



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109477252 A

(43)申请公布日 2019.03.15

(21)申请号 201780022943.6

E·斯克兰 D·斯特恩

(22)申请日 2017.02.12

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

(30)优先权数据

代理人 王永伟 赵蓉民

PCT/IL2016/050874 2016.08.10 IL

(51)Int.Cl.

62/293,880 2016.02.11 US

D01F 8/02(2006.01)

62/317,572 2016.04.03 US

A61F 2/02(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C12N 1/38(2006.01)

2018.10.11

A61K 38/17(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2017/050175 2017.02.12

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/138002 EN 2017.08.17

(71)申请人 赛威克斯材料科学公司

权利要求书2页 说明书50页

地址 以色列,耶路撒冷

序列表10页 附图67页

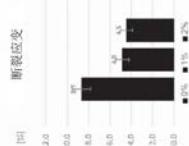
(72)发明人 S·艾特塔禾 M·史梅

(54)发明名称

包括合成拖丝蜘蛛丝的复合材料

(57)摘要

提供基于聚合物和衍生自MaSp(大壶状腺丝蛋白)蛋白的蛋白质混合物的复合材料。进一步，提供其制备方法和复合材料使用方法。



1. 复合材料，其包括蛋白质混合物和至少一种聚合物，其中：所述蛋白质混合物包括分子量不同的“m”种类型的蛋白质，其中所述混合物中的各蛋白质独立地包括大壶状腺丝蛋白(MaSp)的重复性区域、或其功能性同系物、变体、衍生物或片段的“n”个重复段，其中m和n独立地是2至70之间的整数。

2. 权利要求1所述的复合材料，其中所述蛋白质混合物的特征在于，选自下列的一种或多种性质：

- (a) 各重复段具有2kDa至3.5kDa范围内的分子量；
- (b) ‘n’与‘m’的比在1.5:1至1:1.5的范围内。

3. 权利要求1-2中任一项所述的复合材料，其中所述蛋白质混合物是纤维形式。

4. 权利要求1-3中任一项所述的复合材料，其中至少一种聚合物是非MaSp蛋白衍生聚合物。

5. 权利要求1-4中任一项所述的复合材料，其中各所述蛋白质独立地包括SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列：

(X₁)_zX₂GP^GGYGPX₃X₄X₅GPX₆GX₇GGX₈GP^GPGX₉X₁₀,

其中X₁在每种情况中独立地是A或G，其中(X₁)_z的至少50%是A，Z是5至30之间的整数；X₂是S或G；X₃是G或E；X₄是G、S或N；X₅是Q或Y；X₆是G或S；X₇是P或R；X₈是Y或Q；X₉是G或S；和X₁₀是S或G。

6. 权利要求1-5中任一项所述的复合材料，其中所述重复性区域包括SEQ ID NO:3 (AA AAAAASPGGYGPGSQGPGSPGGYGPGGPGSS) 所示的氨基酸序列。

7. 权利要求1-6中任一项所述的复合材料，其特征在于与不含所述蛋白质混合物的所述聚合物的性质相比至少一种改善的机械性质，其中所述性质选自：杨氏模量、拉伸强度、破裂应变、屈服点、韧性、失效前效能、冲击强度、撕裂强度、挠曲模量、弯曲应变和具体伸长百分比时应力。

8. 权利要求1-7中任一项所述的复合材料，其中所述聚合物是合成聚合物、热塑性聚合物、热固性材料、环氧化物、聚酯、聚酰胺、多元醇、聚氨酯、聚乙烯、尼龙、聚丙烯酸酯、聚碳酸酯、聚乳酸(PLA)或其共聚物、硅、液晶聚合物、马来酸酐接枝聚丙烯、聚己内酯(PCL)、橡胶、纤维素、或其任何组合。

9. 权利要求1-8中任一项所述的复合材料，其中所述蛋白质的总浓度在所述复合材料的总重量的约0.1重量%至约10重量%的范围内。

10. 权利要求1所述的复合材料，其具有至少0.5微米厚的层。

11. 权利要求3所述的复合材料，其中所述纤维的特征在于至少30%的孔隙率。

12. 制品，其包括权利要求1-10中任一项所述的复合材料。

13. 权利要求12所述的制品，其包括可生物相容的材料或可植入的材料。

14. 药物组合物，其包括权利要求1-10中任一项所述的复合材料和药学上可接受的载体。

15. 制备权利要求1-10中任一项所述的复合材料的方法，包括步骤：将所述蛋白质混合物附接至所述聚合物，从而形成所述复合材料。

16. 权利要求15所述的方法，包括步骤：熔融所述聚合物以产生熔融聚合物，和将所述蛋白质混合物转化到所述熔融聚合物中。

17. 权利要求15和16中任一项所述的方法,包括步骤:溶解所述聚合物以产生溶解聚合物,和将所述蛋白质混合物转化到所述熔融聚合物中。

18. 权利要求15-17中任一项所述的方法,包括步骤:挤出所述聚合物。

19. 权利要求15-18中任一项所述的方法,包括通过连续电纺形成一层或多层所述蛋白质。

20. 组合物,其包括:(a) 包括分子量不同的“m”种类型的蛋白质的纤维,其中所述“m”种类型的蛋白质中的各蛋白质独立地包括大壶状腺丝蛋白(MaSp)的重复性区域、或其功能性同系物、变体、衍生物或片段的“n”个重复段,其中m和n独立地是2至70之间的整数;和(b) 可生物相容的材料、细胞培养基、细胞、或其任何组合。

21. 权利要求20所述的组合物,其中所述可生物相容的材料是组织骨架、医疗装置、伤口护理敷料、或外科缝线。

22. 提高细胞迁移、提高细胞增殖、抑制细胞死亡、提高细胞附接、或其任何组合的方法,包括使所述细胞与组合物接触,所述组合物包括纤维,所述纤维包括分子量不同的“m”种类型的蛋白质,其中所述“m”种类型的蛋白质中的各蛋白质独立地包括大壶状腺丝蛋白(MaSp)的重复性区域、或其功能性同系物、变体、衍生物或片段的“n”个重复段,其中m和n独立地是2至70之间的整数。

23. 权利要求22所述的方法,其中将所述组合物粘附到表面上。

24. 权利要求22所述的方法,其中将所述组合物与细胞培养基混合。

25. 在表面上组装预定数量细胞层的方法,包括:将预定量的纤维施加至所述表面,所述纤维包括分子量不同的“m”种类型的蛋白质,其中所述“m”种类型的蛋白质中的各蛋白质独立地包括大壶状腺丝蛋白(MaSp)的重复性区域、或其功能性同系物、变体、衍生物或片段的“n”个重复段,其中m和n独立地是2至70之间的整数,其中所述预定量与细胞层的预定数量相关。

26. 权利要求23中所述的方法,其中细胞层的所述预定数量在1至4个细胞层之间。

27. 权利要求24中所述的方法,其中1层需要: 1×10^3 至 8×10^5 个所述纤维/ cm^2 。

28. 权利要求24中所述的方法,其中2层需要: 4×10^5 至 18×10^5 个所述纤维/ cm^2 。

29. 权利要求24中所述的方法,其中3至4层需要:多于 18×10^5 个所述纤维/ cm^2 。

30. 权利要求25中所述的方法,其中所述方法是体外或离体方法。

包括合成拖丝蜘蛛丝的复合材料

[0001] 本申请要求2016年2月11日提交的美国临时专利申请号62/293,880、2016年4月3日提交的美国临时专利申请号62/317,572、和2016年8月10日提交的PCT专利申请PCT/IL2016/050874的优先权权益。以上文件的内容其整体通过引用并入,如同其在本文中被完全展示。

发明领域

[0002] 本发明在其一些实施方式中涉及基于衍生自MaSp(大壶状腺丝蛋白(major ampullate spidroin))蛋白的蛋白质的复合材料及其制备。

发明背景

[0004] 拖丝蜘蛛丝在本领域中被称为由织网蜘蛛(orb-web weaving spider)在它们跌落或逃离危险时构建它们的网的框架和幅射线以及生命线所使用的丝。为了能够完成这些任务,由于高弹性和强度的组合,拖丝纤维(dragline fiber)显示出非常高的韧性,这使其成为最坚韧的纤维,无论是天然的还是人造的。例如,拖丝的强度是其直径的高强度钢的6倍,拖丝比凯夫拉(Kevlar)——其是曾经制备的最强的合成纤维之一——坚韧3倍。

[0005] 拖丝由两种主要多肽组成,通常被称为大壶状腺丝蛋白(MaSp)1和2,在十字园蛛(Araneus diadematus)中也被称为ADF-3和ADF-4。这些蛋白质的表观分子量在200-720kDa范围内,这取决于样品的年龄和分析条件。已知的拖丝蜘蛛丝蛋白由交替的富含丙氨酸的片段(在纤维中形成结晶的 β -片层)和富含甘氨酸的片段(其更具柔性并且主要缺乏有序结构)的高度重复的区段组成。 C -端区域不重复,在物种之间高度保守,并且采用 α -螺旋构象。拖丝蛋白的N-端区域也被发现在不同的蛛丝蛋白之间以及不同的蜘蛛物种之间高度保守。

[0006] 已经进行了许多尝试来合成地产生蜘蛛丝,如通过在组织培养中使用细菌、酵母、植物和哺乳动物细胞以及甚至转基因山羊进行基因工程。

[0007] 美国专利号8,461,301尤其涉及包含半合成蜘蛛丝蛋白结构域或其任何功能同系物、变体、衍生物、片段或突变体的多个重复的分离的氨基酸序列。该出版物通过引用以其全部并入本文。

[0008] 有关拖丝蜘蛛丝的其他出版物包括Ittah,S., et al. Biopolymers, 93 (5), 458-468, 2010; Ittah,S., et al. Biomacromolecules, 8 (9), 2768-2773, 2007; Ittah,S., et al., Biomacromolecules, 7 (6), 1790-1795, 2006; 和Huemerich,D., Ittah,S., et al., Current Biology, 14, 2070-2074, 2004。这些出版物其整体通过引用并入本文。

[0009] 使用基于蜘蛛丝的复合材料的各种应用已被提出,包括用于支架和植入物涂层、纺织品以及弹道学应用。

[0010] 对用于生产具有类似于天然蜘蛛丝机械性质的纤维的改进组合物和方法存在未满足的需求。

发明内容

[0011] 本发明尤其涉及基于衍生自MaSp(大壶状腺丝蛋白)蛋白的蛋白质的复合材料及

其制备。

[0012] 根据一些方面,提供了复合材料,其包括蛋白质混合物和至少一种聚合物,其中:蛋白质混合物包括分子量不同的“m”种类型的蛋白质,其中混合物中的每种蛋白质独立地包括大壶状腺丝蛋白(MaSp)的重复性区域、或其功能性同系物、变体、衍生物或片段的“n”个重复段(repeat),其中m和n独立地是2至70之间的整数。

[0013] 在一些实施方式中,蛋白质混合物的特征在于选自下列的一种或多种性质:

[0014] (a) 每个重复段具有2kDa至3.5kDa范围内的分子量;

[0015] (b) 'n' / 'm' 的比在2:1至1:2的范围内。

[0016] 在一些实施方式中,蛋白质混合物是纤维形式。在一些实施方式中,纤维通过连接体附接至聚合物。在一些实施方式中,蛋白质混合物附接至聚合物的至少一个表面。

[0017] 在一些实施方式中,'n' / 'm' 的比在2:1至1:2的范围内。在一些实施方式中,'n' / 'm' 的比在1.8:1至1:1.8的范围内。在一些实施方式中,'n' / 'm' 的比在1.6:1至1:1.6的范围内。在一些实施方式中,'n' / 'm' 的比在1.5:1至1:1.5的范围内。在一些实施方式中,'n' / 'm' 的比在1.3:1至1:1.3的范围内。在一些实施方式中,'n' / 'm' 的比在1.2:1至1:1.2的范围内。在一些实施方式中,'n' / 'm' 的比在1.1:1至1:1.1的范围内。在一些实施方式中,至少一种聚合物是非MaSp蛋白衍生聚合物。

[0018] 在一些实施方式中,各蛋白质独立地包括SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列

[0019] $(X_1)_z X_2 GPGGYGPX_3 X_4 X_5 GPX_6 GX_7 GGX_8 GPGGPGX_9 X_{10}$,

[0020] 其中 X_1 在每种情况中独立地是A或G,其中 $(X_1)_z$ 的至少50%是A,Z是5至30之间的整数; X_2 是S或G; X_3 是G或E; X_4 是G、S或N; X_5 是Q或Y; X_6 是G或S; X_7 是P或R; X_8 是Y或Q; X_9 是G或S;和 X_{10} 是S或G。

[0021] 在一些实施方式中,重复性区域包括SEQ ID NO:3 (AAAAAAAASPGGYGPGSQGPGSSGYGPGGPGSS) 所示的氨基酸序列。

[0022] 在一些实施方式中,复合材料的特征在于,与不含蛋白质混合物的聚合物的性质相比,至少一种改善的机械性质。在一些实施方式中,该性质选自:杨氏模量、拉伸强度、破裂应变、屈服点、韧性、失效前效能(work to failure)、冲击性、撕裂强度、挠曲模量、弯曲应变和伸长应力(stress at elongation)。

