粒径を有する。相対的に大きな粒子および小さな粒子の両方が存在する広いサイズ分布を有する粒子は、より小さな粒子がより大きな粒子の間のギャップ中に充填され、それによって新たな接触表面を生じさせることを可能とする。広いサイズ分布は、集塊を結合するための多くの接触機会を生じさせることによってより大きな球体をもたらすことができる。本明細書に記載されている粒子は狭いサイズ分布内であり、それによって接触集塊の機会を最小化する。「狭いサイズ分布」とは、５と等しい、もしくはこれ未満の、小さな球状粒子の９０パーセンタイルの体積径と、１０パーセンタイルの体積径の比を有する粒径分布であることを意味する。一部の実施形態では、小さな球状粒子の１０パーセンタイルの体積径に対する９０パーセンタイルの体積径は、４．５と等しい、もしくはこれ未満、４と等しい、もしくはこれ未満、３．５と等しい、もしくはこれ未満、３と等しい、もしくはこれ未満、２．５と等しい、もしくはこれ未満、２と等しい、もしくはこれ未満、１．５と等しい、もしくはこれ未満、１．４５と等しい、もしくはこれ未満、１．４０と等しい、もしくはこれ未満、１．３５と等しい、もしくはこれ未満、１．３と等しい、もしくはこれ未満、１．２５と等しい、もしくはこれ未満、１．２０と等しい、もしくはこれ未満、１．１５と等しい、もしくはこれ未満、または１．１と等しい、もしくはこれ未満である。

【０２３２】

幾何標準偏差（ＧＳＤ）をまた使用して、狭いサイズ分布を示すことができる。ＧＳＤ計算は、１５．９％および８４．１％の百分率未満の累積での有効なカットオフ直径（ＥＣＤ）の決定が関与した。ＧＳＤは、８４．１７％未満のＥＣＤと１５．９％未満のＥＣＤの比の平方根と等しい。ＧＳＤは、ＧＳＤ＜２．５であるとき狭いサイズ分布を有する。一部の実施形態では、ＧＳＤは、２未満、１．７５未満、または１．５未満である。一実施形態では、ＧＳＤは、１．８未満である。

【０２３３】

理論に束縛されるものではないが、粒径は、最終生成物の微視的性質および巨視的性質を大いに決定することができる。粒径は、これらに限定されないが、使用されるセラミッ

クボールのサイズ、各ボールミルカップ中に入れた絹の量、機械の回転速度（ＲＰＭ）、およびボールミル粉砕の期間を含めたいくつかのプロセスパラメーターによって決まる。粉末の粒径は、例えば、数学モデル化および／または相関性を決定する実験法による、これらのプロセスパラメーターのいくつかに基づいて予想することができる。例えば、これは所与の容量の絹フィブロインを、変化するボールミルスピードおよび期間についてミル粉砕することによって行うことができる。各実験からの代表的な試料上で走査型電子顕微鏡観察（ＳＥＭ）を行って、粒径を決定することができる。さらなる試験を各試料上で行って、このように得られた構築物の色、分子量、溶液中の粘度、および水中の溶解性に対するプロセスパラメーターの効果を決定することができる。

【０２３４】

絹粒子（例えば、ナノ粒子およびマイクロ粒子）を生成する様々な方法は、当技術分野において公知である。一部の実施形態では、絹粒子は、例えば、その内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれている国際出願第第ＷＯ２０１１／０４１３９５号に記載されているようなポリビニルアルコール（ＰＶＡ）相分離方法によって生成することができる。絹フィブロイン粒子を生成するための他の方法は、例えば、それらの全ての内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれている米国特許出願公開第ＵＳ２０１０／００２８４５１号およびＰＣＴ特許出願公開第ＷＯ２００８／１１８１３３号（絹マイクロ球体またはナノ球体を作製するためのテンプレートとして脂質を使用）、ならびにWenkら、Ｊ Control Release、２００８年；１３２巻：２６～３４頁（絹マイクロ球体またはナノ球体を生成するために吹き付け方法を使用）に記載されている。

【０２３５】

これらに限定されないが、絹フィブロインおよび添加物または活性作用物質／試料と共に製剤化することができる少なくとも６タイプの粒子、すなわち、（１）絹フィブロインによって形成されるコアを含む粒子であって、コアに添加物／作用物質／試料が吸収／吸着し、または粒子コア上のコーティングを形成する粒子、；（２）絹フィブロインの１つまたは複数の層でコーティングされた、添加物／作用物質／試料によって形成されたコアを含む粒子、；（３）絹フィブロインおよび添加物／作用物質／試料の全体的に均一な混合物を含む粒子；（４）絹フィブロインのコア上のコーティングを伴う、絹フィブロインおよび添加物／作用物質／試料の混合物を含むコアを含む粒子；（５）生体試料もしくは絹フィブロイン、または生体試料および絹フィブロインの任意の組合せを含む１つのさらなる層でコーティングされた絹フィブロインまたは生体試料以外の材料のコアを含む粒子；ならびに（６）（１）～（５）の粒子のいずれかを含み、絹フィブロインまたは生体試料以外の材料、例えば、ポリマーの１つまたは複数の層をさらに含む粒子が存在する。絹フィブロイン粒子（例えば、マイクロ球体、ナノ球体、またはゲル様粒子）およびこれらを調製する方法は、例えば、それらの全ての内容が参照により本明細書中に組み込まれている米国特許第８，１８７，６１６号；および米国特許出願公開第ＵＳ２００８／００８５２７２号、同第ＵＳ２０１０／００２８４５１号、同第ＵＳ２０１２／００５２１２４号、同第ＵＳ２０１２／００７０４２７号、同第ＵＳ２０１２／０１８７５９１号に記載されている。これらに限定されないが、生体試料は、フィルムの絹フィブロインマトリックス中に分布し、フィルムの表面上に存在し、フィルムによってコーティングされ、または任意のこれらの組合せでよい。

【０２３６】

一部の実施形態では、絹粒子は、その内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれている２０１２年１０月２６日に出願された米国特許仮出願第６１／７１９，１４６号に記載されているような凍結乾燥方法を使用して生成することができる。具体的には、絹発泡体は、絹溶液を凍結乾燥することによって生成することができる。次いで、発泡体を粒子に縮小させることができる。例えば、絹溶液は、液体担体が複数の固体結晶または粒子に変換される温度に冷却することができ、複数の固体結晶または粒子の少なくともいくらかを除去し、多孔質絹材料（例えば、絹発泡体）が残る。冷却後、液体担体は、昇華、蒸発、および／または凍結乾燥によって少なくとも部分的に除去することができる。一部の

実施形態では、液体担体は、減圧下で除去することができる。形成後、絹フィブロイン発泡体をグラインディング、切断、クラッシング、または任意のこれらの組合せに供して、絹粒子を形成することができる。例えば、絹フィブロイン発泡体は、通常のブレンダー中でブレンドし、またはボールミル中でミル粉砕して、所望のサイズの絹粒子を形成することができる。したがって、一部の実施形態では、低分子量絹フィブロイン組成物は、凍結乾燥した粉末の形態である。

【０２３７】

一部の実施形態では、提供される絹フィブロイン組成物（例えば、物品）は、ゲルまたはヒドロゲルの形態でよい。「ヒドロゲル」という用語は、本明細書において、溶解を伴わずにその構造内にかなりの部分の水または他の液体を保持する能力を示す、絹をベースとする材料を意味するために使用される。絹フィブロインゲルおよびヒドロゲルを調製するための例示的な方法には、これらに限定されないが、超音波処理、ボルテックス、ｐＨ滴定、電界への曝露、溶媒浸漬、水アニーリング、水蒸気アニーリングなどが含まれる。絹フィブロインゲルおよびヒドロゲルを調製するための例示的な方法は、例えば、それらの全ての内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれているＰＣＴ公開第ＷＯ２００５／０１２６０６号、同第ＷＯ２００８／１５０８６１号、同第ＷＯ２０１０／０３６９９２号、および同第ＷＯ２０１１／００５３８１号に記載されている。電界への曝露によって形成されるゲルはまた、本明細書においてｅ－ゲルと称される。ｅ－ゲルを形成する方法は、例えば、その内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれている米国特許出願公開第ＵＳ２０１１／０１７１２３９号に記載されている。これらに限定されないが、添加物／作用物質／試料は、ゲルまたはヒドロゲルの絹フィブロインマトリックス中に分布し、ゲルまたはヒドロゲルまたはスポンジの表面上に吸収され、ゲルまたはヒドロゲルの細孔中に存在し、あるいは任意のこれらの組合せでよい。

【０２３８】

一部の実施形態では、本明細書に記載されている絹フィブロイン組成物（例えば、物品）は、スポンジまたは発泡体の形態でよい。一部の実施形態では、発泡体またはスポンジは、パターン形成された発泡体またはスポンジ、例えば、ナノパターン形成された発泡体またはスポンジである。絹発泡体およびスポンジを調製するための例示的な方法は、例えば、それらの全ての内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれているＰＣＴ出願公開第ＷＯ２００４／０００９１５号、同第ＷＯ２００４／０００２５５号、および同第ＷＯ２００５／０１２６０６号に記載されている。これらに限定されないが、添加物／活性物質／試料は、発泡体またはスポンジの絹フィブロインマトリックス中に分布し、発泡体またはスポンジの表面上に吸収され、発泡体またはスポンジの細孔中に存在し、あるいは任意のこれらの組合せでよい。

【０２３９】

一部の実施形態では、本明細書に記載のような絹フィブロイン組成物（例えば、物品）は、繊維の形態である。本明細書において使用する場合、「繊維」という用語は、その長さと垂直のその断面に亘って長さと幅の高い比を有する相対的に柔軟な物質単位を意味する。絹フィブロイン繊維を調製する方法は、当技術分野で周知である。繊維は、絹溶液をエレクトロスピニングすること、絹溶液をドローイングすることなどによって調製することができる。エレクトロスピニングされた絹材料、例えば、繊維、およびこれらを調製する方法は、例えば、その内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれているＷＯ２０１１／００８８４２に記載されている。ミクロンサイズの絹繊維（例えば、サイズが１０～６００μｍ）およびこれらを調製する方法は、例えば、それらの全ての内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれているMandalら、PNAS、２０１２年、doi、：１０．１０７３／pnas.１１１９４７４１０９；２０１２年４月６日に出願された米国特許仮出願第６１／６２１，２０９号；および２０１３年４月５日に出願されたＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ１３／３５３８９号に記載されている。

【０２４０】

一部の実施形態では、本明細書に記載のような絹フィブロイン組成物（例えば、物品）

は、フィルム、例えば、絹フィルムの形態でよい。本明細書において使用する場合、「フィルム」という用語は、実質的に平らな構造を指し、実質的に平らな構造から形成される構造をまた包含することができる。例えば、「フィルム」という用語は、管状構造、または実質的に平らなフィルムを所望の形態に操作（例えば、巻取り、および／もしくは折畳み）することによって形成することができる任意の構造を包含することができる。「フィルム」という用語は一般的な意味で使用し、ウェブ、シート、ラミネートなどを含むことに留意すべきである。一部の実施形態では、フィルムは、パターン化されたフィルム、例えば、ナノパターン化されたフィルムである。絹フィブロインフィルムを調製するための例示的な方法は、例えば、それらの両方の内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれているＰＣＴ出願公開第ＷＯ２００４／０００９１５号および同第ＷＯ２００５／０１２６０６号に記載されている。添加物および／または作用物質／試料が含まれる一部の実施形態では、これはフィルム中に分布し、フィルムの表面上に存在し、フィルムによってコーティングされ、または任意のこれらの組合せでよい。

【０２４１】

フィルムは、任意の所望の厚さを有することができる。例えば、フィルム厚さは、約１ｎｍ～約１０ｍｍの範囲でよい。一部の実施形態では、フィルムは、約１ｎｍ～約１０００ｎｍまたは約１μｍ～約１０００μｍの範囲の厚さを有する。

【０２４２】

一部の実施形態では、本明細書に記載のような絹フィブロイン組成物は、コーティング層の形態でよい。一部の実施形態では、このようなコーティング層は、基材表面上でよい。これらに限定されないが、絹フィブロインコーティング層は、１つまたは複数の層を含むことができる。さらに、２つまたはそれ超の層が存在する場合、各層は、絹フィブロイン組成物（例えば、低分子量絹フィブロイン）を含む単一の層、または複数の層でよく、少なくとも１つまたは複数の層は、低分子絹フィブロイン断片を含む。一部の実施形態では、コーティング層は、超薄コーティング層である。一部の実施形態では、本明細書において開示されている絹フィブロイン組成物は、基材の一部分を形成することができる。

【０２４３】

基材の例には、これらに限定されないが、ディップスティック、セルロースベース製品、マイクロタイタープレート、検体容器（例えば、これらに限定されないが、採血容器）、医療デバイス、インプラント、および任意のこれらの組合せを含むことができる。絹フィブロインを含むコーティング層を形成する方法は、例えば、その内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれている米国特許出願第１１／９９７，１９３号に記載されている。

【０２４４】

一部の実施形態では、本明細書に開示されている絹フィブロイン組成物（例えば、物品）は、円柱状マトリックス、例えば、絹チューブの形態でよい。絹チューブは、当技術分野において公知の任意の方法を使用して作製することができる。例えば、チューブは、成形、ディッピング、エレクトロスピニング、ゲルスピニングなどを使用して作製することができる。ゲルスピニングは、Lovettら、Biomaterials、２００８年、２９巻（３５号）：４６５０～４６５７頁に記載されており、ゲルスピニングされた絹チューブの構築は、２００９年４月８日に出願されたＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ２００９／０３９８７０号に記載されている（これらの両方の内容は、参照により本明細書中にその全体が組み込まれている）。ディップコーティング方法を使用した絹チューブの構築は、その内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれている２００８年８月１１日に出願されたＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ２００８／０７２７４２号に記載されている。フィルムスピニング方法を使用した絹フィブロインチューブの構築は、それらの全ての内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれている２０１３年３月１１日に出願されたＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０３０２０６号；２０１２年３月２０日に出願された米国特許仮出願第６１／６１３，１８５号；およびＰＣＴ出願公開第ＷＯ２０１３１２６７９９号に記載されている。理論に束縛されるものではないが、絹チューブの内径および外径は、ディップコーテ

ィング技術よりもフィルムスピニングまたはゲルスピニングを使用してより容易に調節することができると考えられる。

【０２４５】

一部の実施形態では、提供される絹をベースとする材料は、その中に内腔または腔を含むマトリックスの形態である。いくつかのこのような実施形態では、添加物および／または活性作用物質／試料の少なくとも一部は、絹フィブロインネットワーク中に分布している。一部の実施形態では、これは内腔または腔中に存在することができる。一部の実施形態では、絹フィブロインは、その中に内腔または腔を含むマトリックスの形態であり、少なくとも部分的量の添加物／作用物質／試料は内腔または腔中に存在し、少なくとも部分的量は、絹フィブロインネットワーク自体中に分布している。一部の実施形態では、マトリックスが内腔または腔を含むとき、添加物または作用物質／の少なくとも５％、(例えば、　少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%)は、内腔または腔中に存在することができる。一部の実施形態では、全量は、内腔／腔中に存在する。一部の実施形態では、の少なくとも５％、(例えば、　少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%)は、マトリックスの絹フィブロインネットワーク（例えば、絹をベースとする材料の非内腔部分）中に存在することができる。

【０２４６】

一部の実施形態では、本明細書において開示されている絹フィブロイン組成物（例えば、物品）は、多孔質（例えば、多孔質マトリックスまたはスキャフォールド）でよい。例えば、多孔質スキャフォールドは、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、またはそれ超の多孔性を有することができる。本明細書において使用する場合、「多孔性」という用語は、材料中の空隙空間の尺度であり、百分率０～１００％（または０～１）としての、総容量に亘る空隙の容量の分率である。例えば、標準化された技術、例えば、水銀圧入測孔法および気体吸着、例えば、窒素吸着を使用した多孔性の決定は、当業者には周知である。本明細書において使用する場合、「多孔性」という用語は、材料中の空隙空間の尺度であり、百分率０～１００％（または０～１）としての、総容量に亘る空隙の容量の分率である。例えば、標準化された技術、例えば、水銀圧入測孔法および気体吸着、例えば、窒素吸着を使用した多孔性の決定は当業者には周知である。

【０２４７】

多孔質スキャフォールドは、任意の孔径を有することができる。本明細書において使用する場合、「孔径」という用語は、細孔の断面の直径または有効直径を指す。「孔径」という用語はまた、複数の細孔の測定に基づいた細孔の断面の平均直径または平均有効直径を指すことができる。円形ではない断面の有効直径は、非円形断面の断面積と同じ断面積を有する円形断面の直径と等しい。

【０２４８】

一部の実施形態では、絹をベースとする材料の細孔は、約５０ｎｍ～約１０００ｎｍ、約２５０ｎｍ～約５００ｎｍ、約５００ｎｍ～約２５０ｎｍ、約１ｎｍ～約２００ｎｍ、約１０ｎｍ～約１５０ｎｍ、または約５０ｎｍ～約１００ｎｍの範囲のサイズ分布を有することができる。一部の実施形態では、絹をベースとする材料は、水和されたとき膨潤性でよい。次いで、細孔のサイズは、絹をベースとする材料中の水分含有量によって変化することができる。一部の実施形態では、細孔は、流体、例えば、水または空気で充填することができる。

【０２４９】
絹フィブロインをベースとするスキャフォールド中に細孔を形成する方法は当技術分野において公知であり、これらに限定されないが、ポロゲン浸出方法、凍結乾燥方法、および／またはガス形成方法を含む。絹をベースとする材料中に細孔を形成する例示的な方法は、例えば、それらの全ての内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれている米国特許出願公開第ＵＳ２０１０／０２７９１１２号および同第ＵＳ２０１０／０２７９１１２号；米国特許第７，８４２，７８０号；およびＷＯ２００４０６２６９７に記載されている。

【０２５０】
理論に束縛されるものではないが、多孔質スキャフォールドの多孔性、構造、および機械的性質は、異なるスピニング後プロセス、例えば、蒸気アニーリング、熱処置、アルコール処置、空気乾燥、凍結乾燥などによって調節することができる。さらに、マトリックス中にカプセル化された分子の任意の望ましい放出速度、プロファイルまたは動態は、処理パラメーター、例えば、マトリックス厚さ、絹分子量、マトリックス中の絹の濃度、ベータシート高次構造、絹ＩＩベータシート結晶化度、または多孔性および孔径を変化させることによって調節することができる。一部の実施形態では、低分子量絹フィブロインスキャフォールドは、望ましい期間（例えば、１カ月またはそれ超）に亘るスキャフォールドの分解を許容する一方で、インプラント部位における十分な機械的強度／安定性を実現することができる。理論に束縛されるものではないが、一部の実施形態では、絹をベースとする材料の多孔性は、所望の溶解速度について調節することができる。例えば、絹をベースとする材料のより高い多孔性は一般に、水溶液が絹をベースとする材料中により速く浸透することを可能とし、このように溶解のプロセスを加速することができる。当業者は、したがって、これらに限定されないが、所望の溶解速度；絹をベースとする材料中に存在する構成成分の分子の大きさおよび／もしくは拡散係数、ならびに／または絹をベースとする材料中の絹フィブロインの濃度、量、ならびに／または絹をベースとする材料の所望の物理的もしくは機械的性質などのいくつかの要因に基づいて多孔性を調整することができる。

【０２５１】
添加物／作用物質／試料を絹フィブロインマトリックス中に組み込むために、これを、絹をベースとする材料を生成するために使用される絹フィブロイン溶液中に含むことができる。代わりに、またはさらに、予め形成された絹をベースとする材料を添加物／作用物質／試料を含む溶液に加え、添加物／作用物質／試料を、絹をベースとする材料中に／上に吸収させることができる。

【０２５２】
一部の実施形態では、添加物／作用物質／試料は、絹をベースとする材料中に均質的または非均質的（例えば、勾配で）に分布させることができる。一部の実施形態では、添加物／作用物質／試料は、絹をベースとする材料中の絹フィブロインによってカプセル化または捕捉することができる。一部の実施形態では、添加物／作用物質／試料は、絹をベースとする材料中の絹フィブロインと混合またはブレンドすることができる。

【０２５３】
一部の実施形態では、本明細書において開示されている絹フィブロイン組成物は、骨伝導性である。骨伝導性は一般に、材料のインプラント処置の直後に確立されるフィブリンクロットによるスキャフォールドの表面への骨原性細胞の移動を促進する材料の能力として定義される。材料の多孔性は、この材料の骨伝導性に影響を与える。

【０２５４】
一部の実施形態では、本明細書において開示されている絹フィブロイン組成物は、骨誘導性である。骨誘導性は一般に、骨性（骨）組織の構成成分である非分化幹細胞または骨前駆細胞（骨芽細胞）を誘導し、骨芽細胞に分化する能力として定義される。骨誘導性の最も単純な試験は、通常骨を形成しない組織の場所、例えば、筋肉における骨の形成（異所性骨成長）を誘導する能力である。本明細書に記載されている製造品は、増殖因子、例

えば、ｒｈＢＭＰ－２（組換えヒト骨形態形成タンパク質－２）をこれらに加えることによって骨誘導性に作製することができると一般に理解される。ミネラル化および増殖因子の添加は、材料の骨誘導性に影響を与えることができる。

【０２５５】

一部の実施形態では、本明細書において開示されている絹フィブロイン組成物は骨原性であり、ｉｎ　ｖｉｖｏでのインプラント処置の後に新たな骨形成を示す。骨形成は、骨芽細胞を使用した新たな骨材料を固着させるプロセスである。骨芽細胞は、類骨を生成して、主にＩ型コラーゲンからなる類骨マトリックスを形成させることによって骨を構築する。骨組織は、類骨マトリックスおよびミネラル（大部分はリン酸カルシウムを伴う）を含み、これはカルシウムヒドロキシアパタイトと称される化学的配置を形成する。骨芽細胞は典型的には、骨組織を形成させる類骨マトリックスのミネラル化の原因である。理論に束縛されるものではないが、材料の骨伝導性および骨誘導性は、骨形成に対して影響を有する。材料は、ｉｎ　ｖｉｖｏでのインプラント処置の６カ月以内に新たな骨形成を示すことができる。一部の実施形態では、材料は、ｉｎ　ｖｉｖｏでのインプラント処置の８週間以内に新たな骨形成を示す。

【０２５６】

一部の実施形態では、本明細書において開示されている絹フィブロイン物品は、従来の無菌化プロセス、例えば、放射線をベースとする無菌化（すなわち、ガンマ線）、化学作用をベースとする無菌化（酸化エチレン）、オートクレーブ処理、または他の適当な手順を使用して無菌化することができる。一部の実施形態では、無菌化プロセスは、約５２℃～約５５℃の間の温度にて８時間またはそれ未満の時間、酸化エチレンを伴ってもよい。一部の実施形態では、本明細書に記載されている絹フィブロイン物品はまた、無菌的に処理することができる。本明細書に記載されている無菌の絹フィブロイン物品は、出荷のための適当な無菌化耐湿性パッケージ中にパッケージ化することができる。一部の実施形態では、活性作用物質を含有する絹フィブロイン組成物は、活性作用物質を有意に害する、または分解する無菌化に供さない。一部の実施形態では、絹フィブロイン組成物は、活性作用物質を無菌化の害から保護する。

【０２５７】

一部の実施形態では、本明細書に記載されている絹フィブロイン物品は、インプラントまたはインプラント可能な薬物送達デバイスの形態である。

【０２５８】

一部の実施形態では、提供される絹フィブロイン組成物は、注射用組成物の形態である。本明細書において使用する場合、「注射用組成物」という用語は一般に、低侵襲手技を伴って組織中に送達または投与することができる組成物を指す。「低侵襲手技」という用語は、皮膚を通して、または体腔もしくは身体構造上の開口を通して対象の体に進入することによって行われるが、可能な限り最も小さな損傷（例えば、小さな切開、注射）を伴う手技を指す。一部の実施形態では、注射用組成物は、注射によって組織中に投与または送達することができる。一部の実施形態では、注射用組成物は、皮膚上の小さな切開、それに続く、針、カニューレ、および／またはチュービング、例えば、カテーテルの挿入によって組織中に送達することができる。これらに限定するものではないが、注射用組成物は、手術、例えば、インプラント処置によって組織中に投与または配置することができる。いくつかの例示的な注射用組成物には、これらに限定されないが、溶液、ヒドロゲル、ゲル様粒子、および／またはマイクロ球体が含まれる。

【０２５９】

明白にするために、「注射用製剤」および「注射用剤」におけるような「注射用」という用語は、針または任意の他の適切な手段を通過する溶液の十分な流れが存在し、かつこのような流れが使用者によって適度に容易に生じるような、注射による投与に適した溶液（例えば、製剤）の物理的性質を指す。シリンジは、対象に注射薬を送達するために一般に用いられる。一部の実施形態では、注射用製剤は、予め充填されたシリンジとして提供することができる。一部の実施形態では、注射用製剤は、使用準備済の製剤として提供す

ることができる。一部の実施形態では、注射用製剤は、キットとして提供することができる。

【０２６０】

一部の実施形態では、提供される組成物、例えば、注射用組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含むことができる。例えば、一部の実施形態では、注射に適した組成物は、無菌水溶液または分散液を含む。担体は、例えば、水、細胞培養培地、緩衝液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、適切なこれらの混合物を含有する溶媒または分散媒質でよい。一部の実施形態では、医薬担体は、緩衝化溶液（例えば、ＰＢＳ）でよい。

【０２６１】

代わりにまたはさらに、抗微生物保存剤、抗酸化剤、キレート剤、および緩衝液を含めた、注射用組成物の安定性、無菌性、および等張性を増強する様々な添加物を加えることができる。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などによって確実にすることができる。多くの場合において、等張剤、例えば、糖、塩化ナトリウムなどを含むことが望ましくてもよい。注射用組成物はまた、所望の調製によって、補助物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、ｐＨ緩衝剤、ゲル化または粘度増強添加物、保存剤、顔色などを含有することができる。

【０２６２】

提供される液体組成物（例えば、注射用組成物）の粘度は、分子量の部分範囲（ｉ）～（ｘｖｉｉｉ）を有する絹フィブロイン断片の重量パーセントを調節することによってモジュレートすることができる。一部の実施形態では、組成物の粘度は、薬学的に許容される増粘剤を使用して選択したレベルでさらに維持することができる。一実施形態では、メチルセルロースは容易におよび経済的に利用可能であり、扱うことが容易であるため、メチルセルロースを使用することができる。他の適切な増粘剤には、例えば、キサンタンガム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボマーなどが含まれる。濃厚剤の好ましい濃度は、選択した作用物質、および注射のための所望の粘度によって決まり得る。重要なポイントは、例えば、注射用組成物の一部の実施形態中へのこのような増粘剤の添加によって選択した粘度を達成する量を使用することである。

【０２６３】

一部の実施形態では、提供される絹フィブロイン組成物は、噴霧可能な組成物の形態である。

【０２６４】

一部の実施形態では、本明細書に記載されている提供される絹フィブロイン組成物（例えば、低分子量絹組成物）は、エーロゲルまたはエーロゲル様材料の形態でよい。例えば、絹フィブロインを含むエーロゲルまたはエーロゲル様材料を形成する方法は、その全内容が参照により本明細書中に組み込まれている「PEPTIDE-BASED NANOFIBRILLAR MATERIALS」という名称の、２０１３年１１月８日に出願された米国特許仮出願第ＵＳ６１／９０２，１４５号に記載されている。

【０２６５】

理論に束縛されるものではないが、絹をベースとする材料（本明細書に記載のような活性作用物質または生体試料を含有するものを含めた）の性質（例えば、これに限定されないが、溶解性）は、絹をベースとする材料中の絹フィブロイン断片の分子量を変化させることによって変化させることができる。一部の実施形態では、異なる分子量の絹フィブロインを、繭を精練するための異なる期間を使用して生成して、精練されたフィブロインを提供することができる。したがって、低分子量絹フィブロイン組成物を生成する一部の実施形態では、繭を、約１分～２時間、約５分～約２時間、約１０分～約６０分、約６０分～４時間、約６０分～３時間、約６０分～２時間、約６０分～９０分、または約４時間もしくはそれ超の期間煮沸する（例えば、塩溶液、例えば、$Na_2CO_3$中）。一部の実施形態では、繭は、約１０分間、約２０分間、約３０分間、約４５分間、約６０分間、約９０分間、約１００分間またはそれ超、煮沸することができる（例えば、塩溶液、例えば、

$Na_2CO_3$中）。精練時間を調節することによって、絹をベースとする材料（例えば、水溶液中）の溶解性は、低分子量絹フィブロイン組成物中に存在する作用物質の抽出または回収のために最適化することができる。理論に束縛されるものではないが、より長い煮沸時間では一般に、より低い分子量（ＭＷ）／鎖長の絹フィブロインが生じ、このようにより低いＭＷの絹フィブロインから生成された絹をベースとする材料は一般に、より高いＭＷの絹フィブロインから生成されるものより可溶（例えば、水溶液中）であり得る。

【０２６６】

一部の実施形態では、溶解可能な絹をベースとする材料は、絹溶液から生成することができ、繭は、より低いＭＷの絹フィブロインを生じさせるのに十分な期間、例えば、少なくとも約３０分間、少なくとも約６０分間、または少なくとも約９０分間もしくはそれ超、煮沸または精練されている。一部の実施形態では、溶解可能な絹をベースとする材料は、絹溶液から生成された凍結乾燥した絹をベースとする材料であり、繭は、少なくとも約３０分間、少なくとも約６０分間、または少なくとも約９０分間もしくはそれ超、煮沸または精練されている。一部の実施形態では、溶解可能な絹をベースとする材料は、絹溶液から生成された絹をベースとするフィルムであり、繭は、少なくとも約３０分間、少なくとも約６０分間、または少なくとも約９０分間もしくはそれ超、煮沸または精練されている。絹をベースとする材料は、例えば、エレクトロスピニング、ゲル化または当技術分野において公知の他の急速凝固技術によって生成された、本明細書に記載のような任意の他の形態でよい。

【０２６７】

本明細書に記載されている絹をベースとする材料の溶解性を変化させる他の方法をまた、単独でまたは精練時間の調節と組み合わせて用いることができる。例えば、絹をベースとする材料の溶解性は、例えば、強制空気、湿度の減少（周囲湿度より低い）、および／または温度の上昇などによる、絹をベースとする材料の乾燥の速度を加速する手段によって改善することができる。加えてまたは代わりに、絹をベースとする材料の溶解性は、絹をベースとする材料を凍結乾燥条件に曝露させ、かつ／または絹フィブロインにおける結晶化度を誘導することができる条件に曝露させる時間を減少させることによって改善することができる。一部の実施形態では、絹をベースとする材料の溶解性は、例えば、酵素消化、濾過、クロマトグラフィーなどを介した精製の間に、絹の高分子量画分（例えば、重鎖および／または長い疎水性配列）を選択的に除去することによって改善させることができる。一部の実施形態では、絹をベースとする材料の溶解性は、例えば、オートクレーブ処理および除菌濾過を含めた無菌化の手段によって改善することができ、これは分子量を減少させ、かつ／または不溶性微粒子を除去し続ける役目を果たすことができる。

【０２６８】

様々な実施形態では、本明細書に記載のような絹フィブロイン組成物（例えば、低分子量絹フィブロイン組成物中および／または安定化組成物中）の少なくとも一部分は、異なる使用、例えば、生物医学的用途、および／または異なる所望の機械的もしくは化学的性質のために修飾することができる。当業者は、例えば、絹フィブロインの側基、絹フィブロインの所望の反応性および／または絹フィブロイン上の所望の電荷密度によって、絹フィブロインを修飾する適当な方法を選択することができる。

【０２６９】

例えば、組織工学または薬物送達目的のためにｉｎ　ｖｉｖｏでインプラントされたとき、絹フィブロイン組成物中に分布した活性作用物質の安定性を維持するために、絹フィブロインの少なくとも一部分は遺伝子修飾することができ、これによって、絹のさらなる修飾、例えば、繊維性タンパク質ドメインおよびミネラル化ドメインを含む融合ポリペプチドが含まれることが実現され、これを使用して有機－無機複合体を形成することができる。例えば、その内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれているＷＯ２００６／０７６７１１を参照されたい。一部の実施形態では、絹フィブロインは、例えば、ジアゾニウムまたはカルボジイミドカップリング反応、アビジン－ビオチン相互作用、または遺伝子修飾などによって化学修飾することができ、絹タンパク質の物理的性質および官能性

が変化する。化学修飾された絹フィブロインおよびこれらの調製の方法は、例えば、それらの全ての内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれているＰＣＴ出願公開第ＷＯ２０１１／０１１３４７号および同第ＷＯ２０１０／０５７１４２号；ならびに米国特許出願第１２／１９２，５８８号に記載されている。

【０２７０】

一実施形態では、絹フィブロインの修飾は、アミノ酸側鎖化学作用、例えば、共有結合による化学修飾、または電荷－電荷相互作用による修飾を使用することができる。例示的な化学修飾方法には、これらに限定されないが、カルボジイミドカップリング反応（例えば、米国特許出願第ＵＳ２００７／０２１２７３０号を参照されたい）、ジアゾニウムカップリング反応（例えば、米国特許出願第ＵＳ２００９／０２３２９６３号を参照されたい）、アビジン－ビオチン相互作用（例えば、国際出願第ＷＯ２０１１／０１１３４７号を参照されたい）、およびＰＥＧポリマーの化学的活性または活性化誘導体によるペグ化（例えば、国際出願第ＷＯ２０１０／０５７１４２号を参照されたい）が含まれる。絹フィブロインはまた、絹タンパク質の官能性を変化させる遺伝子修飾によって修飾することができる（例えば、国際出願第ＷＯ２０１１／００６１３３号を参照されたい）。例えば、絹フィブロインは、遺伝子修飾することができ、これによって、絹のさらなる修飾、例えば、繊維性タンパク質ドメインおよびミネラル化ドメインを含む融合ポリペプチドが含まれることを実現することができ、これを使用して有機－無機複合体を形成することができる。ＷＯ２００６／０７６７１１を参照されたい。一部の実施形態では、絹フィブロインは、タンパク質、例えば、治療用タンパク質と融合するように遺伝子修飾することができる。

【０２７１】

一部の実施形態では、本明細書に記載されている組成物中の絹フィブロインの少なくとも一部分は、正に帯電している／負に帯電している分子によって誘導体化または修飾することができる。一部の実施形態では、絹フィブロインは、正に帯電している／負に帯電しているペプチドまたはポリペプチド、例えば、ポリ－リシンおよびポリ－グルタミン酸で修飾することができる。組成物中の単一の全ての絹フィブロイン分子が、正に帯電している／負に帯電している分子で修飾されることは、可能である一方で、必要とされない。荷電分子で絹フィブロインを誘導体化または修飾する方法は、例えば、その内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれているＰＣＴ出願公開第ＷＯ２０１１１０９６９１Ａ２号に記載されている。

【０２７２】

修飾された絹フィブロインと修飾されていない絹フィブロインの比を調整して、低分子量絹フィブロイン組成物またはそこから形成した物品の１種または複数の所望の性質を最適化することができる。したがって、一部の実施形態では、組成物中の修飾された絹フィブロインと修飾されていない絹フィブロインの比は、約１０００：１（ｗ／ｗ）～約１：１０００（ｗ／ｗ）、約５００：１（ｗ／ｗ）～約１：５００（ｗ／ｗ）、約２５０：１（ｗ／ｗ）～約１：２５０（ｗ／ｗ）、約２００：１（ｗ／ｗ）～約１：２００（ｗ／ｗ）、約２５：１（ｗ／ｗ）～約１：２５（ｗ／ｗ）、約２０：１（ｗ／ｗ）～約１：２０（ｗ／ｗ）、約１０：１（ｗ／ｗ）～約１：１０（ｗ／ｗ）、または約５：１（ｗ／ｗ）～約１：５（ｗ／ｗ）の範囲でよい。