[0023] 在一些实施方式中,选自杨氏模量、拉伸强度、屈服点、和伸长应力的至少一种性质提高至少5%。在一些实施方式中,杨氏模量提高至少200%。在一些实施方式中,拉伸强度提高至少40%。在一些实施方式中,屈服点提高至少40%。

[0024] 在一些实施方式中,复合材料的特征在于结构强度,其中多于10%的结构强度源自蛋白质混合物。

[0025] 在一些实施方式中,复合材料的特征在于拉伸强度,其中多于10%的拉伸强度源自蛋白质混合物。

[0026] 在一些实施方式中,聚合物是合成聚合物。在一些实施方式中,聚合物是热塑性聚合物。在一些实施方式中,聚合物是热固性材料。在一些实施方式中,聚合物是环氧化物。在一些实施方式中,聚合物是聚酯。在一些实施方式中,聚合物选自聚酰胺、聚氨酯、尼龙、和聚丙烯酸酯、聚碳酸酯、和硅。在一些实施方式中,聚合物是交联聚合物。在一些实施方式中,聚合物是共聚物。在一些实施方式中,聚合物是水凝胶形式。

[0027] 在一些实施方式中，聚合物选自液晶聚合物、马来酸酐接枝聚丙烯、聚酰胺、尼龙4,6、尼龙6、尼龙6,6、尼龙11、尼龙12、聚(芳酰胺)、聚乙烯、聚对苯二甲酸丁二酯、聚对苯二甲酸乙二酯、聚苯硫醚、聚邻苯二甲酰胺、聚丙烯、聚(偏二氟乙烯)、聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)(pHEMA)、聚氨酯、聚乙烯醇缩丁醛、乙烯乙烯醇共聚物、聚乳酸(PLA)、聚己内酯(PCL)、黄原胶(xanthan)、纤维素、胶原蛋白、弹性蛋白、角蛋白、棉、橡胶、纤维素、羊毛和其任何组合或混合物。

[0028] 在一些实施方式中，聚合物选自粘合性和内聚性材料。在一些实施方式中，粘合性和内聚性材料选自环氧物、氨基丙烯酸酯、聚酯、多元醇、聚氨酯、和聚酰亚胺。

[0029] 在一些实施方式中，蛋白质的总浓度在复合材料总重量的约0.1重量%至约10重量%的范围内。在一些实施方式中，该浓度在约0.5重量%至约3重量%的范围内。

[0030] 在一些实施方式中，蛋白质混合物和聚合物基本上连续接触。

[0031] 在一些实施方式中，本公开的复合材料具有至少0.5微米厚的层。

[0032] 根据一些方面，提供了包括蛋白质混合物的纤维，其中蛋白质混合物包括分子量不同的“m”种类型的蛋白质，其中混合物中的每种蛋白质独立地包括大壶状腺丝蛋白(MaSp)的重复性区域、或其功能性同系物、变体、衍生物或片段的“n”个重复段，其中m和n独立地是2至70之间的整数，并且其中纤维附接至至少一种连接体。

[0033] 在一种实施方式中，“m”种类型的蛋白质或蛋白质混合物是本文描述的纤维形式。在一种实施方式中，“m”种类型的蛋白质或蛋白质混合物是分子间结合的。在一种实施方式中，“m”种类型的蛋白质或蛋白质混合物是以本文描述的纤维形式分子间结合的。在一种实施方式中，分子间结合是非共价结合。在一种实施方式中，分子间结合是通过范德华键、离子键、静电键、氢键、或其任何组合。在一种实施方式中，“蛋白质混合物”包括“m”种类型的蛋白质和/或纤维或由“m”种类型的蛋白质和/或纤维组成。在一种实施方式中，“m”种类型的蛋白质是“m”种类型的肽、或“m”种类型的多肽、或“m”种类型的多肽和肽的混合物。

[0034] 在一些实施方式中，多个纤维通过连接体彼此附接。

[0035] 根据一些方面，提供了包括本公开的复合材料的制品。在一些实施方式中，制品在生理条件下是稳定的。在一些实施方式中，制品是医疗装置。在一些实施方式中，医疗装置是可植入的医疗装置。在一些实施方式中，可植入的医疗装置选自人工脉管移植物、人工心脏泵隔膜、组织骨架(tissue scaffold)、矫形植入物、导管和支架。

[0036] 在一些实施方式中，制品选自：丸剂、片剂、胶囊和凝胶胶囊。在一些实施方式中，制品包括织物。

[0037] 在一些实施方式中，制品的特征在于选自下列的一种或多种性质：热绝缘、导热性、电绝缘、光导性和折射性。

[0038] 根据一些方面，提供了制备包括蛋白质混合物和至少一种聚合物的方法，其中：蛋白质混合物包括分子量不同的“m”种类型的蛋白质，其中混合物中的每种蛋白质独立地包括大壶状腺丝蛋白(MaSp)的重复性区域、或其功能性同系物、变体、衍生物或片段的“n”个重复段，其中m和n独立地是2至70之间的整数，方法包括附接蛋白质混合物至聚合物以形成复合材料的步骤。

[0039] 在一些实施方式中，方法包括使聚合物熔融以产生熔融聚合物和将蛋白质混合物转化到熔融聚合物中的步骤。

[0040] 在一些实施方式中,方法包括使聚合物溶解以产生溶解聚合物和将蛋白质混合物转化到熔融聚合物中的步骤。

[0041] 在一些实施方式中,方法包括挤出聚合物的步骤。

[0042] 在一些实施方式中,方法包括通过连续电纺形成一层或多层蛋白质。

[0043] 除非另有限定,本文使用的所有技术和/或科学术语均与本发明所属领域普通技术人员的普遍理解具有相同的含义。虽然本文所述那些的相似或等效方法和材料可用于本发明实施方式的实践和检验,但下文仍描述了示例性的方法和/或材料。在有冲突的情况下,以本专利的说明书(包括定义)为准。另外,材料、方法和实例仅仅是示例性的,而非意图必然限制。

附图说明

[0044] 本文参考附图仅作为实例描述了本发明的一些实施方式。现在在详细具体参考附图的情况下,请注意,所示具体内容是作为实例的并且目的是示例性讨论本发明的实施方式。关于这点,伴以附图进行的描述使得本发明的实施方式可如何实践对于本领域技术人员是显而易见。

[0045] 图1展示了条形图,显示具有不同(0%、1%、2%)浓度(wt.)的本公开蛋白质富集的环氧氧化物EP-520的拉伸强度(左图)、杨氏模量(中图)和断裂应变(右图)。

[0046] 图2展示了扫描电子显微镜(SEM)图像,显示本公开的蛋白质纤维在EP-520上的粘附(2%富集度)。纤维的粘附似乎在聚合物上产生腔洞(左图),而在一些情况下观察到了纤维周围无腔洞的更好粘附(右图,显示具有 $3.165\mu\text{m}$ 长度和约 215nm 直径的粘附纤维)。

[0047] 图3展示了条形图,显示具有1%浓度(wt.)的蛋白质富集的环氧氧化物EP-502的拉伸强度(左图)、杨氏模量(中图)和断裂应变(右图),与对照(无富集或碳纳米管(CNT)富集)进行比较。

[0048] 图4A-E展示了拉伸测试结果,包括热固性PU的杨氏模量(图4A)、30%伸长时的应力(图4B)和30%伸长时的韧性(图4C)、100%伸长时的应力(图4D)和100%伸长时的韧性(图4E)。全部均对对照膜和SS富集膜进行,如各图的嵌图(从左至右)所示。结果以平均值±SD展示($n=5$,来自相同膜的不同条带,用于各条件)。

[0049] 图5A-B展示了显示负载百分比不同(从下曲线至上曲线分别为对照,3%,和5%)的热固性PU的富集批次的撕裂强度(图5A)和曲线(图5B)的图。

[0050] 图6A-C展示了条形图,显示:具有不同(0%、1%、3%)浓度(wt.)的本公开蛋白质富集的聚合物Tecoflex®SG-93A的杨氏模量(图6A)、撕裂测试(图6B)和撕裂强度(图6C)。

[0051] 图7展示了条形图,显示富集1%至3%本公开蛋白质的U-2047vs普通(plain)U-2047对照(无蛋白质富集)的杨氏模量(左图)和拉伸强度(右图)。

[0052] 图8展示了条形图,显示富集1%至3%本公开蛋白质的U-2047vs普通U-2047对照(无蛋白质富集)的破裂应变(左图)和失效前效能(右图)。

[0053] 图9A-F展示了显示具有 140 和 $250\mu\text{m}$ 纤维(2%富集;图9A-B涉及挤出后的尼龙12线)的尼龙12的应力-应变测量结果(图9A,分别右图和左图)的图。图9B展示了尼龙12中2%富集的蛋白质纤维的代表性SEM图像。图9C-E展示了注塑尼龙12狗骨的杨氏模量(图9C)、屈服点(图9D)和2%富集(上图)的应力-应变曲线(图9E)。图9F显示了2%SS富集的聚乳酸

(PLA) 样本的应力-应变图(应变=1时,上曲线)的提高。

[0054] 图10展示了作为对照批次的电纺11% (w/w) 热塑性聚氨酯(TPU) 纤维的图像(比例条:左图,200 μm ;右图,100 μm)。

[0055] 图11展示了电纺纤维~10.5% (w/w) TPU+~2% (w/w) 填充剂(SS) 的图像(比例条:左图中200 μm ;右图中100 μm)。

[0056] 图12展示了显示9、11、和13% w/w的TPU(SG-60) 固体含量时对照批次的流变行为的图。

[0057] 图13A-B展示了流变行为图,显示当增加加入SG-60的填充剂量时,粘度增加,但流变行为保持不受影响。

[0058] 图14展示了条形图,显示由9% w/w SG60(左) 和11% w/w SG60(右) 与本公开的纤维以及与填充剂(0、1%、2%、或3%) 制成的电纺网的杨氏模量测量结果。

[0059] 图15展示了9% w/w配置的应力-应变曲线。

[0060] 图16展示了11% w/w配置的应力-应变曲线。

[0061] 图17展示了11% w/w配置的弹性区域的放大图。显示在弹性区域中富集网具有较高值,其后存在掉换并且对照网具有较高值。

[0062] 图18显示不同批次的PCL电纺网材料的应力-应变曲线,证明1.33%蜘蛛丝富集产生最佳结果。

[0063] 图19展示了PCL电纺的机械性质统计:杨氏模量(左图)、拉伸强度(中图)、和断裂伸长率(右图)。

[0064] 图20展示了电纺Bombyx Mori(BM) 涂覆支架的照片,显示支架金属杆之间的纳米纤维,形成纳米网。

[0065] 图21展示了电纺Bombyx Mori(BM) 涂覆支架的光学显微图像,显示支架金属杆之间的纳米纤维,形成纳米网。

[0066] 图22展示了电纺蜘蛛丝(SS) 涂覆支架的照片(左) 和光学显微,显示支架金属杆上纳米纤维形成,和形成涂层。

[0067] 图23展示了照片,显示膜涂覆支架——利用支架在BM六氟异丙醇(HFIP) 溶液中的浸涂。

[0068] 图24展示了不同尺度的SEM图像,显示由溶解在HFIP中的Bombyx Mori纤维的溶液制成的纳米纤维电纺网(约90至630nm)。比例条以 μm 表示,自左上顺时针方向:100、10、2、和5。

[0069] 图25展示了SEM图像,显示由溶解在HFIP中的蜘蛛丝纤维的溶液制成的纳米纤维电纺网。比例条以 μm 表示,自左上顺时针方向:100、10、1、500、2和5。

[0070] 图26展示了SEM图像,显示蛋白质纤维在聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)(P-HEMA) 中的聚集体。比例条是1 μm 。

[0071] 图27展示了SEM图像,显示在VeroClear中具有2%富集的蛋白质纤维。比例条是2 μm 。

[0072] 图28展示了SEM图像,显示SS冻干纤维。比例条以 μm 表示,从左至右:2和10。左图中的数字指示直径大小(179nm至1.34 μm)

[0073] 图29A-C展示了显示VeroClear富集的动态机械分析(DMA) 的图。提高展现为Tan δ

峰的右移。图29A显示储能模量。图29B显示损耗模量。图29B展示了Tanδ测试。

[0074] 图30展示了下文实施例部分(例如,实施例6)中描述的反应之前活化缓冲剂中的纤维的显微镜检查(比例条是400μm)。

[0075] 图31展示了下文实施例部分(例如,实施例6)中描述的反应10min后缀合缓冲剂中的纤维的显微镜检查(比例条是400μm)。

[0076] 图32展示了下文实施例部分(例如,实施例6)中描述的反应30min后缀合缓冲剂中的纤维的显微镜检查(比例条是400μm)。

[0077] 图33展示了如下文实施例部分(例如,实施例6)所述对活化缓冲剂执行涡流后的显微镜检查。未观察到纤维形状和尺寸的变化(比例条是400μm)。

[0078] 图34展示了涂覆硅(coated silicon)的显微镜图像(有机相在左,水相在右)。

[0079] 图35展示了涂覆硅的显微镜图像的更近观察(有机相在左,水相在右)。

[0080] 图36展示了环境扫描电子显微(ESEM)图像,显示在到达纤维涂覆表面之前(左)和之后(右)的大液滴。箭头指向变化中的一个液滴。白色线/带是轮廓,纤维的本体较深暗。

[0081] 图37展示了ESEM图像,显示围绕纤维但不在纤维上形成的液滴。左图上的箭头显示基材上的液滴(这在纤维表面上是看不到的)。右图上的箭头显示沉浸纤维表面的水量上升,而表面上无液滴形成。

[0082] 图38展示了ESEM图像,显示水量上升和润湿纤维导致纤维周围更深暗的光环(halo)。右图上纤维周围水滴清晰可见,而无液滴在表面上形成。比例条是50μm。

[0083] 图39展示了纤维素纤维的ESEM图像,显示水凝结在纤维周围,而在纤维表面上。下图证明水良好润湿纤维素并且较少被纤维素吸收。比例条是100μm。

[0084] 图40A-B展示了纤维厚度和细胞层数量的分析步骤:蓝色通道(DAPI)用于在限定集群的正交视图中计数L929层数量(图40A);23个包含细胞集群的区域被选择用于分析。所选区域的边缘被增强,并且图像被转换成二进制模式。各坐标的最大z点被设置到图形中,并计算平均厚度。图40B的上图展示了选定区域中SS涂层(DAPI+亮场)的正交视图;中图展示了亮场信号至二进制模式的转换,指示SS的坐标;和下图中的图形显示二进制亮场信号的定量,指示SS涂层的厚度。

[0085] 图41A-B展示了HEK293细胞采取3D生长以及以高密度接种于SS上时在接种后5天独特的迁移模式(图41A)vs胶原蛋白对照(图41B)(比例条是400μm)。

[0086] 图42展示了纤维厚度分析(类似于图40B),显示代表性用于定量以检查SS上的细胞生长层的视场(fields)。

[0087] 图43A-C展示了显微镜检查,显示涂覆有不同浓度的SS的TC板。左图:1层,~ 6×10^5 个纤维/cm²(图43A);中图:2层,~ 12×10^5 个纤维/cm²(图43B);右图:~ 24×10^5 个纤维/cm²(图43C)。不同浓度的纤维产生不同的层数,能够实现细胞的不同表型生长。图43A中的箭头指向表面涂层中的孔,指示纤维数量限制导致的涂层缺陷。具有此纤维数量(6×10^5 /cm²)的涂层造成涂层中平均1层纤维。

[0088] 图44展示了显微镜检查,显示某个区域的纤维量和产生的层数。3D结构在不断生长并开始连接:左图:接种后第3天;中图:接种后第5天;右图:接种后第7天。比例条:上图:200μm,下图:1000μm。

[0089] 图45是用钙黄绿素和碘化丙啶染色的球状体的共焦成像,证明在SS存在的情况

下,接种在NunclonTMSpheraTM微板(设计用于球状体形成)上的细胞(L929)生成具有独特不同特征的球状体。每孔中接种5000个细胞。左图:接种后5天,右图:接种后7天。分析每道堆叠的照片以确定最大的球状体区域(钙黄绿素染色)和坏死核心区域(PI染色)。

[0090] 图46A-C是条形图,显示L929细胞的尺寸和活区域/坏死区域分析:图46A显示SS球状体中的活细胞:死细胞比高75%;图46B显示含SS球状体的体积是对照球状体的体积的3.5-4.8倍。图46C显示含SS球状体中的活区域体积是对照球状体的体积的4.7倍。在每组三连条形中,从左至右:对照(未处理)、胶原蛋白、和SS。

[0091] 图47A-C显示了显微镜图像,显示混合SS的HEK293低密度接种(与无SS接种的细胞对照相比(图47A):下焦平面(图47B),上焦平面(图47C)。比例条是200μm。

[0092] 图48A-C显示了图像,显示接种在SS涂覆板上时,5000个细胞/孔,接种后4天,HEK293细胞的3D生长模式:未涂覆(图48A);下平面(图48B),和上平面(图48C)。

[0093] 图49A-B展示了接种在聚苯乙烯上的L929细胞和接种在SS涂覆板上的细胞之间的细胞运动性定量比较,在显微镜中视化(图49A),和在条形图中视化——显示聚苯乙烯vs SS上的细胞迁移(图49B)。

具体实施方式

[0094] 在其一些实施方式中,本发明涉及包括聚合物和衍生自MaSp(大壶状腺丝蛋白)蛋白的蛋白质混合物的复合材料、其改善的机械性质、及其制备。

[0095] 在一些实施方式中,本发明提供复合材料,其包括:(a)可用于制备合成拖丝蜘蛛丝的具有不同分子量的蛋白质混合物;和(b)聚合物。

[0096] 在一些实施方式中,术语“复合材料”指代由两种或更多种物质构成材料,该两种或更多种物质具有不同的特征,并且其中各物质保持其同一性同时对整体贡献期望的性质。

[0097] 在一些实施方式中,术语“材料”指代固体材料。在一些实施方式中,术语“材料”指代半固体材料(例如,凝胶)。

[0098] 在一些实施方式中,本公开的复合材料呈现较优的机械性质。

[0099] 在一些实施方式中,提供了包括蛋白质混合物的纤维。

[0100] 在一些实施方式中,多个本公开纤维在其一些实施方式中通过连接体彼此附接。连接体的实施方式在下文描述。

[0101] 蛋白质

[0102] 本发明部分基于意料之外的发现:利用具有不同分子量并且衍生自MaSp蛋白的蛋白质混合物合成的人工拖丝蜘蛛丝具有类似于天然拖丝蜘蛛丝的超常机械性质。

[0103] 在一些实施方式中,混合物中的每种蛋白质独立地包括主要MaSp蛋白、或其功能性同系物、变体、衍生物或片段的重复性区域的“n”个重复段,其中m和n独立地是2至70之间的整数。

[0104] 如本文所用,术语“蛋白质的混合物”或“蛋白质混合物”指代多种蛋白质,非限制地如,至少2种、至少3种、至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9或至少10种蛋白质,其中每种类型的蛋白质具有独特并且均一的分子量。

[0105] 在一些实施方式中,术语“蛋白质混合物”或“蛋白质混合物”指代20至40种蛋白

质、或20至35种蛋白质。在一些实施方式中，蛋白质指代单折叠的蛋白质。

[0106] 术语“大壶状腺丝蛋白”和“蛛丝蛋白”贯穿说明书可互换使用，并且包括所有已知的大壶状腺丝蛋白，一般缩写为“MaSp”、或在十字园蛛的情况下为“ADF”。这些大壶状腺丝蛋白总体上有两类，1和2。这些术语此外包括如本文公开的至少与已知的大壶状腺丝蛋白的重复性区域具有高度同一性和/或相似性的非天然蛋白质。其它适当的蜘蛛丝蛋白包括 MaSp2、MiSp、MiSp2、AcSp、FLYS、FLAS、和 flabelliform。

[0107] 如本文所用,术语“重复性区域”、“重复性序列”或“重复段”指代衍生自在蜘蛛丝氨基酸序列中(例如,在MaSp-1蛋白中)天然存在多遍的重复单元的重组蛋白质序列。本领域技术人员将理解,蜘蛛丝蛋白的一级结构被认为主要由单元重复段的一系列小变型组成。天然存在的蛋白质中的单元重复段通常彼此不同。也就是说,沿蛋白质长度极少有或没有完全复制的单元重复段。在一些实施方式中,制成了本发明的合成蜘蛛丝,其中蛋白质的一级结构包括单个单元重复段的多次完全重复。在另外的实施方式中,本发明的合成蜘蛛丝包括一个单元重复段的多次重复以及第二单元重复段的多次重复。这种结构类似于一般的区块共聚物。几种不同序列的单元重复段也可组合提供具有适合具体应用的性质的合成蜘蛛丝蛋白。如本文所用的术语“直接重复段”是与相似的重复段串联(头-尾排列)的重复段。在另一实施方式中,用于形成本发明的合成蜘蛛丝的重复段是直接重复段。在一些实施方式中,重复段在自然界中找不到(即,不是天然存在的氨基酸序列)。

[0109] 在一些实施方式中，各重复性序列包括上至60个氨基酸、上至55个氨基酸、上至50个氨基酸、上至49个氨基酸、上至48个氨基酸、上至47个氨基酸、上至46个氨基酸、上至45个氨基酸、上至44个氨基酸、上至43个氨基酸、上至42个氨基酸、上至41个氨基酸、上至40个氨基酸、上至39个氨基酸、上至38个氨基酸、上至37个氨基酸、上至36个氨基酸或上至35个氨基酸，其中可能的情况表示本发明的单独实施方式。在一些实施方式中，各重复性序列包括5至60个氨基酸、10至55个氨基酸、15至50个氨基酸、20至45个氨基酸、25至40个氨基酸、25至39氨基酸或28至36个氨基酸，其中可能的情况表示本发明的单独实施方式。在一些实施方式中，各重复性序列包括30至40个氨基酸、31至39个氨基酸、32至38个氨基酸、33至37个氨基酸、34至36个氨基酸，其中每种可能的情况表示本发明的单独实施方式。在另外的实施方式中，各重复性序列包括35个氨基酸。

[0110] 在一些实施方式中, n是等于下列任一个的整数:4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、

15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69和70。

[0111] 在一些实施方式中, m' 是等于下列任一个的整数: 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69和70。

[0112] 在另一实施方式中, n' / m' 的比在 2:1-1:2 的范围内。在另一实施方式中, n' / m' 的比在 1.8:1-1:1.8 的范围内。在另一实施方式中, n' / m' 的比在 1.5:1-1:1.5 的范围内。在另一实施方式中, n' / m' 的比在 1.25:1-1:1.25 的范围内。在另一实施方式中, n' / m' 的比在 1.2:1-1:1.2 的范围内。 n' / m' 的比在 1.1:1-1:1.1 的范围内, 在一些实施方式中。在另一实施方式中, n' 和 m' 相等。

[0113] 在一些实施方式中, 混合物中每种类型的蛋白质的 n 是相同的。术语“混合物中每种类型的蛋白质的“ n ”是相同的”, 如本文所用, 与每种类型的蛋白质(即, 具有相同分子量的一种或多种蛋白质)的重复性序列数量相关。作为非限制性实例, 对于具有分子量不同的 16 种蛋白质的蛋白质混合物, 每组蛋白质具有不同数量的重复性序列。

[0114] 在一些实施方式中, 混合物各组蛋白质具有在每种类型的蛋白质的重复性序列数量与该组的摩尔比之间的反比。在一些实施方式中, 对于每组蛋白质(例如, 具有相同数量的重复段), 蛋白质分子量越低, 该组的摩尔比越高。

[0115] 在一些实施方式中, “不同分子量”意在指代分子量值相差至少例如 0.01%、0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、或至少 30%。

[0116] 在另一实施方式中, 各重复段具有如下范围内的分子量: 1.5kDa 至 4.5kDa 的范围内、2kDa 至 3.5kDa 的范围内、2.1kDa 至 3.4kDa 的范围内、2.2kDa 至 3.3kDa 的范围内、2.4kDa 至 3.2kDa 的范围内、2.5kDa 至 3.1kDa 的范围内、2.6kDa 至 3kDa 的范围内、或 2.7kDa 至 2.9kDa 的范围内, 其中每种可能的情况表示本发明的单独实施方式。在另一实施方式中, 各重复段具有约 2.8kDa 范围内的分子量。

[0117] 在另一实施方式中, 组合物包括混合物的具有如下分子量增量的两种或更多种蛋白质: 2kDa 至 3.5kDa、2.1kDa 至 3.4kDa、2.2kDa 至 3.3kDa、2.4kDa 至 3.2kDa、2.5kDa 至 3.1kDa、2.6kDa 至 3kDa、或 2.7kDa 至 2.9kDa, 其中每种可能的情况表示本发明的单独实施方式。在另一实施方式中, 组合物包括混合物的具有约 2.8kDa 的分子量增量的两种或更多种蛋白质。

[0118] 在一些实施方式中, 重复性区域具有第一部分和第二部分, 其中第一部分和第二部分是连续的(即, 彼此紧邻)。一般, 第一部分和第二部分通过肽键连接。

[0119] 在一些实施方式中, 重复性区域的第一部分是包括至少 95%、至少 90%、至少 85%、至少 80%、至少 75%、至少 60%、至少 55%、或至少 50% 丙氨酸残基的 5-30 个氨基酸的氨基酸序列。在一些实施方式中, 第一部分可包括一个或多个甘氨酸残基。在一些实施方式中, 第一部分包括上至 5%、上至 10%、上至 15%、上至 20%、上至 25%、上至 30%、上至 45%、或上至 50% 甘氨酸残基。