【０２７３】

一部の実施形態では、組成物は、例えば、　少なくとも1000:1、少なくとも900:1、少なくとも800:1、少なくとも700:1、少なくとも600:1、少なくとも500:1、少なくとも400:1、少なくとも300:1、少なくとも200:1、少なくとも100:1、少なくとも90:1、少なくとも80:1、少なくとも70:1、少なくとも60:1、少なくとも50:1、少なくとも40:1、少なくとも30:1、少なくとも20:1、少なくとも10:1、少なくとも7:1、少なくとも5:1、少なくとも3:1、少なくとも1:1、少なくとも1:3、少なくとも1:5、少なくとも1:7、少なくとも1:10、少なくとも1:20、少なくとも1:30、少なくとも1:40、少なくとも1:50、少なくとも1:60、少なくとも1:70、少なくとも1:80、少なくとも1:90、少なくとも1:100、少なくとも1:200

、少なくとも1:300、少なくとも1:400、少なくとも1:500、少なくとも600、少なくとも1:700、少なくとも1:800、少なくとも1:900、または少なくとも1:100の修飾された絹フィブロインと修飾されていない絹フィブロインのモル比を含む。

【０２７４】

一部の実施形態では、組成物は、例えば、多くとも1000:1、多くとも900:1、多くとも800:1、多くとも700:1、多くとも600:1、多くとも500:1、多くとも400:1、多くとも300:1、多くとも200:1、100:1、多くとも90:1、多くとも80:1、多くとも70:1、多くとも60:1、多くとも50:1、多くとも40:1、多くとも30:1、多くとも20:1、多くとも10:1、多くとも7:1、多くとも5:1、多くとも3:1、多くとも1:1、多くとも1:3、多くとも1:5、多くとも1:7、多くとも1:10、多くとも1:20、多くとも1:30、多くとも1:40、多くとも1:50、多くとも1:60、多くとも1:70、多くとも1:80、多くとも1:90、多くとも1:100、多くとも1:200、多くとも1:300、多くとも1:400、多くとも1:500、多くとも1:600、多くとも1:700、多くとも1:800、多くとも1:900、または多くとも1:1000の修飾された絹フィブロインと修飾されていない絹フィブロインのモル比を含む。

【０２７５】

一部の実施形態では、組成物は、例えば、約1000:1～約1:1000、約900:1～約1:900、約800:1～約1:800、約700:1～約1:700、約600:1～約1:600、約500:1～約1:500、約400:1～約1:400、約300:1～約1:300、約200:1～約1:200、約100:1～約1:100、約90:1～約1:90、約80:1～約1:80、約70:1～約1:70、約60:1～約1:60、約50:1～約1:50、約40:1～約1:40、約30:1～約1:30、約20:1～約1:20、約10:1～約1:10、約7:1～約1:7、約5:1～約1:5、約3:1～約1:3、または約1:1の修飾された絹フィブロインと修飾されていない絹フィブロインのモル比を含む。

【０２７６】

一部の実施形態では、絹フィブロインは、その天然セリシン含量が実質的に枯渇している（例えば、最終の抽出された絹において５％（ｗ／ｗ）またはそれ未満の残留するセリシン）。代わりに、より高い濃度の残留するセリシンが、抽出に続いて絹上に残ることができ、または抽出ステップを省略することができる。一部の実施形態では、セリシンが枯渇した絹フィブロインは、例えば、約１％（ｗ／ｗ）の残留するセリシン、約２％（ｗ／ｗ）の残留するセリシン、約３％（ｗ／ｗ）の残留するセリシン、約４％（ｗ／ｗ）、または約５％（ｗ／ｗ）の残留するセリシンを有する。一部の実施形態では、セリシンが枯渇した絹フィブロインは、例えば、多くとも１％（ｗ／ｗ）の残留するセリシン、多くとも２％（ｗ／ｗ）の残留するセリシン、多くとも３％（ｗ／ｗ）の残留するセリシン、多くとも４％（ｗ／ｗ）、または多くとも５％（ｗ／ｗ）の残留するセリシンを有する。いくつかの他の実施形態では、セリシンが枯渇した絹フィブロインは、例えば、約１％（ｗ／ｗ）～約２％（ｗ／ｗ）の残留するセリシン、約１％（ｗ／ｗ）～約３％（ｗ／ｗ）の残留するセリシン、約１％（ｗ／ｗ）～約４％（ｗ／ｗ）、または約１％（ｗ／ｗ）～約５％（ｗ／ｗ）の残留するセリシンを有する。一部の実施形態では、絹フィブロインは、その天然セリシン含量が完全に非含有である。本明細書において使用する場合、「完全に非含有」という用語（すなわち、「からなる」用語法）は、使用されている機器またはプロセスの検出範囲内で、物質を検出することができず、またはその存在を確認することができないことを意味する。一部の実施形態では、絹フィブロインは、その天然セリシン含量が本質的に非含有である。本明細書において使用する場合、「本質的に非含有」（または「から本質的になる」）という用語は、極微量のみの物質を検出することができ、検出未満である量で存在し、または存在しないことを意味する。

【０２７７】

理論に束縛されるものではないが、提供される絹フィブロイン組成物の性質は、絹セリシンの調節された部分的除去、またはセリシンによるソース絹の慎重な高濃度化によって修飾することができる。これは、絹精練プロセスのための条件、例えば、時間、温度、濃度などを変化させることによって達成することができる。

【０２７８】

精練された絹は、当業者には公知の任意の従来の方法によって調製することができる。例えば、Ｂ．ｍｏｒｉ繭は、所定の時間に亘って水溶液中で煮沸される。一般に、より長い精練時間は、低分子絹フィブロインを生じさせる。一部の実施形態では、絹の繭は、少なくとも６０分間、少なくとも７０分間、少なくとも８０分間、少なくとも９０分間、少なくとも１００分間、少なくとも１１０分間、少なくとも１２０分間、またはそれ超煮沸され、低分子量絹フィブロイン断片が生じる。さらにまたは代わりに、一部の実施形態では、絹の繭は、温度を上げた状態で加熱または煮沸することができる。例えば、一部の実施形態では、絹の繭は、約１０１．０℃、約１０１．５℃、約１０２．０℃、約１０２．５℃、約１０３．０℃、約１０３．５℃、約１０４．０℃、約１０４．５℃、約１０５．０℃、約１０５．５℃、約１０６．０℃、約１０６．５℃、約１０７．０℃、約１０７．５℃、約１０８．０℃、約１０８．５℃、約１０９．０℃、約１０９．５℃、約１１０．０℃、約１１０．５℃、約１１１．０℃、約１１１．５℃、約１１２．０℃、約１１２．５℃、約１１３．０℃、１１３．５℃、約１１４．０℃、約１１４．５℃、約１１５．０℃、約１１５．５℃、約１１６．０℃、約１１６．５℃、約１１７．０℃、約１１７．５℃、約１１８．０℃、約１１８．５℃、約１１９．０℃、約１１９．５℃、約１２０．０℃またはそれ超で加熱または煮沸することができる。一部の実施形態では、このような高温は、加熱プロセス（例えば、煮沸プロセス）の少なくとも一部分を加圧下で行うことによって達成することができる。例えば、本明細書に記載されている絹フィブロイン断片を生成することができる適切な圧力は典型的には、約１０～４０ｐｓｉ、例えば、約１１ｐｓｉ、約１２ｐｓｉ、約１３ｐｓｉ、約１４ｐｓｉ、約１５ｐｓｉ、約１６ｐｓｉ、約１７ｐｓｉ、約１８ｐｓｉ、約１９ｐｓｉ、約２０ｐｓｉ、約２１ｐｓｉ、約２２ｐｓｉ、約２３ｐｓｉ、約２４ｐｓｉ、約２５ｐｓｉ、約２６ｐｓｉ、約２７ｐｓｉ、約２８ｐｓｉ、約２９ｐｓｉ、約３０ｐｓｉ、約３１ｐｓｉ、約３２ｐｓｉ、約３３ｐｓｉ、約３４ｐｓｉ、約３５ｐｓｉ、約３６ｐｓｉ、約３７ｐｓｉ、約３８ｐｓｉ、約３９ｐｓｉまたは約４０ｐｓｉの間である。

【０２７９】

一実施形態では、絹の繭を精練するプロセスにおいて使用される水溶液は、約０．０２ＭのＮａ$_2$ＣＯ$_3$である。繭を、例えば、水ですすいで、セリシンタンパク質を抽出する。精練された絹を乾燥し、絹粉末を調製するために使用することができる。代わりに、抽出された絹は塩水溶液に溶解することができる。この目的に有用な塩は、臭化リチウム、チオシアン酸リチウム、硝酸カルシウム、または絹を可溶化することができる他の化学物質を含む。一部の実施形態では、抽出された絹は、約８Ｍ～１２ＭのＬｉＢｒ溶液に溶解することができる。塩は、例えば、透析を使用して結果的に除去される。

【０２８０】

必要に応じて、溶液は次いで、例えば、吸湿性ポリマー、例えば、ＰＥＧ、ポリエチレンオキシド、アミロースまたはセリシンに対する透析を使用して濃縮することができる。一部の実施形態では、ＰＥＧは、８，０００～１０，０００ｇ／ｍｏｌの分子量のものであり、約１０％～約５０％（ｗ／ｖ）の濃度を有する。ｓｌｉｄｅ－ａ－ｌｙｚｅｒ透析カセット（Ｐｉｅｒｃｅ、ＭＷ　ＣＯ３５００）を使用することができる。しかし、任意の透析システムを使用することができる。約１０％～約３０％の間の絹水溶液の最終濃度をもたらすのに十分な期間透析を行うことができる。殆どの場合、２～１２時間の透析で十分であり得る。例えば、その内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれている国際特許出願公開第ＷＯ２００５／０１２６０６号を参照されたい。

【０２８１】

濃縮された絹溶液を生じさせる別の方法は、（例えば、蒸発または凍結乾燥によって）希薄絹溶液を乾燥させることを含む。希薄溶液を部分的に乾燥させ、容量を低減させ、それによって絹濃度を増加させることができる。希薄溶液を完全に乾燥させ、次いで、乾燥させた絹フィブロインを希薄絹溶液の容量と比較してより小さな容量の溶媒に溶解させることができる。一部の実施形態では、絹フィブロイン溶液は、適切な時点において、任意選択で濾過および／または遠心分離することができる。例えば、一部の実施形態では、絹

フィブロイン溶液は、加熱または煮沸ステップに続いて、任意選択で濾過および／または遠心分離することができる。一部の実施形態では、絹フィブロイン溶液は、透析ステップに続いて、任意選択で濾過および／または遠心分離することができる。一部の実施形態では、絹フィブロイン溶液は、濃度を調整するステップに続いて、任意選択で濾過および／または遠心分離することができる。一部の実施形態では、絹フィブロイン溶液は、再構成のステップに続いて、任意選択で濾過および／または遠心分離することができる。このような実施形態のいずれかにおいて、濾過および／または遠心分離ステップ（複数可）を行って、不溶性材料を除去することができる。このような実施形態のいずれかにおいて、濾過および／または遠心分離ステップ（複数可）を行って、ある特定の分子量（複数可）の絹フィブロイン断片を選択的に高濃度化することができる。

【０２８２】

一部の実施形態では、絹フィブロイン溶液は、有機溶媒を使用して生成することができる。このような方法は、例えば、全てのそれらの内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれているLi, M.ら、J. Appl. Poly Sci.、２００１年、７９巻、２１９２～２１９９頁；Min, S.ら、Sen’I Gakkaishi、１９９７年、５４巻、８５～９２頁；Nazarov, R.ら、Biomacromolecules、２００４年、５巻、７１８～２６頁に記載されている。絹溶液を生成するために使用することができる例示的な有機溶媒には、これに限定されないが、ヘキサフルオロイソプロパノール（ＨＦＩＰ）が含まれる。例えば、その内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれている国際出願第ＷＯ２００４／０００９１５号を参照されたい。一部の実施形態では、絹溶液は、有機溶媒が完全に非含有または本質的に非含有である。一部の実施形態では、絹溶液は、水以外の溶媒が実質的に非含有である。

【０２８３】

本明細書において開示されている絹フィブロイン組成物は、組成物の総容量／重量に対して任意の量／比の絹フィブロインを含むことができる。理論に束縛されるものではないが、絹フィブロイン組成物（例えば、低分子量絹フィブロイン組成物および／または安定化組成物）自体を作製するために使用される溶液中の絹フィブロインの量自体を変化させて、絹フィブロイン組成物の性質を変化させることができる。一般に、任意の量の絹フィブロインは、絹フィブロイン組成物を作製するために使用される溶液中に存在することができる。例えば、溶液中の絹フィブロインの量は、約０．１％（ｗ／ｖ）～約９０％（ｗ／ｖ）でよい。一部の実施形態では、溶液中の絹フィブロインの量は、約１％（ｗ／ｖ）～約７５％（ｗ／ｖ）、約１％（ｗ／ｖ）～約７０％（ｗ／ｖ）、約１％（ｗ／ｖ）～約６５％（ｗ／ｖ）、約１％（ｗ／ｖ）～約６０％（ｗ／ｖ）、約１％（ｗ／ｖ）～約５５％（ｗ／ｖ）、約１％（ｗ／ｖ）～約５０％（ｗ／ｖ）、約１％（ｗ／ｖ）～約３５％（ｗ／ｖ）、約１％（ｗ／ｖ）～約３０％（ｗ／ｖ）、約１％（ｗ／ｖ）～約２５％（ｗ／ｖ）、約１％（ｗ／ｖ）～約２０％（ｗ／ｖ）、約１％（ｗ／ｖ）～約１５％（ｗ／ｖ）、約１％（ｗ／ｖ）～約１０％（ｗ／ｖ）、約５％（ｗ／ｖ）～約２５％（ｗ／ｖ）、約５％（ｗ／ｖ）～約２０％（ｗ／ｖ）、約５％（ｗ／ｖ）～約１５％（ｗ／ｖ）でよい。一部の実施形態では、溶液中の絹フィブロインは、約２５％（ｗ／ｖ）である。一部の実施形態では、溶液中の絹フィブロインは、約０．５（ｗ／ｖ）～約３０％（ｗ／ｖ）、約４％（ｗ／ｖ）～約１６％（ｗ／ｖ）、約４％（ｗ／ｖ）～約１４％（ｗ／ｖ）、約４％（ｗ／ｖ）～約１２％（ｗ／ｖ）、約４％（ｗ／ｖ）～約０％（ｗ／ｖ）、約６％（ｗ／ｖ）～約８％（ｗ／ｖ）である。絹溶液中の絹の正確な量は、公知の量の絹溶液を乾燥させ、残留物の質量を測定し、溶液濃度を計算することによって決定することができる。

【０２８４】

提供される組成物または物品（例えば、低分子量絹組成物および／または安定化組成物）中の絹フィブロインの量は、約１％（ｗ／ｖ）～約９０％（ｗ／ｖ）でよい。一部の実施形態では、絹フィブロイン組成物中の絹フィブロインの量は、約０．１％（ｗ／ｖ）～約７５％（ｗ／ｖ）、約１％（ｗ／ｖ）～約７０％（ｗ／ｖ）、約１％（ｗ／ｖ）～約６５％（ｗ／ｖ）、約１％（ｗ／ｖ）～約６０％（ｗ／ｖ）、約１％（ｗ／ｖ）～約５５％

（ｗ／ｖ）、約１％（ｗ／ｖ）～約５０％（ｗ／ｖ）、約１％（ｗ／ｖ）～約４５％（ｗ／ｖ）、約１％（ｗ／ｖ）～約４０％（ｗ／ｖ）、約１％（ｗ／ｖ）～約３５％（ｗ／ｖ）、約１％（ｗ／ｖ）～約３０％（ｗ／ｖ）、約１％（ｗ／ｖ）～約２５％（ｗ／ｖ）、約１％（ｗ／ｖ）～約２０％（ｗ／ｖ）、約１％（ｗ／ｖ）～約１５％（ｗ／ｖ）、約１％（ｗ／ｖ）～約１０％（ｗ／ｖ）、約５％（ｗ／ｖ）～約２５％（ｗ／ｖ）、約５％（ｗ／ｖ）～約２０％（ｗ／ｖ）、約５％（ｗ／ｖ）～約１５％（ｗ／ｖ）でよい。一部の実施形態では、低分子量絹フィブロイン組成物中の絹フィブロインは、約２５％（ｗ／ｖ）である。一部の実施形態では、絹フィブロイン組成物中の絹は、約０．５（ｗ／ｖ）～約３０％（ｗ／ｖ）、約２％（ｗ／ｖ）～約８％（ｗ／ｖ）、約２％（ｗ／ｖ）～約７％（ｗ／ｖ）、約２％（ｗ／ｖ）～約６％（ｗ／ｖ）、約２％（ｗ／ｖ）～約５％（ｗ／ｖ）、約３％（ｗ／ｖ）～約４％（ｗ／ｖ）である。

【０２８５】

一部の実施形態では、溶液は、約０．２５％～約５０％（ｗ／ｖ）または約０．５％～約１５％（ｗ／ｖ）、または約０．５％～約１０％（ｗ／ｖ）の絹フィブロイン濃度を有する。一部の実施形態では、絹フィブロイン溶液は、約１０％～約４０％または１５％～約３５％（ｗ／ｖ）の絹フィブロイン濃度を有する。一実施形態では、絹フィブロイン溶液は、約２０％～約３０％（ｗ／ｖ）の絹フィブロイン濃度を有する。一実施形態では、絹フィブロイン溶液は、約３０％（ｗ／ｖ）の絹フィブロイン濃度を有する。一部の実施形態では、絹フィブロイン溶液は、約０．１％～約３０％（ｗ／ｖ）、約０．５％～約１５％（ｗ／ｖ）、約１％～約８％（ｗ／ｖ）、または約１．５％～約５％（ｗ／ｖ）の絹フィブロイン濃度を有する。一部の実施形態では、絹フィブロイン溶液は、約５％～約３０％（ｗ／ｖ）、約１０％～約２５％（ｗ／ｖ）、または約１５～約２０％（ｗ／ｖ）の絹フィブロイン濃度を有する。一部の実施形態では、絹溶液は、約０．５％～１０％（ｗ／ｖ）の絹フィブロイン濃度を有する。

【０２８６】

一部の実施形態における用途によって、提供される組成物中の絹フィブロインにおいて高次構造変化を誘導して、絹フィブロイン組成物／物品の溶解性を調節することができる。一部の実施形態では、高次構造変化によって、絹フィブロインを少なくとも部分的に不溶性に誘導することができる。理論に束縛されるものではないが、誘導された高次構造変化は、絹フィブロインの結晶化度、例えば、絹ＩＩベータシート結晶化度を変化させる。高次構造変化は、これらに限定されないが、アルコール浸漬（例えば、エタノール、メタノール）、水アニーリング、剪断応力、超音波（例えば、超音波処理による）、ｐＨ低減（例えば、ｐＨ滴定および／または電界への曝露）および任意のこれらの組合せを含めた当技術分野において公知の任意の方法によって誘導することができる。例えば、高次構造変化は、これらに限定されないが、調節されたゆっくりした乾燥（Luら、Biomacromolecules、２００９年、１０巻、１０３２頁）；水アニーリング（Jinら、１５Adv. Funct. Mats.、２００５年、１５巻、１２４１頁；Huら、Biomacromolecules、２０１１年、１２巻、１６８６頁）；ストレッチング（DemuraおよびAsakura、Biotech & Bioengin.、１９８９年、３３巻、５９８頁）；圧縮；メタノール（Hofmannら、J Control Release.、２００６年、１１１巻、２１９頁）、エタノール（Miyairiら、J. Fermen. Tech.、１９７８年、５６巻、３０３頁）、グルタルアルデヒド（Acharyaら、Biotechnol J.、２００８年、３巻、２２６頁）、および１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（ＥＤＣ）（Bayraktarら、Eur J Pharm Biopharm.、２００５年、６０巻、３７３頁）を含めた溶媒浸漬；ｐＨ調整、例えば、ｐＨ滴定および／または電界への曝露（例えば、米国特許出願第ＵＳ２０１１／０１７１２３９号を参照されたい）；熱処置；剪断応力（例えば、国際出願第ＷＯ２０１１／００５３８１号を参照されたい）、超音波、例えば、超音波処理（例えば、米国特許出願公開第ＵＳ２０１０／０１７８３０４号および国際出願第ＷＯ２００８／１５０８６１号を参照されたい）；ならびに任意のこれらの組合せを含めた１つまたは複数の方法によって誘導することができる。上に列挙した参照文献の全ての内容は、参照により本明細書中にその全体が組み込まれている。

【０２８７】
一部の実施形態では、材料は、アニーリングによって処置することができる。本明細書において使用する場合、アニーリングのプロセスは、絹フィブロインにおいてベータシート二次構造の形成を誘導することが関与する。これは、絹フィブロインの非共有結合性相互作用の増加によるものであり得る。このような非共有結合性相互作用は、分子内相互作用、分子間相互作用、または両方を含むことができる。典型的には、非共有結合性相互作用は水素結合によって媒介され、これはベータシート形成の増加をもたらす。ベータシート二次構造のある特定の臨界レベルに達することによって、絹フィブロインは、例えば、水性環境中で不溶性となる。この現象は一般に結晶化度と称され、このような絹フィブロインの状態は、絹ＩＩと称される。このように、絹フィブロインが結晶化し、したがって不溶性であるように、「アニーリング」は、ベータシートが優勢の（絹ＩＩ）高次構造への絹フィブロインの高次構造の変化が関与する。理論に束縛されるものではないが、この高次構造変化は、水素結合および／または疎水的相互作用が媒介する、より高いベータシート含量への絹フィブロインの構造的シフトによるものであると考えられる。
【０２８８】
一部の実施形態では、絹フィブロインの高次構造は、水アニーリングによって変化させることができる。水アニーリングのためにいくつかの異なる方法が存在する。水アニーリングの１つの方法は、凝固してはいるが可溶性の絹フィブロインの形態を水蒸気で処置することが関与する。理論に束縛されるものではないが、水分子は可塑剤として作用し、これはフィブロイン分子の鎖移動度が水素結合の形成を促進することを可能とし、ベータシート二次構造の増加がもたらされると考えられる。このプロセスはまた、本明細書において「水蒸気アニーリング」と称される。
【０２８９】
理論に束縛されるものではないが、物理的温度調節された水蒸気アニーリング（ＴＣＷＶＡ）は、絹生体適合材料の分子構造の精巧な調節を得る単純および有効な方法を実現すると考えられる。４℃での条件を使用した低いベータシート含量（αヘリックスが優勢の絹Ｉ構造）から、１００℃での約６０％結晶化度のより高いベータシート含量（βシートが優勢の絹ＩＩ構造）まで、絹材料は結晶化度の調節によって調製することができる。この物理的アプローチは、絹材料の製作の間の結晶化を支配すると従前報告された一連の構造をカバーするが、それにもかかわらず、再現性の厳格な管理を伴うアプローチであるより単純な環境に優しい化学を実現する。水または水蒸気アニーリングは、例えば、それらの全ての内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれている２００４年４月１２日に出願されたＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ２００４／０１１１９９号、および２００５年６月１３日に出願された同第ＰＣＴ／ＵＳ２００５／０２０８４４号；ならびにJinら、Adv.Funct.Mats.、２００５年、１５巻：１２４１頁およびHuら、Biomacromolecules、２０１１年、１２巻（５号）：１６８６～１６９６頁に記載されている。
【０２９０】
アニーリングの別の方法は、絹材料／マトリックス中の絹フィブロインからの遅い調節された水の蒸発による。遅い調節された乾燥は、例えば、Luら、Acta. Biomater.、２０１０年、６巻（４号）：１３８０～１３８７頁に記載されている。
【０２９１】
アニーリングステップは、水蒸気環境内で、例えば、水蒸気で充填されたチャンバー中で異なる期間行うことができる。理論に束縛されるものではないが、アニーリングの長さは、絹をベースとする材料内の絹フィブロイン中で得られるベータシート結晶化度の量を生じさせる。したがって、典型的なアニーリング期間は、数秒から数日の範囲でよい。一部の実施形態では、アニーリングは、数秒から数時間の期間である。例えば、アニーリング時間は、数秒（例えば、約５秒、１０秒、１５秒、２０秒、２５秒、３０秒、３５秒、４０秒、４５秒、５０秒、５５秒、または６０秒）から約２時間、６時間、１２時間、２４時間、３６時間、または４８時間の範囲でよい。
【０２９２】

アニーリングプロセスにおいて使用される水蒸気の温度は、得られるベータシート結晶化度の量をもたらす。HUら、Biomacromolecules、１２巻：１６８６～１６９６頁を参照されたい。したがって、アニーリングは、任意の所望の温度で行うことができる。例えば、アニーリングは、約４℃～約１２０℃の水蒸気温度で行うことができる。絹をベースとする材料内の絹フィブロインにおいて必要とされる量のベータシート結晶化度を得るための最適な水蒸気は、等式（Ｉ）に基づいて計算することができる。Ｃ＝ａ（１－ｅｘｐ（－ｋＴ））（Ｉ）式中、Ｃは、ベータシート結晶化度であり、ａは、６２．５９であり、ｋは、０．０２８であり、Ｔは、アニーリング温度である。Huら、Biomacromolecules、１２巻：１６８６～１６９６頁を参照されたい。

【０２９３】

理論に束縛されるものではないが、アニーリングが行われる圧力はまた、ベータシート結晶化度の程度または量に影響することができる。一部の実施形態では、接触は、真空環境において行うことができる。

【０２９４】

アニーリングが行われる相対湿度はまた、ベータシート結晶化度の程度または量に影響することができる。絹をベースとする材料が水または水蒸気と接触する相対湿度は、約５％～１００％の範囲でよい。例えば、相対湿度は、約５％～約９５％、約１０％～約９０％、または約１５％～約８５％でよい。一部の実施形態では、相対湿度は、９０％またはそれ超である。

【０２９５】

絹フィブロインをアニーリングするための別の有用な方法は、絹をベースとする材料を、有機溶媒、例えば、アルコール、例えば、メタノール、エタノール、イソプロピル、アセトンなどの使用による脱水に供することである。このような溶媒は、絹フィブロインを脱水する効果を有し、これは絹フィブロイン分子の「パッキング」を促進して、ベータシート構造を形成する。一部の実施形態では、絹をベースとする材料は、アルコール、例えば、メタノール、エタノールなどで処置することができる。アルコール濃度は、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％または１００％でよい。一部の実施形態では、アルコール濃度は、約９０％である。

【０２９６】

このように、一部の実施形態では、絹フィブロインの高次構造における変化は、アルコール、例えば、メタノール、エタノールなどへの浸漬によって誘導されることができる。アルコール濃度は、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％または１００％でよい。一部の実施形態では、アルコール濃度は、１００％である。高次構造の変化が溶媒への浸漬による場合、絹組成物は例えば、溶媒／水の勾配で洗浄し、浸漬のために使用される残留溶媒の一部を除去することができる。洗浄は、１回、例えば、１回、２回、３回、４回、５回、またはそれ超の回数繰り返すことができる。

【０２９７】

代わりに、絹フィブロインの高次構造における変化は、剪断応力によって誘導し得る。剪断応力は、例えば、絹組成物を針に通すことによって加えることができる。高次構造変化を誘導する他の方法は、電界をかけること、圧力をかけること、または塩濃度を変化させることを含む。

【０２９８】

高次構造変化を誘導するための処置時間は、所望の絹ＩＩ（ベータシート結晶化度）含量を実現するのに任意の期間でよい。一部の実施形態では、処置時間は、約１時間～約１２時間、約１時間～約６時間、約１時間～約５時間、約１時間～約４時間、または約１時間～約３時間の範囲でよい。一部の実施形態では、焼結時間は、約２時間～約４時間または２．５時間～約３．５時間の範囲でよい。

【０２９９】
高次構造変化の誘導が溶媒浸漬によるものであるとき、処置時間は、数分から数時間の範囲でよい。例えば、溶媒への浸漬は、少なくとも約１５分、少なくとも約３０分、少なくとも約１時間、少なくとも約２時間、少なくとも３時間、少なくとも約６時間、少なくとも約１８時間、少なくとも約１２時間、少なくとも約１日、少なくとも約２日、少なくとも約３日、少なくとも約４日、少なくとも約５日、少なくとも約６日、少なくとも約７日、少なくとも約８日、少なくとも約９日、少なくとも約１０日、少なくとも約１１日、少なくとも約１２日、少なくとも約１３日、または少なくとも約１４日の期間でよい。一部の実施形態では、溶媒への浸漬は、約１２時間～約７日、約１日～約６日、約２～約５日、または約３～約４日の期間でよい。

【０３００】
高次構造変化を誘導する処置の後、絹フィブロインは、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または少なくとも約９５％ではあるが、１００％（すなわち、全ての絹は、絹ＩＩベータシート高次構造中に存在する）ではない絹ＩＩベータシート結晶化度含量を含むことができる。一部の実施形態では、絹をベースとする材料中の絹フィブロインは、少なくとも１０％、例えば、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、７０％、８５％、９０％、９５％またはそれ超ではあるが、１００％ではない（すなわち、全ての絹フィブロインが、ベータシート高次構造にあるとは限らない）ベータシート結晶化度を含む。一部の実施形態では、絹は、完全に絹ＩＩベータシート高次構造で存在し、すなわち、１００％の絹ＩＩベータシート結晶化度である。

【０３０１】
用いるアニーリング方法にかかわらず、アニーリングプロセスの最終結果は、しばしば、アニーリングされた絹フィブロインが、不溶性となるように、高度の結晶化度を有することになる。一部の実施形態では、「高度の結晶化度」とは、約２０％～約７０％、例えば、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％および約７５％のベータシート含量を指す。

【０３０２】
一部の実施形態では、アニーリングプロセスは、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または少なくとも約９５％ではあるが、１００％（すなわち、全ての絹は、絹ＩＩベータシート高次構造中に存在する）ではない絹ＩＩベータシート結晶化度含量を含む絹をベースとする材料を実現することができる。一部の実施形態では、絹をベースとする材料は、１００％の絹ＩＩベータシート結晶化度を有することができる。

【０３０３】
一部の実施形態では、提供される絹フィブロイン組成物中の絹フィブロインは、βターンおよびβストランド領域を実質的に含むタンパク質構造を有する。理論に束縛されるものではないが、絹βシート含量は、組成物のゲル機能およびｉｎ　ｖｉｖｏでの長寿命に影響することができる。非βシート含量を含む組成物（例えば、ｅ－ゲル）をまた利用することができることを理解すべきである。これらの実施形態の態様では、提供される組成物中の絹フィブロインは、例えば、約５％のβターンおよびβストランド領域、約１０％のβターンおよびβストランド領域、約２０％のβターンおよびβストランド領域、約３０％のβターンおよびβストランド領域、約４０％のβターンおよびβストランド領域、約５０％のβターンおよびβストランド領域、約６０％のβターンおよびβストランド領域、約７０％のβターンおよびβストランド領域、約８０％のβターンおよびβストランド領域、約９０％のβターンおよびβストランド領域、または約１００％のβターンおよびβストランド領域を含むタンパク質構造を有する。これらの実施形態の他の態様では、

低分子量絹フィブロイン組成物中の絹フィブロインは、例えば、少なくとも１０％のβターンおよびβストランド領域、少なくとも２０％のβターンおよびβストランド領域、少なくとも３０％のβターンおよびβストランド領域、少なくとも４０％のβターンおよびβストランド領域、少なくとも５０％のβターンおよびβストランド領域、少なくとも６０％のβターンおよびβストランド領域、少なくとも７０％のβターンおよびβストランド領域、少なくとも８０％のβターンおよびβストランド領域、少なくとも９０％のβターンおよびβストランド領域、または少なくとも９５％のβターンおよびβストランド領域を含むタンパク質構造を有する。これらの実施形態のさらに他の態様では、低分子量絹フィブロイン組成物中の絹フィブロインは、例えば、約１０％～約３０％のβターンおよびβストランド領域、約２０％～約４０％のβターンおよびβストランド領域、約３０％～約５０％のβターンおよびβストランド領域、約４０％～約６０％のβターンおよびβストランド領域、約５０％～約７０％のβターンおよびβストランド領域、約６０％～約８０％のβターンおよびβストランド領域、約７０％～約９０％のβターンおよびβストランド領域、約８０％～約１００％のβターンおよびβストランド領域、約１０％～約４０％のβターンおよびβストランド領域、約３０％～約６０％のβターンおよびβストランド領域、約５０％～約８０％のβターンおよびβストランド領域、約７０％～約１００％のβターンおよびβストランド領域、約４０％～約８０％のβターンおよびβストランド領域、約５０％～約９０％のβターンおよびβストランド領域、約６０％～約１００％のβターンおよびβストランド領域、または約５０％～約１００％のβターンおよびβストランド領域を含むタンパク質構造を有する。一部の実施形態では、１０％未満～約５５％の絹βシート含量を、本明細書において開示されている絹フィブロイン組成物において使用することができる。

【０３０４】

一部の実施形態では、本明細書において提供する絹フィブロイン組成物中の絹フィブロインは、αヘリックスおよびランダムコイル領域が実質的に非含有であるタンパク質構造を有する。これらの実施形態の態様では、絹フィブロインは、例えば、約５％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、約１０％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、約１５％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、約２０％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、約２５％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、約３０％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、約３５％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、約４０％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、約４５％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、または約５０％のαヘリックスおよびランダムコイル領域を含むタンパク質構造を有する。これらの実施形態の他の態様では、絹フィブロインは、例えば、多くとも５％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、多くとも１０％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、多くとも１５％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、多くとも２０％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、多くとも２５％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、多くとも３０％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、多くとも３５％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、多くとも４０％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、多くとも４５％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、または多くとも５０％のαヘリックスおよびランダムコイル領域を含むタンパク質構造を有する。これらの実施形態のさらに他の態様では、絹フィブロインは、例えば、約５％～約１０％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、約５％～約１５％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、約５％～約２０％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、約５％～約２５％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、約５％～約３０％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、約５％～約４０％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、約５％～約５０％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、約１０％～約２０％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、約１０％～約３０％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、約１５％～約２５％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、約１５％～約３０％のαヘリックスおよびランダムコイル領域、または約１５％～約３５％のαヘリックスおよびランダムコイル領域を含むタンパク質構造を有する。

【０３０５】
別の態様では、本開示は、本明細書に記載されている絹フィブロイン物品または製造品の少なくとも１つの性質をモジュレートするための方法を提供する。一般に、方法は、絹フィブロイン物品または製造品における低分子量絹中の様々な絹フィブロイン断片の重量比を変化させることを含む。一部の実施形態では、方法は、約３．５ｋＤａ～約１２０ｋＤａの間の第１の指定範囲内の分子量を有する絹フィブロイン断片と、約３．５ｋＤａ～約１２０ｋＤａの間の第２の指定範囲内の分子量を有する絹フィブロイン断片の重量比を変化させることを含み、第１および第２の指定範囲は重複しない。一部の実施形態では、方法は、２００ｋＤａを超える分子量を有する絹フィブロイン断片と、約３．５ｋＤａ～約１２０ｋＤａの間の指定範囲内の分子量を有する絹フィブロイン断片の重量比を変化させることを含む。

【０３０６】
これらに制限されないが、本明細書に記載されている方法を使用してモジュレートすることができる性質は、物品中に存在する作用物質の放出速度、物品中に存在する作用物質の放出動態、再溶解性、分解、機械的性質、光学性質、多孔性、孔径、粘度、生体適合性、生体吸収性、物品の実効電荷、粒径、および任意のこれらの組合せからなる群から選択されることができる。

【０３０７】
別の態様では、本開示は、絹粒子のサイズを調節する方法を提供する。方法は一般に、溶液中の低分子量絹の様々な絹フィブロイン断片の重量比を変化させて、溶液から絹粒子を形成することを含む。一部の実施形態では、方法は、約３．５ｋＤａ～約１２０ｋＤａの間の第１の指定範囲内の分子量を有する絹フィブロイン断片と、約３．５ｋＤａ～約１２０ｋＤａの間の第２の指定範囲内の分子量を有する絹フィブロイン断片の重量比を変化させることを含み、第１および第２の指定範囲は重複しない。一部の実施形態では、方法は、２００ｋＤａを超える分子量を有する絹フィブロイン断片と、約３．５ｋＤａ～約１２０ｋＤａの間の指定範囲内の分子量を有する絹フィブロイン断片の重量比を変化させることを含む。絹粒子を調製する方法は、例えば、それらの全ての内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれている国際出願第ＷＯ２０１１／０４１３９５号；国際特許出願公開第ＷＯ２００８／１１８１３３号；米国特許出願公開第ＵＳ２０１０／００２８４５１号；２０１２年１０月２６日に出願された米国特許仮出願第６１／７１９，１４６号；およびWenkら、Ｊ Control Release、２００８年；１３２巻：２６～３４頁に記載されている。