[0120] 在一些实施方式中,第一部分包括丙氨酸-甘氨酸二肽的1至50之间的“n”个重复段,如下式:(AG)₁₋₁₅。在一些实施方式中,第一部分包括甘氨酸-丙氨酸二肽的1至50之间的“n”个重复段,如下式:(GA)₁₋₁₅。

[0121] 在一些实施方式中,重复性区域的第二部分是包括至少80%选自甘氨酸、丝氨酸、脯氨酸和酪氨酸的残基的20-60个氨基酸的氨基酸序列。

[0122] 在一些实施方式中,重复性区域的第二部分是包括至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%选自甘氨酸、丝氨酸、脯氨酸和酪氨酸的残基的20-60个氨基酸的氨基酸序列。在一些实施方式中,重复性区域的第二部分包括不多于1或2个谷氨酰胺残基。本领域技术人员将理解,重复性区域中甘氨酸、丝氨酸、脯氨酸和酪氨酸残基的确切数量和顺序可不同,只要该序列形成自组装纤维。

[0123] 在一些实施方式中,重复性区域包括:

[0124] (i) 10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%或50%丙氨酸残基;

[0125] (ii) 20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%或50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%或60%甘氨酸残基;

[0126] (iii) 10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%或30%丝氨酸残基;

[0127] (iv) 10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%或30%脯氨酸残基;

[0128] (v) 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%酪氨酸残基;

[0129] (vi) 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%谷氨酰胺残基;和

[0130] (vii) 0%、1%、2%、3%、4%、5%精氨酸残基。

[0131] 在一些实施方式中,重复性区域包括13-42%的丙氨酸残基、25-55%甘氨酸残基、10-18%丝氨酸残基、12-21%脯氨酸残基、4-7%酪氨酸残基、4-7%谷氨酰胺残基、和0-3%精氨酸残基。

[0132] 在一些实施方式中,各蛋白质独立地包括SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列

[0133] (X₁)_zX₂GPXYGPX₃X₄X₅GPX₆GX₇GGX₈GPX₉PGX₁₀

[0134] 其中X₁在每种情况中独立地是A或G。

[0135] 在一些实施方式中,(X₁)_z的至少50%是A,Z是5至30之间的整数;X₂是S或G;X₃是G或E;X₄是G、S或N;X₅是Q或Y;X₆是G或S;X₇是P或R;X₈是Y或Q;X₉是G或S;和X₁₀是S或G。

[0136] 在一些实施方式中,蛋白质混合物的特征在于,选自下列的一种或多种性质:

[0137] (a) 各重复段具有2kDa至3.5kDa范围内的分子量,和

[0138] (b) 'n' / 'm' 的比在2:1至1:2的范围内。

[0139] 在一些实施方式中,混合物中每种类型的蛋白质的n是相同的。

[0140] 在另一实施方式中,n是等于4和32或在4和32之间的整数。在另一实施方式中,m是等于4和32或在4和32之间的整数。在另一实施方式中,'n' / 'm' 的比在1.8:1-1:1.8的范围

内。在另一实施方式中，'n' 和'm' 相等。

[0141] 在一些实施方式中，Z是6至11之间的整数、6至10之间的整数或7至9之间的整数。在一种实施方式中，Z是选自5、6、7、8、9、10、11、和12的整数。在另一实施方式中，Z是8。

[0142] 在另一实施方式中，MaSP1蛋白的重复性区域包括SEQ ID NO:2 (SGPGGYGPGSQGPGSGPGGYGPGGPGSS) 所示的氨基酸序列。在另一实施方式中，MaSP1蛋白的重复性区域包括SEQ ID NO:3 (AAAAAAAASGPGGYGPQSQGPGSGPGGYGPGGPGSS) 所示的氨基酸序列。

[0143] 在另一实施方式中，同系物与SEQ ID NO:1共享至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同源性。

[0144] 在另一实施方式中，同系物与SEQ ID NO:2共享至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同源性。

[0145] 在另一实施方式中，同系物与SEQ ID NO:3共享至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同源性。

[0146] 在另一实施方式中，MaSP1蛋白的重复性区域包括SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。在另一实施方式中，MaSP1蛋白的重复性区域具有SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。

[0147] 在另一实施方式中，混合物的各蛋白质进一步包括选自下列的单个N端区域：SEQ ID NO:5 (MSYYHHHHHDYDIPPTENLYFQGAMDPEFKGLRRRAQLV)；SEQ ID NO:6 (MSYYHHHHHDYDIPPTENLYFQGAMDPEFKGLRRRAQLVRPLSNLDNAP)；SEQ ID NO:7 (MSYYHHHHHDYDIPPTENLYFQGAMDPEFKGLRRRAQLVDPPGCRNSARAGSS)、或其任何功能性同系物、变体、衍生物、或片段。在另一实施方式中，C端区域的同系物与SEQ ID NOs:5-7中任一种共享至少70%同源性。

[0148] 在另一实施方式中，混合物的各蛋白质进一步包括选自下列的单个C端区域：SEQ ID NO:8 (VAASRLSSPAASSRVSSAVSSLVSSGPTNGAAVSGALNSLVSQISASNPGLSCDALVQALLELVSALVAILSSASIGQNVVSSVSQSTQMISQALS)；和SEQ ID NO:9 (GPSGPGAYGPSPSASASVAASRLSSPAASSRVSSAVSSLVSSGPTNGAAVSGALNSLVSQISASNPGLSCDALVQALLELVSALVAILSSASIGQNVVSSVSQSTQMISQALS)、或其任何功能性同系物、变体、衍生物、片段或突变体。在另一实施方式中，N端区域的同系物与SEQ ID NO:8-9共享至少70%同源性。

[0149] 在一些实施方式中，混合物的一种或多种蛋白质进一步包括至少一个标签序列。可用于本发明的标签的非限制性实例包括His标签、HA标签、T7标签、和类似物。示例性His标签包括6个His残基或由6个His残基组成，如SEQ ID NO:11 (HHHHHH) 所示。在另一实施方式中，标签是包括SEQ ID NO:12 (YPYDVPDYA) 所示的氨基酸序列或由SEQ ID NO:12 (YPYDVPDYA) 所示的氨基酸序列组成的HA标签。在另一实施方式中，标签是包括SEQ ID NO:13 (MASMTGGQQMG) 所示的氨基酸序列或由SEQ ID NO:13 (MASMTGGQQMG) 所示的氨基酸序列组成的T7标签。技术人员非常清楚可选的适当的标签或其它融合配偶体。

[0150] “氨基酸”，如本文所用，指代天然存在的和合成的氨基酸、以及作用方式类似于天然存在氨基酸的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是通过遗传密码编码的那些氨基酸、以及后来被修饰的那些氨基酸，例如，羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸酯、和O-磷酸丝氨酸。“氨基酸类似物”指代与天然存在的氨基酸具有相同基础化学结构的化合物，即，结

合至氢、羧基、氨基、和R基团的 α 碳(例如,高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砜、甲硫氨酸甲基锍)。这种类似物具有修饰的R基团或修饰的肽骨干,但保持与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。“氨基酸模拟物”指代具有不同于氨基酸一般化学结构的结构但作用方式类似于天然存在的氨基酸的化学化合物。氨基酸可在本文中通过IUPAC-IUB生物化学命名委员会(Biochemical Nomenclature Commission)建议的其公知三字母符号或单字母符号来提及。

[0151] “氨基酸序列”或“肽序列”是通过肽键连接的氨基酸残基居于肽和蛋白质链中的顺序。序列总体上从包含自由氨基的N端至包含自由羧基的C端报告。氨基酸序列通常被称为肽、蛋白质序列——如果其表示蛋白质的一级结构,但必须分辨术语“氨基酸序列”或“肽序列”和“蛋白质”,因为蛋白质被定义为折叠成具体三维构型并且一般已经历翻译后修饰如磷酸化、乙酰化、糖基化、巯基键形成、切割和类似情况的氨基酸序列。

[0152] 如本文所用,“分离的”或“基本上纯化的”,在本发明示例的合成蜘蛛丝氨基酸序列或其编码核酸分子的环境下,意为已脱离其天然环境或已从其天然状态改变的氨基酸序列或多核苷酸。由此,“分离的”不一定反映氨基酸序列或核酸分子的纯化程度。然而,将理解,这种已被一定程度上纯化的分子是“分离的”。如果分子不存在于天然环境中,即其不存在于自然界中,则该分子是“分离的”,无论其存在于何处。作为实例,不是天然存在于人体中的氨基酸序列或多核苷酸是“分离的”,即使在其存在于人体中时。

[0153] 术语“分离的”或“基本上纯化的”,在用于氨基酸序列或核酸时,表示氨基酸序列或核酸本质上不含其在天然状态下联合的其它细胞组分。其可以处于均质状态、或可选地处于干燥或水溶液。纯度和同质度一般利用分析化学技术如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法确定。作为制剂中存在的主要物种的氨基酸序列或核酸被基本上纯化。

[0154] 在一些实施方式中,重复段是MaSP1蛋白或其片段的重复性区域的同系物、变体、衍生物的重复段。在一些实施方式中,重复段是ADF-4蛋白或其片段的重复性区域的同系物、变体、衍生物的重复段。

[0155] 如本文所用,“功能性同系物、变体、衍生物或片段”中的术语“功能性”指代具有通过限定的功能性测定确定的生物功能或活性的氨基酸序列。更具体地,限定的功能性测定是表达功能性同系物、变体、衍生物或片段的细胞中的自组装纤维的形成。

[0156] 在同源性被确定是至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%或至少99%时,氨基酸序列或核酸序列是相应的氨基酸序列或核酸的同系物。

[0157] 同源性,如本文所用,可在两氨基酸(肽)或DNA序列之间的同一性百分比基础上确定。总体上,将两待比较序列进行比对,以给出序列之间的最大相关性。考察两序列的比对,并确定给出两序列之间的精确氨基酸(或核苷酸)对应的位置数量,除以总比对长度,乘以100,给出同一性百分比数字。此同一性百分比数字可基于待比较序列的全长确定,这特别适于长度相同或非常相似并且高度同源的序列;或基于较短的限定长度确定,这更适于长度不等或具有较低水平的同源性的序列。比较两个或更多个序列的同一性的方法在本领域公知。因此,例如,在Wisconsin序列分析包9.1版中可获得的程序,例如程序GAP和BESTFIT,可用于确定两氨基酸序列之间的同一性百分比和两多核苷酸序列之间的同一性百分比。BESTFIT采用Smith和Waterman的“局部同源性”算法,并且发现两序列之间最佳的单个相似

性区域。BESTFIT更适于比较长度不相似的两个多肽或两个多核苷酸序列,该程序假设较短序列是较长者的一部分。在比较时,GAP比对两序列,根据Needleman和Wunsch的算法发现“最大相似性”。GAP更适于比较近似相同长度的序列,并且预期基于全长的比对。优选地,各程序中使用的参数“缺隙权重(缺口权重)”和“长度权重”分别对于多核苷酸序列是50和3,并且对于多肽序列12和4。优选地,同一性和相似性百分比在被比较的两序列被最优化对(对齐,aligned)时确定。

[0158] 术语“相同的(同一的,identical)”、“基本同一性”、“基本同源性”或“同一性”百分比,在两个或更多个氨基酸或核酸序列的环境下,指代两个或更多个序列或子序列相同或有相同指定百分比的氨基酸残基或核苷酸(即,指定区域(例如,氨基酸序列SEQ ID NO:2或3)上约60%同一性、或至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或99%同一性,在基于比较窗或指定区域以最大对应度比较和比对时),如利用BLAST或BLAST 2.0序列比较算法以下述默认参数测量或通过手动比对和目视检查测量。这种序列由此是“基本相同的/同一的”。此定义还涉及或可适用于测试序列的补体(compliment)。该定义还包括具有删除和/或添加的序列,以及具有取代的那些序列。优选的算法可说明缺隙和类似物。

[0159] 关于序列比较,一般,一个序列充当测试序列与之相比较的参照序列。当采用序列比较算法时,将测试和参照序列输入计算机,指定子序列坐标——如需——并且指定序列算法程序参数。优选地,可使用默认程序参数,或可指定可选的参数。序列比较算法然后基于程序参数计算测试序列相对于参照序列的序列同一性百分比。

[0160] 应理解,本发明进一步包括包括SEQ ID NO:1、2、或3中任一个的变体的“n”个重复段的氨基酸序列。如本文所用,术语“变体”或“基本上相似”包括其中删除、取代或添加一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20或25个)氨基酸残基或核苷酸的不同于具体确定序列的氨基酸或核苷酸序列。变体可以是天然存在的等位变体或非天然起源的变体。变体或基本上相似的序列指代可以通过现有技术使用的常见算法确定的、其氨基酸或核苷酸序列与本文所述氨基酸或核苷酸序列的同一性百分比表征的氨基酸序列或核酸的片段。优选的氨基酸或核酸的片段是具有与参照序列相比具有至少40或45%左右的序列同一性的氨基酸或核苷酸序列的那些,优选50%或55%左右的序列同一性,更优选60%或65%左右的序列同一性,更优选70%或75%左右的序列同一性,更优选80%或85%左右的序列同一性,还更优选90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%左右的序列同一性。