【０３０８】
本明細書に記載されている実施形態のいずれかにおいて、低分子量絹フィブロインのアミノ酸配列が、完全長の絹フィブロインポリペプチドの１００％未満を集合的に表すように、低分子量絹フィブロイン断片は、完全長の絹フィブロインポリペプチドの１つまたは複数の部分に由来することができる。例えば、１つまたは複数の組換え技術によって産生された絹フィブロインポリペプチドを使用して、本明細書に記載されている任意の態様の一部の実施形態を行うことができる。このような組換え絹フィブロインポリペプチドは、完全長のカウンターパートの断片（複数可）を含有することができる。一部の実施形態では、完全長のカウンターパートの断片（複数可）に対応する絹フィブロインポリペプチドは、導入遺伝子を担持するトランスジェニック生物から生成することができ、このような断片が生じる。

【０３０９】
本明細書に記載されている実施形態のいずれかにおいて、低分子量絹フィブロイン断片は、絹フィブロインの天然（例えば、野性型）配列に対して１つまたは複数の変異および／または修飾を含むことができる。絹フィブロイン断片におけるこのような変異および／または修飾は、自発的に起こり、または設計することによって導入することができる。例えば、一部の実施形態では、絹フィブロイン断片におけるこのような変異および／または修飾は、組換え技術、化学修飾などを使用して導入することができる。

【０３１０】
絹フィブロインは、ベータシート二次構造を採用することができるアミノ酸配列の１つまたは複数の部分を有するポリペプチドの一例である。例えば、絹フィブロイン構造は一般に、アミノ酸の配列を含み、配列の１つまたは複数の部分は一般に、交互のグリシンおよびアラニン、またはアラニン単独によって特徴付けられる。理論に束縛されるものではないが、このような配置は、フィブロイン分子がベータシート高次構造に自己構成することを可能とする。したがって、さらに別の態様では、本明細書において提供されるのは、交互のグリシンおよびアラニン、またはアラニン単独によって特徴付けられるアミノ酸配列の１つまたは複数の部分を有し、かつ約３．５ｋＤａ～約１２０ｋＤａまたは約５ｋＤａ～約１２５ｋＤａの範囲のある範囲の分子量を有する、ポリペプチド断片の集団を含む組成物である。一部の実施形態では、組成物は、集団中のポリペプチド断片の総数の１５％以下が、２００ｋＤａを超える分子量を有し、集団中のポリペプチド断片の総数の少なくとも５０％が、指定範囲内の分子量を有し、指定範囲が、約３．５ｋＤａ～約１２０ｋＤａ、または約５ｋＤａ～約１２５ｋＤａであることによって特徴付けられる。

【０３１１】
別の態様では、本明細書に記載されている組成物および／または方法における絹フィブロインは、ベータシート構造を含み、またはアミノ酸配列に基づいてこのような構造を形成する性向を有する他の非絹ポリペプチドで置き換えることができ、あるいはこのような他の非絹ポリペプチドと組み合わせて使用することができる。このように、本明細書において提供されるのはまた、ベータシート形成ポリペプチド断片の集団を含むポリペプチド組成物を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されているベータシート形成ポリペプチド断片の集団は、ある範囲の分子量を有することができ、集団中のベータシート形成ポリペプチド断片の総数の１５％以下が、２００ｋＤａを超える分子量を有し、集団中のベータシート形成ポリペプチド断片の総数の少なくとも５０％が、指定範囲内の分子量を有し、指定範囲が、約３．５ｋＤａ～約１２０ｋＤａまたは約５ｋＤａ～約１２５ｋＤａであることによって特徴付けられる。

【０３１２】
本明細書において使用する場合、「ベータシート形成ポリペプチド」という用語は、ベータシート二次構造を採用するアミノ酸配列の１つまたは複数の部分を有するポリペプチドを指す。一部の実施形態では、ベータシート形成ポリペプチドは、ベータシート構造またはアミノ酸配列に基づいてこのような構造を形成する性向を有することに基づいて選択することができる。

【０３１３】
一部の実施形態では、ベータシート形成ポリペプチドは、両親媒性本質を有することができる（すなわち、親水性および疎水性部分の両方を有する）。両親媒性ポリペプチドは、単一の源（例えば、天然タンパク質）から得ることができ、単一のポリペプチド自体が天然で両親媒性であるように、ポリペプチド内で疎水性モジュールまたはストレッチ、および親水性モジュールまたはストレッチの両方を含有する。一部の実施形態では、疎水性モジュールまたはストレッチ、および親水性モジュールまたはストレッチは、一緒に融合またはカップリングして、両親媒性実体を形成することができる。このような「融合」または「キメラ」ポリペプチドは、組換え技術、化学カップリング、または両方を使用して生成することができる。

【０３１４】
一部の実施形態では、ベータシート形成ポリペプチドは、下記のリスト、すなわち、フィブロイン、アクチン、コラーゲン、カテニン、キトサン、クローディン、コイリン、エラスチン、エラウニン、エクステンシン、フィブリリン、ラミン、ラミニン、ケラチン、チューブリン、ウイルス構造タンパク質、ゼインタンパク質（種子貯蔵タンパク質）および任意のこれらの組合せから選択されるポリペプチドのアミノ酸配列の１つまたは複数の部分を含むことができる。

【０３１５】

一部の実施形態では、ベータシート形成ポリペプチドは、自然源からの再生（例えば、精製）されたタンパク質、異種系において生成された組換えタンパク質、合成もしくは化学的に生成されたペプチド、またはこれらの組合せを含むことができる。

【０３１６】

一部の実施形態では、ベータシート形成ポリペプチドは、天然または野性型カウンターパートと比較して１つまたは複数の配列バリエーションを伴い、または伴わずに、上に提供するリストのいずれか１つに対応するポリペプチドのアミノ酸配列の１つまたは複数の部分を含むことができる。例えば、一部の実施形態では、このようなバリアントは、野性型配列と比較して、少なくとも８５％の全体的な配列同一性、例えば、少なくとも８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％の全体的な配列同一性を示し得る。

【０３１７】

ある特定の例示的な調製方法

理論に束縛されるものではないが、最終の望ましい形状への処理の前の熱または高圧による処置は、絹フィブロインを含む物品を形成することに関連するいくつかの問題を低減させ、または限定することができる。これによって、かなりの気泡、縮み、および変形を伴わずに一貫した幾可学的形状の物品を製造する能力を実現する。これは試験およびインプラント処置のための再現性のある一貫した試料をもたらす。さらに、物品は機械加工することができ、生物学的幾可学的形状の正確な複製、例えば、所望の構築物へと絹ブランクを機械加工するコンピュータ数値調節（ＣＮＣ）ミルを可能とする。最終の所望の形状への絹フィブロイン物品の処理の前の熱または高圧での処置を含む方法は、例えば、それらの全ての内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれている２０１３年４月５日に出願された米国特許仮出願第６１／８０８，７６８号、２０１２年１０月２６日に出願された同第６１／７１９，１４６号、２０１３年４月８日に出願された同第６１／８０９，５３５号、および２０１３年９月２４日に出願された同第６１／８８１，６５３号に記載されている。

【０３１８】

したがって、一態様では、本開示は、絹フィブロイン物品を調製する方法を提供する。一般に、方法は、高温および／または高圧下で絹フィブロイン組成物（例えば、低分子量絹フィブロイン組成物）をインキュベートすることを含む。組成物中の絹フィブロインは、少なくとも部分的に不溶性状態でよい。インキュベーション後、組成物は、所望の最終の形状に処理することができる。これらに限定されないが、製造品を調製するための絹フィブロイン組成物は、溶液、スラリー、懸濁液、コロイド、混合物、分散物、ペーストなどの形態でよい。

【０３１９】

本明細書において使用する場合、「不溶性状態」という用語は、絹フィブロインに関して使用されたとき、実質的にアモルファスの主にベータシート高次構造の形成または状態を指す。「不溶性状態に形成される」という用語は、絹ポリマーへの絹モノマーの重合を反映することを意図しない。むしろ、水不溶性状態への可溶性絹フィブロインの変換を反映することを意図する。本明細書において使用する場合、絹フィブロインは、遠心分離によってペレット化されることができる場合、あるいは３７℃もしくはそれ未満にて水に浸漬し、または水ですすぐことによって溶解することができない場合、「不溶性状態」である。

【０３２０】

一部の実施形態では、絹フィブロイン組成物は、有機溶媒を含むことができる。一実施形態では、有機溶媒は、ヘキサフルオロイソプロパノール（ＨＦＩＰ）でよい。いくつかの他の実施形態では、絹フィブロイン組成物は、有機溶媒が非含有または本質的に非含有であり、すなわち、水以外の溶媒が非含有である。理論に束縛されるものではないが、絹フィブロイン組成物中の有機溶媒は、組成物のより一様な乾燥を実現し、最終の絹フィブロイン製造品におけるより均一な機械的および構造的性質をもたらす。さらに、有機溶媒

を使用することはまた、最終の形状への処理のためのより良好な機械的および構造的性質を実現する。

【０３２１】

一部の実施形態では、方法は、（ｉ）絹フィブロイン組成物を提供するステップであって、絹フィブロインは、少なくとも部分的に不溶性状態である、ステップと、（ｉｉ）組成物を高温および／または高圧下でインキュベートするステップと、（ｉｉｉ）ステップ（ｉｉ）を任意選択で繰り返すステップと、（ｉｖ）組成物を所望の形状に処理するステップとを含む。本明細書において使用する場合、「インキュベートする」という用語は、組成物を高温および／または圧力に供することを意味する。

【０３２２】

一部の実施形態では、絹フィブロイン組成物は、モールド中にある。本明細書において使用する場合、「モールド」という用語は、絹フィブロイン組成物を整形、保持または支持することができる任意のモールド、容器または基材を包含することを意図する。このように、その最も単純な形態のモールドは、支持表面を単純に含むことができる。モールドは任意の所望の形状のものでよく、ポリマー（ポリスルホン、ポリプロピレン、ポリエチレンなど）、金属（ステンレス鋼、チタン、コバルトクロムなど）、セラミクス（アルミナ、ジルコニアなど）、ガラスセラミック、およびガラス（ホウケイ酸ガラスなど）を含めた任意の適切な材料から製作することができる。一部の実施形態では、モールドは、単純な幾可学的形状のスキャフォールドを提供することができ、これは最終の所望の形状に処理することができ、すなわち、モールドを使用してブランクを提供することができ、これは最終の形状に処理することができる。

【０３２３】

したがって、一部の実施形態では、方法は、（ｉ）絹フィブロイン組成物を含むモールドを提供するステップであって、組成物中の絹フィブロインは、少なくとも部分的に不溶性状態である、ステップと、（ｉｉ）温度を上げた状態でまたは加圧下で組成物をインキュベートするステップと、（ｉｉｉ）ステップ（ｉｉ）を１回または複数回任意選択で繰り返すステップと、（ｉｖ）組成物を所望の形状に処理するステップとを含む。

【０３２４】

一部の実施形態では、絹フィブロイン組成物を含むモールドを提供するステップは、絹フィブロインを含む溶液をモールドに移し、絹フィブロインにおいて高次構造の変化を誘導することを含む。

【０３２５】

本明細書において使用する場合、「高温」という用語は、室温より高い温度を意味する。一般に、高温は、約２５℃超の温度である。例えば、高温は、約３０℃もしくはそれ超、約３５℃もしくはそれ超、約４０℃もしくはそれ超、約４５℃もしくはそれ超、約５０℃もしくはそれ超、約５５℃もしくはそれ超、約６０℃もしくはそれ超、約６５℃もしくはそれ超、約７０℃もしくはそれ超、約７５℃もしくはそれ超、約８０℃もしくはそれ超、約８５℃もしくはそれ超、約９０℃もしくはそれ超、約９５℃もしくはそれ超、約１００℃もしくはそれ超、約１０５℃もしくはそれ超、約１１０℃もしくはそれ超、約１１５℃もしくはそれ超、約１２０℃もしくはそれ超、約１２５℃もしくはそれ超、約１３０℃もしくはそれ超、約１３５℃もしくはそれ超、約１４０℃もしくはそれ超、約１４５℃もしくはそれ超、または約１５０℃もしくはそれ超の温度でよい。一部の実施形態では、高温は、少なくとも約１２１℃である。

【０３２６】

本明細書において使用する場合、「高圧」という用語は、約０．０５バール、約０．１バール、約０．１５バール、約０．２バール、約０．２５バール、約０．３バール、約０．３５バール、約０．４バール、約０．４５バール、約０．５バール、約０．５５バール、約０．６バール、約０．６５バール、約０．７バール、約０．７５バールまたはそれ超の圧力を意味する。例えば、高圧は、約１バール、１．２５バール、１．５バール、１．７５バール、２バール、２．２５バール、２．５バール、２．７５バール、３バール、３

．２５バール、３．５バール、３．７５バール、４バール、４．２５バール、４．５バール、４．７５バール、５バール、５．２５バール、５．５バール、５．７５バール、６バール、７．２５バール、７．５バール、７．７５バール、８バール、８．２５バール、８．５バール、８．７５バール、９バール、９．２５バール、９．５バール、９．７５バール、１０バール、またはそれ超でよい。一部の実施形態では、高圧は、約１バールまたはそれ超である。一部の実施形態では、前記インキュベーションは、真空下である。

【０３２７】

一部の実施形態では、前記インキュベーションは、水蒸気の存在下である。

【０３２８】

これらに限定されないが、インキュベーションは、任意の所望の期間でよい。例えば、インキュベーションは、約１分、約２分、約３分、約４分、約５分、約６分、約７分、約８分、約８分、約１０分またはそれ超の期間でよい。一部の実施形態では、インキュベーションは、約１０分～約５時間、約１５分～約２．５時間、約２０分～約２時間、約２５分～約１．５時間の期間でよい。一部の実施形態では、前記インキュベーションは、約２５分間である。

【０３２９】

製造した物品のいくつかの性質（例えば、強度、分子量、分解プロファイル、膨潤性、密度、色など）は、インキュベーションステップを繰り返すことによって調節することができる。したがって、一部の実施形態では、インキュベーションステップは、１回、例えば、１回、２回、３回、４回、５回、６回、７回、８回、９回、１０回、またはそれ超の回数繰り返すことができる。

【０３３０】

一部の実施形態では、絹フィブロイン組成物は、インキュベーションステップを繰り返す前に、任意選択で乾燥させることができる。これらに限定されないが、乾燥は、任意の所望の期間でよい。例えば、乾燥は、約１分、約２分、約３分、約４分、約５分またはそれ超の期間でよい。一部の実施形態では、インキュベーションは、約５分～約５時間、約１０分～約２．５時間、約１５分～約２時間、約２０分～約１．５時間の期間でよい。一部の実施形態では、前記乾燥は、約１５分間である。さらに、前記乾燥は、室温または高温においてでよい。例えば、このような乾燥は、約４℃～約１００℃、約１０℃～約９５℃、約１５℃～約９０℃、約２０℃～約８５℃、約２５℃～約８０℃、約３０℃～約７５℃、約３５℃～約６０℃、または約４５℃～約６５℃の温度でよい。

【０３３１】

一部の実施形態では、前記インキュベーションは、オートクレーブ処理を含む。「オートクレーブ処理」とは、水蒸気（例えば、飽和蒸気）の存在下または非存在下での超大気圧での熱処置を意味する。この開示の目的のために、オートクレーブ処理という用語は、十分な圧力にて十分な期間、組成物温度を上昇させるプロセスを表す。一般に、オートクレーブ処理は、下記のパラメーター、すなわち、加圧下での１５分またはそれ超の期間の１２０℃またはそれ超への加熱によって特徴付けられる標準化された熱的加熱手順に関する。オートクレーブ処理のための温度は、１２０～１５０℃、より好ましくは１２０～１４０℃の範囲でよく、圧力は、１～２０バール、より好ましくは１～１０バール、さらにより好ましくは１～５バールの範囲でよい。必要とされる時間は、１５～１２０分、より好ましくは１５～６０分の範囲でよい。一部の実施形態では、オートクレーブ処理は、１回、例えば、１回、２回、３回、４回、５回、６回、７回、８回、９回、１０回、またはそれ超の回数繰り返すことができる。

【０３３２】

理論に束縛されるものではないが、オートクレーブ処理の間に蒸気、高熱、および／または圧力は、水を試料中に押し進めると考えられ、ここでは水は可塑剤として作用し、鎖の移動を可能とする。乾燥サイクルの間、移動性鎖は圧縮され、より密でより強い材料が生じる。時間および熱によって、タンパク質鎖は分解し得る。これは、いくつかの鎖のもつれを回避することによってより緊密なパッキングを可能とすることができる。このよう

に、オートクレーブ処理プロセスのパラメーター、例えば、遅いまたは急速な通気、温度、圧力、および期間における変化は、生成される材料の機械的、物理的、または構造的性質に影響を与えることができる。

【０３３３】

一部の実施形態では、絹フィブロイン組成物は、インキュベーションの後ではあるが、所望の形状または幾可学的形状への処理前に任意選択で乾燥させることができる。これらに限定されないが、所望の形状への処理の前の乾燥は、任意の所望の期間でよい。例えば、乾燥は、約数分から数日の期間でよい。一部の実施形態では、乾燥は、約少なくとも１２時間、少なくとも１日、少なくとも２日、少なくとも３日、少なくとも４日、少なくとも５日、少なくとも６日、少なくとも７日、少なくとも８日、少なくとも９日、少なくとも１０日、少なくとも１１日、少なくとも１２日、少なくとも１３日、または少なくとも１４日の期間でよい。一部の実施形態では、最終の形状への処理の前の前記乾燥は、約少なくとも７日である。さらに、前記乾燥は、室温または高温においてでよい。例えば、このような乾燥は、約４℃～約１００℃、約１０℃～約９５℃、約１５℃～約９０℃、約２０℃～約８５℃、約２５℃～約８０℃、約３０℃～約７５℃、約３５℃～約６０℃、または約４５℃～約６５℃の温度でよい。一部の実施形態では、乾燥は、約６０℃の温度である。

【０３３４】

絹フィブロイン組成物を任意選択で乾燥させた後、組成物は、最終の所望の形状に処理することができる。本明細書において使用する場合、「処理すること」という用語は、所望の形状への処理に関して、製造した物品の最終の形状を実現するために使用される任意の方法またはプロセスを含むと理解すべきである。これらに限定されないが、このような処理には、これらに限定されないが、機械的および化学的手段を含むことができる。例えば、処理は、機械加工、旋削（旋盤）、転造、ネジ転造、ドリル加工、ミル粉砕、サンダー仕上げ、パンチング、ダイ打抜き、ブランキング、ブローチ削り、押出し、化学エッチング、および任意のこれらの組合せからなる群から選択されることができる。本明細書において使用する場合、「機械加工」という用語は、これらに限定されないが、ＣＮＣ機械加工、切断、ミル粉砕、旋削、ドリル加工、形削り、平削り、ブローチ削り、のこ引き、バニシング、グラインディングなどを含めた全てのタイプの機械加工操作を含むと理解すべきである。処理方法の１つまたは複数は組み合わせて使用され、より複雑で入り組んだ幾可学的形状を得ることができる。「機械加工可能」という用語は、機械加工に容易に供することができる材料を意味する。

【０３３５】

所望の形状に処理した後、製造した物品は、さらに後処理することができる。例えば、製造した物品は、温度を上げた状態でまたは加圧下でインキュベートすることができる。物品の後処理を使用して、製造した物品のいくつかの性質（例えば、強度、分子量、分解プロファイル、膨潤性、密度、色など）を調節することができる。一部の実施形態では、後処理は、その最終の形状で物品を１回、例えば、１回、２回、３回、４回、５回、６回、７回、８回、９回、１０回、またはそれ超の回数オートクレーブすることを含む。

【０３３６】

本明細書の上において考察されているように、絹フィブロイン組成物は、インキュベーションステップの後に任意選択で乾燥させることができる。したがって、一部の実施形態では、方法は、（ｉ）絹フィブロイン組成物を含むモールドを提供するステップであって、組成物中の絹フィブロインは、少なくとも部分的に不溶性状態である、ステップと、（ｉｉ）組成物を、温度を上げた状態でまたは加圧下でインキュベートするステップと、（ｉｉｉ）組成物を乾燥させるステップと、（ｉｖ）ステップ（ｉｉ）および（ｉｉｉ）を１回または複数回、任意選択で繰り返すステップと、（ｉｖ）組成物を所望の形状に処理するステップとを含む。

【０３３７】

本開示はまた、本明細書において開示されている方法によって調製される絹フィブロイ

ン物品を提供する。これらに限定されないが、物品は、医療用途、例えば、医療デバイスのために使用することができ、または物品は、非医療用途のためでもよい。本明細書において使用する場合、医療デバイスという用語は、哺乳動物の外部または内部処置に関連して使用されるものを含めた全てのタイプの医療デバイスを包含することを意図する。哺乳動物の外部処置において使用される医療デバイスには、これらに限定されないが、創傷被覆材、熱傷用包帯材または他の皮膚のカバリング、および手術用糸が含まれる。哺乳動物の内部処置において使用される医療デバイスには、これらに限定されないが、血管移植片、ステント、カテーテル、バルブ、人工関節、人工臓器、手術用糸などが含まれる。

【０３３８】

例示的な医療デバイスには、これらに限定されないが、整形外科インプラント、顔面インプラント、鼻のインプラント（例えば、鼻の再構築のため）、縫合糸アンカー、歯のインプラント、Ｓｗａｎｓｏｎプロテーゼ、および任意のこれらの組合せが含まれる。一部の実施形態では、製造品は、連続的な１相縫合糸アンカーである。

【０３３９】

本明細書において使用する場合、「整形外科インプラント」という用語は、その範囲内で、これらの構造における疼痛の軽減を含めた、筋骨格系、特に、関節および骨の機能の保存および修復のための、脊椎動物、特に、哺乳動物、例えば、ヒトの体中にインプラントされることを意図する任意のデバイスを含む。例示的な整形外科インプラントには、これらに限定されないが、整形外科用スクリュー、整形外科用プレート、整形外科用ロッド、整形外科用チューリップ、または任意のこれらの組合せが含まれる。

【０３４０】

一部の実施形態では、製造品は、タッピングスクリュー、例えば、セルフタッピングスクリューでよい。

【０３４１】

一部の実施形態では、製造品は、縫合糸アンカーでよい。縫合糸アンカーは、アンカー、アイレット、および縫合糸からなる。アンカーを、スクリュー機序または締まりばめであり得る骨に挿入し、アイレットは、縫合糸が通過する、アンカーにおける穴またはループである。

【０３４２】

一部の実施形態では、製造品は、歯のインプラントでよい。本明細書において使用する場合、「歯のインプラント」という用語は、その範囲内で、歯の修復手順において、脊椎動物、特に、哺乳動物、例えば、ヒトの口腔中にインプラントすることを意図する任意のデバイスを含む。歯のインプラントはまた、歯のプロテーゼデバイスとして示すことができる。一般に、歯のインプラントは、１つまたはいくつかのインプラントパーツからなる。例えば、歯のインプラントは通常、二次的インプラントパーツ、例えば、支台歯および／または歯の修復、例えば、クラウン、ブリッジまたは義歯にカップリングした歯フィクスチャーを含む。しかし、インプラント処置を意図した任意のデバイス、例えば、歯フィクスチャーは、たとえ他のパーツがそこに接続していても、単独でインプラントと称することができる。歯のインプラントは、現在好ましい実施形態である。

【０３４３】

一部の実施形態では、歯のインプラントは、クラウンおよびスクリューインプラントからなる。インプラントは、クラウンの安定化のためのスクリュー機序を使用して骨中に挿入される。

【０３４４】

一部の実施形態では、製造品は、骨スクリューおよび／または骨プレートでよい。骨スクリューは、関連する装置、例えば、骨プレートの挿入および安定化のために使用されるネジ山部分およびヘッドからなる。

【０３４５】

一部の実施形態では、製造品は、Ｓｗａｎｓｏｎプロテーゼでよい。Ｓｗａｎｓｏｎ指関節インプラントは、関節リウマチ、変形性関節症または外傷性関節炎によって不能とな

った手および手首の機能を回復することを助ける可撓性の髄内固定一体型のインプラントである。これはシリコーンエラストマーからなり、その主な機能は、適正な関節腔、ならびに良好な横安定性および最小の屈曲－伸展性の制限との整合性を維持することを助けることである。これらのインプラントは、圧縮負荷の大部分が骨に分布しているため、最小の負荷を担持する。

【０３４６】

一部の実施形態では、製造品は、鼻の再構築のために使用することができる。機能を維持する一方で審美的に注意を引かない鼻を生じさせるために、鼻の再構築を行う。構造的移植片は、側壁に強剛性を実現し、側部の崩壊に抵抗し、鼻の輪郭および突起を確立することが必要とされることが多い。現在の材料は、アロプラスト、例えば、シリコーンおよび多孔質高密度ポリエチレンを含み、また同種移植片、例えば、ａｌｌｏｄｅｒｍまたは肋軟骨を有する。

【０３４７】

本明細書において開示されている方法によって、種々の異なる形状に製造される絹の能力によって、絹が本出願のために使用されることを可能とする。例えば、絹は、ロッドに押し出され、次いで、旋削（旋盤）されて変形を除去し、所望のサイズを得ることができる。さらに、構築物はインサイチュで成形され、鼻の自然の幾可学的形状に従うことができる。

【０３４８】

一部の実施形態では、製造品は、耳形成術のために使用することができる。耳形成術は、典型的には先天性の形成不全、外傷、がんのアブレーション、および立ち耳に起因する部分的または完全な耳の欠損を再構築するプロセスである。耳は胸郭からの軟骨を使用することによって再構築することができ、または人工の耳を生じさせることができる。肋軟骨は刻まれ、微細なステンレス鋼ワイヤーを使用して一緒に結ばれ、非常に詳細に亘るフレームワークが生じる。

【０３４９】

本明細書において開示されている方法によって、絹がインサイチュで押し出され、ドローイングされ、極めて細いワイヤーネットワークに成形されることが可能となり、これを使用して、新たな耳のフレームワークを生じさせることができる。さらに、入り組んだ幾可学的形状を生じさせることができる多数のプロセスによって、患者の特定の必要性に基づいて絹を製造することができる。

【０３５０】

上記で考察した特定の医療デバイスおよびインプラントに加えて、本明細書において開示されている方法は、顔面インプラント（皮膚充填剤、頬インプラント、眼窩）、目の形成術、唇にボリュームを出す手術、生殖器形成手術（陰茎インプラント、膣形成術、性転換）、殿部増強、および他の軟部組織「形成術」のために使用することができる。

【０３５１】

非医療用途は、ダイス、画びょう、弾丸、子供のおもちゃ（例えば、構造ブロック、レゴ、チェッカーなど）、および生分解性プラスチック代替物の製造を含む。

【０３５２】

添加物

一部の実施形態では、本明細書に記載されている絹フィブロイン組成物は、少なくとも１種の添加物を含むことができる（例えば、本明細書において考察されているような活性作用物質／試料／構成成分の代用として、もしくはこれらに加えて、または一部の実施形態では、活性作用物質／試料／構成成分は、この用語が本明細書において使用されているように「添加物」であり得る）。本明細書に記載されている様々な態様の一部の実施形態では、絹組成物は、１種または複数（例えば、１種、２種、３種、４種、５種もしくはそれ超）の添加物をさらに含むことができる。理論に束縛されるものではないが、添加物は、１つまたは複数の望ましい性質、例えば、強度、可撓性、処理および取扱いの容易さ、生体適合性、生体吸収性、表面形態、放出速度ならびに／または組成物中に存在する１種

もしくは複数の活性作用物質の動態などを実現することができる。添加物は、絹フィブロインと共有結合的または非共有結合的に連結することができ、絹組成物内に均質または不均質に統合することができる。

【０３５３】

例えば、絹材料は、１種または複数（例えば、１種、２種、３種、４種、５種もしくはそれ超）の添加物を含むフィブロイン溶液から調製することができる。

【０３５４】

これらに限定されないが、添加物は、小さな有機または無機分子；サッカリド；オリゴサッカリド；ポリサッカリド；ポリマー；タンパク質；ペプチド；ペプチド類似体および誘導体；ペプチド模倣物；核酸；核酸類似体などから選択することができる。いくつかの実施形態では、添加物は、免疫原；抗原；生体学的材料、例えば、細菌、植物、真菌、または動物細胞から作製した抽出物；動物組織；天然または合成組成物；ならびに任意のこれらの組合せであり、あるいはこれらを含む。さらに、添加物は、任意の物理的形態でよい。例えば、添加物は、粒子、繊維、フィルム、ゲル、メッシュ、マット、不織マット、粉末、液体、または任意のこれらの組合せの形態でよい。一部の実施形態では、添加物は、粒子である。

【０３５５】

一実施形態では、前記少なくとも１種の添加物は、組成物、および／もしくはその中に含まれる活性作用物質／試料／構成成分の１つまたは複数の態様を安定化し、かつ／または絹フィブロインの溶解性を増加させるために使用することができる安定剤である。生体試料中に存在する少なくともＲＮＡまたはタンパク質の安定化のために加えることができる安定剤の一例には、それぞれ、ヌクレアーゼ阻害剤（例えば、ＲＮアーゼ阻害剤）またはプロテイナーゼ阻害剤が含まれる。

【０３５６】

安定剤のさらなる例には、これらに限定されないが、アミノ酸、例えば、グルタミン酸ナトリウム、アルギニン、リシン、およびシステイン；モノサッカリド、例えば、グルコース、ガラクトース、フルクトース、およびマンノース；ジサッカリド、例えば、スクロース、マルトース、およびラクトース；糖アルコール、例えば、ソルビトールおよびマンニトール；ポリサッカリド、例えば、オリゴサッカリド、デンプン、セルロース、およびその誘導体；ヒト血清アルブミンおよびウシ血清アルブミン；ゼラチン、およびゼラチン誘導体、例えば、水分解されたゼラチン；抗酸化剤としてアスコルビン酸；イオン（例えば、カチオンまたはアニオン安定剤）；界面活性剤；ならびに任意のこれらの組合せを含むことができる。これらの材料は、公開資料、例えば、Neiによって記述された「Toketsu-Kanso To Hogo Busshitsu（Lyophilization And Protective Materials）」、１～１７６頁、１９７２年、東京大学出版会（東京大学の出版会）、日本によって公表；およびOtaらによって記述された「Shinku Gijutsu Koza （８）：Sinku Kanso （Lecture on Vacuum Technology（８）:Vacuum Drying）」、１７６～１８２頁、１９６４年に日刊工業新聞社、日本によって公表、に記載されている。

【０３５７】

一部の実施形態では、添加物は、生体適合性ポリマーである。例示的な生体適合性ポリマーには、これらに限定されないが、ポリ－乳酸（ＰＬＡ）、ポリ－グリコール酸（ＰＧＡ）、ポリ－ラクチド－ｃｏ－グリコリド（ＰＬＧＡ）、ポリエステル、ポリ（オルトエステル）、ポリ（ホスファジン）、ポリ（リン酸エステル）、ポリカプロラクトン、ゼラチン、コラーゲン、フィブロネクチン、ケラチン、ポリアスパラギン酸、アルギネート、キトサン、キチン、ヒアルロン酸、ペクチン、ポリヒドロキシアルカノエート、デキストラン、およびポリ無水物、ポリエチレンオキシド（ＰＥＯ）、ポリ（エチレングリコール）（ＰＥＧ）、トリブロックコポリマー、ポリリシン、アルギネート、ポリアスパラギン酸、任意のその誘導体および任意のこれらの組合せが含まれる。本開示による使用を受け入れられる他の例示的な生体適合性ポリマーには、例えば、それらの全ての内容が参照により本明細書中に組み込まれている米国特許第６，３０２，８４８号；同第６，３９５，

７３４号；同第６，１２７，１４３号；同第５，２６３，９９２号；同第６，３７９，６９０号；同第５，０１５，４７６号；同第４，８０６，３５５号；同第６，３７２，２４４号；同第６，３１０，１８８号；同第５，０９３，４８９号；同第ＵＳ３８７，４１３号；同第６，３２５，８１０号；同第６，３３７，１９８号；同第ＵＳ６，２６７，７７６号；同第５，５７６，８８１号；同第６，２４５，５３７号；同第５，９０２，８００号；および同第５，２７０，４１９号に記載されているものが含まれる。

【０３５８】

一実施形態では、添加物は、絹ベースの可撓性および／または溶解性に影響を与えることができるグリセロールである。絹をベースとする材料、例えば、グリセロールを含む絹フィルムは、その内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれているＷＯ２０１０／０４２７９８に記載されている。

【０３５９】

他の添加物の例には、これらに限定されないが、細胞付着メディエーター、例えば、コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、プロテオグリカン、または細胞の付着に影響を与えることが公知である公知のインテグリン結合ドメイン、例えば、「ＲＧＤ」インテグリン結合配列を含有するペプチド、もしくはそのバリエーション（Schaffner Ｐ ＆ Dard、２００３年、Cell Mol Life Sci. Jan；６０巻（１号）：１１９～３２頁；Hersel U.ら、２００３年、Biomaterials. Nov；２４巻（２４号）：４３８５～４１５頁）；生物活性のあるリガンド；および細胞内部成長または組織内部成長の特定の変種を増強または排除する物質が含まれる。増殖または分化を増強させる付加的な作用物質の他の例には、これらに限定されないが、骨誘導性物質、例えば、骨形態形成タンパク質（ＢＭＰ）；サイトカイン、増殖因子、例えば、上皮増殖因子（ＥＧＦ）、血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）、インスリン様増殖因子（ＩＧＦ－ＩおよびＩＩ）ＴＧＦ－β１などが含まれる。

【０３６０】

組成物中の添加物の総量は、総絹組成物の約０．０１重量％～約９９重量％、約０．０１重量％～約７０重量％、約５重量％～約６０重量％、約１０重量％～約５０重量％、約１５重量％～約４５重量％、または約２０重量％～約４０重量％でよい。一部の実施形態では、組成物中の絹フィブロインと添加物の比は、約１０００：１（ｗ／ｗ）～約１：１０００（ｗ／ｗ）、約５００：１（ｗ／ｗ）～約１：５００（ｗ／ｗ）、約２５０：１（ｗ／ｗ）～約１：２５０（ｗ／ｗ）、約２００：１（ｗ／ｗ）～約１：２００（ｗ／ｗ）、約２５：１（ｗ／ｗ）～約１：２５（ｗ／ｗ）、約２０：１（ｗ／ｗ）～約１：２０（ｗ／ｗ）、約１０：１（ｗ／ｗ）～約１：１０（ｗ／ｗ）、または約５：１（ｗ／ｗ）～約１：５（ｗ／ｗ）の範囲でよい。

【０３６１】

いくつかの実施形態では、絹をベースとする材料中の添加物の総量は、絹をベースとする材料中の総絹フィブロインの約０．１重量％～約７０重量％、約５重量％～約６０重量％、約１０重量％～約５０重量％、約１５重量％～約４５重量％、または約２０重量％～約４０重量％でよい。当業者は、例えば、本明細書に記載されている様々な比での添加物の添加によって影響される構成成分または絹をベースとする材料の性質を測定することによって、絹フィブロインと添加物の適当な比を決定することができる。

【０３６２】

一部の実施形態では、組成物は、例えば、 少なくとも1000:1, 少なくとも900:1, 少なくとも800:1, 少なくとも700:1, 少なくとも600:1, 少なくとも500:1, 少なくとも400:1, 少なくとも300:1, 少なくとも200:1, 少なくとも100:1, 少なくとも90:1, 少なくとも80:1, 少なくとも70:1, 少なくとも60:1, 少なくとも50:1, 少なくとも40:1, 少なくとも30:1, 少なくとも20:1, 少なくとも10:1, 少なくとも7:1, 少なくとも5:1, 少なくとも3:1, 少なくとも1:1, 少なくとも1:3, 少なくとも1:5, 少なくとも1:7, 少なくとも1:10, 少なくとも1:20, 少なくとも1:30, 少なくとも1:40, 少なくとも1:50, 少なくとも1:60, 少なくとも1:70, 少なくとも1:80, 少なくとも1:90

, 少なくとも1:100, 少なくとも1:200, 少なくとも1:300, 少なくとも1:400, 少なくとも1:500, 少なくとも600, 少なくとも1:700, 少なくとも1:800, 少なくとも1:900, or 少なくとも1:100の絹フィブロインと添加物のモル比を含む。

【０３６３】

一部の実施形態では、組成物は、例えば、多くとも1000:1、多くとも900:1、多くとも800:1、多くとも700:1、多くとも600:1、多くとも500:1、多くとも400:1、多くとも300:1、多くとも200:1、100:1、多くとも90:1、多くとも80:1、多くとも70:1、多くとも60:1、多くとも50:1、多くとも40:1、多くとも30:1、多くとも20:1、多くとも10:1、多くとも7:1、多くとも5:1、多くとも3:1、多くとも1:1、多くとも1:3、多くとも1:5、多くとも1:7、多くとも1:10、多くとも1:20、多くとも1:30、多くとも1:40、多くとも1:50、多くとも1:60、多くとも1:70、多くとも1:80、多くとも1:90、多くとも1:100、多くとも1:200、多くとも1:300、多くとも1:400、多くとも1:500、多くとも1:600、多くとも1:700、多くとも1:800、多くとも1:900、or 多くとも1:1000の絹フィブロインと添加物のモル比を含む。

【０３６４】

一部の実施形態では、組成物は、例えば、約1000:1～約1:1000、約900:1～約1:900、約800:1～約1:800、約700:1～約1:700、約600:1～約1:600、約500:1～約1:500、約400:1～約1:400、約300:1～約1:300、約200:1～約1:200、約100:1～約1:100、約90:1～約1:90、約80:1～約1:80、約70:1～約1:70、約60:1～約1:60、約50:1～約1:50、約40:1～約1:40、約30:1～約1:30、約20:1～約1:20、約10:1～約1:10、約7:1～約1:7、約5:1～約1:5、約3:1～約1:3、または約1:1の絹フィブロインと添加物のモル比を含む。

【０３６５】

一部の実施形態では、添加物は、生物学的活性作用物質である。「生物学的活性作用物質」という用語は、本明細書において使用する場合、ｉｎ ｖｉｖｏで少なくとも１つの生物学的効果を発揮する任意の分子を指す。例えば、生物学的活性作用物質は、対象において病態または状態を処置または予防するための治療剤でよい。生物学的活性作用物質には、これらに限定されないが、有機分子、無機材料、タンパク質、ペプチド、核酸（例えば、遺伝子、遺伝子断片、遺伝子制御配列、およびアンチセンス分子）、核タンパク質、ポリサッカリド、糖タンパク質、ならびにリポタンパク質が含まれる。本明細書に記載されている組成物中に組み込むことができる生物活性化合物のクラスには、これらに限定されないが、抗がん剤、抗生物質、鎮痛剤、抗炎症剤、免疫抑制剤、酵素阻害剤、抗ヒスタミン剤、抗痙攣薬、ホルモン、筋弛緩剤、鎮痙剤、眼病剤、プロスタグランジン、抗うつ剤、抗精神病物質、栄養因子、骨誘導性タンパク質、増殖因子、およびワクチンが含まれる。

【０３６６】

一部の実施形態では、添加物は、治療剤である。本明細書において使用する場合、「治療剤」という用語は、診断、治療、予防医学、または獣医学の目的のために生物に投与される分子、分子の群、複合体または物質を意味する。本明細書において使用する場合、「治療剤」という用語は、「薬物」または「ワクチン」を含む。この用語は、臨床および獣医学スクリーニング、予防、予防法、治癒、健康推進、検出、イメージング、診断、治療、手術、モニタリング、化粧品、人工装具、科学捜査などにおいて有用な調製物を含めて、外部的および内部的に投与された局所性、局部性および全身性のヒトおよび動物の医薬、処置、療法、栄養補助食品、薬用化粧品、生物学的製剤、デバイス、診断用薬および避妊薬を含む。この用語はまた、細胞受容体、膜受容体、ホルモン受容体、治療受容体、病原微生物、ウイルス、あるいは植物、動物および／もしくはヒトを含む、またはこれらと接触することができる選択した標的を認識することができる選択した分子または選択した核酸配列を含む、アグリシューティカル、職場、軍隊、産業および環境的な治療または療法に関して使用することができる。この用語はまた、例えば、ＤＮＡナノプレックス、ｓｉＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、アプタマー、リボザイム、デコイ核酸、アンチセンス核酸、ＲＮＡアクチベーターなどを含めて、核酸、および治療効果を生じさせる核

酸を含む化合物、例えば、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）、リボ核酸（ＲＮＡ）、核酸類似体（例えば、ロックド核酸（ＬＮＡ）、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、ゼノ核酸（ＸＮＡ））、またはこれらの混合物もしくは組合せを特に含むことができる。一般に、任意の治療剤は、本明細書に記載されている組成物に含まれることができる。

【０３６７】

「治療剤」という用語はまた、これが適用される生物系において局所性または全身性の生体学的効果、生理学的効果、または治療効果を実現することができる作用物質を含む。例えば、治療剤は、他の機能の中で、感染症または炎症を抑制し、細胞増殖および組織再生を増強し、腫瘍増殖を抑制し、鎮痛剤として作用し、抗細胞付着を促進し、骨成長を増強するように作用することができる。他の適切な治療剤は、抗ウイルス剤、ホルモン、抗体、または治療用タンパク質を含むことができる。他の治療剤は、投与するときに生物活性がないが、対象への投与によって、代謝またはいくつかの他の機序によって生物学的活性作用物質に変換される作用物質であるプロドラッグを含む。さらに、絹をベースとする薬物送達組成物は、１種の治療剤、または２種もしくはそれ超の治療剤の組合せを含有することができる。

【０３６８】

治療剤は、化合物、および化合物の混合物、例えば、小さな有機または無機分子；サッカリン；オリゴサッカリド；ポリサッカリド；生体高分子、例えば、ペプチド、タンパク質、およびペプチド類似体および誘導体；ペプチド模倣物；抗体およびその抗原結合断片；核酸；核酸類似体および誘導体；生物活性材料、例えば、細菌、植物、真菌、または動物細胞から作製された抽出物；動物組織；天然または合成組成物；ならびに任意のこれらの組合せを含めた多種多様の異なる化合物を含むことができる。一部の実施形態では、治療剤は、小分子である。

【０３６９】

本明細書において使用する場合、「小分子」という用語は、「天然物様」である化合物を指すことができるが、「小分子」という用語は、「天然物様」化合物に限定されない。むしろ、小分子は典型的には、いくつかの炭素－炭素結合を含有し、５０００ダルトン（５ｋＤａ）未満、好ましくは３ｋＤａ未満、またより好ましくは２ｋＤａ未満、最も好ましくは１ｋＤａ未満の分子量を有することによって特徴付けられる。いくつかの場合において、小分子が７００ダルトンと等しい、もしくはこれ未満の分子量を有することが好ましい。

【０３７０】

例示的な治療剤には、これらに限定されないが、これらの全ての完全な内容が参照により本明細書中に組み込まれている、Harrison’s Principles of Internal Medicine、第１３版、T.R. Harrisonら編、McGraw-Hill N.Y.、NY；Physicians’ Desk Reference、第５０版、１９９７年、Oradell New Jersey, Medical Economics Co.；Pharmacological Basis of Therapeutics、第８版、Goodman and Gilman、１９９０年；United States Pharmacopeia、The National Formulary、USP XII NF XVII、１９９０年において見出されるものが含まれる。

【０３７１】

治療剤は、本明細書において開示されたカテゴリーおよび具体例を含む。カテゴリーは具体例によって限定されることを意図しない。当業者は、カテゴリーの範囲内に入り、かつ本開示によって有用である多数の他の化合物をまた認識する。例には、放射線増感剤、ステロイド、キサンチン、ベーター２－アゴニスト気管支拡張剤、抗炎症剤、鎮痛剤、カルシウムアンタゴニスト、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、ベータ遮断薬、中枢作用性アルファ－アゴニスト、アルファ－１－アンタゴニスト、抗コリン剤／鎮痙剤、バソプレシン類似体、抗不整脈剤、抗パーキンソン病剤、抗狭心症剤／降圧剤、抗血液凝固剤、抗血小板剤、鎮静剤、抗不安剤（ansiolytic agent）、ペプチド性剤、バイオポリマー剤、抗新生物剤、緩下剤、止瀉剤、抗微生物剤、抗真菌剤、ワクチン、タンパク質、または核酸が含まれる。さらなる態様では、医薬活性作用物質は、クマリン、アルブミン、ステ

ロイド、例えば、ベタメタゾン、デキサメタゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プレドニゾン、トリアムシノロン、ブデソニド、ヒドロコルチゾン、および薬学的に許容されるヒドロコルチゾン誘導体；キサンチン、例えば、テオフィリンおよびドキソフィリン（doxophylline）；ベーター２－アゴニスト気管支拡張剤、例えば、サルブタモール、フェノテロール（fenterol）、クレンブテロール、バンブテロール、サルメテロール、フェノテロール；抗喘息抗炎症剤、抗関節炎抗炎症剤、および非ステロイド性抗炎症剤を含めた抗炎症剤でよく、これらの例には、これらに限定されないが、スルフィド、メサラミン、ブデソニド、ｓａｌａｚｏｐｙｒｉｎ、ジクロフェナク、薬学的に許容されるジクロフェナク塩、ニメスリド、ナプロキセン、アセトアミノフェン、イブプロフェン、ケトプロフェンおよびピロキシカム；鎮痛剤、例えば、サリチレート；カルシウムチャネル遮断薬、例えば、ニフェジピン、アムロジピン、およびニカルジピン；アンジオテンシン変換酵素阻害剤、例えば、カプトプリル、ベナゼプリル塩酸塩、ホシノプリルナトリウム、トランドラプリル、ラミプリル、リシノプリル、エナラプリル、キナプリル塩酸塩、およびモエキシプリル塩酸塩；ベータ遮断薬（すなわち、ベータアドレナリン作動性遮断剤）、例えば、ソタロール塩酸塩、チモロールマレイン酸塩、エスモロール塩酸塩、カルテオロール、プロパノロール塩酸塩、ベタキソロール塩酸塩、ペンブトロール硫酸塩、酒石酸メトプロロール、コハク酸メトプロロール、アセブトロール塩酸塩、アテノロール、ピンドロール、およびビソプロロールフマル酸塩；中枢作用性アルファ－２－アゴニスト、例えば、クロニジン；アルファ－１－アンタゴニスト、例えば、ドキサゾシンおよびプラゾシン；抗コリン剤／鎮痙剤、例えば、ジサイクロミン塩酸塩、スコポラミン臭化水素酸塩、グリコピロレート、臭化クリジニウム、フラボキサート、およびオキシブチニン；バソプレシン類似体、例えば、バソプレシンおよびデスモプレシン；抗不整脈剤、例えば、キニジン、リドカイン、トカイニド塩酸塩、メキシレチン塩酸塩、ジゴキシン、塩酸ベラパミル、プロパフェノン塩酸塩、フレカイニド酢酸塩、プロカインアミド塩酸塩、モリシジン塩酸塩、およびリン酸ジソピラミド；抗パーキンソン病剤、例えば、ドパミン、Ｌ－ドーパ／カルビドパ、セレギリン、ジヒドロエルゴクリプチン、ペルゴリド、リスリド、アポモルヒネ、およびブロモクリプチン；抗狭心症剤および降圧剤、例えば、一硝酸イソソルビド、硝酸イソソルビド、プロプラノロール、アテノロールおよびベラパミル；抗血液凝固剤および抗血小板剤、例えば、Ｃｏｕｍａｄｉｎ、ワルファリン、アセチルサリチル酸、およびチクロピジン；鎮静剤、例えば、ベンゾジアゼピン（benzodiazapines）およびバルビツレート；抗不安剤、例えば、ロラゼパム、ブロマゼパム、およびジアゼパム；ペプチド性およびバイオポリマー剤、例えば、カルシトニン、ロイプロリドおよび他のＬＨＲＨアゴニスト、ヒルジン、シクロスポリン、インスリン、ソマトスタチン、プロチレリン、インターフェロン、デスモプレシン、ソマトトロピン、チモペンチン、ピドチモド、エリスロポエチン、インターロイキン、メラトニン、顆粒球／マクロファージ－ＣＳＦ、およびヘパリン；抗新生物剤、例えば、エトポシド、リン酸エトポシド、シクロホスファミド、メソトレキセート、５－フルオロウラシル、ビンクリスチン、ドキソルビシン、シスプラチン、ヒドロキシ尿素、ロイコボリンカルシウム、タモキシフェン、フルタミド、アスパラギナーゼ、アルトレタミン、ミトタン、およびプロカルバジン塩酸塩；緩下剤、例えば、センナ濃縮物、カサンスラノール、ビサコジル、およびピコスルファートナトリウム；止瀉剤、例えば、ジフェノキシン塩酸塩、塩酸ロペラミド、フラゾリドン、ジフェノキシレート塩酸塩（hdyrochloride）、および微生物；ワクチン、例えば、細菌ワクチンおよびウイルス性ワクチン；抗微生物剤、例えば、ペニシリン、セファロスポリン、およびマクロライド、抗真菌剤、例えば、イミダゾールおよびトリアゾール誘導体；ならびに核酸、例えば、生体タンパク質をコードするＤＮＡ配列、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。

【０３７２】

抗がん剤には、アルキル化剤、白金剤、代謝拮抗剤、トポイソメラーゼ阻害剤、抗腫瘍抗生物質、有糸分裂阻害剤、アロマターゼ阻害剤、チミジル酸シンターゼ阻害剤、ＤＮＡアンタゴニスト、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、ポンプ阻害剤、ヒストンアセ

チルトランスフェラーゼ阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、リボヌクレオシドレダクターゼ阻害剤、ＴＮＦアルファアゴニスト／アンタゴニスト、エンドセリンＡ受容体アンタゴニスト、レチノイン酸受容体アゴニスト、免疫調節剤、ホルモン剤および抗ホルモン剤、光力学的物質、ならびにチロシンキナーゼ阻害剤が含まれる。

【０３７３】

抗生物質には、アミノグリコシド（例えば、ゲンタマイシン、トブラマイシン、ネチルマイシン、ストレプトマイシン、アミカシン、ネオマイシン）、バシトラシン、カルバペネム（corbapenems）（例えば、イミペネム／シラスタチン（cislastatin））、セファロスポリン、コリスチン、メテナミン、モノバクタム（例えば、アズトレオナム）、ペニシリン（例えば、ペニシリンＧ、ペニシリンＶ、メチシリン、ナフシリン（natcillin）、オキサシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、アンピシリン、アモキシシリン、カルベニシリン、チカルシリン、ピペラシリン、メズロシリン、アズロシリン）、ポリミキシンＢ、キノロン、およびバンコマイシン；および細菌発育阻止剤、例えば、クロラムフェニコール、クリンダニアン（clindanyan）、マクロライド（例えば、エリスロマイシン、アジスロマイシン、クラリスロマイシン）、リンコマイシン（lincomyan）、ニトロフラントイン、スルホンアミド、テトラサイクリン（例えば、テトラサイクリン、ドキシサイクリン、ミノサイクリン、デメクロサイクリン（demeclocyline））、およびトリメトプリムが含まれる。また含まれるのは、メトロニダゾール、フルオロキノロン、およびリファンピン（ritampin）である。

【０３７４】

酵素阻害剤は、酵素反応を阻害する物質である。酵素阻害剤の例には、塩化エドロホニウム、Ｎ－メチルフィゾスチグミン、ネオスチグミン臭化物、硫酸フィゾスチグミン、タクリン、タクリン、１－ヒドロキシマレエート、ヨードツベルシジン、ｐ－ブロモテトラミゾール（bromotetramiisole）、１０－（アルファ－ジエチルアミノプロピオニル）－フェノチアジン塩酸塩、カルミダゾリウムクロリド、ヘミコリニウム－３，３，５－ジニトロカテコール、ジアシルグリセロールキナーゼ阻害剤Ｉ、ジアシルグリセロールキナーゼ阻害剤ＩＩ、３－フェニルプロパルギルアミン、Ｎ°－モノメチル－Ｌアルギニンアセテート、カルビドパ、３－ヒドロキシベンジルヒドラジン、ヒドララジン、クロルジリン、デプレニル、ヒドロキシルアミン、イプロニアジドホスフェート、６－ＭｅＯ－テトラヒドロ－９Ｈ－ピリド－インドール、ニアラミド、パルギリン、キナクリン、セミカルバジド、トラニルシプロミン、Ｎ，Ｎ－ジエチルアミノエチル－２，２－ジフェニルバレレート塩酸塩、３－イソブチル－１－メチルキサンチン（methylxanthne）、パパベリン、インドメタシン（indomethacind）、２－シクロオクチル－２－ヒドロキシエチルアミン塩酸塩、２，３－ジクロロ－ａ－メチルベンジルアミン（ＤＣＭＢ）、８，９－ジクロロ－２，３，４，５－テトラヒドロ－１Ｈ－２－ベンズアゼピン塩酸塩、ｐ－アミノグルテチミド、ｐ－アミノグルテチミドタルトレート、３－ヨードチロシン、アルファ－メチルチロシン、アセタゾラミド、ジクロフェナミド、６－ヒドロキシ－２－ベンゾチアゾールスルホンアミド、およびアロプリノールが含まれる。

【０３７５】

抗ヒスタミン剤には、数ある中でも、ピリラミン、クロルフェニラミン、およびテトラヒドロゾリン（tetrahydrazoline）が含まれる。

【０３７６】

抗炎症剤には、コルチコステロイド、非ステロイド性抗炎症薬（例えば、アスピリン、フェニルブタゾン、インドメタシン、スリンダク、トルメチン、イブプロフェン、ピロキシカム、およびフェナム酸）、アセトアミノフェン、フェナセチン、金塩、クロロキン、Ｄ－ペニシラミン、メソトレキセート、コルヒチン、アロプリノール、プロベネシド、およびスルフィンピラゾンが含まれる。

【０３７７】

筋弛緩剤には、メフェネシン、メトカルバモール（methocarbomal）、シクロベンザプリン塩酸塩、トリヘキシフェニジル（trihexylphenidyl）塩酸塩、レボドパ／カルビドパ

、およびビペリデンが含まれる。
【０３７８】
鎮痙剤には、アトロピン、スコポラミン、オキシフェノニウム、およびパパベリンが含まれる。
【０３７９】
鎮痛剤には、アスピリン、フェニルブタゾン（phenybutazone）、インドメタシン（idomethacin）、スリンダク、トルメチック（tolmetic）、イブプロフェン、ピロキシカム、フェナム酸、アセトアミノフェン、フェナセチン、硫酸モルヒネ、硫酸コデイン、メペリジン、ナロルフィン、オピオイド（例えば、硫酸コデイン、フェンタニルクエン酸塩、酒石酸水素ヒドロコドン、ロペラミド、硫酸モルヒネ、ノスカピン、ノルコデイン、ノルモルヒネ、テバイン、ノルビナルトルフィミン、ブプレノルフィン、クロマルトレキサミン、フナルトレキサミン（funaltrexamione）、ナルブフィン、ナロルフィン、ナロキソン、ナロキソナジン、ナルトレキソン、およびナルトリンドール）、プロカイン、リドカイン（lidocain）、テトラカインおよびジブカインが含まれる。
【０３８０】
眼病剤には、フルオレセインナトリウム、ローズベンガル、メタコリン、アドレナリン、コカイン、アトロピン、アルファ－キモトリプシン、ヒアルロニダーゼ、ベタキソロール（betaxalol）、ピロカルピン、チモロール、チモロール塩、およびこれらの組合せが含まれる。
【０３８１】
プロスタグランジンは当技術分野で認識されており、種々の生物学的効果を有する１クラスの天然の化学的に関連する長鎖ヒドロキシ脂肪酸である。
【０３８２】
抗うつ剤は、うつを予防または軽減することができる物質である。抗うつ剤の例には、イミプラミン、アミトリプチリン、ノルトリプチリン、プロトリプチリン、デシプラミン、アモキサピン、ドキセピン、マプロチリン、トラニルシプロミン、フェネルジン、およびイソカルボキサジド（isocarboxazide）が含まれる。
【０３８３】
栄養因子は、その継続する存在が細胞の生存能または長寿命を改善させる因子である。栄養因子には、これらに限定されないが、血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）、好中球活性化タンパク質、単球走化性タンパク質、マクロファージ炎症性タンパク質、血小板因子、血小板塩基タンパク質、および黒色腫成長刺激活性；上皮増殖因子、トランスフォーミング増殖因子（アルファ）、線維芽細胞増殖因子、血小板由来内皮細胞増殖因子、インスリン様増殖因子、グリア由来成長神経栄養因子、繊毛様神経栄養因子、神経増殖因子、骨成長／軟骨誘導因子（アルファおよびベータ）、骨形成タンパク質、インターロイキン（例えば、インターロイキン１からインターロイキン１０を含めた、インターロイキン阻害剤またはインターロイキン受容体）、インターフェロン（例えば、インターフェロンアルファ、ベータおよびガンマ）、エリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子、マクロファージコロニー刺激因子および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子を含めた造血因子；腫瘍壊死因子、およびベーター１、ベーター２、ベーター３を含めたトランスフォーミング増殖因子（ベータ）、インヒビン、ならびにアクチビンが含まれる。
【０３８４】
ホルモンには、エストロゲン（例えば、エストラジオール、エストロン、エストリオール、ジエチルスチルベストロール（diethylstibestrol）、キネストロール、クロロトリアニセン、エチニルエストラジオール、メストラノール）、抗エストロゲン剤（例えば、クロミフェン、タモキシフェン）、プロゲスチン（例えば、メドロキシプロゲステロン、ノルエチンドロン、ヒドロキシプロゲステロン、ノルゲストレル）、抗黄体ホルモン（ミフェプリストン）、アンドロゲン（例えば、テストステロンシピオネート、フルオキシメステロン、ダナゾール、テストラクトン）、抗アンドロゲン剤（例えば、酢酸シプロテロン、フルタミド）、甲状腺ホルモン（例えば、トリヨードチロニン（triiodothyronne）

、チロキシン、プロピルチオウラシル、メチマゾール、およびヨージキソド（iodixode））、ならびに下垂体ホルモン（例えば、コルチコトロピン、ソマトトロピン（sumutotropin）、オキシトシン、およびバソプレシン）が含まれる。ホルモンは、ホルモン補充療法において、および／または受胎調節の目的のために一般に用いられる。ステロイドホルモン、例えば、プレドニゾンはまた、免疫抑制剤および抗炎症薬として使用される。

【０３８５】

一部の実施形態では、添加物は、天然組織の組織形成、および／または治癒および再成長、ならびに任意のこれらの組合せを刺激する作用物質である。新規な組織の形成を増加させ、かつ／または注射の部位における天然組織の治癒または再成長を刺激する作用物質は、これらに限定されないが、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）、トランスフォーミング増殖因子ベータ（ＴＧＦ－β）、血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）、上皮増殖因子（ＥＧＦ）、結合組織活性化ペプチド（ＣＴＡＰ）、骨形態形成タンパク質を含めた骨原性因子、ヘパリン、アンジオテンシンＩＩ（Ａ－ＩＩ）およびその断片、インスリン様増殖因子、腫瘍壊死因子、インターロイキン、コロニー刺激因子、エリスロポエチン、神経増殖因子、インターフェロン、このような増殖因子の生物活性のある類似体、断片、および誘導体、ならびに任意のこれらの組合せを含むことができる。

【０３８６】

一部の実施形態では、絹組成物は、軟部組織増強のための少なくとも１種のさらなる材料、例えば、これらに限定されないが、ポリ（メタクリル酸メチル）マイクロ球体、ヒドロキシルアパタイト、ポリ（Ｌ－乳酸）、コラーゲン、エラスチン、およびグリコサミノグリカン、ヒアルロン酸、市販の皮膚充填剤製品、例えば、ＢＯＴＯＸ（登録商標）（Ａｌｌｅｒｇａｎから）、ＤＹＳＰＯＲＴ（登録商標）、ＣＯＳＭＯＤＥＲＭ（登録商標）、ＥＶＯＬＥＮＣＥ（登録商標）、ＲＡＤＩＥＳＳＥ（登録商標）、ＲＥＳＴＹＬＡＮＥ（登録商標）、ＪＵＶＥＤＥＲＭ（登録商標）（Ａｌｌｅｒｇａｎから）、ＳＣＵＬＰＴＲＡ（登録商標）、ＰＥＲＬＡＮＥ（登録商標）、およびＣＡＰＴＩＱＵＥ（登録商標）、ならびに任意のこれらの組合せを含めた皮膚充填剤材料をさらに含むことができる。

【０３８７】

一部の実施形態では、添加物は、創傷治癒剤である。本明細書において使用する場合、「創傷治癒剤」は、創傷治癒プロセスを活発に促進する化合物または組成物である。例示的な創傷治癒剤には、これらに限定されないが、デクスパンテノール；増殖因子；酵素、ホルモン；ポビドンヨード；脂肪酸；抗炎症剤；抗生物質；抗微生物剤；消毒剤；サイトカイン；トロンビン；鎮痛剤（angalgesics）；オピオイド；アミノキシル；フロキサン；ニトロソチオール；ニトレートおよびアントシアニン；ヌクレオシド、例えば、アデノシン；ヌクレオチド、例えば、アデノシン二リン酸（ＡＤＰ）およびアデノシン三リン酸（ＡＴＰ）；神経伝達物質（neutotransmitter）／神経調節物質、例えば、アセチルコリンおよび５－ヒドロキシトリプタミン（セロトニン／５－ＨＴ）；ヒスタミンおよびカテコールアミン、例えば、アドレナリンおよびノルアドレナリン；脂質分子、例えば、スフィンゴシン－１－リン酸およびリゾホスファチジン酸；アミノ酸、例えば、アルギニンおよびリシン；ペプチド、例えば、ブラジキニン、サブスタンスＰおよびカルシウム遺伝子関連ペプチド（ＣＧＲＰ）；一酸化窒素；ならびに任意のこれらの組合せが含まれる。

【０３８８】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている活性作用物質は、免疫原である。一実施形態では、免疫原は、ワクチンである。大部分のワクチンは、これが貯蔵および／または輸送される環境条件に対して感受性である。例えば、フリージングは、いくつかのワクチン（例えば、ＨｅｐＢ、およびＤＴａＰ／ＩＰＶ／ＨＩＢ）についての反応源性（例えば、免疫反応をもたらす性能）ならびに／または効力の喪失を増加させ、あるいは容器における毛髪状割れの原因となり、汚染をもたらし得る。さらに、いくつかのワクチン（例えば、ＢＣＧ、水痘、およびＭＭＲ）は、熱に対して感受性である。多くのワクチン（例えば、ＢＣＧ、ＭＭＲ、水痘、髄膜炎菌性Ｃコンジュゲート、および大部分のＤＴａＰ含有ワクチン）は、光感受性である。例えば、Galazkaら、Thermostability of vacc

ines、Global Programme for Vaccines & Immunization（World Health Organization、Geneva、１９９８年）；Peetermansら、Stability of freeze-dried rubella virus vaccine（Cendehill strain）at various temperatures、１、J. Biological Standardization、１７９頁（１９７３年）を参照されたい。このように、本明細書に記載されている組成物および方法はまた、コールドチェーンおよび／または他の環境条件にかかわらずワクチンの安定化を実現する。

【０３８９】

一部の実施形態では、添加物は、細胞、例えば、生体細胞である。組成物中への組込みに有用である細胞は、任意の源、例えば、哺乳動物、昆虫、植物などから由来することができる。一部の実施形態では、細胞は、ヒト、ラットまたはマウス細胞でよい。一般に、本明細書に記載されている組成物と共に使用される細胞は、任意のタイプの細胞でよい。一般に、細胞は、組成物内にカプセル化されたとき生存可能であるべきである。一部の実施形態では、組成物と共に使用することができる細胞には、これらに限定されないが、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞、霊長類細胞、哺乳動物細胞、げっ歯類細胞など）、トリ細胞、魚細胞、昆虫細胞、植物細胞、真菌細胞、細菌細胞、およびハイブリッド細胞が含まれる。一部の実施形態では、組成物と共に使用することができる例示的な細胞は、血小板、活性化血小板、幹細胞、全能性細胞、多能性細胞、および／または胚性幹細胞を含む。一部の実施形態では、組成物内にカプセル化することができる例示的な細胞には、これらに限定されないが、任意の組織からの初代細胞および／または細胞系が含まれる。例えば、心筋細胞、筋細胞、肝細胞、ケラチン生成細胞、メラニン形成細胞、ニューロン、アストロサイト、胚性幹細胞、成体幹細胞、造血幹細胞、造血細胞（例えば、単球、好中球、マクロファージなど）、エナメル芽細胞、線維芽細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、ニューロン、精子細胞、卵細胞、肝細胞、肺からの上皮細胞、腸からの上皮細胞、腸からの上皮細胞、肝臓、皮膚からの上皮細胞など、および／またはそのハイブリッドは、本明細書において開示されている絹／血小板組成物中に含まれることができる。本明細書において列挙される細胞は、細胞の網羅的ではない例示的なリストを表すことを当業者なら理解するであろう。細胞は、ドナー（同種異系）から、またはレシピエント（自系）から得ることができる。細胞は、非限定的例として、バイオプシーまたは当業者には公知の他の外科的手段によって得ることができる。

【０３９０】

一部の実施形態では、細胞は、遺伝子修飾された細胞でよい。細胞を遺伝子修飾して、所望の化合物、例えば、生理活性作用物質、増殖因子、分化因子、サイトカインなどを発現および分泌することができる。目的の化合物を発現および分泌するために細胞を遺伝子修飾する方法は、当技術分野において公知であり、当業者が容易に適応可能である。

【０３９１】

幹細胞中に再プログラムされた分化した細胞をまた使用することができる。例えば、Ｏｃｔ３／４、Ｓｏｘ２、ｃ－ＭｙｃおよびＫｌｆ４の形質導入によって胚性幹細胞中に再プログラムされたヒト皮膚細胞（Junying Yuら、Science、２００７年、３１８巻、１９１７～１９２０頁およびTakahashi K.ら、Cell、２００７年、１３１巻、１～１２頁）。

【０３９２】

一部の実施形態では、添加物は、絹フィブロイン粒子でよい。絹フィブロイン粒子およびこれらを作製する方法は、本明細書において上で説明している。

【０３９３】

一部の実施形態では、添加物は、絹をベースとする材料でよい。絹をベースとする材料は、絹繊維、マイクロサイズの絹繊維、処理されていない絹繊維、絹粒子、および任意のこれらの組合せからなる群から選択することができる。一部の実施形態では、添加物は、絹繊維である。絹繊維の使用は、例えば、その内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれている米国特許出願公開第ＵＳ２０１１００４６６８６号に記載されている。

【０３９４】

一部の実施形態では、絹繊維は、マイクロ繊維またはナノ繊維である。一部の実施形態では、添加物は、ミクロンサイズの絹繊維（１０～６００μｍ）である。ミクロンサイズの絹繊維は、精練された絹フィブロインを加水分解することによって、または精練プロセスの煮沸時間を増加させることによって得ることができる。ミクロンサイズの絹繊維を得るための絹フィブロインのアルカリ加水分解は、例えば、それらの全ての内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれているMandalら、PNAS、２０１２年、doi： １０．１０７３／pnas.１１１９４７４１０９；２０１２年４月６日に出願された米国特許仮出願第６１／６２１，２０９号；および２０１３年４月５日に出願されたＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ１３／３５３８９号に記載されている。ＨＦＩＰ絹溶液から作製された再生された絹繊維は機械的に強いため、再生された絹繊維はまた、添加物として使用することができる。

【０３９５】

一部の実施形態では、絹繊維は、処理されていない絹繊維、例えば、生絹または生絹繊維である。「生絹」または「生絹繊維」という用語は、セリシンを除去するように処置していない絹繊維を指し、したがって、例えば、繭から直接採取した絹繊維を包含する。このように、処理されていない絹繊維とは、絹糸腺から直接得られる絹フィブロインを意味する。絹糸腺から直接得た絹フィブロインが乾燥されるとき、その構造は固体状態で絹Ｉと称される。このように、処理されていない絹繊維は、大部分は絹Ｉ高次構造の絹フィブロインを含む。他方、再生または処理されている絹繊維は、十分な絹ＩＩまたはベータシート結晶化度を有する絹フィブロインを含む。

【０３９６】

一部の実施形態では、添加物は、生体適合性ポリマーである。例示的な生体適合性ポリマーには、これらに限定されないが、ポリ－乳酸（ＰＬＡ）、ポリ－グリコール酸（ＰＧＡ）、ポリ－ラクチド－ｃｏ－グリコリド（ＰＬＧＡ）、ポリエステル、ポリ（オルトエステル）、ポリ（ホスファジン）、ポリ（リン酸エステル）、ポリカプロラクトン、ゼラチン、コラーゲン、フィブロネクチン、ケラチン、ポリアスパラギン酸、アルギネート、キトサン、キチン、ヒアルロン酸、ペクチン、ポリヒドロキシアルカノエート、デキストラン、およびポリ無水物、ポリエチレンオキシド（ＰＥＯ）、ポリ（エチレングリコール）（ＰＥＧ）、トリブロックコポリマー、ポリリシン、アルギネート、ポリアスパラギン酸、任意のその誘導体および任意のこれらの組合せが含まれる。本開示による使用を受け入れられる他の例示的な生体適合性ポリマーは、例えば、それらの全ての内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれている米国特許第６，３０２，８４８号；同第６，３９５，７３４号；同第６，１２７，１４３号；同第５，２６３，９９２号；同第６，３７９，６９０号；同第５，０１５，４７６号；同第４，８０６，３５５号；同第６，３７２，２４４号；同第６，３１０，１８８号；同第５，０９３，４８９号；同第ＵＳ３８７，４１３号；同第６，３２５，８１０号；同第６，３３７，１９８号；同第ＵＳ６，２６７，７７６号；同第５，５７６，８８１号；同第６，２４５，５３７号；同第５，９０２，８００号；および同第５，２７０，４１９号に記載されているものを含む。本明細書において使用する場合、「生体適合性」という用語は、宿主において十分な免疫応答を引き出さない材料を指す。

【０３９７】

一部の実施形態では、生体適合性ポリマーは、ＰＥＧまたはＰＥＯである。本明細書において使用する場合、「ポリエチレングリコール」または「ＰＥＧ」という用語は、約２０～約２０００００００の連結モノマー、典型的には約５０～１０００の連結モノマー、通常約１００～３００を含有するエチレングリコールポリマーを意味する。ＰＥＧはまた、その分子量によってポリエチレンオキシド（ＰＥＯ）またはポリオキシエチレン（ＰＯＥ）として公知である。一般に、ＰＥＧ、ＰＥＯ、およびＰＯＥは化学的に同義であるが、歴史的にＰＥＧは、２０，０００ｇ／ｍｏｌ未満の分子量を有するオリゴマーおよびポリマーを、ＰＥＯは２０，０００ｇ／ｍｏｌ超の分子量を有するポリマーを、およびＰＯＥは任意の分子量のポリマーを指す傾向を有する。ＰＥＧおよびＰＥＯは、これらの分子量

によって液体または低融点の固体である。ＰＥＧは酸化エチレンの重合によって調製され、３００ｇ／ｍｏｌから１０，０００，０００ｇ／ｍｏｌの広範囲の分子量に亘って市販されている。異なる分子量を有するＰＥＧおよびＰＥＯは、異なる用途に使用され、鎖長効果によって異なる物理的性質（例えば、粘度）を有する一方、これらの化学的性質は殆ど同一である。重合過程のために使用される開始剤によって、異なる形態のＰＥＧがまた利用可能である。最も一般の開始剤は、単官能性メチルエーテルＰＥＧ、またはメトキシポリ（エチレングリコール）、省略されてｍＰＥＧである。より低分子量のＰＥＧはまた、単分散の均一なものと称されるより純粋なオリゴマーとして利用可能であるか、または別個のＰＥＧはまた、異なる幾可学的形状を伴って利用可能である。