[0161] 在一种实施方式中,蛋白质混合物是纤维。在一种实施方式中,纤维包括蛋白质混合物。在一种实施方式中,纤维包括“m”种类型的蛋白质。在一种实施方式中,“m”种类型的蛋白质是纤维。在一种实施方式中,“m”种类型的蛋白质是蛋白质混合物。在一种实施方式中,纤维或蛋白质混合物包括分子量不同的“m”种类型的蛋白质,其中“m”种类型的蛋白质中的各蛋白质独立地包括大壶状腺丝蛋白(MaSp)的重复性区域、或其功能性同系物、变体、衍生物或片段的“n”个重复段。在一种实施方式中,蛋白质混合物包括分子量不同的“m”种类型的蛋白质,其中蛋白质混合物中的各蛋白质独立地包括大壶状腺丝蛋白(MaSp)的重复性区域、或其功能性同系物、变体、衍生物或片段的“n”个重复段。

[0162] 在一种实施方式中,蛋白质混合物或纤维由单体构成。在一种实施方式中,多个单

体布置在纳米纤丝中。在一种实施方式中，多个纳米纤丝布置在纤维中或构成纤维。在一种实施方式中，蛋白质混合物或纤维中的单体或纳米纤丝具有4至16nm的直径。在一种实施方式中，蛋白质混合物或纤维中的单体或纳米纤丝具有6至14nm的直径。在一种实施方式中，蛋白质混合物或纤维中的单体或纳米纤丝具有8至12nm的直径。在一种实施方式中，纤维或蛋白质混合物具有70至450nm的直径。在一种实施方式中，纤维或蛋白质混合物具有80至350nm的直径。在一种实施方式中，纤维或蛋白质混合物具有80至300nm的直径。在一种实施方式中，纤维或蛋白质混合物具有150至250nm的直径。在一种实施方式中，纤维或蛋白质混合物作为线圈布置。在一种实施方式中，单个纤维或一种蛋白质混合物作为线圈布置。在一种实施方式中，线圈具有5至800微米的直径。在一种实施方式中，线圈具有5至500微米的直径。在一种实施方式中，线圈具有5至30微米的直径。在一种实施方式中，线圈具有5至20微米的直径。在一种实施方式中，纤维或蛋白质混合物具有5至800微米的长度。在一种实施方式中，纤维或蛋白质混合物具有30至300微米的长度。

[0163] 在一种实施方式中，本文描述的复合材料和/或组合物包括，基于复合材料和/或组合物中的纤维总数，少于5%或3%量的等于或短于5微米(长度)的纤维。在一种实施方式中，本文描述的复合材料和/或组合物包括，基于复合材料和/或组合物中的纤维总含量的总重，少于5%或3%量的等于或短于8微米(长度)的纤维。

[0164] 在一种实施方式中，本文描述的复合材料和/或组合物包括，基于复合材料和/或组合物中的纤维总重量，少于5%或3%w/w的等于或短于5微米(长度)的纤维。在一种实施方式中，本文描述的复合材料和/或组合物包括，基于复合材料和/或组合物中的纤维总含量的总重量，少于5%或3%w/w量的等于或短于8微米(长度)的纤维。

[0165] 在一种实施方式中，等于或短于5或8微米的纤维导致不稳定。在一种实施方式中，等于或短于5或8微米的纤维降低本文描述的组合物或复合材料的完整性。在一种实施方式中，等于或短于5或8微米的纤维降低本文描述的组合物或复合材料的物理强度。

[0166] 在一种实施方式中，纤维或蛋白质混合物是分支的。在一种实施方式中，纤维或蛋白质混合物包括1至10个分支。在一种实施方式中，纤维或蛋白质混合物不含碳水化合物。在一种实施方式中，纤维或蛋白质混合物是非糖基化的。在一种实施方式中，纤维或蛋白质混合物不含脂肪或脂肪酸。在一种实施方式中，纤维或蛋白质混合物不含磷。在一种实施方式中，“不含”是“没有”或本质上“没有”。

[0167] 在一种实施方式中，纤维或蛋白质混合物中至少50%的蛋白质大于/重于(kDa)纤维或蛋白质混合物中蛋白质的中值重量。在一种实施方式中，纤维或蛋白质混合物中至少55%的蛋白质大于/重于(kDa)纤维或蛋白质混合物中蛋白质的中值重量。在一种实施方式中，纤维或蛋白质混合物中至少60%的蛋白质大于/重于(kDa)纤维或蛋白质混合物中蛋白质的中值重量。在一种实施方式中，纤维或蛋白质混合物中至少65%的蛋白质大于/重于(kDa)纤维或蛋白质混合物中蛋白质的中值重量。在一种实施方式中，纤维或蛋白质混合物中至少70%的蛋白质大于/重于(kDa)纤维或蛋白质混合物中蛋白质的中值重量。在一种实施方式中，纤维或蛋白质混合物中至少75%的蛋白质大于/重于(kDa)纤维或蛋白质混合物中蛋白质的中值重量。

[0168] 在一种实施方式中，纤维或蛋白质混合物的长度与直径的纵横比是至少1:10。在一种实施方式中，纤维或蛋白质混合物的长度与直径的纵横比是至少1:10至1:1500。在一

种实施方式中,纤维或蛋白质混合物的长度与直径的纵横比是至少1:50至1:1000。在一种实施方式中,纤维或蛋白质混合物的长度与直径的纵横比是至少1:100至1:1200。在一种实施方式中,纤维或蛋白质混合物的长度与直径的纵横比是至少1:100至1:1000。在一种实施方式中,纤维或蛋白质混合物的长度与直径的纵横比是至少1:500至1:1000。

[0169] 术语衍生物和功能性衍生物,如本文所用,意为带有任何插入、删除、取代和修饰的本发明氨基酸序列。

[0170] 应理解,术语“插入”,如本文所用,意为如下氨基酸残基对本发明序列的任何添加:1至50个之间的氨基酸残基,具体地,20至1个之间的氨基酸残基,和更具体地,1至10个之间的氨基酸残基。最具体地,1、2、3、4、5、6、7、8、9和10个氨基酸残基。进一步,本发明的氨基酸序列可在其N端和/或C端处以各种相同或不同的氨基酸残基延伸。

[0171] 氨基酸“取代”是使一个氨基酸被具有相似结构和/或化学性质的另一氨基酸置换的结果,即,保守型氨基酸置换。氨基酸取代可在所涉残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和/或两亲性相似的基础上进行。例如,非极性(疏水)氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、和甲硫氨酸;极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、和谷氨酰胺;带正电(碱性)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸、和组氨酸;和带负电(酸性)氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。

[0172] 在另一实施方式中,本发明的重复段序列具有对SEQ ID NO:2或3中任一个序列的17或更少、16或更少、15或更少、14或更少、13或更少、12或更少、11或更少、10或更少、9或更少、8或更少、或7或更少个氨基酸取代。在一种实施方式中,本发明的重复段序列具有对SEQ ID NO:2或3中任一个序列的至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、或至少13个氨基酸取代。

[0173] 关于氨基酸序列,技术人员将知道对氨基酸、核酸、肽、多肽、或蛋白质序列的、改变、添加或删除被编码序列中的单个氨基酸或小百分比氨基酸的个体取代、删除或添加是“保守修饰的变体”,其中所述改变导致氨基酸被化学上相似的氨基酸取代。提供功能相似氨基酸的保守型取代表在本领域中是公知的。这种保守修饰的变体在本发明的多态变体、物种间同系物、和等位基因之外,并且不排除本发明的多态变体、物种间同系物、和等位基因。

[0174] 例如,取代可如下进行:其中脂肪族氨基酸(G、A、I、L、或V)被该组另一成员取代、或诸如一个极性残基取代另一个极性残基(如精氨酸取代赖氨酸、谷氨酸取代天冬氨酸、或谷氨酰胺取代天冬酰胺)的取代。下列8组各组包含作为彼此的保守型取代的其它示例性氨基酸:1)丙氨酸(A)、甘氨酸(G);2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4)精氨酸(R)、赖氨酸(K);5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);7)丝氨酸(S)、苏氨酸(T);和8)半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)。

[0175] 保守型核酸取代是导致上文限定的保守型氨基酸取代的核酸取代。

[0176] 本发明氨基酸序列的变体可在氨基酸水平上具有至少80%序列相似性、至少85%序列相似性、90%序列相似性、或至少95%、96%、97%、98%、或99%序列相似性,其中重复单元由SEQ ID NO:2或3中任一个表示。

[0177] 本发明的氨基酸序列可包括SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.3或其任何片段的“n”个重叠段。“片段”构成具体区域的氨基酸或DNA序列的一部分。肽序列的片段是短于所述具体区

域的至少一个氨基酸，并且DNA序列的片段是短于所述具体区域的至少一个碱基对。片段可在C端或N端侧或两侧均截短。氨基酸片段可包括SEQ ID NO:1或3的至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少24、至少26、至少27、至少28、至少29、至少30、至少31、至少32、至少33或至少34个氨基酸。

[0178] 本发明氨基酸序列的突变体的特征在于其氨基酸中的一个(点突变体)或多个——约上至10个——与一个或多个另一氨基酸交换。这些是导致不同密码子的、DNA水平上的相应突变的结果。

[0179] 再进一步，本发明涉及本发明氨基酸序列的衍生物。本发明氨基酸序列的衍生物例如是这样的：其中官能团如氨基、羟基、巯基或羧基分别被衍生化，例如糖基化、酰化、酰胺化或酯化。在糖基化的衍生物中，寡糖通常连接至天冬酰胺、丝氨酸、苏氨酸和/或赖氨酸。酰化衍生物尤其被天然存在的有机或无机酸酰化，例如，乙酸、磷酸或硫酸，通常发生在N端氨基处或羟基处，特别是分别在酪氨酸或丝氨酸的N端氨基处或羟基处。酯是天然存在的醇(例如，甲醇或乙醇)的那些酯。进一步衍生物是盐，特别是药学上可接受的盐，例如金属盐，如碱金属和碱土金属盐，例如，钠、钾、镁、钙或锌盐、或用氨或适当的有机胺如低级烷基胺(例如，三乙基胺、羟基-低级烷基胺，例如，2-羟基乙基胺)和类似物形成的铵盐。

[0180] 根据一些方面，本发明涉及编码本发明蛋白质混合物的两种或更多种蛋白质的分离的核酸序列。根据一些实施方式，本发明提供编码本发明蛋白质混合物的分离的核酸序列。

[0181] “核酸”指代由包含糖、磷酸基和嘌呤或嘧啶单体(核苷酸)构成的分子，其可以是单链或双链的。在细菌、低等真核生物中和在高等动物和植物中，“脱氧核糖核酸”(DNA)指代遗传物质，而“核糖核酸”(RNA)涉及从DNA到蛋白质的信息翻译。

[0182] 由于遗传密码简并性属性，明确了多种不同核酸序列可用于编码本发明的氨基酸序列。应理解，本发明的核酸序列中包括的密码子可优化以在Sf9宿主细胞中表达。

[0183] 术语“密码子优化”，在其涉及用于转化各种宿主的基因或核酸分子编码区时，指代基因或核酸分子编码区中的密码子改变以反映宿主生物体的一般密码子使用，而不改变该DNA编码的多肽。在本发明的环境中，基因和DNA编码区被密码子优化以在宿主细胞(在具体实例中，Sf9草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)昆虫细胞)中最优表达。

[0184] 术语“表达”，如本文所用，意指从编码基因产物的序列的基因转录和翻译成基因产物。在表达时，编码基因产物的序列的DNA链先被转录成互补RNA——通常是信使RNA，然后由此转录的信使RNA被翻译成上述基因产物——如果基因产物是蛋白质。

[0185] 在一些实施方式中，本发明涉及一种或多种表达载体，其包括编码本发明蛋白质混合物的核酸序列。在一些实施方式中，本发明涉及一种或多种表达载体，其包括编码至少部分本发明蛋白质混合物(例如，具有不同分子量的两组或更多组蛋白质)的核酸序列。本发明的表达载体中包括的核酸序列所编码的氨基酸序列可任选地进一步包括下列至少一种：C端区域(例如，以SEQ ID NO:8或9表示)；和N端区域(例如，选自SEQ ID NO:5-7)。应注意，核酸序列在可操作地连接的启动子和任选地调控序列的表达控制之下。

[0186] 如本文所用，本文提及的“载体”、“表达载体”或“质粒”是染色体外的元件，其通常携带非细胞中枢代谢部分的基因，并且通常是环状双链DNA分子形式。其可以是其中可通过