【０３９８】

本明細書において使用する場合、ＰＥＧという用語は、包括的および非排他的であることを意図する。ＰＥＧという用語は、アルコキシＰＥＧ、二官能性ＰＥＧ、マルチアームのＰＥＧ、フォーク形ＰＥＧ、分岐ＰＥＧ、ペンダントＰＥＧ（すなわち、ＰＥＧ、もしくはポリマー骨格に対してペンダントである１つもしくは複数の官能基を有する関連するポリマー）、またはその中に分解可能な連結を有するＰＥＧを含めた、その形態のいずれかのポリ（エチレングリコール）を含む。さらに、ＰＥＧ骨格は、直鎖状または分岐状でよい。分岐ポリマー骨格は一般に、当技術分野において公知である。典型的には、分岐ポリマーは、中央分岐コア部分、および中央分岐コアに連結した複数の直鎖状ポリマー鎖を有する。ＰＥＧは、様々なポリオール、例えば、グリセロール、ペンタエリスリトールおよびソルビトールへの酸化エチレンの添加によって調製することができる分岐形態で一般に使用される。中央分岐部分はまた、いくつかのアミノ酸、例えば、リシンに由来することができる。分岐ポリ（エチレングリコール）は、一般形態でＲ（－ＰＥＧ－ＯＨ）ｍとして表すことができ、式中、Ｒは、コア部分、例えば、グリセロールまたはペンタエリスリトールを表し、ｍは、アームの数を表す。マルチアームのＰＥＧ分子、例えば、参照により本明細書中にその全体が組み込まれている米国特許第５，９３２，４６２号に記載されているものはまた、生体適合性ポリマーとして使用することができる。

【０３９９】

いくつかの例示的なＰＥＧには、これらに限定されないが、ＰＥＧ２０、ＰＥＧ３０、ＰＥＧ４０、ＰＥＧ６０、ＰＥＧ８０、ＰＥＧ１００、ＰＥＧ１１５、ＰＥＧ２００、ＰＥＧ　３００、ＰＥＧ４００、ＰＥＧ５００、ＰＥＧ６００、ＰＥＧ１０００、ＰＥＧ１５００、ＰＥＧ２０００、ＰＥＧ３３５０、ＰＥＧ４０００、ＰＥＧ４６００、ＰＥＧ５０００、ＰＥＧ６０００、ＰＥＧ８０００、ＰＥＧ１１０００、ＰＥＧ１２０００、ＰＥＧ１５０００、ＰＥＧ　２００００、ＰＥＧ２５００００、ＰＥＧ５０００００、ＰＥＧ１０００００、ＰＥＧ２０００００００などが含まれる。一部の実施形態では、ＰＥＧは、ＭＷ１０，０００ダルトンのものである。一部の実施形態では、ＰＥＧは、ＭＷ１００，０００のもの、すなわち、ＭＷ１００，０００のＰＥＯである。

【０４００】

一部の実施形態では、添加物は、絹フィブロインを加水分解する酵素である。理論に束縛されるものではないが、このような酵素を使用して、製造品の分解を調節することができる。

【０４０１】

一部の実施形態では、添加物は、可塑剤である。理論に束縛されるものではないが、可塑剤を含むことは、絹をベースとする物品、例えば、絹フィブロインフィルムの可撓性および／または溶解性に影響を与えることができる。一実施形態では、可塑剤は、グリセロールである。絹をベースとする材料、例えば、グリセロールを含む絹フィルムは、その内容の全体が参照により本明細書中に組み込まれているＷＯ２０１０／０４２７９８に記載されている。

【０４０２】

他の添加物の例には、これらに限定されないが、細胞付着メディエーター、例えば、コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、プロテオグリカ

ン、または細胞の付着に影響を与えることが公知である公知のインテグリン結合ドメイン、例えば、「ＲＧＤ」インテグリン結合配列、またはそのバリエーションを含有するペプチド（Schaffner P & Dard、Cell Mol Life Sci.、２００３年、６０巻（１号）：１１９～３２頁およびHersel U.ら、Biomaterials、２００３年、２４巻（２４号）：４３８５～４１５頁）；生物活性のあるリガンド；ならびに細胞内部成長または組織内部成長の特定の変種を増強または排除する物質が含まれる。

【０４０３】

一部の実施形態では、絹フィブロイン組成物からの活性作用物質の放出は、絹フィブロインおよび活性作用物質の間の相互作用を撹乱させることができる組成物に添加物を加えることによって調節することができる。したがって、一部の実施形態では、添加物は、タンパク質－活性作用物質相互作用を撹乱、阻害、または低減させる作用物質である。例えば、絹フィブロインは、正味の負電荷を有する。このように、正味の正電荷を有する活性作用物質は、イオン性／静電相互作用を通して絹フィブロインと相互作用することができ、組成物中に保持される。イオン性／静電相互作用を変化させることは、組成物からの因子の放出速度を変化させることができる。イオン性／静電相互作用を変化させる１つの方法は、組成物にカチオン性分子を加えることによってでよい。いくつかの他の作用物質は、疎水的相互作用によって絹フィブロインと相互作用することができる。理論に束縛されるものではないが、このような因子は、非イオン相互作用を撹乱、阻害、または低減させる添加物を使用して放出することができる。このように、一部の実施形態では、添加物は、界面活性剤でよい。本明細書において使用する場合、「界面活性剤」という用語は、天然または合成両親媒性化合物を指す。界面活性剤は、非イオン性、双性イオン性、またはイオン性でよい。界面活性剤の非限定的例には、ポリソルベート、例えば、ポリソルベート２０（ＴＷＥＥＮ（登録商標）２０）、ポリソルベート４０（ＴＷＥＥＮ（登録商標）４０）、ポリソルベート６０（ＴＷＥＥＮ（登録商標）６０）、ポリソルベート６１（ＴＷＥＥＮ（登録商標）６１）、ポリソルベート６５（ＴＷＥＥＮ（登録商標）６５）、ポリソルベート８０（ＴＷＥＥＮ（登録商標）８０）、およびポリソルベート８１（ＴＷＥＥＮ（登録商標）８１）；ポロキサマー（ポリエチレン－ポリプロピレンコポリマー）、例えば、ポロキサマー１２４（ＰＬＵＲＯＮＩＣ（登録商標）Ｌ４４）、ポロキサマー１８１（ＰＬＵＲＯＮＩＣ（登録商標）Ｌ６１）、ポロキサマー１８２（ＰＬＵＲＯＮＩＣ（登録商標）Ｌ６２）、ポロキサマー１８４（ＰＬＵＲＯＮＩＣ（登録商標）Ｌ６４）、ポロキサマー１８８（ＰＬＵＲＯＮＩＣ（登録商標）Ｆ６８）、ポロキサマー２３７（ＰＬＵＲＯＮＩＣ（登録商標）Ｆ８７）、ポロキサマー３３８（ＰＬＵＲＯＮＩＣ（登録商標）Ｌ１０８）、ポロキサマー４０７（ＰＬＵＲＯＮＩＣ（登録商標）Ｆ１２７）、ポリオキシエチレングリコールドデシルエーテル、例えば、ＢＲＩＪ（登録商標）３０、およびＢＲＩＪ（登録商標）３５；２－ドデコキシエタノール（ＬＵＢＲＯＬ（登録商標）－ＰＸ）；ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル（ＴＲＩＴＯＮ（登録商標）Ｘ－１００）；ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）；３－［（３－コールアミドプロピル）ジメチルアンモニオ］－１－プロパンスルホネート（ＣＨＡＰＳ）；３－［（３－コールアミドプロピル）ジメチルアンモニオ］－２－ヒドロキシ－１－プロパンスルホネート（ＣＨＡＰＳＯ）；モノラウリン酸スクロース；ならびにコール酸ナトリウムが含まれる。界面活性剤添加剤の他の非限定的例は、例えば、医薬品剤形および薬物送達システム（Howard C. Anselら編、Lippincott Williams & Wilkins Publishers、第７版、１９９９年）；Remington：The Science and Practice of Pharmacy（Alfonso R. Gennaro編、Lippincott, Williams & Wilkins、第２０版、２０００年）；Goodman & Gilman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics（Joel G. Hardmanら編、McGraw-Hill Professional、第１０版、２００１年）；およびHandbook of Pharmaceutical Excipients（Raymond C. Roweら、APhA Publications、第４版、２００３年）において見出すことができ、これらのそれぞれは参照により本明細書にその全体が組み込まれている。一部の実施形態では、界面活性剤は、カチオン性ポリマーである。一実施形態では、カチオン性ポリマーは、ポリリシン、例えば、ε－ポリ－Ｌ－リシンである。代わ

りの実施形態では、界面活性剤は、アニオン性ポリマーである。一実施形態では、アニオン性ポリマーは、ポリグルタミン酸、例えば、ポリ－Ｌ－グルタメートである。

【０４０４】

対象への投与のために、提供される絹フィブロイン組成物は、１種または複数の薬学的に許容される担体（添加物）および／または賦形剤と一緒に製剤化される、本明細書において開示されている絹フィブロイン組成物を含む薬学的に許容される組成物中に製剤化することができる。対象への投与のために、医薬組成物は一般に、単位剤形に製剤化することができる。さらに、医薬組成物は、下記のために適応されたものを含めて、固体または液体形態、例えば、錠剤、カプセル剤、散剤、溶液剤、懸濁剤、または乳剤での投与のために特に製剤化することができる。（１）局所適用、例えば、皮膚へ適用されるクリーム剤、軟膏剤、調節放出パッチ、またはスプレーとして；（２）例えば、皮下、筋内、静脈内、または硬膜外注射、例えば、無菌溶液剤もしくは懸濁剤、または持続放出製剤による非経口投与；（３）経口投与、例えば、水薬（水溶液または非水溶液または懸濁剤）、ロゼンジ剤、糖衣錠、カプセル剤、丸剤、錠剤（例えば、バッカル、舌下、および全身性吸収を標的としたもの）、ボーラス、散剤、顆粒剤、舌への適用のためのペースト剤；（４）例えば、ペッサリー、クリームまたは発泡体として腟内または直腸内；（５）舌下；（６）目；（７）経皮的；（８）経粘膜的；あるいは（９）経鼻。さらに、組成物は、患者にインプラントし、または薬物送達組成物を使用して注射することができる。例えば、Urquhartら、Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.、２４巻：１９９～２３６頁（１９８４年）；Lewis編「Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals」（Plenum Press、New York、１９８１年）；米国特許第３，７７３，９１９号；および米国特許第３５３，２７０，９６０号を参照されたい。

【０４０５】

本明細書で使用するように、「薬学的に許容される」という用語は、正しい医学的判断の範囲内で、過剰な毒性、刺激作用、アレルギー反応、または他の問題または合併症を伴わない、合理的な利益／リスク比と釣り合った、人間および動物の組織との接触において使用するのに適したこれらの化合物、材料、組成物、および／または剤形を指す。

【０４０６】

本明細書で使用するように、「薬学的に許容される担体」という用語は、薬学的に許容される材料、組成物またはビヒクル、例えば、液体または固体の充填剤、賦形剤、添加剤、製造助剤（例えば、滑沢剤、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウムまたはステアリン酸亜鉛、もしくはステアリン酸（steric acid））、または１つの器官、または体の一部分から、別の臓器、または体の一部分に対象化合物を運搬または輸送することに関与する溶媒封入材料を意味する。各担体は、製剤の他の成分と適合性であり、患者にとって傷害性でないという意味で「許容され」なくてはならない。薬学的に許容される担体としての役割を果たすことができる材料のいくつかの例には、（１）糖、例えば、ラクトース、グルコースおよびスクロース；（２）デンプン、例えば、トウモロコシデンプンおよびバレイショデンプン；（３）セルロース、およびその誘導体、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、エチルセルロース、微結晶性セルロースおよび酢酸セルロース；（４）トラガカント粉末；（５）麦芽；（６）ゼラチン；（７）滑沢剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウムおよびタルク；（８）添加剤、例えば、カカオバターおよび坐剤ワックス；（９）油、例えば、ピーナッツ油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油およびダイズ油；（１０）グリコール、例えば、プロピレングリコール；（１１）ポリオール、例えば、グリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコール（ＰＥＧ）；（１２）エステル、例えば、オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチル；（１３）寒天；（１４）緩衝剤、例えば、水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム；（１５）アルギン酸；（１６）発熱物質を含まない水；（１７）等張食塩水；（１８）リンゲル液；（１９）エチルアルコール；（２０）ｐＨ緩衝化溶液；（２１）ポリエステル、ポリカーボネートおよび／またはポリ無水物；（２２）増量剤、例えば、ポリペプチドおよびア

ミノ酸（２３）血清構成成分、例えば、血清アルブミン、ＨＤＬおよびＬＤＬ；（２２）Ｃ２～Ｃ１２アルコール（alchols）、例えば、エタノール；ならびに（２３）医薬製剤において用いられる他の無毒性の適合性物質が含まれる。湿潤剤、着色剤、離型剤、コーティング剤、甘味剤、香味剤、香料、保存剤および抗酸化剤はまた、製剤中に存在することができる。「添加剤」、「担体」、「薬学的に許容される担体」などの用語は、本明細書において互換的に使用される。

【０４０７】

薬学的に許容される抗酸化剤には、これらに限定されないが、（１）水溶性抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸、塩酸システイン、硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど；（２）油溶性抗酸化剤、例えば、パルミチン酸アスコルビル、ブチルヒドロキシアニソール（ＢＨＡ）、ブチルヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）、レシチン（lectithin）、没食子酸プロピル、アルファ－トコフェロールなど；および（３）金属キレート剤、例えば、クエン酸、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ソルビトール、酒石酸、リン酸などが含まれる。

【０４０８】

本明細書において使用する場合、「投与される」という用語は、所望の部位における医薬活性作用物質の少なくとも部分的局在化をもたらす方法または経路による、対象への薬物送達組成物の配置を指す。

【０４０９】

組成物は、対象における有効な処置をもたらす任意の適当な経路によって投与することができ、すなわち、投与によって対象における所望の場所への送達をもたらし、医薬活性作用物質の少なくとも一部分が送達される。例示的な投与方法には、これらに限定されないが、局所、インプラント、注射、注入、滴下注入、インプラント処置、または経口摂取が含まれる。「注射」には、これらに限定されないが、静脈内、筋内、動脈内、くも膜下腔内、脳室内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、脳脊髄内、および胸骨内の注射および注入が含まれる。

【０４１０】

注射用剤は、組成物が注射による投与に適したある特定の物理的基準に合致することを必要とする。例えば、このような製剤は、十分なレベルのいわゆるシリンジ通過性を必要とする。シリンジ通過性という用語は、手で行う注射のために必要な時間および力（または自動注射器を使用した注射のために必要とされる時間）を指すが、これは重要なパラメーターである。シリンジ通過性がエンドユーザーによる製品の操作性、したがってコンプライアンスに対して影響を与え得るためである。所定のゲージおよび長さの針を介した所与の注射速度において溶液の注射のために必要とされる力は、シリンジ通過性と称される（Burckbuchler, Vら、Eur. J.Pharm. Biopharm.、２０１０年、７６巻（３号）：３５１～３５６頁）。推進（または滑走）力を推定するためにハーゲン－ポアズイユ等式を利用することができ、これは、

Ｆ＝８ＱμＬ／πＲ４×Ａ（等式１）

として表すことができ、式中、Ｑ＝体積流量；μ＝流体粘度；Ｌ＝針の長さ；Ｒ＝針の内径；Ａ＝シリンジプランジャーの断面積；Ｆ＝無摩擦の推進力である。

【０４１１】

溶液の粘度は、タンパク質自体、タンパク質濃度、温度および配合、例えば、ｐＨ、添加剤のタイプおよび添加剤濃度によって決まる。タンパク質自体に加えて、タンパク質濃度は、粘度についての別の重要な要因である。皮下注射は一般に、概ね＜１．５ｍＬの注入量に制限される（例えば、Adler（２０１２年）Am. Pharmaceutical Rev.、１～９頁を参照されたい）。

【０４１２】

一部の実施形態では、本明細書において開示されている絹フィブロイン組成物は、対象においてインプラントすることができる。本明細書において使用する場合、「インプラントされた」という用語および文法的に関連する用語は、対象における特定のローカスにお

ける組成物の、一時的、半ば一時的、または持続的な位置付けを指す。この用語は、特定の位置または場所における組成物の持続的固定化を必要としない。例示的なｉｎ　ｖｉｖｏでのローカスには、これらに限定されないが、創傷、外傷または疾患の部位が含まれる。

【０４１３】

対象への投与のために、絹フィブロイン組成物は一般に、単位投与量の注射用形態で製剤化することができる。注射に適した組成物および調製物は、無菌水溶液または分散液を含む。担体は、例えば、水、細胞培養培地、緩衝液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、適切なこれらの混合物を含有する溶媒または分散媒質でよい。一部の実施形態では、医薬担体は、緩衝化溶液（例えば、ＰＢＳ）でよい。

【０４１４】

一部の実施形態では、医薬組成物は、送達デバイス、例えば、シリンジで投与することができる。したがって、本明細書に記載されているさらなる態様は、放出口を有する少なくとも１つのチャンバーを含む送達デバイスを提供し、少なくとも１つのチャンバーは、所定の量の本明細書に記載されている任意の組成物を含み、放出口は、チャンバー内に封入される組成物のための出口を提供する。一部の実施形態では、本明細書に記載されている送達デバイスは、放出口を通る組成物の放出を調節するアクチュエータをさらに含むことができる。このような送達デバイスは、対象への本明細書に記載されている任意の組成物の投与を促進する任意のデバイス、例えば、シリンジ、乾燥粉末注射器、鼻用スプレー、ネブライザー、またはインプラント、例えば、本明細書に記載されている任意の組成物の持続放出または調節放出のためのマイクロチップでよい。

キット

【０４１５】

本明細書に記載されている組成物および方法において用いることができる試料収集デバイスおよびキットをまた提供する。したがって、本明細書において提供する別の態様は、試料、例えば、生体試料または活性作用物質を集めるためのチャンバーを含む試料収集デバイスであり、チャンバーは、絹フィブロイン組成物を含む。生体試料または活性作用物質と絹フィブロイン溶液とを接触させることによって、生体試料の少なくとも１種の構成成分の少なくとも１つの性質、または活性作用物質の生物活性は、ある時間安定化させることができる。一部の実施形態では、チャンバー中に存在する絹フィブロイン組成物は、溶液、粉末、懸濁液、またはゲルの形態で存在することができる。

【０４１６】

任意の試料、例えば、当技術分野において公知の生体試料収集デバイスを、本明細書において適用することができる。デバイスの非限定的例は、生体学的検体収集チューブ（例えば、採血管）、バイアル、シリンジ、遠心分離管、マイクロタイタープレート、ディップスティック、生体学的検体収集バッグ、スポンジ、および任意のこれらの組合せを含むことができる。一実施形態では、デバイスは、採血管またはバッグでよい。

【０４１７】

一部の実施形態では、デバイスのチャンバーは、本明細書に記載のような添加物をさらに含むことができる。一部の実施形態では、デバイスのチャンバーは、抗凝固剤、安定剤、ゲル化誘導剤、プロテアーゼまたは消化酵素、または任意のこれらの組合せをさらに含むことができる。生体試料の標的構成成分の安定化をさらに増強するために使用することができる安定剤には、これらに限定されないが、サッカリド、糖アルコール、イオン、界面活性剤、アミノ酸、ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ゼラチン、およびゼラチン誘導体、抗酸化剤、本明細書に記載されている任意の安定剤、または任意のこれらの組合せが含まれてもよい。一部の実施形態では、安定剤は、ヌクレアーゼ阻害剤またはプロテイナーゼ阻害剤でよい。ＲＮＡを生体試料から検出する一部の実施形態では、安定剤は、ＲＮアーゼ阻害剤および／またはＤＥＰＣを含むことができる。

【０４１８】

ゲル化誘導剤は、絹フィブロインのゲル化を誘導し、絹をベースとする材料、例えば、その内容が参照により本明細書中に組み込まれている国際出願第ＷＯ／２０１２／０３１１４４号に開示されている機能的に活性化されたＰＥＧを形成することができる任意の作用物質でよい。例えば、一実施形態では、チャンバーは、国際出願第ＷＯ／２０１２／０３１１４４号に開示されているような第１の機能的に活性化されたＰＥＧ構成成分をさらに含むことができる。この実施形態では、生体試料収集デバイスは、第１の機能的に活性化されたＰＥＧ構成成分と反応して固体状態の絹をベースとする材料を形成することができる第２の機能的に活性化されたＰＥＧ構成成分を含むさらなるチャンバーをさらに含むことができる。

【０４１９】

デバイスが採血管である一部の実施形態では、チャンバーは、例えば、これらに限定されないが、クロットアクチベーター、ナトリウムヘパリン、リチウムヘパリン、トロンビンをベースとするクロットアクチベーター、$K_2$ＥＤＴＡ、液体$K_3$ＥＤＴＡ、$Na_2$ＥＤＴＡ、シュウ酸カリウム、フッ化ナトリウム、ナトリウムポリアネトールスルホネート（ＳＰＳ）、クエン酸デキストロース添加物（ＡＣＤ）（クエン酸三ナトリウムおよびクエン酸を含む）、クエン酸ナトリウム、シトレート、テオフィリン、アデノシン、ジピリダモールを含む混合物（ＣＴＡＤ）、または任意のこれらの組合せを含めた、従来の採血管において一般に見出される少なくとも１種の添加物をさらに含むことができる。

【０４２０】

本明細書に記載されている生体試料収集デバイスの１つまたは複数の実施形態を含むキットをまた提供する。一部の実施形態では、キットは、例えば、国際出願第ＷＯ／２０１２／０３１１４４号に開示されている機能的に活性化されたＰＥＧ構成成分を含むゲル化誘導剤、ｐＨ低減剤（例えば、酸）、またはこれらの組合せを含有する少なくとも１つの容器をさらに含むことができる。

【０４２１】

一部の実施形態では、キットは、絹可溶化剤を含有する容器をさらに含むことができる。絹可溶化剤の例は、水、緩衝化溶液、またはこれらの組合せを含むことができる。検出する標的構成成分がタンパク質またはペプチドではない一部の実施形態では、絹可溶化剤は、絹フィブロインを分解させるプロテイナーゼを含むことができる。

【０４２２】

一部の実施形態では、キットは、安定剤を含有する容器をさらに含むことができ、安定剤は、生体試料の少なくとも１つの構成成分を安定化する。例えば、安定剤には、これらに限定されないが、サッカリド、糖アルコール、イオン、界面活性剤、アミノ酸、ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ゼラチン、およびゼラチン誘導体、抗酸化剤、本明細書に記載されている任意の安定剤または任意のこれらの組合せが含まれることができる。一実施形態では、安定剤は、ヌクレアーゼ阻害剤またはプロテイナーゼ阻害剤でよい。ＲＮＡが生体試料から検出される一実施形態では、安定剤は、ＲＮアーゼ阻害剤を含むことができる。

【０４２３】

一部の実施形態では、キットは、生体試料の前記少なくとも１種の構成成分を検出するための作用物質を含有する容器をさらに含むことができる。キットの目的、例えば、ジェノタイピングまたは発現分析によって、当業者は分析を行うための適当な作用物質を決定することができる。ほんの一例として、作用物質は、構成成分精製剤（例えば、非標的構成成分、例えば、ゲノムＤＮＡから標的構成成分、例えば、ＲＮＡを精製する；または生体試料からタンパク質を抽出する作用物質）；核酸増幅剤（例えば、これらに限定されないが、プライマー、ポリメラーゼ、オリゴヌクレオチド）；免疫親和性をベースとする検出剤（例えば、これらに限定されないが、一次および／または二次抗体、ならびにアプタマー）、標識剤（例えば、蛍光染料、比色分析酵素－基質反応のための作用物質、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）およびそれぞれの色素生産性基質（例えば、ＴＭＢ、ＤＡＢ、ＡＢＴＳ））、あるいは任意のこれらの組合せを含むことができる。

【０４２４】
本明細書に記載されている組成物の一部の実施形態では、絹フィブロインを修飾して、例えば、放出が、数時間から数日、または数カ月の範囲のある時間に亘って起こるように、活性作用物質のその分解、したがって放出を調節することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載されている組成物は、当業者が利用可能であり公知である他のタイプの送達系と組み合わせることができる。これらは、例えば、ポリマーをベースとする系、例えば、ポリ乳酸および／またはポリグリコール酸、ポリ無水物、ポリカプロラクトン、コポリオキサレート、ポリエステルアミド、ポリオルトエステル、ポリヒドロキシ酪酸、および／またはこれらの組合せを含む。薬物を含有する上記のポリマーのマイクロカプセルは、例えば、米国特許第５，０７５，１０９号に記載されている。他の例は、ステロール、例えば、コレステロール、コレステロールエステル、および脂肪酸またはノイカ１脂肪（neuka1 fats）、例えば、モノ、ジおよびトリグリセリド；ヒドロゲル放出系；リポソームをベースとする系；リン脂質をベースとする系；ｓｉｌａｓｔｉｃ系；ペプチドをベースとする系；または部分的に融合したインプラントを含めた脂質ベースである非ポリマー系を含む。特定の例には、これらに限定されないが、組成物がマトリックス内の形態中に含有されている侵食系（例えば、米国特許第４，４５２，７７５号、同第４，６７５，１８９号、同第５，７３６，１５２号、同第４，６６７，０１４号、同第４，７４８，０３４号および同第２９５，２３９，６６０号に記載されているような）、または活性構成成分が放出速度を調節する拡散系（例えば、米国特許第３，８３２，２５３号、同第３，８５４，４８０号、同第５，１３３，９７４号および同第５，４０７，６８６号に記載されているような）が含まれる。製剤は、例えば、マイクロ球体、ヒドロゲル、ポリマーレザバー、コレステロールマトリックス、またはポリマー系としてでよい。一部の実施形態では、系は、例えば、組成物を含有する製剤の拡散または侵食／分解速度の調節によって、組成物の持続放出または調節放出が起こることを可能にし得る。さらに、ポンプをベースとするハードウェア送達系を使用して、本明細書に記載されている組成物または調製物の１つまたは複数の実施形態を送達することができる。長期間持続放出製剤またはインプラントの使用は、慢性的な状態、例えば、糖尿病の処置に特に適していてもよい。長期間放出は、本明細書において使用する場合、製剤またはインプラントが、本明細書に記載されている組成物または調製物を治療レベルで少なくとも３０日間、または少なくとも６０日間送達するように作製および配置されることを意味する。一部の実施形態では、長期間放出とは、活性作用物質を治療レベルで数カ月に亘り送達するように構成された製剤またはインプラントを指す。

【０４２５】
ある特定の例示的な用途
本明細書に記載されている様々な態様の実施形態によると、絹フィブロインおよび生体試料を含む絹をベースとする材料を形成することは、生体試料の少なくとも１種の構成成分を安定化することができ、これは後の時間における構成成分の検出および／または分析を可能とする。一部の実施形態では、生体試料を含むこれらの絹をベースとする材料は、冷蔵またはフリージングを必要とすることなく貯蔵および／または輸送することができ、これはヒトの健康の診断的評価のために試料の質を維持／保持するために生体試料を現在貯蔵および取り扱う典型的な方法である。したがって、一部の実施形態では、絹をベースとする材料および本明細書に記載されている方法は、診断用途において有用でよい。例えば、生体試料の少なくとも１種の構成成分を診断用途のためにアッセイすることができるように、絹をベースとする材料および方法を使用して、貯蔵および／または輸送の間に、あるいはいつくかの開発途上国において、または連続的な低温貯蔵をサポートする最低限のインフラが存在しない遠隔フィールド条件において、生体試料の質を維持および／または保持することができる。一部の実施形態では、絹をベースとする材料および本明細書に記載されている方法を使用して、従前に記載した下記の条件、すなわち、（ａ）貯蔵および／または輸送の間に０℃超の温度（例えば、少なくとも約室温またはそれ超）；（ｂ）貯蔵および／または輸送の間の光（例えば、ＵＶ光、赤外光、および／または可視光）へ

の曝露；ならびに（ｃ）貯蔵および／または輸送の間の少なくとも約１０％もしくはそれ超の相対湿度、の少なくとも１つまたは任意の組合せの下で、生体試料の質を維持および／または保持することができる。

【０４２６】

したがって、本明細書において提供するさらに別の態様は、本明細書に記載されている絹をベースとする材料を使用する方法に関する。方法は、（ａ）絹フィブロインを含む絹をベースとする材料、および生体試料の１つまたは複数の実施形態を提供するステップと、（ｂ）生体試料の少なくとも１種の構成成分を少なくとも１つの分析に供するステップとを含む。

【０４２７】

一部の実施形態では、絹をベースとする材料は、生体試料と絹フィブロインとを接触させることによって形成することができる。絹をベースとする材料を形成する方法を本明細書に記載する。一部の実施形態では、絹をベースとする材料は、液体状態でよい。他の実施形態では、絹をベースとする材料は、溶解可能な固体状態の材料（例えば、これらに限定されないが、溶解可能な絹をベースとするフィルム、または発泡体）でよい。一部の実施形態では、疾患または障害の診断を必要としている対象または患者は、生体試料を提供し、生体試料と絹フィブロインとを接触させ、絹をベースとする材料を形成することができ、次いでこれを分析のために診断試験実験室に送る。一部の実施形態では、生体試料は、臨床現場において熟練した専門家が対象から集めることができ、次いで、生体試料を絹フィブロインと接触させ、絹をベースとする材料を形成し、分析のために診断試験実験室に送る。

【０４２８】

一部の実施形態では、生体試料の少なくとも１つの構成成分は、生体試料から構成成分を単離することなく、検出および／または分析することができる一方で、代わりの実施形態では、構成成分は、検出および／または分析の前に、当技術分野において公知の任意の方法を使用して、絹をベースとする材料の少なくとも一部分から抽出または回収することができる。本明細書に記載されている絹をベースとする材料の一部の実施形態によると、絹をベースとする材料は、水溶液（例えば、水、緩衝化溶液、またはこれらの組合せ）中にて可溶性でよい。セルロースをベースとする技術、例えば、血液が濾紙上に吸収され、その後回収されることが困難である乾燥血液スポットとは異なり、本明細書に記載されている溶解可能な絹をベースとする材料の少なくとも一部分は、水溶液（例えば、水、緩衝化溶液、またはこれらの組合せ）に可溶化することができる。次いで、最終の絹／生体試料溶液は、さらなる精製を伴わずに、通例の液体アッセイ、例えば、実施例において記載されているようなＥＬＩＳＡおよびＬｕｍｉｎｅｘ（商標）アッセイを受け入れることができる。したがって、一部の実施形態では、方法は、生体試料の前記少なくとも１種の構成成分を少なくとも１つの分析に供する前に、絹をベースとする材料の少なくとも一部分と水溶液（例えば、水、緩衝化溶液、またはこれらの組合せ）とを接触させることをさらに含むことができる。

【０４２９】

様々なタイプの分析は、例えば、作用物質／構成成分の本質によって、生体試料の活性作用物質／標的構成成分上で行うことができる。分析の非限定的例は、これらに限定されないが、ジェノタイピング、核酸配列決定、発現分析（例えば、タンパク質レベル、または転写物レベル）、結合親和性、酵素活性、トランスフェクション効率性、細胞計数、細胞同定、細胞生存率、免疫原性、感染性、代謝物プロファイリング、および任意のこれらの組合せを含むことができる。一部の実施形態では、生体試料の少なくとも１種の構成成分は、少なくとも１つのジェノタイピングまたは核酸配列決定分析、発現分析（例えば、タンパク質レベルおよび／もしくは転写物レベル）、代謝物プロファイリング、または任意のこれらの組合せに供することができる。これらの分析を行う様々な方法には、これらに限定されないが、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、リアルタイム定量的ＰＣＲ、マイクロアレイ、ウエスタンブロット、免疫組織化学分析、酵素結合吸収度アッセイ（ＥＬＩ

ＳＡ）、質量分析法、核酸配列決定、フローサイトメトリー、ガスクロマトグラフィー、高性能液体クロマトグラフィー、核磁気共鳴（ＮＭＲ）分光法、または任意のこれらの組合せが含まれてもよい。核酸配列決定のための技術は当技術分野において公知であり、構成成分をアッセイし、核酸または遺伝子発現測定、例えば、これらに限定されないが、ＤＮＡ配列決定、ＲＮＡ配列決定、デノボ配列決定、次世代配列決定、例えば、大規模並列シグネチャー配列決定（ＭＰＳＳ）、ポロニー配列決定、ピロシーケンス、Ｉｌｌｕｍｉｎａ（Ｓｏｌｅｘａ）配列決定、ＳＯＬｉＤ配列決定、イオン半導体配列決定、ＤＮＡナノボール配列決定、Ｈｅｌｉｓｃｏｐｅ単一分子配列決定、単一分子リアルタイム（ＳＭＲＴ）配列決定）、ナノポアＤＮＡ配列決定、ハイブリダイゼーションによる配列決定、質量分析法による配列決定、マイクロフルイディックサンガー配列決定、顕微鏡観察をベースとする配列決定法、ＲＮＡポリメラーゼ（ＲＮＡＰ）配列決定、または任意のこれらの組合せを決定するために使用することができる。

【０４３０】

一部の実施形態では、少なくとも１つの分析を、読出し機器またはシステムとインターフェースをとることができるフォーマットで行うことができる。一部の実施形態では、少なくとも１つの分析は、システム上で行うことができる。

【０４３１】

一部の実施形態では、分析、または絹をベースとする材料と水溶液との接触の前に、絹をベースとする材料はより小さなポーションに縮小または分注することができ、例えば、これらのいくつかは後の分析のためにとっておくことができ、かつ／または異なる標的構成成分（例えば、タンパク質、核酸、および／もしくは代謝物）について分析することができる。絹をベースとする材料は、重量によって、または容量によってより小さな部分に分注することができる。

【実施例】

【０４３２】

以下の実施例は、本発明の一部の実施形態および態様を例示する。本発明の趣旨および範囲を変更することなく、様々な改変、付加、置換などを行うことができ、そうした改変および変更が、以下の特許請求の範囲において定義されるような本発明の範囲内に包含されることは、当業者に明らかであろう。以下の実施例は本発明を限定するものではまったくない。

【０４３３】

（実施例１）

絹フィブロインを含む組成物および特徴付けをもたらすために使用される例示的な材料および方法

絹フィブロイン溶液。カイコＢｏｍｂｙｘ　ｍｏｒｉの繭を、Sofia Sら（２００１年）Journal of Biomedical Materials Research、５４巻、１３９～１４８頁に記載されているような修正抽出工程により精練した。低分子量絹フィブロインの組成物を作製するための例示的なプロトコールを本明細書で示す。

－　繭を切断し、繭の内部から蛹、蛹の皮膚およびその他の汚れを除去する；

－　約６０分間またはそれ超の精練時間を使用して約０．０２Ｍの沸騰炭酸ナトリウム（$Na_2CO_3$）溶液中で繭ピースを精練する；

－　水（例えば、Ｍｉｌｌｉ－Ｑ　ｗａｔｅｒ）中で、精練された絹フィブロインを、毎回少なくとも３０分間、少なくとも３回濯ぐ。

－　濯いだ絹フィブロインを空気乾燥する。

－　絹フィブロインを、６０℃で９．３Ｍ臭化リチウム溶液（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ、ＭＯ、ＵＳＡ、ＲｅａｇｅｎｔＰｌｕｓ＞９９％）に溶解し、例えば、Ｓｌｉｄｅ－ａ－Ｌｙｚｅｒ透析カセット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、ＩＬ、ＵＳＡ、ＭＷＣＯ　３，５００）を用いて、定期的に、例えば6時間毎に水を取り替えながら約2日間、水（例えば、Ｍｉｌｌｉ－Ｑ　ｗａｔｅｒ）に対して透析させる。

－　得られた絹水溶液を、毎回約１１，０００ｒｐｍで２０分間、２回遠心分離する。

－　得られた低分子量絹フィブロイン水溶液は７％ｗｔ／ｖｏｌ～９％ｗｔ／ｖｏｌの間の絹フィブロインの濃度を有する。この時点までで、この絹フィブロイン溶液を精製したままの溶液と称する。この精製したままの絹フィブロイン溶液をさらにオートクレーブ処理ステップに供することができる。そこで、この絹フィブロイン溶液をオートクレーブ処理した溶液と称する。
－　絹フィブロイン溶液を４℃で保存する。
【０４３４】
固体状態の絹フィブロインの調製。図１に概要を示したように、精製したままの絹フィブロイン溶液またはオートクレーブ処理した絹フィブロイン溶液を、凍結ステップ、および一次乾燥ステップまたは一次乾燥ステップと二次乾燥ステップの組合せに供する。凍結ステップについては、絹フィブロイン溶液を大気圧下、室温～－４０℃で、０．８℃／ｍｉｎの速度で凍結させ、－４０℃で４８０分間保持する。一次乾燥については、絹フィブロイン溶液を、１００ｍｔｏｒｒ、－４０℃～－２０℃で、０．２℃／ｍｉｎのランプ速度で乾燥し、－２０℃で２４００分間保持する。二次乾燥については、絹フィブロイン溶液を、１００ｍｔｏｒｒ、－２０℃～４℃で、０．２℃／ｍｉｎのランプ速度で乾燥し、４℃で６２０分間保持する。凍結ステップおよび一次乾燥ステップの終わりに形成された絹フィブロイン発泡体を、一次乾燥だけ（Ｐｒｉｍａｒｙ　Ｄｒｙ　Ｏｎｌｙ）の発泡体（Ｐ）と称する。凍結ステップならびに一次乾燥および二次乾燥ステップの終わりに形成された絹フィブロイン発泡体を、一次＋二次乾燥発泡体（Ｐ＋Ｓ）と称する。絹発泡体を４℃、２２℃または３７℃で保存する。次いで絹フィブロイン溶液を、図１のフローダイヤグラムにしたがって絹発泡体を溶解することによって作製することができる。
【０４３５】
特徴付け。ゲル電気泳動法を、異なる温度保存条件および煮沸時間のもとで絹発泡体から作製された絹フィブロイン溶液の分子量分布を決定するために使用する。図２は、分子量分布を定量化するために使用した方法を示す。フィブロイン分子の電気泳動移動度を、ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）法を使用して決定した。目的の各条件について、０．１５％（１．５ｍｇ／ｍＬ）絹フィブロイン溶液を、３～８％トリスアセテートゲル（ＮｕＰＡＧＥ、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ）にロードする。ゲルを基準としての高分子量ラダー（Ｍａｒｋ１２タンパク質標準品、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で実行し、コロイダルブルー染色キット（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で染色した。絹溶液の分子量分布を、ゲルを画像化し、ピクセル密度分析を実施し、１つのピーク強度値についてすべてのレーンにわたって正規化することによって決定した（ＩｍａｇｅＪ、ＮＩＨ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ）。基準フレームとして使用される分子量ラダーを含む矩形のブラケットを、各レーンに適用した。ブラケットを、スメアの出発点のすぐ上に置き、２１．５ｋＤａマーカーのポイントで、底部でのタンパク質スメアのバウンドを超えて拡げた。
【０４３６】
ＩｍａｇｅＪソフトウェアは、矩形部を水平に横断してピクセル強度を自動的に平均化し、次いで、スメアの長さ方向に下ってこの平均をプロットする（スメアの頂部＝左、スメアの底部＝右）。以下の通りにして、ラダー位置を使用してブラケットを作製する：
１）２００ｋＤａ超（スメア頂部から２００ｋＤａのラダー位置まで）
２）２００ｋＤａ～１１６ｋＤａ
３）１１６ｋＤａ～６６．３ｋＤａ
４）６６．３ｋＤａ～３６．５ｋＤａ（分解可能な最小の分子量位置）
【０４３７】
それぞれの分子量ブラケットにおけるパーセンテージでの分子量分布を定義するために、各ブラケット内の曲線下面積（最小バックグラウンド閾値より上）を、スメアバウンドの頂部と底部の間の全面積に対して正規化する。次いで、分子量の変化を半定量化するために、ブラケットで囲まれた範囲を、異なる煮沸時間により作製された試料にわたってプ

ロットする。例えば、図２Ｂにおいて、２００ｋＤａ超の分子量を有する絹フィブロインのパーセンテージは次式：

【数１】

$$200kDa超の分子量\% = \frac{面積1}{面積(1+2+3+4)} \times 100$$

を使用して計算することができる。

【０４３８】

図３、図４および図５は、それぞれ４℃、２２℃および３７℃で保存した絹発泡体から得られた絹フィブロイン溶液の分子量分布を示す。各保存温度について２種類の絹発泡体、すなわち：一次乾燥による絹発泡体、および一次乾燥と二次乾燥の両方による絹発泡体を使用した。試験したすべての絹発泡体試料について、２００ｋＤａまたはそれ超の分子量を有する絹フィブロインのパーセンテージは、精練時間が増大するにしたがって低下する。一方、１２０ｋＤａ以下の分子量を有する絹フィブロインのパーセンテージは、精練時間が増大するにしたがって増大する。長い精練時間（６０分間またはそれ超）の結果として、本明細書で説明する低分子量絹フィブロインは：その集団中の絹フィブロイン断片の全数（または全モル数）または全重量の１５％以下が２００ｋＤａを超える分子量を有し、集団中の絹フィブロイン断片の総数（または全モル数）または全重量の少なくとも５０％が指定された範囲の分子量を有し、ここでその指定された範囲が約３．５ｋＤａ～約１２０ｋＤａの間または約５ｋＤａ～約１２５ｋＤａの間であることに特徴付けられる、分子量の範囲を有する絹フィブロイン断片の集団を含む。

【０４３９】

図１に示した凍結乾燥システムからの粉砕した絹粉末の溶解度差を比較するために、ｉ）煮沸時間、およびｉｉ）図１の可溶化比の表にしたがった粉末ローディングの質量を変えながら、試験を実施した。溶液の絹濃度を重量／体積％の単位で直接測定するために、フィルムを各回収溶液からキャストした。乾燥と計量が完了したら、次いで絹を水に不溶性にするまたは下流での固化技術の有用性を阻害する、架橋した立体配座状態がまったく存在しないことを確認するために、フィルムを、ＦＴＩＲを使用して二次構造について測定した。架橋した水不溶性の構造を形成するそれらの能力を実証するために、これらの固体フィルムをメタノールで処理した。回収された溶液の測定濃度を、初期絹粉末ローディング質量でグループ化して以下の図６に示す。参考のため、「精製したままの」絹系と「オートクレーブ処理した」絹系の両方の分子量分布も図６に含める。

【０４４０】

図６の作製フィルムを、構造を確認するためにＪａｓｃｏ　ＦＴＩＲ装置で評価した。図７で示すように、アミドＩおよびＩＩの領域は、キャストされたままのフィルムについて、およそ１６５０ｃｍ$^{-1}$および１５２５ｃｍ$^{-1}$を中心とした特性ピークを示しており、これは、ほぼ非晶質の「絹Ｉ」高次構造（すなわち、架橋していない）を示唆している。しかし、これらのフィルムを９０％ｖ／ｖのメタノールで１時間処理した後、アミドＩ領域は右へシフトし、１７００ｃｍ$^{-1}$で小さい肩を含んでいるが、アミドＩＩは１５３５ｃｍ$^{-1}$で、より幅広い肩へシフトしている。これらのメタノール誘発の変化は、「絹ＩＩ」確認の特徴を示すβ－シート構造の形成に起因している。

【０４４１】

６カ月間の発泡体安定性。実験を、種々の温度条件で６カ月間保存した後、変動する煮沸時間の凍結乾燥絹を粉砕することによって形成された絹粉末の溶解度を比較するために行った。図８は、一次乾燥だけを使用して形成された発泡体からの結果を示し、図９は、一次および二次乾燥を使用して形成された発泡体を示す。

【０４４２】

６カ月間のフィルム安定性。実験を、図１０で示すような種々の温度条件で６カ月間保存した後、厚肉絹フィルムと薄肉絹フィルムの溶解度を比較するために行った。

【０４４３】
（実施例２）
絹－血液試料からの血液回収
材料および方法。新鮮なドナー血液（バキュテナーチューブ（Ｖａｃｕｔａｉｎｅｒ ｔｕｂｅ）、Ｎａ－ヘパリン抗凝血剤、Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｂｌｏｏｄ Ｃｏｍｐｏｎｅｎｔｓ、Ｂｒｉｇｈｔｏｎ、ＭＡ）を、採血して１時間以内に単一のドナーから受け取った。次いで、血漿を単離するために、チューブを直ちに１０００×ｇで遠心分離した。次いで血漿アリコートを直ちに凍結して陽性対照として供した。絹溶液を、上記したようにして、カイコＢｏｍｂｙｘ ｍｏｒｉの繭から調製した。繭を、０．０２Ｍ $Na_2CO_3$ の溶液中で煮沸することによって、１０、２０、３０または６０分間精練した。絹フィルムをポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）表面上にキャストした。そこでは、１００μＬの血液または血漿を１．９ｍＬの絹溶液（煮沸時間に関係なく水中に約８ｗｔ％）と混合し、次いで、２ｍＬを、厚肉フィルム（３×２．５ｃｍ直径キャスティング表面）かまたは薄肉フィルム（３×表面上に７．５ｃｍ直径キャスティング）としてキャストした。フィルムを終夜（８ｈｒ）乾燥した後、分析用に試料を４０ｍｇクーポンに切断する。予備的な実験では、１０ｍｇおよび４０ｍｇのクーポンを、そのポイントで４０ｍｇが回収試験に適していると確認されている（データは示していない）標準曲線内に、分析に必要な質量ローディングを調整するため、ＥＬＩＳＡ読み取り用に血漿および血液フィルムから調製した。フィルムを希釈剤としての９６０μＬのＰＢＳに加え、５秒間渦巻き混合し、次いで、利用できる上清を使用して直ちにアッセイした。すべてのＥＬＩＳＡ（表１でａｂＣＡＭまたはＲ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ）について、凍結血漿アリコートを製造業者の推奨にしたがって（１：１００～１：８０００）希釈し、溶解した血液および血漿フィルムを、回収率の理論推定値をもとにして４０×小さい希釈率で試験した。
【表１】

**表** 1. ELISA **マーカー、タンパク質特性および検出限界**

| ELISA **キット** | **タンパク質** | **分子量** | ELISA **標準品** (pg/mL) | **組織サブタイプ/疾患** |
|---|---|---|---|---|
| Ab108841, Abcam | **フィブリノゲン** | 340kDa | 1,250-80,000 | **炎症、循環器疾患** (CVD) |
| DCRP00, R&D | **C 反応性タンパク質**(CRP) | 118-144kDa | 78,100-500,000 | CVD、**糖尿病** |

【０４４４】
血漿および血液の回収率の計算。血液および血漿クーポンから回収されたタンパク質の値を、ドナーに適合させた血漿において見られる濃度に正確に変換し、それによって回収効率を決定するために、血液および血漿のいくつかの物理学的測定を行った。血液または血漿のｗｔ／ｖｏｌ割合（ｗｔ％）（すなわち、単位体積［ｍＬ］当たりの血液または血漿固体［ｇ］）を、既知の体積の全血または血漿をドラフト中で２４ｈｒ乾燥し、残留質量を測定することによって決定した。次いで、血液の体積当たりの血漿固体の重量割合を、血液の血漿体積を５５％と仮定することによって推定した。各フィルムの重量当たりの血漿固体を、どの１００μＬの血液キャスティング溶液においても約２０ｍｇの全血（表２の値による）および１４４ｍｇの絹が含まれており、血漿キャスティング溶液についても同じであるという知見によって計算した。

【数２】

$$\text{血液中の血漿固形分の重量割合}\left[\frac{g}{mL}\right] = \text{血漿重量割合}\left[\frac{g}{mL}\right] \times 0.55 \left[\frac{\text{血漿体積}(mL)}{\text{全血液体積}(mL)}\right]$$

$$\text{血液フィルムの重量当たりの血漿固形分}\left[\frac{g}{g}\right] = \frac{\text{血液中の血漿固形分の重量割合}\left[\frac{g}{mL}\right] \times 0.1mL\ \text{血液}}{\left(\text{血液重量割合}\left[\frac{g}{mL}\right] \times 0.1mL\ \text{血液}\right) + \left(\text{絹質量割合}\left[\frac{g}{mL}\right] \times 1.9mL\ \text{絹}\right)}$$

$$\text{血漿フィルムの重量当たりの血漿固形分}\left[\frac{g}{g}\right] = \frac{\text{血液重量割合}\left[\frac{g}{mL}\right] \times 0.1mL\text{血漿}}{\left(\text{血漿重量割合}\left[\frac{g}{mL}\right] \times 0.1mL\ \text{血漿}\right) + \left(\text{絹質量割合}\left[\frac{g}{mL}\right] \times 1.9mL\text{絹}\right)}$$

【表２】

表 2. 血液/血漿ローディング(3 ドナーの平均)を決定するための物理的パラメーター

| | | ドナーA | ドナーB | ドナーC | ドナー |
|---|---|---|---|---|---|
| I | 血液重量割合 [g/mL] | 0.2316 | 0.1827 | 0.2298 | **0.2146** |
| II | 血漿重量割合 [g/mL] | 0.1040 | 0.0994 | 0.1075 | **0.1036** |
| III | 中の血漿固体重量割合 | 0.0572 | 0.0547 | 0.0591 | **0.0570** |
| IV | 血液の重量当たりの血漿固体 | 0.0341 | 0.0335 | 0.0353 | **0.0343** |
| V | 血漿の重量当たりの血漿固体 | 0.0671 | 0.0644 | 0.0693 | **0.0669** |

【０４４５】

最後に、アッセイにおける、血漿または血液の理論ローディングを上記割合から計算することができる。各２０ｍｇクーポン中の血漿固体に、アッセイで測定した血漿濃度［ｍｇ／ｍＬ］を乗じ、次いでこれを、所与の［１．０２ｍＬ］ＰＢＳ再懸濁体積中の全血漿固体質量に対して正規化する。我々の分析において行った仮定を例示するために、また、理論ローディング値から正確な回収率推定値を決定するのに物理的な血液および血漿パラメーターを如何に取り込んだかを示すために、これらの計算を以下に示す。

【数３】

$$\text{20mgクーポン中の理論血漿ローディング}\left[\frac{mg}{mL}\right] = \text{血漿フィルムの重量当たりの血漿固体}\left[\frac{mg}{mg}\right] \times 20\,[mg]\ \text{クーポン} \times \frac{\text{アッセイで測定された血漿濃度}\,[mg/mL]}{\text{血漿固体重量割合}\,[mg/mL] \times 1.02\,[mL]}$$

$$\text{20mgクーポン中の理論血液ローディング}\left[\frac{mg}{mL}\right] = \text{血液フィルムの重量当たりの血漿固体}\left[\frac{mg}{mg}\right] \times 20\,[mg]\text{クーポン} \times \frac{\text{アッセイで測定された血漿濃度}\,[mg/mL]}{\text{血漿固体重量割合}\,[mg/mL] \times 1.02\,[mL]}$$

【０４４６】

試料回収率を、血漿および血液の回収率の計算の節の説明にしたがって計算した。試料分散を、同じドナーからの繰り返し試料による３連の読み取りをもとにして計算した。結

果を、α＝０．０５のファミリーワイズの有意性レベルで多重比較およびチューキーの補正テストで２元配置ＡＮＯＶＡを使用して、異なる煮沸時間および異なる厚さ（「厚肉」対「薄肉」）を使用して調製したフィルム間で比較した。

【０４４７】

結果。本発明者らは、モデルマーカーとしてのＣＲＰおよびフィブリノゲンについて、絹からの回収率は、統計的に有意なレベルで煮沸時間とフィルム厚さの両方に依存し（図１１を参照されたい）；さらに、ＣＲＰの場合、血液回収率と血漿回収率の両方について、厚さと煮沸時間の変数は強い相互作用効果を有していることを見出した。これは、絹マトリックスからの回収率を改善する付加的な特徴を示唆している。具体的な比較に関して、６０分間煮沸した絹は、煮沸時間および厚さに関係なく最大の回収率を提供するマトリックスを形成し、他方、より短い煮沸時間系は、用量依存的な仕方で回収可能性が低下した。どの煮沸時間についても、それほどそうというわけではないが、厚肉フィルムは、試料種類（血液対血漿）に関係なく、より薄い対応物と比較して、大量の分析物の解放という点で圧倒的により効果的であった。

【０４４８】

（実施例３）

絹フィブロイン溶液における塩基性線維芽細胞成長因子（ｂＦＧＦ）の安定化

絹溶液を、上述したカイコＢｏｍｂｙｘ　ｍｏｒｉの繭から調製した。０．０２Ｍ　Ｎａ$_2$ＣＯ$_3$の溶液中で煮沸することによって、繭を１０、２０または６０分間精練した。絹溶液は１ｗ／ｖ％または４ｗ／ｖ％であり、１×ＰＢＳを含むかまたは緩衝液を含まない。絹溶液は、精製したままのものであるかまたはオートクレーブ処理したものである。以下の対照：１×ＰＢＳ中に０．１％ＢＳＡ、１×ＰＢＳ中に１．０％ＢＳＡおよび１×ＰＢＳを使用する。ｂＦＧＦを各溶液に加えて２５０ｎｇ／ｍＬの最終濃度にする。すべてのｂＦＧＦ含有溶液を３７℃で１週間保存し、次いで回収率を測定する。図１２は、絹フィブロイン溶液からのｂＦＧＦ回収率を示しており、これは、低分子量絹フィブロインがより高い回収率をもたらすことができることを実証しており、特に、ＰＢＳ中に１％の低ＭＷ絹は、使用した絹がオートクレーブ処理されているかまたは精製したまま（すなわち「ニート絹」）であるかどうかにかかわらず、最も期待できるｂＦＧＦ回収率をもたらすことを実証している。図１２Ａおよび図１２Ｂの赤色の点線は、ＰＢＳ対照の値を示す。

【０４４９】

ゲル化をモニターする実験については、ｂＦＧＦを添加しない。５５０ｎｍでの吸収（Matsumoto+、２００６年）を、ゲル化をモニターするために使用する。図１３Ａおよび図１３Ｂは、精製したままの絹フィブロイン溶液およびオートクレーブ処理した絹フィブロイン溶液についてのゲル化結果を示す。図１４は、それぞれ４℃、２２℃および３７℃での（Ａ）精製したままの絹フィブロイン溶液および（Ｂ）オートクレーブ処理した絹フィブロイン溶液についてのゲル化状態を示す。

【０４５０】

本明細書および実施例において特定されているすべての特許および他の出版物を、すべての目的で、明確に参照により本明細書に組み込む。これらの出版物は、本出願の出願日以前のそれらの開示についてだけ提供される。この関連で、本発明者らが、先願発明のためまたは他の理由で、そうした開示に先行する資格がないことを承認するものと解釈されるべきではない。すべての、日付に関する記述またはこれらの文書の内容に関する表現は、出願者らが利用できる情報をもとにしており、これらの文書の日付または内容の正確さに関して何ら承認を構成するものではない。

【０４５１】

（実施例４）

絹フィブロインマトリックスでの血液および血液構成成分の安定化

セルロースベースの技術は、現在、生物検体保存の市場空間を支配している。乾燥血液スポット（ＤＢＳ）検体を、指、かかとまたは足指からランセットで採血した数滴の血液

を特製の吸収性濾紙上に塗布することによって採取する。これらの紙マトリックスは、独占所有のケミストリーおよび／または埋め込み酵素阻害剤で設計することができる。実験室で乾燥が済んだら、技術者は自動または手動の穴あけ器を使用してシートから飽和紙の小さな円盤状物を分離し、その円盤状物を平底のマイクロタイタープレートに落とす。血液を、緩衝食塩水中、４℃で終夜溶出させる。得られた溶出物質を含有するプレートは、それから、後続する試験のための希釈液を作製することができる「マスター」を形成する。このように、１９６０年代以降、濾紙は、個別診断および公衆衛生目的のために血液を採取するのに使用されてきている（Guthrie and Susi、１９６３年）。ＣＤＣは、最近２０～３０年間にわたる文献引用から集められた、ＤＢＳを使用して安定化された物質のアクティブリストをそのウェブサイト（ｗｗｗ．ｃｄｃ．ｇｏｖ／ｌａｂｓｔａｎｄａｒｄｓ／ｎｓｑａｐ＿ｂｌｏｏｄｓｐｏｔｓ．ｈｔｍｌ）上に維持しており、血液スポットのための独立の品質管理プログラムを維持している。カードが、「Ｗｈａｔｍａｎ ＦＴＡカード技術」として、Ｗｈａｔｍａｎ（登録商標）から最初に製造販売されており、それ以来、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅおよびＡｌｔｕｒａｓ Ａｎａｌｙｔｉｃｓからリパックして販売されている。Ａｈｌｓｔｒｏｍなどの新規の企業も、同様の液体濾過および安定化能力を有する繊維複合体を市販している（ｗｗｗ．ａｈｌｓｔｒｏｍ．ｃｏｍ／ｅｎ／ｐｒｏｄｕｃｔｓ／ｅｎｄｕｓｅＡｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ／ｍｅｄｉｃａｌＡｎｄＨｅａｌｔｈｃａｒｅ／ｌａｂｏｒａｔｏｒｙＡｎｄＤｉａｇｎｏｓｔｉｃｓＦｉｌｔｒａｔｉｏｎ／Ｐａｇｅｓ／Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｆｉｌｔｒａｔｉｏｎ．ａｓｐｘ）。

【０４５２】

３０年超、研究者によって、ＤＢＳ試料における、多くの障害についてのマーカーの温度／安定性の関係が研究されており、特に、低容量分析および遠隔診断に対する需要のため、新生のスクリーニングの用途に焦点が当てられている。したがって、研究者は、どの紙フォーマットも目的のすべての分析物をカバーするのに適してはおらず、いくつかのマーカーは化学的に修正されたカードを使用しても十分に回収されていないことを発見している。これらの紙ベースのシステムのいくつかの具体的な欠点も、幅広い臨床状況における長年の評価によって見出されている。ＤＢＳ検体は、達成可能な検出下限（ＬＬＯＤ）、およびそれにわたって妥当な量的区別があるダイナミックレンジに対して制約をもたらす（Andreottiら、２０１０年）。検体の完全性を確実にすることは、ＲＮＡウイルスのための分子的試験についてロジスティックな制約のままでもある（Dinevaら、２００７年；Purenら、２０１０年）。したがって、生物学的試料および／またはその構成成分を（例えば、周囲条件で）安定化させ、検出および／または分析用の安定化された試料から様々な分析物の十分な量での回収を可能にすることができる改善された技術および／または生産物の必要性がある。

【０４５３】

大規模スクリーニング試験（疫学的または毒物学的）においては、現場での、訓練を受けた瀉血専門医の不足、または静脈穿刺などの侵襲的なサンプリング手法に対する一般的な嫌悪感のため、非常に小さい毛細血管血液試料が、大部分の患者から、指またはかかとへの穿刺によって入手できる。さらに、ヒトの全血および血液構成成分は非常に不安定である可能性があり、したがって、ヒトの健康の診断評価用に試料品質を維持／保持するために特別の取扱いが必要である。採血または血液の画分（血漿、血清、バフィーコート、ヘマトクリット等）を保存または取り扱う一般的な方法は、試料完全性を保持するために、凍結（ｃｏｌｄ-ｆｒｅｅｚｉｎｇ）（－２０℃）によるか、または高度に不安定なＲＮＡの場合、超低温（－８０℃）にすることである。採取場所（現地、病院等）から、直接分析または血漿タンパク質／ＲＮＡのさらなる抽出のためのラボへの生物学的試料の輸送は、発泡スチレンボックスやドライアイスなどのかさばった材料の使用が必要となるため、しばしば、実行するのに非常にコストがかかることになる。そうしたかさばった包装は、地域的な輸送でも、しばしば高価な輸送費をもたらす（表３を参照されたい）。

【表３】

表3:

| 輸送タイプ | ドイツ | オーストラリア | インド | 日本 |
|---|---|---|---|---|
| ドライアイス、FedEx* | $ 178 | $ 202 | $ 205 | $ 172 |
| 周囲、USPS | < $5 | < $5 | < $5 | < $5 |
| 費用節減 | > $173 | > $197 | > $200 | > $167 |
| *10lbのドライアイスで1～10試料 | | | | |

【０４５４】

いくつかの発展途上国または遠隔地の現場条件では、持続的な低温保存を支援するための最小限のインフラも存在しておらず、したがって、実行できる診断精密検査の範囲が限定される。残念なことに、これが、薬物動態学的（ＰＫ）スクリーニングのため、または、治療効能をモニターするため、および二次治療への適切な切り替えを指導するための安価で／持続性のある保存フォーマットが極めて必要とされている、これらの限られた資源の状況である。さらに、疾病対策予防センター（ＣＤＣ）などの連邦組織によって行われるような集団的な疫学的スクリーニングは、低侵襲的な小さい試料ボリュームの回収にもっぱら依存する、試料安定化でのより合理化されたアプローチによって大きな恩恵を受けることになる（Meiら、２００１年）。もし、これらのコミュニティーが、限られてはいても、既存のインフラ状況によって、生物学的材料を送り出すために、簡単で安価なツールセットを利用できれば、我々は、世界的規模の健康モニタリングのパラダイムシフトを見ることができ、より多くの国際的な第ＩＩ／ＩＩＩ相臨床試験を容易にすることになる。

【０４５５】

この試験では、本発明者らは、適切に調製され再構成された絹フィブロインは、全血および血液構成成分を、長期にわたりある保存温度範囲で安定化させることができ、分析用の構成成分の回収を可能にすることを実証する実験を開示する。絹タンパク質溶液を液体状態でこれらの構成成分と混合し、次いで、生物製剤／絹複合体を空気乾燥して、安定化フォーマットとして作用する薄肉フィルムにする。あるいは、不安定な少量の核酸分子を、絹タンパク質を使用して同様に安定化できることを実証する迅速な固化手法を提供するために、核酸を含有する再構成された絹溶液を凍結乾燥することができる。本明細書で説明する絹安定化のこれらの実施形態は、活性作用物質および／または生物学的試料用の保護剤としての、絹タンパク質の独特な特徴の最近の発見をベースとした基盤をさらに拡大する。保護剤または安定剤としての絹タンパク質の使用に加えて、本発明者らは、本明細書で、絹処理特性の調節は、最終安定化マトリックスの溶解特性を少なくとも部分的に決定することができ、これは、次いで診断ならびにいくつかの治療状況において使用される分析のための生物学的試料を回収する能力を決定づけることができることを示す。

【０４５６】

一実施形態では、本発明者らは、特に、高レベルの血漿タンパク質は、凍結した液状血漿保存フォーマット（至適基準）と比較して、絹安定化された全血または血漿から単離することができることを実証する。評価されるいくつかのマーカーの場合、至適基準と比較して、絹安定化フォーマットは、少量の血漿タンパク質の保持を改善した。核酸の場合、驚くべきことに、保存温度に関係なく、ＲＮＡｓｅ不活性化絹溶液の存在下で取り込まれた大量のＲＮＡが非常に良く回収されることを発見した。総合すれば、これらの発見は、再構成された絹溶液は、例えば、診断の分野、特にポイントオブケア診断、試料の保存および試料の他の地域への輸送のため、かつ／または保存された生物検体について進歩した診断が実施されることを要求する遠隔地の患者に役立てるために、使用できる様々な製品のために構成できることを示している。一部の実施形態では、絹中で安定化された血液試料は、血液が抜き取られる（指穿刺または静脈採血によって）遠隔環境を、患者の健康のマーカーについて血液構成成分を分析することができる集中ラボと連結するコールドチェ

ーンを迂回する（すなわち、連続した中断されない低温保存）のを助けることができる。

【０４５７】

血液の乾式保存用に現在市販されている他の唯一の技術は紙をベースとした技術（Ｗｈａｔｍａｎ（登録商標）ＦＴＡ乾燥血液スポットカード）であるが、それがコールドチェーン性能評価指標に適合できないため、この手法は、広く採用されてはいない。この意味で、絹安定化技術は、紙ベースのデバイスに取って代わり、コールドチェーン保存への依存からパラダイムをシフトさせるのに使用することができ、絹デバイスのための新たな市場を開くことができる。さらに、本明細書で提示する様々な態様の一部の実施形態は、他の形態の試料採取、例えば尿、唾液および他の体液または同様の診断有用性のある細胞に適用することができる。

【０４５８】

（実施例５）

絹フィブロインの向上した／最適な溶解度のための絹処理調節

絹フィブロインから誘導された材料の性能に対する異なる処理条件の影響は、これまで評価されており、これらの性能評価指標には、機械的性能をモジュレートする方法、分解性および生物学的放出特性が含まれる（Altmanら、２００３年；Pritchardら、２０１３年；Vepari and Kaplan、２００７年）。しかし、オンデマンドでかつ完全な仕方で生物製剤（あらゆる種類の）を取り込み回収するためにそれらの溶解度を最適化する示された目的で、絹から誘導された固体マトリックスを操作するストラテジーを規定している文献は得られない。本発明者らは、絹誘導マトリックスの溶解特性は、その一部がこれまでに文献で特定されている（しかしこの目的のために使用されてはいない）タンパク質特異的な処理パラメーター、および本明細書で説明する他の新規の修正法によって操作できることを発見した。本明細書では、従来利用できる手法を増補するタンパク質処理調節のための方式は、それによって、絹材料が、様々な目的のために、有意に抽出され／分析された、可溶化し取り込まれた材料であり得る最適の手段を提供することを示す。さらに、その現場環境で使用された場合にそれらが遭遇する可能性のある様々な温度条件に対するそれらの安定性を立証するために、保存実験を、代表的な絹フィルムおよび凍結乾燥された発泡体配合物を使用して実施した。

【０４５９】

絹溶解度に対する精練時間の効果を本明細書で評価した。具体的には、絹溶液を、煮沸時間を変えて、従来記載されているようにして精製した（Pritchardら、２０１３年）。簡潔に述べると、Ｂｏｍｂｙｘ ｍｏｒｉカイコ絹の繭をＴａｊｉｍａ Ｓｈｏｊｉ Ｃｏ．，ＬＴＤ（横浜市中区住吉町、日本）から購入した。０．０２Ｍ $Na_2CO_3$ の溶液中で煮沸することによって、繭を１０、２０、３０または６０分間精練した。精練されたフィブロインを濯ぎ、次いで周囲条件で終夜乾燥した。乾燥したフィブロインを９．３Ｍ ＬｉＢｒ水溶液に可溶化し、Ｓｌｉｄｅ－ａ－Ｌｙｚｅｒ透析カセット（分子量カットオフ（ＭＷＣＯ）３．５ｋＤａ（Ｐｉｅｒｃｅ Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｉｎｃ．、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）を使用して蒸留水に対して２．５ｄ透析し、遠心分離した。既知の体積の溶液試料から水を蒸発させて、絹フィブロイン濃度（ｗ／ｖで）を決定した。使用するまで、すべての溶液を４℃で保存した。

【０４６０】

絹マトリックスを、フィルムキャスティング法かまたは凍結乾燥法による約１０～６０分間煮沸（ＭＢ）溶液を使用して調製した。また、６０ＭＢ溶液を、滅菌代替法として、標準的な２０分間オートクレーブ条件を使用してオートクレーブ処理した。４ｗｔ／ｖ％絹溶液をポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）表面上にピペット操作して３連で絹フィルムを作製した。連続したフィルム構造としての取り出しをなお可能にしながら、薄肉フィルムがＰＤＭＳ表面上にできるだけ展延されるように設計した。逆に、厚肉フィルムは、慣行的なピペット操作手順のもとでできるだけ厚く設計した。これら２つのフィルムキャスティング手順は、マルチウェルプレート、ペトリ皿で、または潜在的に現場条件において試料をピペット操作する場合に遭遇する実際的なシナリオを表している。キャスティン

グ手法を図１５に図式的に示す。

【０４６１】

凍結乾燥された発泡体試料について、絹発泡体中でモノクローナル抗体を安定化させるために従来記載されているプロトコール（Guziewiczら、２０１１年）を利用して、１．５ｍＬの４ｗ／ｖ％溶液およびＶｉｒＴｉｓ　Ｇｅｎｅｓｉｓ　２５Ｌ　Ｓｕｐｅｒ　ＸＬ凍結乾機を使用した。最初に、試料を標準的な実験用冷凍庫中、－２０℃で凍結させ、次いで凍結乾燥機を使用して試料を－４５℃に冷却し続け、次いで、一次乾燥（ｖａｃ　１００ｍＴ、－２０℃）を開始した。試料の半分はこの時点までで完了し、残留する結合水を絹から十分に除去するために、半分をさらに二次乾燥（ｖａｃ　１００ｍＴ、３５℃）にかけた。

【０４６２】

絹フィルムと凍結乾燥された発泡体の両方の場合、異なる保存温度（４℃、２５℃、３７℃）で保持した後、試料を、指定された時間点、０日目、６カ月および１年ペンディング）で取り出した。絹フィルムを切断し、分析用てんびんを使用して４０ｍｇ試料を量り取った。絹発泡体を、分析用ミルを使用して１５秒間粉砕し、分析用てんびんを使用して１５ｍｇ試料を量り取った。両方の場合、試料当たり６０ｍｇの出発質量を想定した。すべての試料を、２ｍＬエッペンドルフ管中で、１ｍＬの超純水（ＵＰＷ）と混合し、１０秒間渦巻き混合し、１０００×ｇで１０分間遠心分離した。再溶解性を評価するために、２５０μＬのアリコートを取り出し、初期絹濃度を評価するために行ったようにして、絹ｗ／ｖ％の測定用に、追加的なＰＤＭＳ表面上にキャストした。

結果および考察

【０４６３】

生物製剤をカプセル化する前に、絹精製手法を特定し、完全に溶解性の絹ベースの材料フォーマットが得られる調製方法を構築することを検討した。図１６および図１７で示すように、精製スキームの開始時点で絹繭を長時間（≦６０分間）煮沸することによって、フィルムおよび発泡体の溶解度をそれぞれ効果的に増大させることができる。

【０４６４】

図１８および図１９で示すように、薄肉および厚肉の絹フィルムの溶解度を、種々の温度条件で６カ月間保存した後でも比較した。この発見は、絹フィルムの溶解特性は、煮沸時間に関係なく非常に安定しており、現場で使用するために長い（ｈｉｇｈ）煮沸時間が選択された場合でも、これらの特徴は、取り込まれた生物製剤を回収する能力を損なわないことを示している。

【０４６５】

溶解度および温度安定性に関して、再構成された絹フィブロイン材料の挙動を評価した後、いくつかの実施上の配慮点を以下にまとめる：

－　フィルムおよび発泡体（またはその粉末）などの固体マトリックスに成形された試料を、オンデマンドでの分配および／または使用のための保存安定性のある絹配合物として利用することができ、これらは、一般に、溶液形態の絹（これは通常ゲル化するまでに３～４カ月の保管寿命を有する）よりずっと安定である。さらに、温度プロファイルが変動するのに加えて、しばしば掻き混ぜに遭遇する長距離輸送条件の場合、固体マトリックスはずっと弾力性がある。

－　長期温度安定性は、絹材料が取り込み用マトリックスとして使用され、分析物の回収が、一部、持続的な溶解特性に依存する現場条件に望ましい可能性がある。

－　他の取り込まれた材料の存在下、またはそれとの混合物中での絹の溶解度は、例えば、取り込まれた生物製剤と絹の比、取り込まれた材料の種類（例えば、これらに限定されないが、尿、血液、糞便、耳垢、精製または非精製ＤＮＡ／ＲＮＡ／抗体、治療薬等）、および／またはこれらの生物製剤の安定化を助けるのに一般に使用される緩衝液／添加剤に依存し得る。

【０４６６】

絹ベースの材料またはマトリックスの溶解度は、例えば：フィルムまたは発泡体の水へ

のローディングを低下（例えば、それぞれ４％より低く、または１．５％ｗ／ｖより低く）させることによって最適化することができる。本発明者らは、この試験のためにこれらの値を使用したが、ローディングの飽和を、溶解度を最適化するために使用することができる。

【０４６７】

例えば、強制空気、湿度の低下（周囲より低く）、温度の増大等のいずれかによる、フィルムの乾燥速度を加速する手段。理論に拘泥するわけではないが、この機序は、多分部分的に、本明細書で見られる薄肉フィルム溶解度の改善に関係していると考えられる。

【０４６８】

発泡体品質を改善する、かつ／または絹ベースの材料において結晶化を誘発する可能性のある条件への曝露時間を減少させるための凍結乾燥条件。

【０４６９】

６０分間超の長い煮沸時間、または酵素消化、濾過、クロマトグラフィー等による精製の間に、絹の高い分子量画分（例えば、重鎖および／または長い疎水性配列）を選択的に除去するための方法。