限制和连接而插入期望的序列以在不同的遗传环境之间运输或在宿主细胞中表达的任何数量的核酸。载体一般由DNA构成,虽然RNA载体也是可利用的。载体包括但不限于,质粒和噬菌粒。克隆载体这样的载体:其能够在宿主细胞中复制,并且其进一步特征在于一个或多个内切核酸酶限制性位点——在此可以确定性方式切割载体,并在其中可连接期望的DNA序列,使得新重组载体保持其在宿主细胞中复制的能力。在质粒的情况下,期望序列的复制可在宿主细菌中质粒的拷贝数增加时多次发生,或在宿主通过有丝分裂繁殖前在每个宿主中仅发生一次。在噬菌体的情况下,复制可在裂解阶段中主动发生,或在溶源阶段中被动发生。表达载体是这样的载体:其中可通过限制和连接插入期望的DNA序列,使得其被可操作地连接至调控序列并且可作为RNA转录物表达。载体可进一步包含适用于识别和选择已被载体转化或转染的细胞的一种或多种标记序列。如本文所用,“转化”或“转染”是细胞中通过核酸并入而获得新基因。标记包括,例如,编码增加或减少对抗生素或其它化合物的抗性或敏感性的蛋白质的基因、编码其活性可通过本领域已知的标准测定检测的酶(例如,β-半乳糖苷酶或碱性磷酸酶)的基因、和可见地影响被转化或转染的细胞、宿主、群落或斑块的表型的基因。优选的载体是能够实现其可操作地连接的DNA区段中存在的结构基因产物的自主复制和表达(即,合成蜘蛛丝蛋白的表达)的那些载体。

[0187] 在具体实施方式中,载体是病毒载体,最具体地是杆状病毒载体系统或牛痘病毒载体系统。这种市售的杆状病毒系统的实例是Baculo-金®、Flash-Bac®和bac to bac系统。其它病毒载体系统也可用于本发明。依情况不同,可需要载体的修饰。其它病毒载体的实例是腺病毒和所有负链RNA病毒,例如,狂犬病、麻疹、RSV等。

[0188] 在一种实施方式中,杆状病毒系统用于表达本发明的合成丝蛋白。杆状病毒是一类(科,family)大型杆状病毒,其可分成两属(genera):核多角体病毒和颗粒体病毒。其具有有限范围的其可感染的宿主,即一般限于有限数量的密切相关的昆虫物种。由于杆状病毒对人无害,其是用于研究和商业或工业应用的安全选择。昆虫细胞中的杆状病毒表达代表了一种可靠的制备重组糖蛋白的方法、相对于在糖基化方面缺乏的原核生物表达的显著优势、和因而适当的蛋白质折叠。

[0189] 如上所述,本发明的表达载体可操作地连接至启动子。术语“启动子”和“启动子区域”指代通常在结构基因的蛋白质编码序列上游(5')、通过提供RNA聚合酶和/或转录在正确位点开始所需的其它因子的识别来控制编码区的表达的DNA序列。启动子序列是必需的,但不一定足以驱动基因的表达。术语“适当的启动子”将指代能够驱动合成蜘蛛丝变体基因表达的任何真核生物或原核生物启动子。

[0190] 可用于驱动Sf9中异源DNA片段表达的启动子很多,并且为本领域技术人员所熟悉。实际上任何能够驱动基因编码丝变体蛋白质的启动子适于本发明。例如,多角体蛋白(polyhedrin)、碱性蛋白、p10、OpIE2和gp4启动子可以是适于表达的启动子。

[0191] 编码序列和调控序列,当其被共价连接致使编码序列的表达或转录处于调控序列的影响或控制之下时,是“可操作地连接”或“可操作连接”的。如果调控序列被相对于基因定位使得调控序列能够对基因产物的产量发挥可测作用,则调控序列是可操作地连接至该基因的。如果期望多个编码序列被翻译成一个功能蛋白,两DNA序列将被可操作地连接——如果5'调控序列中启动子的诱导导致编码序列转录,和如果两DNA序列之间的连接属性不(1)导致移码突变的引入、(2)干扰启动子区域引导编码序列转录的能力、或(3)干扰相应

RNA转录物被翻译成蛋白质的能力。因此，启动子区域将被可操作地连接至编码序列——如果启动子区域能够影响该DNA序列的转录，使得所得转录物可被翻译成期望的蛋白质或多肽。

[0192] 基因表达所需的调控序列的精确属性可在物种或细胞类型之间相异，但应总体上按需包括转录和翻译起动分别涉及的5'非转录序列和5'非翻译序列，如TATA盒、封端序列、CAAT序列。特别是，这种5'非转录调控序列将包括启动子区域，该启动子区域包括用于可操作地连接的基因的转录控制的启动子序列。如需，调控序列还可包括增强子序列或上游激活子序列。

[0193] “调控(regulation和regulate)”指代通过DNA序列元件控制的基因表达调制，该DNA序列元件主要(但不一定)位于基因转录起点的上游(5')。调控可导致对刺激的完全响应或无响应，或其可导致基因表达水平变化。

[0194] 在进一步方面中，本发明涉及用根据本发明的表达载体转化的宿主细胞。

[0195] “细胞”、“宿主细胞”或“重组宿主细胞”在本文中是可互换使用的术语。将理解，这种术语不仅指代具体的对象细胞，而且指代这种细胞的后代或潜在后代。由于某种修饰可在后续世代中因突变或环境影响而发生，这种后代可能事实上不与母体细胞(parent cell)相同，但仍被包括在本文所用术语范围内。

[0196] “宿主细胞”，如本文所用，指代可被裸DNA或利用重组DNA技术构建的表达载体重组地转化的细胞。药物抗性或其它可选择的标记部分意图促进转化体的选择。另外，可选择的标记如药物抗性标记的存在可以用于防止污染微生物在培养基中倍增。通过在要求诱导表型存活的条件下培养细胞，获得转化的宿主细胞的这种纯培养物。

[0197] 本发明的宿主细胞被本文描述的表达载体转化或转染以表达本发明的合成蜘蛛丝蛋白。“转化”，如本文所用，指代细胞摄入外源DNA或RNA导致细胞基因型改变的过程以及例如转化的细胞表达期望的合成蜘蛛丝蛋白的重组形式的过程。术语“转染”意为核酸(例如，裸DNA或表达载体)通过核酸介导的基因转移而引入受体细胞。

[0198] 在一种具体实施方式中，用根据本发明的表达载体转化的宿主细胞是昆虫细胞。作为昆虫细胞，可使用鳞翅目昆虫细胞，更具体地来自草地贪夜蛾和来自粉纹夜蛾(*Trichoplusiani*)的细胞。最具体地，昆虫细胞是Sf9、Sf21或high 5细胞。

[0199] 在一些实施方式中，本发明的丝蛋白不含翻译后修饰。

[0200] 在一些实施方式中，本发明的丝蛋白是可生物降解的。此特征可具有重要性——例如在药物领域中，只要丝蛋白意图用于期望生物降解的体内应用时。此特征可特别适用于缝合材料及伤口闭合和覆盖系统。

[0201] 根据一些方面，本发明涉及包括本发明的核酸序列的表达载体，其中核酸序列处于可操作地连接的启动子和任选地调控序列的表达控制之下。

[0202] 在一些实施方式中，蛋白质混合物导致自组装形成限定结构。在一些实施方式中，蛋白质混合物是网络形式。在一些实施方式中，蛋白质混合物是复合物形式。在一些实施方式中，蛋白质混合物引起限定的二级结构，例如， β 转角、 γ 转角、 β 折叠、 α 螺旋构象和类似构象。

[0203] 根据一些方面，本公开的蛋白质混合物是纤维形式。“纤维”，如本文所用，意为由两个或更多个捻合在一起的细丝构成的纤维性材料细索。“细丝”意为不确定长度(范围跨

越显微(微观,microscopic)长度至英里或更长长度)的细长线状物体或结构。具体地,合成蜘蛛丝的细丝是显微的,并且是蛋白质的。“生物细丝”意为由蛋白质(包括重组制备的蜘蛛丝蛋白)形成的细丝。在一些实施方式中,术语“纤维”不包括非结构化的聚集体或沉淀。

[0204] 在一些实施方式中,蛋白质纤维的特征在于,其至少一个维度的尺寸(例如,直径、长度)。例如并且非限制地,纤维的直径在10nm-1μm、20-100nm、或10-50nm之间。

[0205] 在一些实施方式中,纤维由纳米纤丝构成。在一些实施方式中,纳米纤丝具有如下直径:例如,1nm、约2nm、约3nm、约4nm、约5nm、约6nm、约7nm、约8nm、约9nm、约10nm、约11nm、约12nm、约13nm、约14nm、约15nm、约16nm、约17nm、约18nm、约19nm、约20nm、约21nm、约22nm、约23nm、约24nm、约25nm、约26nm、约27nm、约28nm、约29nm、约30nm、约31nm、约32nm、约33nm、约34nm、约35nm、约36nm、约37nm、约38nm、约40nm、约42nm、约44nm、约46nm、约48nm、或约50nm,包括其间的任何数值或范围。在一种实施方式中,纳米纤丝具有3-7nm的直径。在一种实施方式中,纳米纤丝具有4-6nm的直径。

[0206] 在一些实施方式中,本公开的纤维的长度在1-200μm、10-100μm、100至500μm或200-500μm之间。

[0207] 在本文描述的任一实施方式的一些实施方式中,本公开纤维的特征在于,多孔结构。在一些实施方式中,多孔结构的特征在于至少30%(例如,30至99%)的孔隙率。在一些实施方式中,多孔结构的特征在于至少50%(例如,50至99%)的孔隙率。在一些实施方式中,多孔结构的特征在于至少60%(例如,60至99%)的孔隙率。在一些实施方式中,多孔结构的特征在于至少70%(例如,70至99%)的孔隙率。在一些实施方式中,多孔结构的特征在于至少80%(例如,80至99%)的孔隙率。在一些实施方式中,多孔结构的特征在于至少90%(例如,90至99%)的孔隙率。在一些实施方式中,多孔结构的特征在于约90%的孔隙率。

[0208] 在此,术语“孔隙率”指代由空隙组成的物质(例如,“海绵样”材料)的体积百分比。在另一实施方式中,孔隙率根据表面区域中的空隙除以整个表面积(多孔的和非多孔的)来测量。

[0209] 在一些实施方式中,本公开纤维的多孔结构允许纤维表面上有效吸水。即,不束缚于任何具体理论,这种惊人的发现可基于明显区别于自然界中发现的天然蜘蛛丝的本公开纤维结构和其孔隙率来解释。

[0210] 在本文描述的任一实施方式的一些实施方式中,本公开的纤维的特征在于平均直径是纳米尺寸的。

[0211] 在一些实施方式中,本公开的纤维的特征在于平均直径在1至50nm的范围内。在一些这种实施方式中,平均直径在3至50nm的范围内。在一些这种实施方式中,平均直径在5至50nm的范围内。在一些这种实施方式中,平均直径在1至40nm的范围内。在一些这种实施方式中,平均直径在1至30nm的范围内。在一些这种实施方式中,平均直径在5至40nm的范围内。如下文实施例部分进一步示例,在一些实施方式中,多个本公开的纤维可以是自组装结构或基质的形式。在一些实施方式中,可使这种基质适于生物材料应用。

[0212] 在一些实施方式中,纤维或蛋白质混合物包括分子量不同的“m”种类型的蛋白质,其中所述“m”种类型的蛋白质中的各蛋白质独立地包括大壶状腺丝蛋白(MaSp)的重复性区域、或其功能性同系物、变体、衍生物或片段的“n”个重复段,其中m是2至70之间的整数并且n是6至70之间的整数。在一些实施方式中,纤维或蛋白质混合物包括分子量不同的“m”种类

型的蛋白质，其中所述“m”种类型的蛋白质中的各蛋白质独立地包括大壶状腺丝蛋白 (MaSp) 的重复性区域、或其功能性同系物、变体、衍生物或片段的“n”个重复段，其中m是2至70之间的整数并且n是7至70之间的整数。在一些实施方式中，纤维或蛋白质混合物包括分子量不同的“m”种类型的蛋白质，其中所述“m”种类型的蛋白质中的各蛋白质独立地包括大壶状腺丝蛋白 (MaSp) 的重复性区域、或其功能性同系物、变体、衍生物或片段的“n”个重复段，其中m是2至70之间的整数并且n是8至70之间的整数。在一种实施方式中，大壶状腺丝蛋白 (MaSp) 的重复性区域的“n”个重复段必须等于或大于6，以有效支持细胞生长、细胞扩增和增殖、多层细胞组装、细胞迁移、细胞死亡减少、组织再生和/或愈合过程。在一种实施方式中，大壶状腺丝蛋白 (MaSp) 的重复性区域的“n”个重复段必须等于或大于7，以有效支持细胞生长、细胞扩增和增殖、多层细胞组装、细胞迁移、细胞死亡减少、组织再生和/或愈合过程。在一种实施方式中，大壶状腺丝蛋白 (MaSp) 的重复性区域的“n”个重复段必须等于或大于8，以有效支持细胞生长、细胞扩增和增殖、多层细胞组装、细胞迁移、细胞死亡减少、组织再生和/或愈合过程。在一种实施方式中，大壶状腺丝蛋白 (MaSp) 的重复性区域的“n”个重复段必须等于或大于9，以有效支持细胞生长、细胞扩增和增殖、多层细胞组装、细胞迁移、细胞死亡减少、组织再生和/或愈合过程。在一种实施方式中，大壶状腺丝蛋白 (MaSp) 的重复性区域的“n”个重复段必须等于或大于10，以有效支持细胞生长、细胞扩增和增殖、多层细胞组装、细胞迁移、细胞死亡减少、组织再生和/或愈合过程。