【０４７０】

分子量を低下させる、かつ／または不溶性微粒子を除去するのを続行するのに役に立つ可能性のある、例えばオートクレーブ処理および滅菌濾過を含む滅菌の手段。

【０４７１】

（実施例６）

絹フィブロインベースの材料における全血および血漿の安定化

診断の応用空間において、長期間にわたって、かつ有害な環境条件の関連で、溶解度を最適化した絹マトリックスを、ヒトの全血および血液構成成分を安定化させるためにさらに使用できることを実証することが望ましい。この目的のために、本発明者らは、最初に、再構成された絹の特定のフォーマットから一旦回収されたある範囲のドナーからの血漿および血液タンパク質の相対的存在量を測定するのに使用できる、臨床的に関連する分析ツールの幅を実証するために、予備的な試験を実施した。これらの測定値は、臨床精密検査のために現在使用されているフォーマットであるドナーに適合させた新鮮なまたは凍結した血漿に対して実施された測定値と一致しているはずである。この機能性を実証するために、血漿をドナー静脈血液から単離し、大量の全血かまたは血漿（血液穿刺に相当する体積で）を、絹フィブロイン中に取り込んだ。次いで絹／血液または絹／血漿の複合体マトリックスを空気乾燥させた。次いでこれらのマトリックスを緩衝食塩水溶液に再可溶化させ、分析物を溶液状態で回収した。

【０４７２】

標準的なＥＬＩＳＡウェルプレート法を、最初に、絹タンパク質は別として、血液中のマーカーを確認するため、または、逆に絹の干渉に起因して損なわれている可能性のある特定のマーカーを確認するための、免疫親和性ベースの手法を実証するために使用した。次いでＥＬＩＳＡの結果を、バイオマーカー定量化のためのハイスループットアプローチと比較した。具体的には、それが、同様の抗体ベースの検出法を使用するが同じ試料において同時に複数タグを多重化する能力を有するので、ＬｕｍｉｎｅｘＴＭプラットホームをハイスループット法として使用した。原理上は、ＬｕｍｉｎｅｘＴＭアプローチは、より少ない試料しか必要とせずに、より多くの分析物を検出できるようにする。順に、この試料多重化は、診断の信頼性のために多くの補助的および確証的バイオマーカーを必要とする疾患（例えば、これに限定されないが、循環器疾患、ＣＶＤ）のより迅速な検出を可能にする。さらに、これらの実験は、実際的に重要な問題、例えば、高分子量タンパク質残基によってもたらされる流体の潜在的な目詰まりのため、安定化マトリックス（例えば、可溶化した絹フィルムからの残留物）の存在が、ＬｕｍｉｎｅｘＴＭプラットホームの有用性を損なう可能性があるかどうかに対処する。

【０４７３】

上記の実験を実施するために、新鮮なドナー血液（バキュテナーチューブ、Ｎａ－ヘパ

リン抗凝血剤、Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｂｌｏｏｄ Ｃｏｍｐｏｎｅｎｔｓ、Ｂｒｉｇｈｔｏｎ、ＭＡ）を、採血して１時間以内に別個の３ドナーから受け取った。次いで、血漿単離用に、チューブを直ちに１０００×ｇで遠心分離した。次いで血漿アリコートを直ちに凍結して陽性対照として供した。絹溶液を、従来記載されている（Luら、２０１０年）カイコＢｏｍｂｙｘ ｍｏｎｉの繭から調製した。絹フィルムをポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）表面上にキャストした。そこでは、３ドナーのそれぞれからの１００μＬの血液かまたは血漿を１．９ｍＬの絹溶液（水中に７．６ｗｔ％）と混合し、次いで、空気乾燥するために大きな表面（８．５ｃｍ径のペトリ皿）にわたってキャストした。フィルムを終夜（８ｈｒ）乾燥した後、分析用に試料を打ち出す。例えば、１０ｍｇおよび４０ｍｇのクーポンを、標準曲線内に、分析に必要な質量ローディングを調整するため、ＥＬＩＳＡ読み取り用に血漿および血液フィルムから調製した。すべてのＥＬＩＳＡ（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ）について、凍結血漿アリコートを１：１０および１：１００で希釈し、同時に絹ベースのフィルム中の溶解した血液および血漿を希釈することなく試験した。

【表４】

表 4: ELISA マーカー、タンパク質特性および検出限界

| R&D Systems | タンパク質 | Mw | ELISA 標準品 [pg/mL] | 組織サブタイプ/疾患 |
|---|---|---|---|---|
| DLP00 | レプチン | 16kDa | 1,560 ～ 100,000 | 糖尿病、ストレス |
| DCRP00 | C 反応性タンパク質 | 118～ | 78,100 ～ 5,00,000 | CVD、糖尿病 |
| DTSP10 | トロンボスポンジン-1 | 150kDa | 781,000 ～ | 循環器疾患 |
| DSE100 | PAI-1 | 45kDa | 31,200 ～ 2,000,000 | 乳がん、ぜんそく |

__ = Luminex 結果と相互参照される

【０４７４】

ハイスループット分析（例えば、ＬｕｍｉｎｅｘＴＭ ＣＶＤキットを使用、以下の表５）を、乾燥したフィルム試料および血漿アリコートで実施した。ＬｕｍｉｎｅｘＴＭアッセイを、標準曲線検出限界内に入るように凍結血漿アリコートの希釈（１：２，０００および１：２０，０００）を必要とする、製造業者の取扱説明書（ＥＭＤ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ、ＭＡ）にしたがって実行した。２０ｍｇの血液および血漿クーポンをそれぞれ１ｍＬのリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）に入れ、１５秒間渦巻き混合させ、次いで、目視で溶解を確認するために２分間静置した。血漿アリコートと同様に、絹ベースのクーポン（およびブランクの絹対照）に溶解した血液および血漿をキット試薬中に１：２００および１：２，０００希釈して、絹フィルムフォーマットでの先の知見をもとにして潜在的回収率を算出した（ａｃｃｏｕｎｔ ｆｏｒ）。

【表５】

表 5: LuminexTM マーカー、タンパク質特性および検出限界

| Luminex キット# | タンパク質 | Mw | Luminex 標準品 | 疾患マーカー |
|---|---|---|---|---|
| HCVD3-67CK-02 | 血清アミロイド P | 25kDa | 80～250,000 | 糖尿病 |
| HCVD3-67CK-02 | C 反応性タンパク質 | 118～ | 80～250,000 | 炎症、CVD |
| HCVD2-67BK- | ハプトグロビン | 43kDa | 80～250,000 | 溶血性貧血 |
| HCVD1-67AK-02 | tPAI-1 | 45kDa | 16～50,000 | 乳がん |
| HCVD1-67AK-02 | sVCAM-1 | 100～ | 80～250,000 | CVD |
| HCVD3-67CK-02 | フィブリノゲン | 340kDa | 80～250,000 | 炎症、CVD |

__ = ELISA 結果と相互参照される

【０４７５】

血漿および血液の回収率の計算：血液および血漿クーポンから回収されたタンパク質の値を、ドナーに適合させた血漿において見られる濃度に正確に変換するため、したがって回収効率を決定するために、実施例２において上述したようにして、最初に、血液および

血漿のいくつかの物理学的測定を行った。

【０４７６】

ＬｕｍｉｎｅｘＴＭアッセイ結果についての統計：２元配置ＡＮＯＶＡを、２組の独立変数：ｉ）３ドナーにわたって検出される血液または血漿のレベル、およびｉｉ）凍結血漿アリコートからの読み取りから計算した、理論クーポン回収率と比較した血液または血漿クーポン回収率の間の試料分散の供給源と比較するために実行した。試料分散を、ＬｕｍｉｎｅｘＴＭアッセイからの３連の読み取りに基づいて計算し、この誤差を、血液および血漿重量割合などの物理的パラメーターにおける分散を調整することなく、クーポン回収率の計算にわたって持ち込んだ。結果は、Ｐ値＜０．０５で有意であると見なした。

【０４７７】

これらの結果は、３０分間煮沸した絹から形成された薄肉フィルム（ＰＤＭＳコーティングされた８．５ｃｍペトリ皿表面全体にわたってキャストされている）は、完全な溶解が望まれる用途に理想的であり得ることを示した。絹／血液と絹／血漿の混合により形成されたフィルムはさらなる分析用に容易に可溶化するフォーマットをもたらした（図２０を参照されたい）。最大で４０ｍｇの乾燥マトリックスを、このフォーマットにおいて使用した。

【０４７８】

ＥＬＩＳＡ結果：次いで回収した液体アリコートを、ヒト血漿についての製造業者のプロトコール（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、上記表４）にしたがってＥＬＩＳＡにより試験した。ドナーに適合させた血液からの血漿試料を、製造業者による取扱説明書にしたがってＰＢＳ中に１：１０および１：１００希釈し、これらを、絹クーポンからの回収効率を決定するために使用した。

【０４７９】

図２１のグラフは、ＥＬＩＳＡキットは、ある分子量範囲（１６～１５０ｋＤａ）および濃度範囲（５．９１ｎｇ／ｍＬ～１６．７ｍｇ／ｍＬ）で、選択されたバイオマーカーの臨床的に関連する量を検出できていることを示している。注目すべきことに、これらの値は、高いレプチンレベルおよび低いＣＲＰレベルを含むドナープロファイル（アジア人、女性、年齢２５才、無症候性）と一致しており（表６）、これは、アッセイの正確さおよび血漿の適切な調製を示している。より重要なことに、絹の混合、乾燥、キャスティングおよび再可溶化の後に回収された試料からの値は、ドナー血漿の直接の測定値と類似していた。約１０ｍｇクーポンと約４０ｍｇクーポン（それぞれｎ＝６のアッセイ測定値）の両方がアッセイ標準曲線の範囲内にある値をもたらす場合、１０ｍｇ群および４０ｍｇ群の平均を平均し、理論ローディング値に対して正規化して回収率％を計算した（以下の表６にまとめる）。ＣＲＰおよびセルピンＥ１について、４０ｍｇクーポンだけがＥＬＩＳＡの検出可能な範囲に入るのに十分な血液を放出した。したがって回収率％を単一のフィルム質量について報告する。

【表６】

**表 6: ELISA 結果のまとめ**

| タンパク質 | Mw | 血漿値 (R&D) (ng/mL) | ドナーELISA 値 (ng/mL) | 絹フィルム回収率% |
|---|---|---|---|---|
| レプチン | 16kDa | 3877 ～ 77,273 (♀) | 12,628.87 | 101.91% (10mg +40mg) |
| C 反応性タンパク質 | 118～144kDa | 108～4523 | 233.88 | 53% (40mg) |
| トロンボスポンジン-1 | 150kDa | 8,794～28,335 | 16,680.25 | 95.74% (10mg+40mg) |
| セルピン E1、PAI-1 | 45kDa | 0.98～18.7 | 5.91 | 142.66% (40mg) |

【０４８０】

Ｌｕｍｉｎｅｘ実験：ＬｕｍｉｎｅｘＴＭシステムを、３つの異なるキットにわたって３つの異なるドナー血液試料間で６マーカーについて実行し、これらのアッセイの結果を図２２に示す。

【０４８１】

絹フィルムにおける取り込みの前に、３ドナーからの血液の物理的外観の差を観察し（静脈採血および輸送の後）、ドナー３は、明らかな溶血の兆候（すなわち、単離された血漿の発赤およびバキュテナーチューブの内側上のＲＢＣ塗抹を示した。Ｌｕｍｉｎｅｘアッセイは、ドナー間の変動と、全ドナーにわたる、全血から単離された血液タンパク質ｖｓ．精製血漿から単離されたタンパク質の相対量に対して敏感であるようであった。理論的なおよび測定された血漿についてすべての値は、実際の血液濃度より約６０～１００％高かった（細胞画分の除去に起因して）。

【０４８２】

２元配置ＡＮＯＶＡは、血液および血漿クーポンについてのｓＶＣＡＭマーカーならびに血液クーポンについてのｔＰＡＩ－１マーカーを例外として、Ｌｕｍｉｎｅｘシステムで測定した血液と血漿の両方の比較について、ドナー間における有意な（殆どの場合、高度に有意な）変動を示した。これは一部、ｔＰＡＩ－１、ｓＶＣＡＭ－１およびハプトグロビンアッセイの感度ならびに使用される標準曲線に起因していた。例えば、ドナー２は、理論比較をより不正確にする１：２０，０００×希釈であっても、最も高いアッセイ標準値［５０ｎｇ／ｍＬ］を超える血漿ハプトグロビンレベルを有していた。逆に、ｓＶＣＡＭ－１およびｔＰＡＩ－１の検出は、低末端の感度問題があり、それによって１：２０，０００×希釈でのすべての血漿値は最低のアッセイ標準（それぞれ０．０８および０．０１６ｎｇ／ｍＬ）またはそれ未満であり；次いで、これは、高信頼度（大部分のドナーおよびクーポンタイプについてＣＶ値＞２０％）でのクーポン回収率の定量化における困難さをもたらした。絹からの測定可能なバックグラウンドの欠如は、絹タンパク質がＬｕｍｉｎｅｘＴＭ機器を妨害しないことを示している。

【０４８３】

ＣＶＤパネルにおけるマーカーのうちの２つ、すなわちＳＡＰおよびＣＲＰは、理論ローディングレベル（凍結血漿アリコートをもとにした）と血液および血漿クーポン（絹フィブロインを有する）から回収されたレベルの間の高度の一致を示した。これらの２つのマーカーの場合、２元配置ＡＮＯＶＡは、ドナーからの変動の有意な供給源をもたらすが、凍結血漿と血液または血漿クーポンの間の有意差はない（ｐ＜０．０５）。ドナーの差が試料セットにおける変動の＞６０％を占めるので、ドナーのフィブリノゲンとハプトグロビンレベルの間の差も、適合させた血液と血漿のクーポンレベル間のそれぞれの差よりはるかに大きかった。これらの発見は、ＥＬＩＳＡキットでの先の結果を裏付けており、キャスティング／乾燥／再可溶化手法によって提供された分析物の十分な回収率を示している。さらに、特に、ＣＲＰ試験は、２桁を超える範囲のドナーレベルにもかかわらず、クーポンと凍結血漿対照との間の優れた忠実性を示した。ｓＶＣＡＭ－１、ｔＰＡＩ－１およびハプトグロビンアッセイでの上記課題は、ドナー間の差を検出する我々の能力を低減させており；したがって、これら３つの場合、ドナー－ドナー間の差による変動は、全体の試料変動に対して、血漿と凍結したアリコートとの間の忠実性より、統計的に、より有意に寄与するものとは考えられなかった。総合すれば、これら６つの異なるＣＶＤマーカーは、いくつかのドナーレベルの較正は必要であるが、Ｌｕｍｉｎｅｘプラットホームを、我々の絹系において安定化した血液検出のために使用できることを実証している。

【０４８４】

ＥＬＩＳＡフォーマットから計算された血漿の絶対レベルをＬｕｍｉｎｅｘフォーマットと比較した場合、ＥＬＩＳＡを使用したすべてのマーカーについて、Ｌｕｍｉｎｅｘアッセイと比較して、一貫して、より低い濃度が見出された（図２３を参照されたい）。これらの差は、使用したマーカー（ＣＲＰとＰＡＩ－１が例として示されている）および各アッセイのダイナミックレンジ（１０～１００，０００ｎｇ／ｍＬ）に沿った位置に関係なく観察された。ＥＬＩＳＡとＬｕｍｉｎｅｘの間で観察された差は、分析物に応じた度

合いで変動した（例えば、ＣＲＰでは１０倍の差であるが、ＰＡＩ－１ではわずか２～３倍の差である）。

【０４８５】

驚くべきことに、最も大きい差は、ドナー１および２から単離された血漿とドナー３からの溶血した血漿の間のすべてのマーカーにわたって見られた。これはＣＲＰについて特にそうであった。ＣＲＰの生理学的役割は、補体系を活性化するために、死細胞もしくは瀕死の細胞またはそれらの核構成成分の表面上に発現するホスホコリンと結合することである（Changら、２００２年）。したがって、採血による細胞画分（ＷＢＣまたはＲＢＣ）に対する破壊が、ＣＲＰを、血漿調製の間にペレット化した細胞溶解物と会合させ、したがって血漿における検出には利用できなかった可能性がある。しかし、血液クーポンは非常に低いＣＲＰレベルであることも示されているので、採血もしくは取扱いの際のｉｎｖｉｔｒｏでのＲＢＣへの損傷がドナーについてのＣＲＰレベルの全体的な希釈を引き起こしたか、または、単に、ドナーＣＲＰレベルが本質的に低かった可能性もある。ＣＲＰのためのＥＬＩＳＡスクリーンは、図２２で示すようなＬｕｍｉｎｅｘキットにより報告されているように、ドナー３に対応する低い値が確認された。さらに、ＥＬＩＳＡの結果は、ドナー３は、ドナー１および２（データは示していない）と比較して、レプチンの２倍の増大により、高い脂質レベルを含有していることを示した。理論に拘泥するわけではないが、脂肪分解は、ＥＬＩＳＡ法による不正確なＣＲＰ読み取りのソースである可能性があり（Martinez-Subiela and Ceron、２００５年）、それによって、ビリルビンなどの種々の脂質での未使用の血漿のドーピングは、測定されるＣＲＰの用量依存的な減少をもたらした。

【０４８６】

時間経過の結果：３つの異なるドナー血液試料間で６つのマーカーについて３７℃または室温で３０日間保存した後、ＬｕｍｉｎｅｘＴＭシステムを実行した。これらのアッセイの結果を図２４に示す。０日目に当初観察されたのと同様の傾向が３０日目で判定された（図２２）。ＬｕｍｉｎｅｘＴＭアッセイは、全ドナーにわたって、ドナー間の変動ならびに全血から単離された血液タンパク質ｖｓ．精製血漿から単離されたタンパク質の相対量の両方に対して敏感であった（データは示していない）。一部の実施形態では、ｔＰＡＩ－１およびＶＣＡＭ－１マーカーは、それらの試料の希釈量を減少させることによって検出された。ｔＰＡＩ－１アッセイにおけるブランク絹対照からのいくつかのバックグラウンドが判定されたが、これは、そうした低い分析物レベルで悪化するこのマーカーのために使用される抗体間でのいくらかのクロストークを示している。ｔＰＡＩ－１の場合、すべてのフィルム含有試料からベースライン絹フィルム陰性対照を減じたが、それでも、クーポンｔＰＡＩ－１レベルは、１００％ベースラインに対してなおも上昇していた。

【０４８７】

クーポンから測定され理論ローディングレベルに変換された分析物のすべての値は、ＣＲＰおよびハプトグロビンについての血液クーポン測定値を除いて、完全な１００％の回収率を示した。これらの相違に対する、可能性のある生物学的根拠は上記で論じた。２元配置ＡＮＯＶＡは、異なる保存フォーマット間での有意（いくつかの場合、高度に有意である、Ｐ＜０．０１）な分散を示した。特に、絹ベースのクーポンから測定されたフィブリノゲンおよびｓＶＣＡＭ－１レベルは、保存条件に対して鈍感であるようであり、一方、それぞれの液状血漿レベルは減少しており、３７℃で有意にそうであった。

【０４８８】

図２４で示すように、その各グラフ上の灰色の点線で示される３０日目に測定された凍結血漿アリコートレベルは、０日目のベースライン値と常に適合しているわけではなかった。具体的には、ＣＲＰレベルは０日目のベースラインの８０％であったが、フィブリノゲンレベルは、それらのそれぞれのベースラインの４８％しかなかった。これは、至適基準の凍結／解凍手法を使用したフィブリノゲンの有意な分解を示しており、これは、フィルム安定化手法を使用すると回避されるようである。実際、従来の報告は、－８０℃未満（例えば、本明細書で使用する－２０℃の条件）の凍結温度で、ヘパリン化された血液か

ら単離された血漿中で、小さな沈殿物が形成される可能性があること、および、一般に凝固因子のバイアビリティー／回収可能性の喪失に主に寄与するものであることを示している（Palmerら、１９９３年）。この挙動は、室温および３７℃での液状血漿レベルから取られた対応するフィブリノゲンマーカーの分解によって強調される。フィブリノゲンおよび他の凝固因子の感受性は、絹系と比較した、使用抗凝血剤および保存温度の選択の関数として評価することができる。

【０４８９】

４カ月で（図２５）、絹系から回収されたタンパク質マーカーレベルは、多くの場合低下しているが、それでも、フィブリノゲンについては至適基準の低温保存条件を超える有意な性能増進、およびＳＡＰなどの他のマーカーについては非常に高いレベルの維持を示した。

【０４９０】

（実施例７）

絹フィブロインベースの材料におけるＲＮＡの安定化

この実施例は、機能を失うことなく、ＲＮＡを、凍結乾燥絹溶液中に取り込み回収することができることを示す。ＲＮＡの回収率を最大化するために、一連の実験を実施して最適の溶液条件を確立した。例えば、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）コード化ｍＲＮＡを絹溶液と混合し、これに３日間の混合、凍結乾燥および回収プロトコールを施した。このプロトコールにしたがって、ｍＲＮＡを超純水に再可溶化することによって回収し、ＲＮＡ特異的な蛍光分析アッセイを、カプセル化および回収効率を定量するために使用した。さらに、凍結乾燥プロトコールを施しながら、溶液中でのＲＮＡへの損傷を緩和するために、市販のＲＮＡｓｅ阻害剤の取り込みを用いた。これらの阻害剤／絹系を使用して、絹からの回復後のＲＮＡ機能の保持を、ｍＲＮＡ分子の回収された画分をモデル細胞系にトランスフェクトすることによって評価した。一部の実施形態では、本明細書で説明する方法および／または組成物は、より長い期間（例えば、３０～１２０日間）にわたって安定に保持することができる。

【０４９１】

これらの実験を実施するために、ＧＦＰコード化ＲＮＡを商業的な供給源から購入した（Ｓｔｅｍｇｅｎｔ（登録商標）ｅＧＦＰ　ｍＲＮＡ、ｗｗｗ．ｓｔｅｍｇｅｎｔ．ｃｏｍ／ｐｒｏｄｕｃｔｓ／ｓｈｏｗ／２２２）。このＲＮＡ配列は、Ｗａｒｒｅｎらによって当初、自然抗ウイルス応答を克服するように修飾された合成ＲＮＡの投与をもとにした、リプログラミング細胞のための簡単な非組み込み（すなわち、非ウイルスまたはＤＮＡベースの）ストラテジーを提供するために開発された（Warrenら、２０１０年）。この配列は、３つの重要な構成成分：ｉ）細胞質中での安定性を改善するための５’グアニンキャップ、ｉｉ）翻訳を開始させるための強力なコザックコンセンサス配列、およびｉｉｉ）ｍＲＮＡポリアデニル化に必要な終結配列を含有する。ＧＦＰ配列は、ＰＣＲアンプリコンによるｉｎ　ｖｉｔｒｏでの転写反応鋳型を使用して、この構築物中に合成的に作られる。ストック溶液は高濃度（１００ｊｉｇ／ｍＬ）でＳｔｅｍｇｅｎｔ（登録商標）により販売されており、Ｗａｒｒｅｎらによる従来の結果は、十分なＧＦＰの翻訳を短期間（８～１２ｈｒ）で行うことができ、それを、ＲＮＡ特異的機能についてアッセイを必要とするカプセル化および回復試験に理想的なものにしていると示唆している。

【０４９２】

絹溶液を、２０分間の煮沸および溶解条件を使用して調製し（９．３Ｍ　ＬｉＢｒ、ｄｉＨ２Ｏに対して４８ｈｒ透析）、最終濃度は、計量した体積の溶液を乾燥して評価して、超純水中に６ｗｔ％であった。この溶液を、認定されているＲＮＡｓｅフリー水を使用して２％、１％または０．５％ｗｔ／ｖに希釈した。それぞれ、最終作業濃度１０ｍＭ～１ｍＭを得るために、トリスＥＤＴＡ（ＴＥ）を加えた。例えば、絹タンパク質を変化させる可能性がある、必要なオートクレーブ処理ステップのため、絹精製工程を、ＤＥＰＣベースのＲＮＡｓｅ処理で使用できない一部の実施形態では、ｍＲＮＡ取扱いの間にＲＮＡｓｅの存在または活性を排除する他の方法を使用することができる。例えば、認定され

ているＲＮＡｓｅ／ＤＮＡｓｅフリーのピペット先端、チューブおよび溶液をＡｍｂｉｏｎ（登録商標）から購入し、そのままで利用し、ＲＮＡｚａｐをすべての外部表面に対して使用した。６０ｊｉｇのストックＧＦＰ　ｍＲＮＡ溶液（１×ＴＥで供給）を、使用するときまで－８０℃で保存した。使用する時点で、これを氷上で解凍し、次いで、最終ステップとして、最終ｍＲＮＡ濃度２０×$10^3$ｎｇ／ｍＬのため、各容器において、２０ｊｉＬ　ｍＲＮＡ／８０ｊｉＬ（絹＋ＴＥ）のｖ／ｖ比の溶液中で混合した。ｍＲＮＡピペット操作プロセスを、すべての試料について５分間未満持続させた。ｍＲＮＡローディングを含まない適合させた対照も、ブランク１×ＴＥ緩衝液を使用して調製した。さらに、取扱いの間、ＲＮＡをさらに保護するために、これらの条件を、ＳＵＰＥＲａｓｅ・ＩｎＴＭ　ＲＮａｓｅ阻害剤（Ａｍｂｉｏｎ（登録商標））を加えて、完全に反復した（絹単独および絹／ＲＮＡ）。

【０４９３】

絹／ＲＮＡ溶液の凍結乾燥：混合ステップに続いて、絹発泡体においてモノクローナル抗体を安定化させるために従来記載されているプロトコール（Guziewiczら、２０１１年）を利用して、２ｍＬチューブ中で保存したすべての１００μＬ試料を、ＶｉｒＴｉｓ　Ｇｅｎｅｓｉｓ　２５Ｌ　Ｓｕｐｅｒ　ＸＬ凍結乾燥機に直ちに移した。キャップを側部で開けたまま試料を入れて急速な乾燥を促進させ、チューブを冷却プレートと直接接触させて、より正確で均一な熱制御がしやすいようにした。このプロセスを、－２０℃の凍結条件からのランピングによって開始させ、そこで、試料を、プレート上で６３分間にわたって徐々に－４５℃に冷却し、その温度でさらに８ｈｒ保持し、次いで加温して－２０℃に戻した。次いで、１００ｍＴの真空下、－２０℃で４０ｈｒ一次乾燥して非結合水を除去した。試料を再度３５℃に加温し、二次乾燥段階として６２０分間保持して結合水を除去した。次いで試料を、回収プロトコールが開始されるまで、－４℃、８００ｍＴ圧で通常２～３ｈｒ保存した。

【０４９４】

絹溶液の濃度（絹ｗ／ｖ６～１％）を、絹フィブロインベースの材料を凍結乾燥プロトコールにしたがって再可溶化できるように最適化した。以下の図２６に示すように、自立性の発泡体を、ＥＤＴＡ（ＴＥ緩衝液中に）を含むか含まないで、各溶液から生成させた。水に再可溶化させると、少しの割合の非溶解絹残留物が見られた。そのサイズは初期絹ローディングに依存していた。しかし、サイズ／溶解度はＴＥ緩衝化に依存していなかった。これらの結果に基づいて、２％ｗ／ｖを、溶解度に対する濃度効果を検討するための出発点として選択した。

【０４９５】

ＲＮＡ含量の回収および測定：スクリーニング試験に続いて、２％、１％および０．５％の絹溶液をＲＮＡ回収試験のための主要候補として選択した。上述の取り込みおよび凍結乾燥プロトコールにしたがって、試料を－４５℃での凍結乾燥機保存状態から取り出し、直ちに氷上で２ｈｒ解凍した（アッセイ調製の期間）。

【０４９６】

回収のＲＮＡ定量：Ｑｕａｎｔ－ｉＴＴＭ　Ｒｉｂｏｇｒｅｅｎ（登録商標）ＲＮＡ試薬およびキットを、ｐｒｏｂｅｓ．ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ．ｃｏｍ／ｍｅｄｉａ／ｐｉｓ／ｍｐ１１４９０．ｐｄｆでのウェブからの製造業者指針にしたがって調製した。リボソームＲＮＡ標準品を、標準曲線（１０００～７．８１２５ｎｇ／ｍＬの範囲）を作成するために使用し、同時に、－８０℃で保存したストックＧＦＰ　ｍＲＮＡを、同様に氷上で解凍し、１：８０希釈し、Ｒｉｂｏｇｒｅｅｎ試薬との異なるシーケンス結合についての標準曲線の結果を較正する内部対照として使用した。アッセイを、試料当たり２５μＬを必要とする９６ウェルフォーマットで実行した。標準品を調製した後、凍結乾燥された絹試料（および０％対照）を氷から取り出し、２００μＬのＤＮＡａｓｅ／ＲＮＡｓｅフリー水を加え、１５秒間渦巻き混合し、直ちに２５μＬの試料を各ウェルにピペットで取った（２連のアッセイ読み取り、Ｎ＝３の生物学的複製で）。

【０４９７】

回収ｍＲＮＡを使用した真核細胞のトランスフェクション：回収ｍＲＮＡの安定性、およびｉｎ　ｖｉｔｒｏでの翻訳鋳型としての連続使用の可能性を調べるために、試料当たり約１０μＬを、絹／阻害剤複合体の再可溶化の後、直ちに保持した。ｍＲＮＡの回収の前に、２９３線維芽細胞を５×１０$^{4}$細胞／ｃｍ$^{2}$の密度で９６ウェルプレートに播種し、ダルベッコ変法イーグル培地（ＤＭＥＭ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中、１５％血清、１％抗生物質／抗真菌剤の存在下で付着させた。細胞を３７℃、５％$CO_2$で維持した。

【０４９８】

製造業者の推奨によって、ＳｔｅｍｆｅｃｔＴＭトランスフェクションキットを、公開されている利用者用プロトコール（Ｓｔｅｍｇｅｎｔ、ｗｗｗ．ｓｔｅｍｇｅｎｔ．ｃｏｍ／ｐｒｏｄｕｃｔｓ／ｓｈｏｗ／２２１）にしたがって使用した。トランスフェクション試薬をトランスフェクション緩衝液と一緒にしてストック溶液として作製し、次いでこれを７．３３μＬアリコートに分割し、続いて１０μＬの回収ｍＲＮＡと一緒にした。この緩衝液／試薬／ｍＲＮＡ溶液を室温で１５分間平衡化させ、続いて１５μＬを各アリコートから取り、９６ウェルプレート中の個々のウェルに滴下添加した。次いで細胞を上記したように、１２ｈｒインキュベーションに戻し、その時点で、４８８ｎｍ（青）励起および５１０ｎｍ（緑）発光用のフィルターセットを備えたＡｘｉｏｖｅｒｔ　ＣＦＬ蛍光顕微鏡で撮像した。

【０４９９】

結果および考察

初期試験の結果を図２７に示す。ＲｉｂｏＧｒｅｅｎアッセイは、絹だけの群において明らかな絹タンパク質（４８０ｎｍで蛍光分析的に活性である）からの小さいが有意なバックグラウンドと、すべての群における回収されたＲＮＡからの大きな読み取りの両方を示した。したがって、ロードされていない群を、すべての対応する濃度からの絹－ＲＮＡ試料に対して正規化するために使用した。１％および０．５％の群から回収されたＲＮＡは、非絹０％の群に匹敵していたが、これらすべての凍結乾燥された系は、未使用凍結ストックよりはるかに低かった。

【０５００】

これらの結果にしたがって、例えば溶液保存条件を操作することによって、ＲＮＡ回収効率を改善することを検討した。ＲＮＡｓｅは絹溶液中に少量存在しており、すべての条件で回収されたｍＲＮＡは、アッセイ調製の間に回収された後、分解の影響を受けやすいと考えられ、したがって、１Ｕ／μＬの作業濃度でのＳＵＰＥＲａｓｅ・ＩｎＴＭ　ＲＮａｓｅ阻害剤（ｔｏｏｌｓ．ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ．ｃｏｍ／ｃｏｎｔｅｎｔ／ｓｆｓ／ｍａｎｕａｌｓ／ｓｐ＿２６９４．ｐｄｆ）を、アッセイに含めた。結果を図２８に示す。絹／ＴＥ単独を使用して実行した先のアッセイと比較して（図２７）、阻害剤の存在は、－８０℃保存条件と比較してｍＲＮＡ回収率を大幅に改善した。さらに、１％および０．５％の群についての値は非絹０％の群に匹敵しているので、絹構成成分の干渉は最少化された。

【０５０１】

以下の図２９に示すように、凍結したストック（－８０℃保存）およびすべての回収絹群を含む、トランスフェクション試薬およびｍＲＮＡを含有するすべての媒体条件の細胞は、１２時間のインキュベーションで２９３線維芽細胞によるＧＦＰ発現を誘発した。－８０℃の群は、植菌したウェル中の細胞群体に、より広範な発現パターンをもたらすことも分かった。これは、ｍＲＮＡベースのトランスフェクションの用量依存的な性質、および－８０℃ストックの限定された希釈に起因しているようである。絹群（０～２％）からの回収ｍＲＮＡは、ポジティブなトランスフェクション結果を観察するのに必要な最少滴定量であった可能性がある。

【０５０２】

この実施例における、凍結乾燥絹溶液からのＲＮＡの回収率は、トランスフェクションのためには十分であったが、絶対レベルは凍結した対照より低かった。しかし、絹の配合および／または絹処理の方法は、凍結乾燥絹溶液からのＲＮＡの回収率を増大させるよう

に最適化することができる。例えば、事前可溶化繭煮沸時間を変更して、最も可溶性溶液のサブタイプを選択することができる。図１７は、６０分間またはそれ超の煮沸を、改善された再溶解性で、凍結乾燥絹溶液からＲＮＡを回収するために使用することができることを示している。

特定の文献

【０５０３】

Altman, G.H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R.L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J., and Kaplan, D.L. (2003). Silk-based biomaterials. Biomaterials 24, 401-416.

【０５０４】

Andreotti, M., Pirillo, M., Guidotti, G., Ceffa, S., Paturzo, G., Germano, P., Luhanga, R., Chimwaza, D., Mancini, M.G., Marazzi, M.C., et al. (2010). Correlation between HIV-1 viral load quantification in plasma, dried blood spots, and dried plasma spots using the Roche COBAS Taqman assay. Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology 47, 4-7.

【０５０５】

Chang, M.K., Binder, C.J., Torzewski, M., and Witztum, J.L. (2002). C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99, 13043-13048.

【０５０６】

Dineva, M.A., MahiLum-Tapay, L., and Lee, H. (2007). Sample preparation: a challenge in the development of point-of-care nucleic acid-based assays for resource-limited settings. The Analyst 132, 1193-1199.

【０５０７】

Guthrie, R., and Susi, A. (1963). A SIMPLE PHENYLALANINE METHOD FOR DETECTING PHENYLKETONURIA IN LARGE POPULATIONS OF NEWBORN INFANTS. Pediatrics 32, 338-343.

【０５０８】

Guziewicz, N., Best, A., Perez-Ramirez, B., and Kaplan, D.L. (2011). Lyophilized silk fibroin hydrogels for the sustained local delivery of therapeutic monoclonal antibodies. Biomaterials 32, 2642-2650.

【０５０９】

Lu, Q., Wang, X., Hu, X., Cebe, P., Omenetto, F., and Kaplan, D.L. (2010). Stabilization and release of enzymes from silk films. Macromol Biosci 10, 359-368.

【０５１０】

Martinez-Subiela, S., and Ceron, J.J. (2005). Effects of hemolysis, lipemia, hyperbilirrubinemia, and anticoagulants in canine C-reactive protein, serum amyloid A, and ceruloplasmin assays. Can Vet J 46, 625-629.

【０５１１】

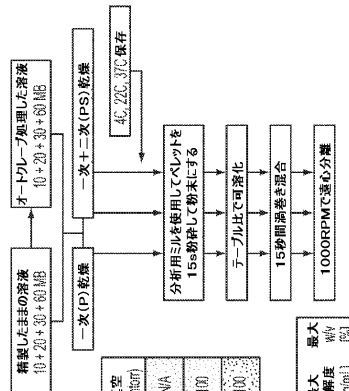
Mei, J.V., Alexander, J.R., Adam, B.W., and Hannon, W.H. (2001). Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. The Journal of nutrition 131, 1631S-1636S.