[0213] 在一些实施方式中，本公开的基质中的一种或多种纤维包括至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、或至少12个重复段 (“n”如上文限定)。在一些实施方式中，本公开的基质中的一种或多种纤维包括：6-70、7、8-70、9-70、10-70、11-70、12-70、13-70、14-70、15-70、16-70、17-70、18-70、19-70、或20-70个重复段 (“n”如上文限定)。在一些实施方式中，本文描述的细胞、医药和生物组合物和方法需要至少6个重复段。在一些实施方式中，本文描述的细胞、医药和生物组合物和方法需要至少7个重复段。在一些实施方式中，本文描述的细胞、医药和生物组合物和方法需要至少8个重复段。在一些实施方式中，本文描述的细胞、医药和生物组合物和方法需要：6-70、7、8-70、9-70、10-70、11-70、12-70、13-70、14-70、15-70、16-70、17-70、18-70、19-70、或20-70个重复段 (“n”如上文限定)。

[0214] 在一些实施方式中，此基质适于细胞生长，并适于保持或促进细胞活性，如下文进一步证明。

[0215] 在一些实施方式中，术语“自组装的”指代在一个结构域上的联合基团充分接近并且定向以允许与另一结构域构建性联合时发生的、基于纤维 (一个或多个) 的至少两个结构域之间的一系列联合化学反应的自组装过程 (例如，自发的自组装过程) 得到的结构。换句话说，联合性相互作用意为导致一个或多个纤维的结构域彼此附接的相遇。在一些实施方式中，附接的结构域不相互平行。还考虑如下布置：其中自组装结构有多于两个结构域，各结构域接入不同的平面。

[0216] 在一些实施方式中，纳米纤丝的密度也影响自组装纤维的性质。在一些实施方式中，纳米纤丝的密度 (g/cm^3) 是0.5至1.5，例如，0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5，包括其间的任何数值和范围。在示例性实施方式中，单独纳米纤丝的密度是约 $1.3\text{g}/\text{cm}^3$ 。

[0217] 值得注意的是，在一些实施方式中，自组装纤维的密度 (例如，约80%空隙) 在

0.1g/cm³至0.4g/cm³或0.2g/cm³至0.3g/cm³的范围内。在示例性实施方式中,自组装纤维的密度是约0.26g/cm³。

[0218] 在纳米级空间分辨率和高时间分辨率下的表面润湿性研究是理论和实践方面的新兴领域。

[0219] 如下文实施例部分中证明,本公开的纤维呈现高度的表面润湿性,呈现相对于其体积和重量杰出的流体吸收能力。

[0220] 复合材料和机械性质

[0221] 在一些实施方式中,本公开的复合材料的特征在于,与参照材料相比改善的机械性质。在一些实施方式中,术语“参照材料”指代与复合材料化学组成相同,不含一种或多种蛋白质。在一些实施方式中,术语“参照材料”指代具有与复合材料一样的聚合物分子量(M_w)的普通聚合物(即,不包括蛋白质)。

[0222] 在一些实施方式中,术语“参照材料”指代具有相同单体和分子构型(例如,结晶度和结晶类型)的普通聚合物。在一些实施方式中,术语“参照材料”指代具有相同分子构型(例如,结晶度和结晶类型)的普通聚合物。在一些实施方式中,术语“参照材料”指代具有衍生自相同单体单元的骨干的普通聚合物。在一些实施方式中,术语“参照材料”指代相应的单体。

[0223] “改善的机械性质”意指具有更期望的机械性质。

[0224] 在一些实施方式中,复合材料是基质形式。在此,术语“基质”(包括“核心基质”)可指代多层基质。在一些实施方式中,术语“基质”指代一层或多层的一种或多种聚合物,其进一步包括掺在层(一个或多个)中和/或插入层之间的蛋白质混合物。

[0225] 在一些实施方式中,改善的机械性质指代弹性模量。在一些实施方式中,短语“弹性模量”指代杨氏模量。在一些实施方式中,短语“弹性模量”通过材料对拉伸应力施加的响应来确定(例如,根据本领域已知的程序)。

[0226] 在一些实施方式中,如下文实施例部中进一步显示,改善的机械性质指代挠曲模量。如本文和本领域所用,挠曲模量(还被称为“弯曲模量”)是挠曲变形中应力与应变的比、或材料弯曲的倾向。挠曲模量可由应力-应变曲线的斜率确定。

[0227] 在一些实施方式中,性质选自而不限于,杨氏模量、拉伸强度、破裂应变、屈服点、韧性、刚度、蠕变抗性、失效前效能、应力和伸长百分比。

[0228] 刚性指代载荷-变形曲线的线性部分的斜率。失效前效能指代失效前载荷-变形曲线下方面积。这些每一者均可通过本领域已知的标准方法测量和计算。

[0229] 在一些实施方式中,材料的拉伸强度指代失效(例如,断裂)前可用的拉伸应力最大量。

[0230] 在一些实施方式中,术语“拉伸强度”,如本文所用,是材料在不撕裂、断裂、缩颈形成微裂纹(necking forming microcracks)或破裂的情况下或在撕裂、断裂、缩颈形成微裂纹或破裂前可承受的最大力量(例如以牛顿为单位测量)。

[0231] “撕裂、断裂、缩颈形成微裂纹或破裂”意指永久变形。在一些实施方式中,术语“永久变形”不包括微裂纹或破裂。在一些实施方式中,“永久变形”意指相对于原始尺寸或结构的至少0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、或1%,包括其间的任何数值。

[0232] 在一些实施方式中,术语“破裂应变”意为破裂时的应变(位移),如例如在拉伸测

试中通过应力-应变曲线确定。

[0233] 在一些实施方式中,术语“屈服点”指代应力-应变曲线具有平顶状态(plateau)并且达到弹性极限时的应力。如本文所用,“蠕变”是在聚合物样本遭受恒定拉伸应力(例如,重力或施加的机械或物理应力)时拉伸应变变化的度量。换句话说,蠕变是固体材料在恒定拉伸应力的影响下缓慢移动或永久变形的倾向。如本文所用,术语“蠕变抗性”指代聚合物在长时间处于载荷下时抵抗任何类型的畸变的能力。“改善的蠕变抗性”指代例如20%时间至例如5%拉伸应变的改善。

[0234] 在一些实施方式中,术语“伸长应力”指代作用于伸展状态下的材料的力。例如,“100%伸长时的应力”指代作用于伸展至其两倍长度的材料的力。

[0235] 在一些实施方式中,选自杨氏模量、拉伸强度、屈服点、和伸长应力的一种或多种性质提高例如至少1%、至少3%、至少4%、至少5%、至少6%、至少7%、至少8%、至少9%、至少10%、至少11%、至少12%、至少13%、至少14%、至少15%、至少16%、至少17%、至少18%、至少19%、至少20%、至少21%、至少22%、至少23%、至少24%、至少25%、至少26%、至少27%、至少28%、至少29%、至少30%、至少50%、至少100%、至少200%、或至少500%。

[0236] 在一些实施方式中,选自杨氏模量、拉伸强度、屈服点、和伸长应力的至少两种性质提高例如至少1%、至少3%、至少4%、至少5%、至少6%、至少7%、至少8%、至少9%、至少10%、至少11%、至少12%、至少13%、至少14%、至少15%、至少16%、至少17%、至少18%、至少19%、至少20%、至少21%、至少22%、至少23%、至少24%、至少25%、至少26%、至少27%、至少28%、至少29%、至少30%、至少50%、至少100%、至少200%、或至少500%。

[0237] 在一些实施方式中,选自杨氏模量、拉伸强度、屈服点、和伸长应力的至少三种性质提高例如至少1%、至少3%、至少4%、至少5%、至少6%、至少7%、至少8%、至少9%、至少10%、至少11%、至少12%、至少13%、至少14%、至少15%、至少16%、至少17%、至少18%、至少19%、至少20%、至少21%、至少22%、至少23%、至少24%、至少25%、至少26%、至少27%、至少28%、至少29%、至少30%、至少50%、至少100%、至少200%、或至少500%。

[0238] 在一些实施方式中,杨氏模量提高例如至少10%、至少11%、至少12%、至少13%、至少14%、至少15%、至少16%、至少17%、至少18%、至少19%、至少20%、至少21%、至少22%、至少23%、至少24%、至少25%、至少26%、至少27%、至少28%、至少29%、至少30%、至少50%、至少100%、至少200%、或至少500%。

[0239] 在一些实施方式中,拉伸强度提高例如至少10%、至少11%、至少12%、至少13%、至少14%、至少15%、至少16%、至少17%、至少18%、至少19%、至少20%、至少21%、至少22%、至少23%、至少24%、至少25%、至少26%、至少27%、至少28%、至少29%、至少30%、或至少50%。

[0240] 在一些实施方式中,屈服点提高例如至少10%、至少11%、至少12%、至少13%、至少14%、至少15%、至少16%、至少17%、至少18%、至少19%、至少20%、至少21%、至少22%、至少23%、至少24%、至少25%、至少26%、至少27%、至少28%、至少29%、至少30%、或至少50%。

[0241] 在一些实施方式中,复合材料的特征在于结构强度,其中多于1%的结构强度源自蛋白质纤维。

[0242] 不束缚于任何具体理论,将理解,蛋白质混合物导致成功自组装,进而产生蛋白质

纤维。聚合物复合材料的强化源自掺入其中的纤维(一个或多个)。在一些实施方式中,复合材料的特征在于结构强度,其中多于5%的结构强度源自蛋白质纤维(一个或多个)的掺入。在一些实施方式中,复合材料的特征在于结构强度,其中多于10%的结构强度源自蛋白质纤维的掺入。

[0243] 在一些实施方式中,复合材料的特征在于结构强度,其中多于20%的结构强度源自掺入的蛋白质纤维(一个或多个)。在一些实施方式中,复合材料的特征在于结构强度,其中多于30%的结构强度源自掺入的蛋白质纤维(一个或多个)。

[0244] 在一些实施方式中,复合材料的特征在于结构强度,其中多于1%的拉伸强度源自掺入的蛋白质纤维(一个或多个)。在一些实施方式中,复合材料的特征在于结构强度,其中多于5%的拉伸强度源自掺入的蛋白质纤维(一个或多个)。在一些实施方式中,复合材料的特征在于结构强度,其中多于10%的拉伸强度源自掺入的蛋白质纤维(一个或多个)。在一些实施方式中,复合材料的特征在于结构强度,其中多于20%的拉伸强度源自掺入的蛋白质纤维(一个或多个)。在一些实施方式中,复合材料的特征在于拉伸强度,其中多于30%的结构强度源自掺入的蛋白质纤维(一个或多个)。

[0245] 在一些实施方式中,短语“结构强度”,如本文所用,指代机械性质,如而不限于,弹性模量、拉伸应力、伸长(应变)和韧性[例如,拉伸应力和伸长(应变)的组合]。

[0246] 在一些实施方式中,术语“聚合物”,如贯穿本文所用,描述了由多个重复的结构单元(可互换地称为骨干单元或单体单元)构成的物质(例如,有机物质,但可选地无机物质),该结构单元彼此共价连接并且形成聚合物的聚合物骨干。术语“聚合物”,如本文所用,包括有机和无机聚合物,并且进一步包括均聚物、共聚物或其混合物(例如,掺混物)中的一种或多种。术语“均聚物”,如本文所用,描述了由一种类型的单体单元构成并且因此由同种骨干单元构成的聚合物。术语“共聚物”,如本文所用,描述了由多于一种类型的单体单元构成并且因此由异种骨干单元构成的聚合物。异种骨干单元可彼此区别在于其侧基。

[0247] 为简便,术语“聚合物”和“聚合物骨干”,如贯穿本文互换所用,涉及均聚物、共聚物和其混合物。

[0248] 在一些实施方式中,聚合物是疏水的。在一些实施方式中,聚合物是UV固化的。

[0249] 在一些实施方式中,本公开的复合材料是生物稳定的。在一些实施方式中,本公开的复合材料是可生物裂解的。在一些实施方式中,本公开的复合材料是可生物降解的。