【０５１２】

Palmer, D.S., Rosborough, D., Perkins, H., Bolton, T., Rock, G., and Ganz, P.R. (1993). Characterization of factors affecting the stability

of frozen heparinized plasma. Vox sanguinis 65, 258-270.
【０５１３】
Pritchard, E.M., Hu, X., Finley, V., Kuo, C.K., and Kaplan, D.L. (2013). Effect of Silk Protein Processing on Drug Delivery from Silk Films. Macromolecular bioscience.
【０５１４】
Puren, A., Gerlach, J.L., Weigl, B.H., Kelso, D.M., and Domingo, G.J. (2010). Laboratory operations, specimen processing, and handling for viral load testing and surveillance. The Journal of infectious diseases 201 Suppl 1, S27-36.
【０５１５】
Scott, C.T., Caulfield, T., Borgelt, E., and Illes, J. (2012). Personal medicine--the new banking crisis. Nature biotechnology 30, 141-147.
【０５１６】
Vepari, C., and Kaplan, D.L. (2007). Silk as a biomaterial. Prog Polym Sci 32, 991.
【０５１７】
Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., et al. (2010). Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. Cell Stem Cell 7, 618－630.
【０５１８】
本明細書および実施例において特定されているすべての特許および他の出版物を、すべての目的で、明確に参照により本明細書に組み込む。これらの出版物は、本出願の出願日以前のそれらの開示についてだけ提供される。この関連で、本発明者らが、先願発明のためまたは他の理由で、そうした開示に先行する資格がないことを承認するものと解釈されるべきではない。すべての、日付に関する記述またはこれらの文書の内容に関する表現は、出願者らが利用できる情報をもとにしており、これらの文書の日付または内容の正確さに関して何ら承認を構成するものではない。
均等物
【０５１９】
好ましい実施形態を本明細書で詳細に表現し、説明してきたが、本発明の趣旨を逸脱することなく、様々な改変、付加、置換などを行うことができ、したがって、これらは、以下の特許請求の範囲において定義されるような本発明の範囲内にあると考えられることは、当業者に明らかであろう。さらに、すでに示されてはいない程度に、本明細書で説明し例示する様々な実施形態のいずれか１つを、本明細書で開示する他の実施形態のいずれかにおいて示されている特徴を組み込むようにさらに改変できることを、当業者は理解されよう。

【図１】




凍結乾燥条件

| 種類 | ステップ | シェルフ温度 (°C min⁻¹) | ランプ (°C min⁻¹) | 保持 (min) | 真空 (mbar) |
|---|---|---|---|---|---|
| P<br>P+S | 凍結 | -40 | 0.8 | 480 | N/A |
| P | 一次乾燥 | -20 | 0.2 | 2400 | 100 |
| P+S | 二次乾燥 | 4 | 0.2 | 620 | 100 |

可溶化比

| 調製した細胞の種類 | 使用した試験 | 細胞質量 [mg] | $H_2O$ 体積 [mL] | 最大溶解度 [mg/mL] | 最大 w/v [%] |
|---|---|---|---|---|---|
| P<br>PS | 温度／時間安定性 | 15 | 985 | 15 | 1.5 |
| 精製したままオートクレーブ処理 | ローディング試験 | 20 | 980 | 20 | 2.0 |
| 精製したままオートクレーブ処理 | ローディング試験 | 40 | 960 | 40 | 4.0 |
| 精製したままオートクレーブ処理 | ローディング試験 | 80 | 920 | 80 | 8.0 |

FIG. 1

【図２】

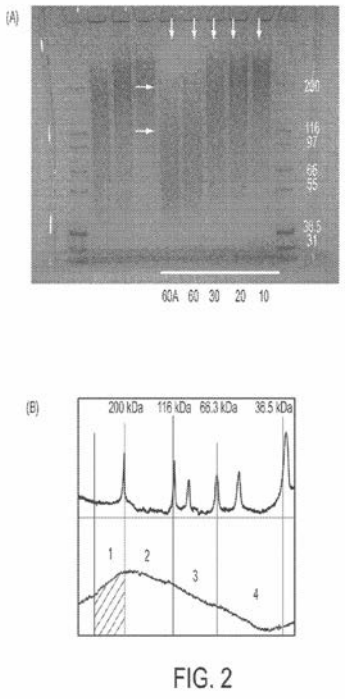



FIG. 2

【図３Ａ】

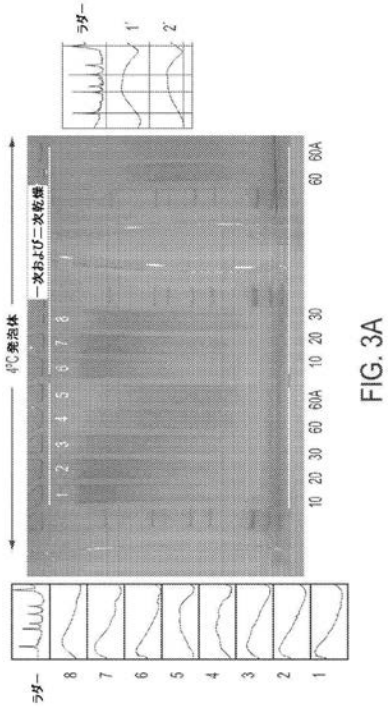



FIG. 3A

【図３Ｂ】

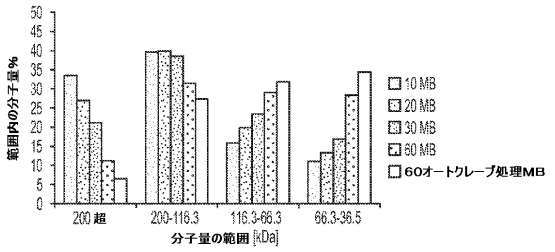



FIG. 3B

【図３Ｃ】

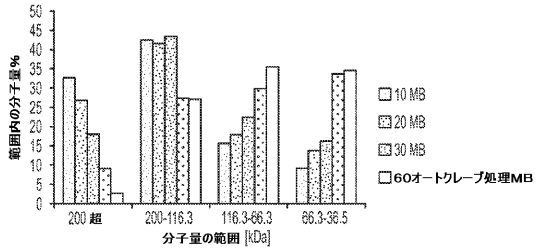



FIG. 3C

【図４Ａ】

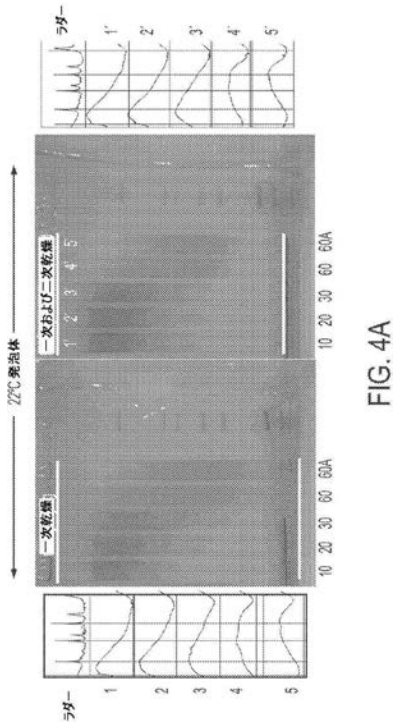



FIG. 4A

【図４Ｂ】

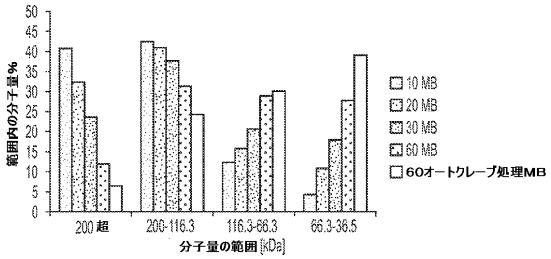



FIG. 4B

【図４Ｃ】

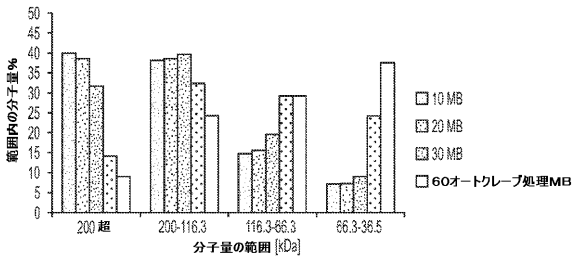



FIG. 4C

【図５Ａ】

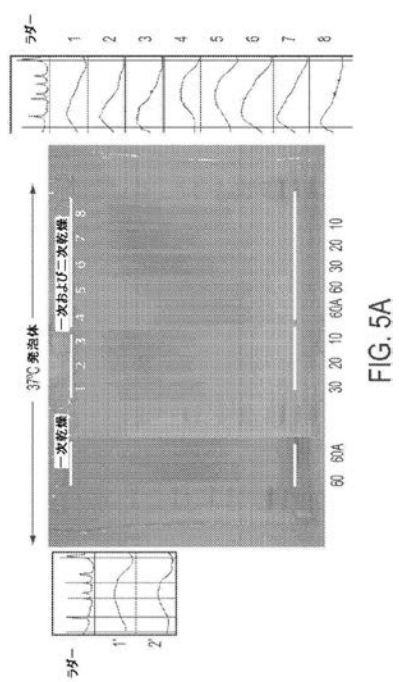



FIG. 5A

【図５Ｂ】

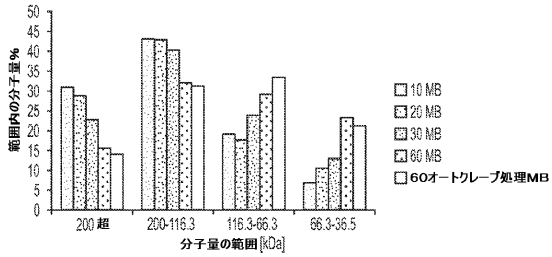



FIG. 5B

【図５Ｃ】

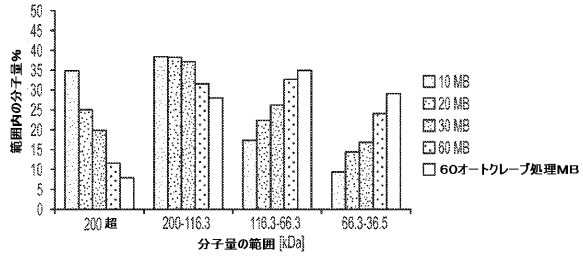



FIG. 5C

【図６Ａ－Ｄ】

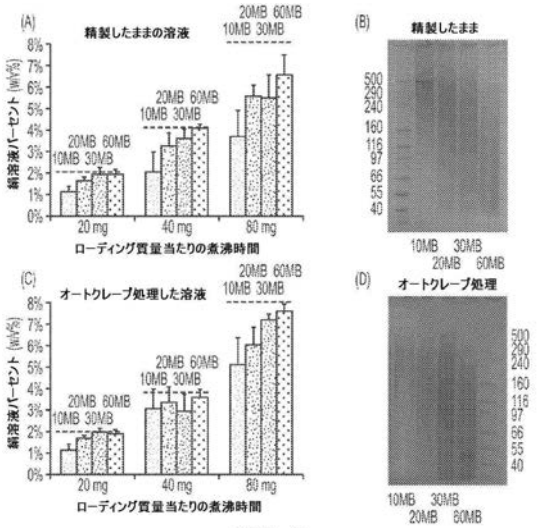



FIG. 6

【図６Ｅ】

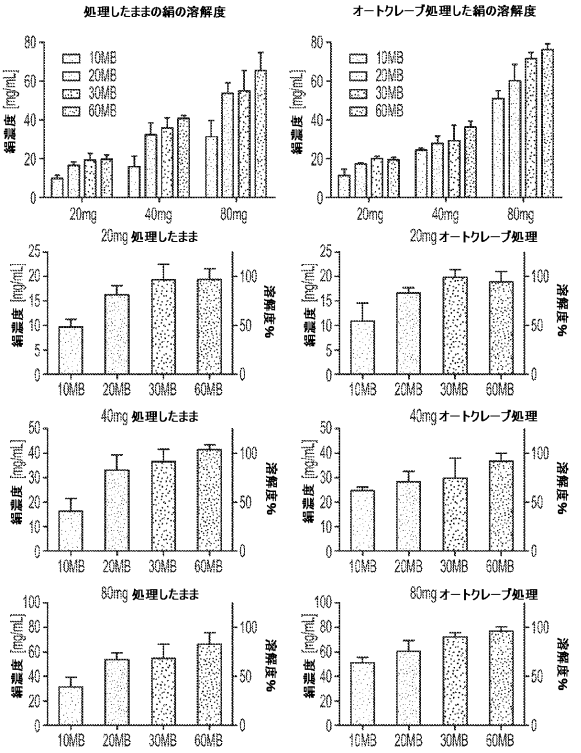



FIG. 6E

【図７】

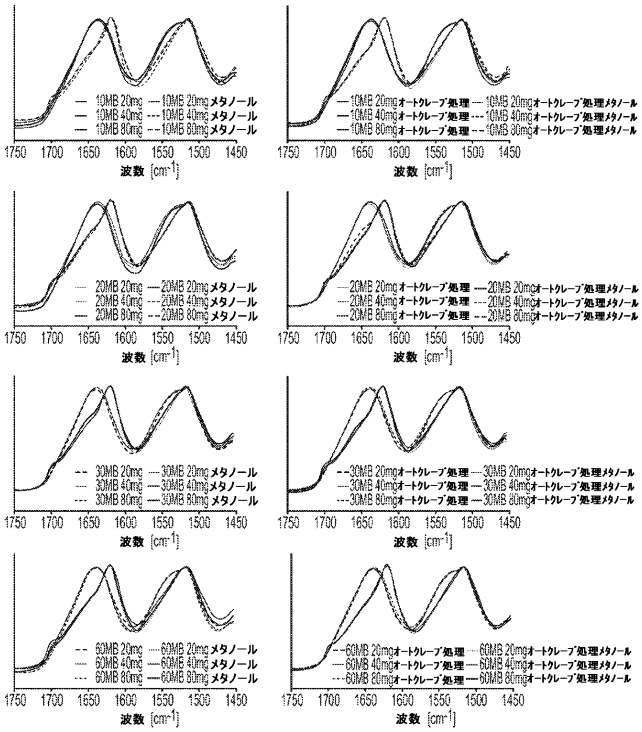



FIG. 7

【図８】

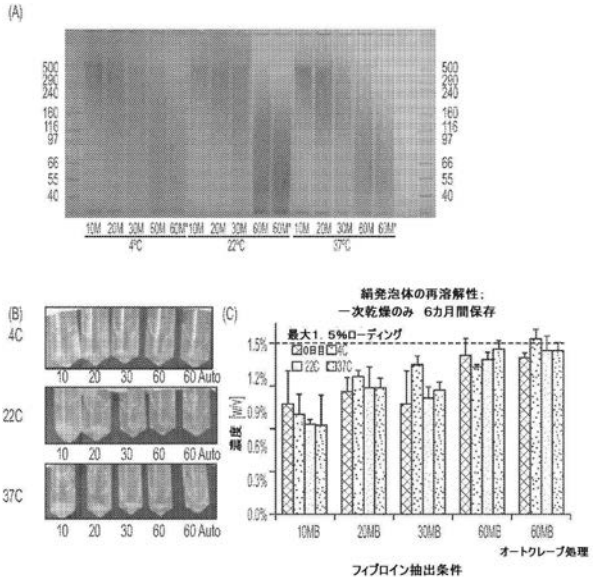



FIG. 8

【図９】

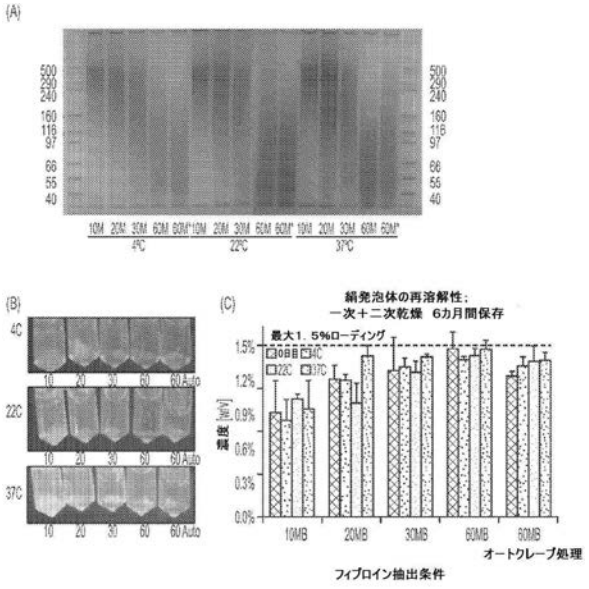



FIG. 9

【図１０】

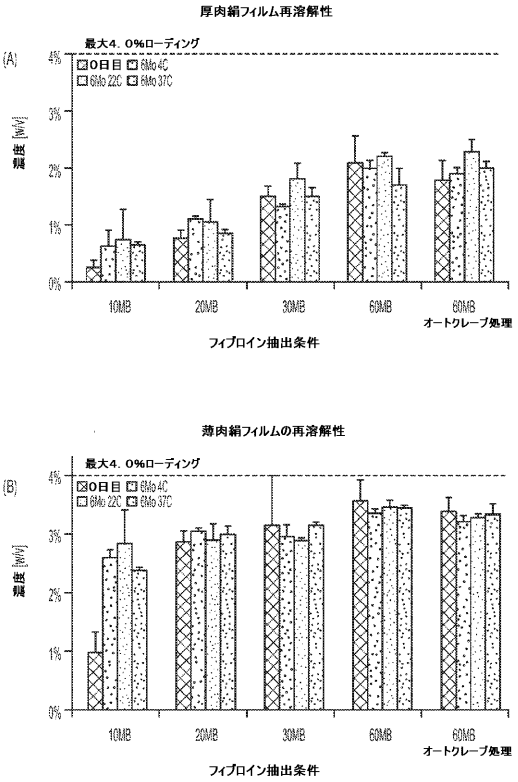



FIG. 10

【図１１】

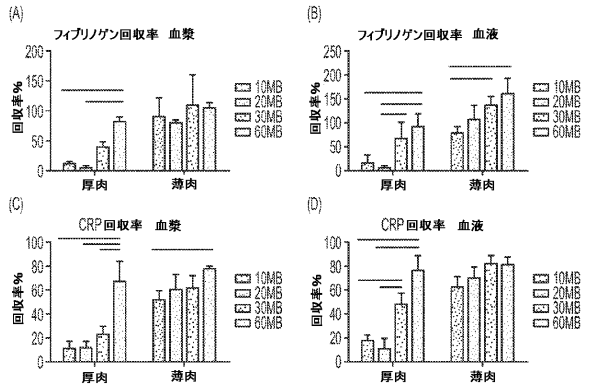



FIG. 11

【図１２】

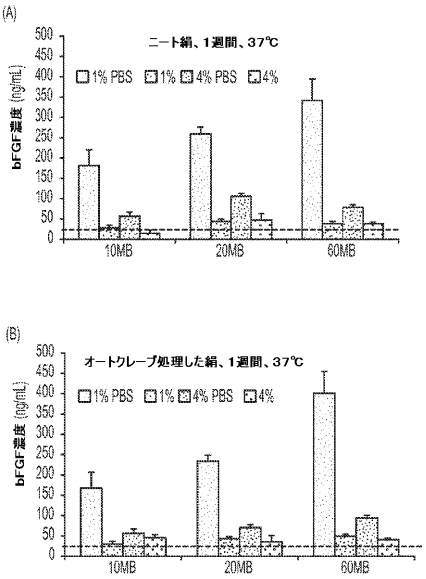



FIG. 12

【図１３】

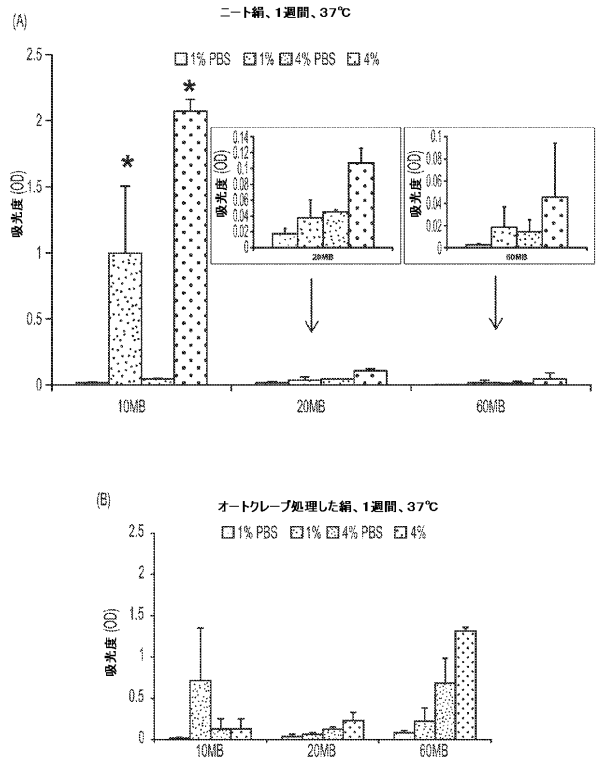



FIG. 13

【図１４Ａ】

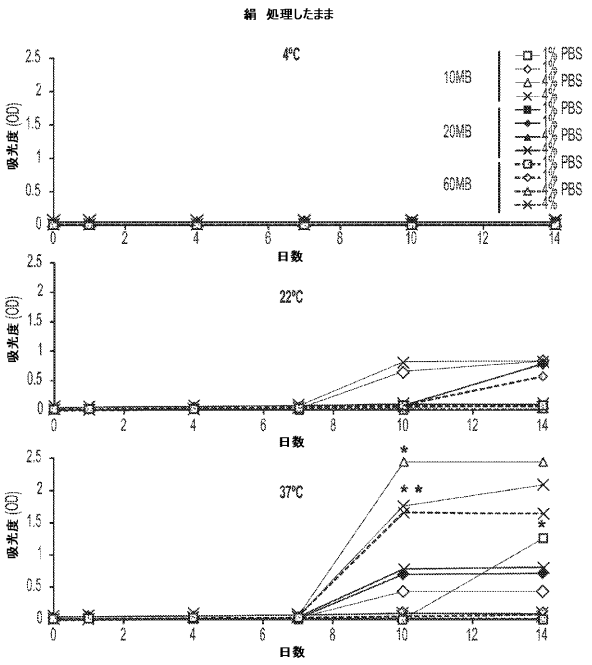



FIG. 14A

【図１４Ｂ】

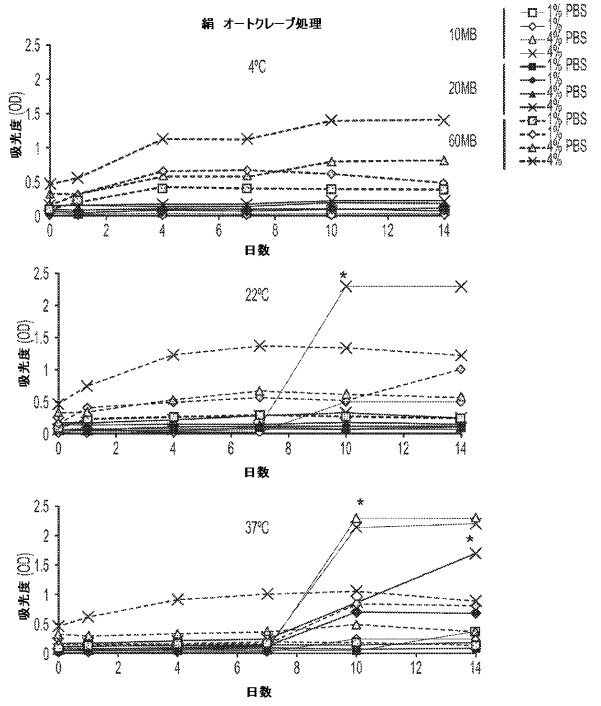



FIG. 14B

【図１５】

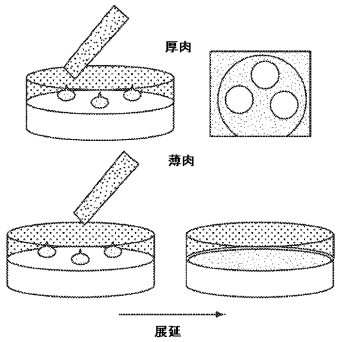



FIG. 15

【図１６】

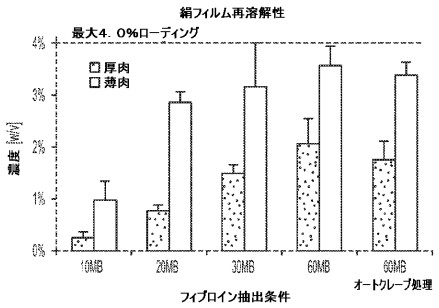



FIG. 16

【図１７】

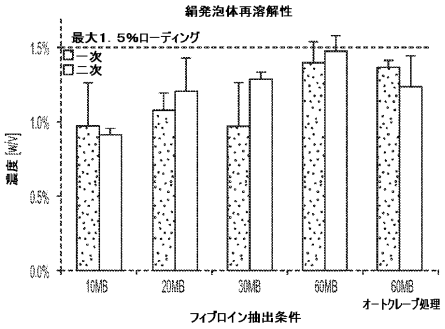



FIG. 17

【図１８】

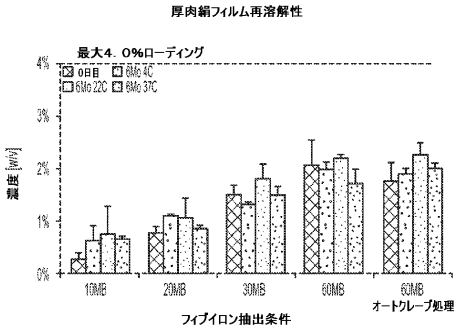



FIG. 18

【図１９】

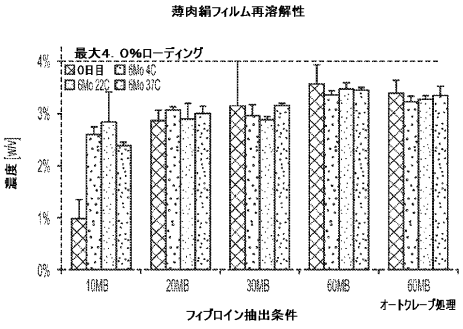



FIG. 19

【図２０】

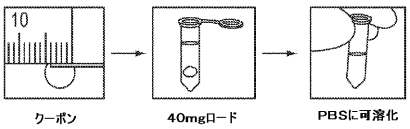



FIG. 20

【図２１】

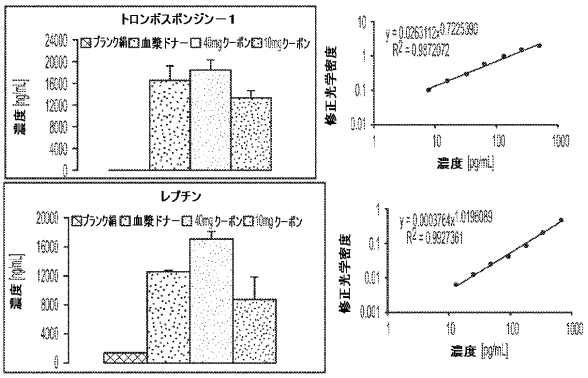



FIG. 21

【図２２】

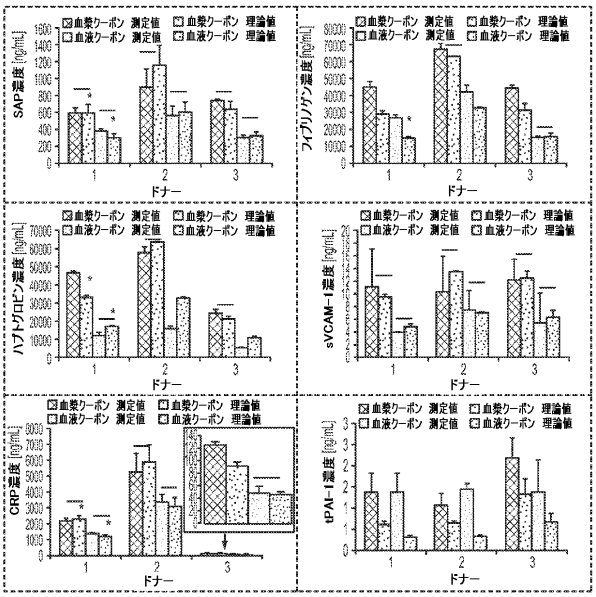



FIG. 22

【図２３】

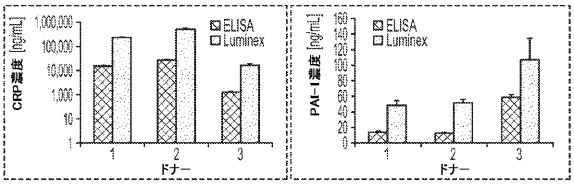



FIG. 23

【図２４】

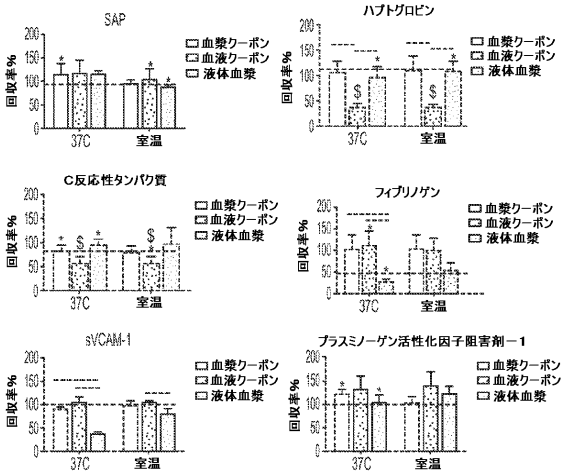



FIG. 24

【図２５】

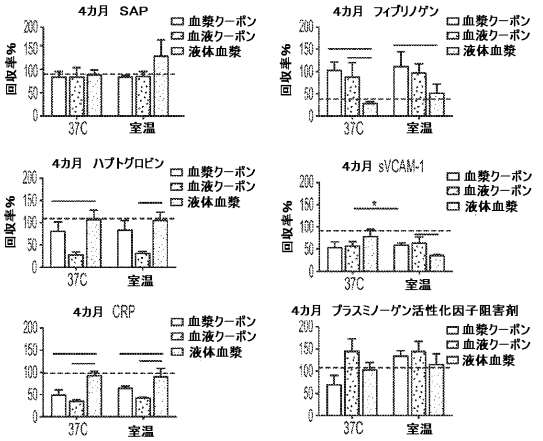



FIG. 25

【図２６】

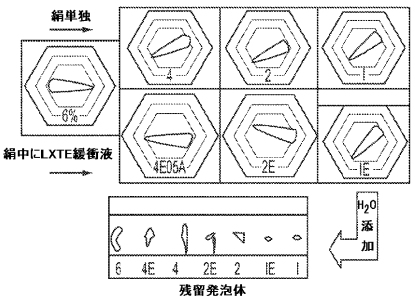



FIG. 26

【図２７】

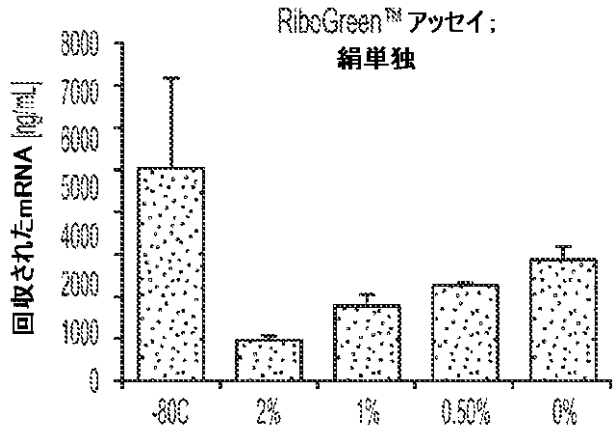



FIG. 27

【図２８】

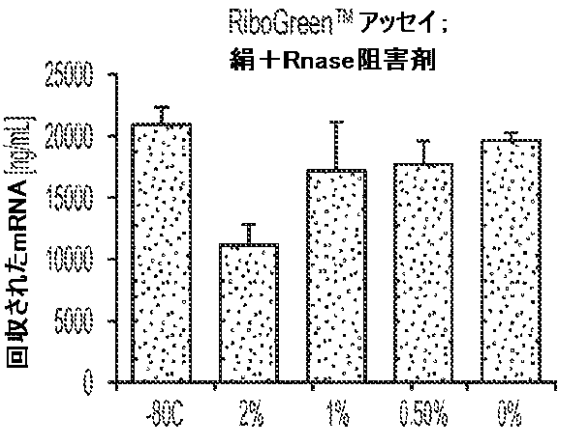



FIG. 28

【図２９】

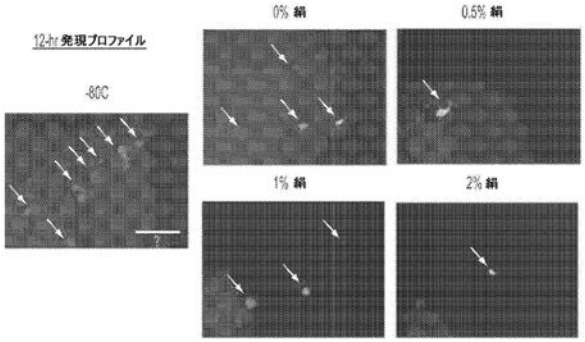



FIG. 29

【図３０】

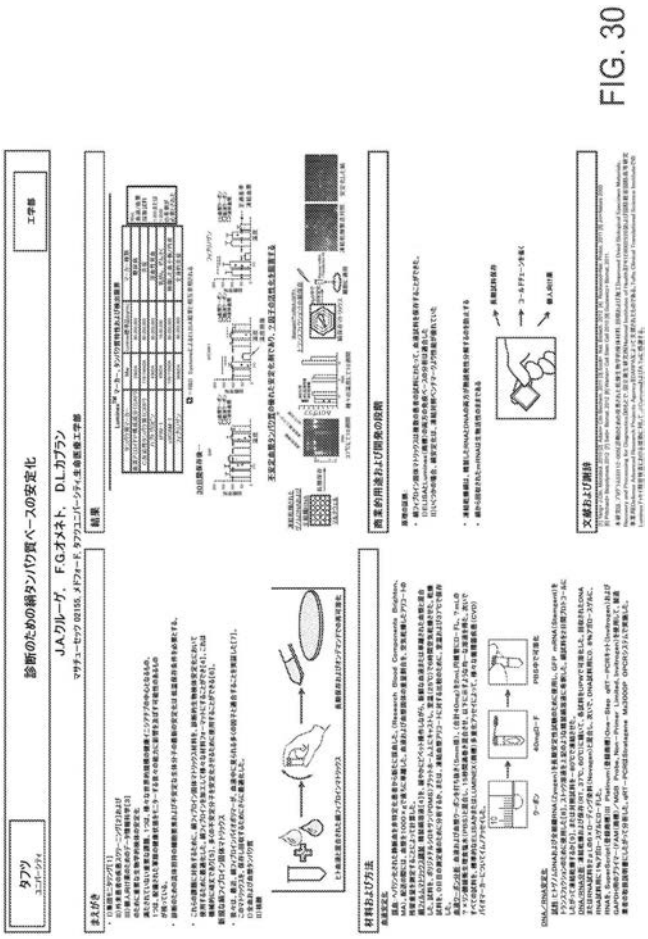


FIG. 30

【配列表】

2021080277000001.app

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/883,732
(32)優先日 平成25年9月27日(2013.9.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 61/909,687
(32)優先日 平成25年11月27日(2013.11.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(72)発明者 ジョナサン エー. クルーゲ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１７７２, サウスボロー, ディアフット ロード ５１
(72)発明者 フィオレンゾ ジー. オメネト
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４２１, レキシントン, コンコード アベニュー ５０３

Ｆターム(参考) 4B029 AA09 BB15 BB20 GB09 HA06
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA51 EA34 EA60 FA65 FA71 GA01
GA10

【外国語明細書】
2021080277000001.pdf