[0250] 在一些实施方式中,术语“生物稳定的”描述了在生理条件下保持完整的化合物或聚合物(例如,不在体内降解,因此是非可生物降解的或非可生物裂解的)。

[0251] 在一些实施方式中,术语“可生物降解的”描述了可在生理和/或环境条件(一个或多个)下分解成分解产物的物质。这种生理和/或环境条件包括例如,水解(通过水解裂解的分解)、酶催化(酶降解)、和机械相互作用。此术语一般指代在这些条件下分解,使得50重量%的物质在短于一年的时期内分解的物质。

[0252] 在一些实施方式中,术语“可生物降解的”,如本发明实施方式的环境中所用,还包括术语“可生物再吸收的”,其描述了在生理条件下分解成在宿主-生物体中进行生物再吸收(即,成为宿主-生物体的生物化学系统的代谢物)的分解产物的物质。

[0253] 聚合物

[0254] 在一些实施方式中,聚合物是或包括合成聚合物。在一些实施方式中,聚合物是或

包括天然聚合物。天然聚合物可指代这样的聚合物：非限制地由天然来源如植物、动物和矿物来源制成，或可由天然纤维如棉、亚麻制品、黄麻、亚麻、苎麻、剑麻和大麻、角蛋白纤维结构(毛发)、和羊毛编织而成。

[0255] 其它示例性天然聚合物包括聚交酯、胶原蛋白、角蛋白、纤维素、肌动蛋白、肌球蛋白、几丁质、桑蚕丝(*bombyx mori* silk)。

[0256] 在一些实施方式中，聚合物是热塑性聚合物。在一些实施方式中，聚合物是热固性材料。在一些实施方式中，聚合物是环氧化物。在一些实施方式中，聚合物是聚酯(例如，脂肪族聚酯)。在一些实施方式中，聚合物选自聚酰胺、聚氨酯、和尼龙。在一些实施方式中，聚合物是交联聚合物。在一些实施方式中，聚合物是共聚物。在一些实施方式中，聚合物是水凝胶形式。

[0257] 在一些实施方式中，聚合物材料是两种或更多种组分的材料(例如，共聚物)。如下文实施例部分中证明，组分(还被称为“部分”)A可以是主要(基础)聚合物，并且部分B可以是例如硬化剂或催化剂。

[0258] 硬化剂化学家族随聚合物基础而变，但包括胺、异氰酸酯、过氧化物和其它几种。

[0259] 共聚物可通过选自下列的机制生成：自由基聚合过程(例如，利用偶氮二异丁腈(简称为AIBN))、逐步增长聚合和链增长聚合。

[0260] 术语“环氧化物”，如本文所用，指代这样的反应性基团：具有一个氧和两个亚甲基的具有分子式-C₂H₃O的三元杂环分子。

[0261] 在一些实施方式中，聚合物选自而不限于，液晶聚合物、马来酸酐接枝聚丙烯、聚酰胺、尼龙4,6、尼龙6、尼龙6,6、尼龙11、尼龙12、聚丙烯酸酯如PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)、聚(芳酰胺)、聚乙烯(PE)、高密度PE(HDPE)、低密度PE(LDPE)、超高分子量聚乙烯(UHMWPE)、聚对苯二甲酸丁二酯、聚对苯二甲酸乙二酯、聚苯硫醚、聚邻苯二甲酰胺、聚丙烯、聚苯乙烯、聚(偏二氟乙烯)、聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)(pHEMA)、热固性和热塑性聚氨酯、聚碳酸酯、聚乙烯醇缩丁醛、乙烯乙稀醇共聚物、聚氯乙烯(PVC)、氟化聚合物如聚四氟乙烯(PTFE)、聚乳酸(PLA)或其共聚物(例如，聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA))、聚己内酯(PCL)或其共聚物、聚乙二醇、胶乳、橡胶(例如，天然橡胶、合成橡胶、丁二烯橡胶、苯乙烯-丁二烯橡胶、氯丁二烯橡胶、丁基橡胶、腈橡胶、异戊二烯橡胶、聚氨酯橡胶、丙烯腈-丁二烯-苯乙烯(ABS))、聚醚酮(PEK)、聚醚醚酮(PEEK)、聚醚酮酮(PEKK)和聚醚醚酮酮(PEEKK)。热塑性弹性体、苯乙烯-丁二烯共聚物橡胶(SBR)、黄原胶、纤维素、胶原蛋白、弹性蛋白、角蛋白、棉、羊毛、丝和其任何组合或混合物。

[0262] “纤维素”还意为包括其衍生物，包括而不限于，硝酸纤维素、三乙酰纤维素(TAC)、和乙酸丙酸纤维素(CAP)。

[0263] 在一些实施方式中，聚合物选自而不限于用作粘合剂的材料，选自而不限于，环氧化物、氨基丙烯酸酯、聚酯、多元醇、聚氨酯、和聚酰亚胺。

[0264] 在一些实施方式中，聚合物是蛋白质衍生聚合物。在一些中，蛋白质衍生聚合物不是衍生自MaSp蛋白。

[0265] 在一些实施方式中，聚合物是非蛋白质衍生聚合物。

[0266] 如本文所用，术语“水凝胶”指代包含从约50%起或从约80%起并且上至99.9%(按质量计)的水的三维纤维网络。水凝胶可被认为是大部分是水、但因液体内的三维交联

网络表现如同固体或半固体、由天然和/或合成聚合物链制成的材料。

[0267] 根据本发明的一些实施方式，水凝胶可包含各种长度和化学组成的聚合物链，该聚合物链可源于通过化学键(例如，共价键、氢键和离子键/复合键/金属键)相互连接(交联)的单体、低聚物、嵌段聚合物单元。

[0268] 在一些实施方式中，水凝胶可包含没有化学连接至主要交联网路、而是与之机械地相互交织和/或陷入其中的大分子聚合物元件和/或纤维元件。这种大分子纤维元件可以是编织的(如在例如网结构中)或非编织的，并且在一些实施方式中可充当水凝胶纤维网络的强化材料。这种大分子的非限制性实例包括聚己内酯、明胶、明胶甲基丙烯酸酯、藻酸酯、藻酸甲基丙烯酸酯、壳聚糖、壳聚糖甲基丙烯酸酯、乙二醇壳聚糖、乙二醇壳聚糖甲基丙烯酸酯、透明质酸(HA)、HA甲基丙烯酸酯、和其它非交联天然或合成聚合物链和类似物。

[0269] 在一些实施方式中，水凝胶可包含使其可用于具体应用的另外的元件，如治疗剂和标记剂——如下文讨论这些，骨架和其它结构元件、活细胞、细胞组分和类似物。

[0270] 在一些实施方式中，聚合物材料，例如水凝胶，进一步包括一种或多种表面活性剂、增效剂、增稠剂和一种或多种酶。

[0271] 在一些实施方式中，水凝胶可采用在软、脆性和弱材料至硬、弹性和韧性材料的范围内的物理形式。软水凝胶可特征在于流变参数，包括弹性和粘弹性参数，而硬水凝胶更适合特征在于拉伸强度参数、弹性、储能和损耗模量，这些术语在上文被定义或是本领域已知的。

[0272] 在一些实施方式中，术语“热固性材料”指代通过任何技术已被不可逆地固化的合成聚合物，该任何技术包括通过加热、通过化学反应(例如，如环氧化物)或辐射的固化。热固性聚合物的实例非限制地包括，热固性聚酯(例如，如用于纤维玻璃)、聚氨酯、硫化橡胶、酚醛树脂(例如，Bakelite®聚合物)、Duroplast、脲-甲醛(例如，如用于胶合板)、蜜胺树脂、环氧树脂、聚酰亚胺、氰酸酯和聚氰酸酯。

[0273] 在一些实施方式中，术语“热塑性材料”指代在特定温度以上时充分柔软从而容易实现聚合物塑性变形并且在特定温度以下时充分坚硬从而保持期望的形状的聚合物。热塑性聚合物的软化通常发生在聚合物的转变温度(例如，玻璃化转变温度、熔点)附近和/或以上的温度下。这种转变温度可例如通过量热法确定。

[0274] 短语“软化温度”，如本文所用，指代热塑性聚合物的玻璃化转变温度范围中的最低温度。

[0275] 在一些实施方式中，复合材料中的蛋白质的总浓度(还被称为“%载荷”或“%富集”)在复合材料总重量的约0.1重量%至约10重量%的范围内。在一些实施方式中，复合材料中的蛋白质总浓度在约0.5重量%至约3重量%的范围内。

[0276] 在一些实施方式中，复合材料中的蛋白质总浓度是例如约0.1重量%、约0.5重量%、约1重量%、约1.5重量%、约2重量%、约2.5重量%、约3重量%、约3.5重量%、约4重量%、约4.5重量%、约5重量%、约5.5重量%、约6重量%、约6.5重量%、约7重量%、约7.5重量%、约8重量%、约8.5重量%、约9重量%、约10重量%、约20重量%、约30重量%、约40重量%、约50重量%，包括其间任何数值或范围。

[0277] 在一些实施方式中，聚合物包括本公开蛋白质以外的一种或多种添加剂。在一些实施方式中，术语“添加剂”可指代可被加入聚合物材料而对其目的应用无害的材料。在一

些实施方式中,添加剂选自而不限于抗氧化剂、颜料、抗静电添加剂和阻燃剂。在一些实施方式中,添加剂用于促进和/或控制蛋白质混合物其中/其上的载荷。在一些实施方式中,术语“添加剂”指代表面活性剂或分散剂。

[0278] 在一些实施方式中,上文描述的一种或多种机械性质的提高(例如,杨氏模量、拉伸强度、屈服点、和伸长应力)与蛋白质总浓度相关。术语“相关”或“相关的”,如本文所用,指代两事件情况之间的关联,例如,复合材料的%载荷和机械性质之间具有因果、互补、平行或交互关系。

[0279] 在一些实施方式中,蛋白质混合物和聚合物基本上连续接触。

[0280] 在一些实施方式中,聚合物是透明的,因此适于要求目视的应用,例如车窗等。

[0281] 在一些实施方式中,聚合物基本上是板,无论曲线状、平坦状、包括一个或多个基本上平面的表面、或其组合,例如从而避免弱点形成,和/或允许与蛋白质基本上连续接触。

[0282] 在一些实施方式中,蛋白质混合物和聚合物至少部分连续接触。在一些实施方式中,蛋白质混合物和聚合物基本上连续接触。

[0283] 在一些实施方式中,本公开的蛋白质混合物和/或本公开的衍生自蛋白质混合物的纤维被限定为进一步包括连接体。这种连接体可以是用于偶联另一剂(agent)、目标部分、或表面同时没有不利影响目标功能或目标部分的化学部分。

[0284] 在一些实施方式中,多种本公开的蛋白质混合物和/或本公开的衍生自蛋白质混合物的纤维彼此非共价地附接(例如,通过静电键)。

[0285] 在一些实施方式中,多种本公开的蛋白质混合物和/或本公开的衍生自蛋白质混合物的纤维彼此共价交联。在一些实施方式中,纤维的交联形式是可逆的(例如,通过加热)。

[0286] 在一些实施方式中,共价交联在体内完成。可选地,共价交联离体完成。

[0287] 在一些实施方式中,共价交联的存在与本文描述的较强机械性质相关。

[0288] 在一些实施方式中,蛋白质混合物附接或沉积在聚合物的至少一个表面上。

[0289] 在一些实施方式中,蛋白质混合物附接或沉积在无机基材的至少一个表面上。示例性无机基材包括选自但不限于下列的一种或多种材料:硅、陶瓷如氧化铝、氧化钛、镍、玻璃、镍钛诺等。

[0290] 在一些实施方式中,蛋白质混合物通过连接体附接或沉积在聚合物的至少一个表面上。在一些实施方式中,连接体是有机连接体。在一些实施方式中,连接体是无机连接体。在一种实施方式中,有机连接体是单一直链连接体。在一些实施方式中,连接体还可包括支链。

[0291] 在一些实施方式中,连接体还可包括非可裂解的交联剂(例如,包括通过二硫键)。

[0292] 另外的示例性连接体可以是水溶性剂,非限制地包括杂官能桥,如3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES)、NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)、包含4个或更多个聚乙二醇单元的羧基-PEG-胺形式的聚乙二醇化氨基酸、和BS³(双[磺基琥珀酰亚胺基]辛二酸酯)。

[0293] 另外的示例性连接体可以是水不溶性剂,非限制地包括,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)、羰基二咪唑(CDI)、4-(二甲基氨基)吡啶(DMAP)、戊二醛(GA)。

[0294] 在一些实施方式中,连接体以其它官能团使纤维官能化,例如,以进一步与测试聚合物的基质附接或创建与测试聚合物的基质的共价键。

[0295] 在一些实施方式中，术语“连接体”指代键，例如共价键。在一种实施方式中，有机连接体包括反应性基团，该反应性基团构成连接体的一部分。

[0296] 如本文所用，短语“反应性基团”描述了能够进行一般导致键形成的化学反应的化学基团。导致键形成的化学反应包括例如亲核和亲电子取代、亲核和亲电子加成反应、烷基化、加成-消除反应、环加成反应、重排反应和任何其它已知的涉及官能团的有机反应、以及其组合。

[0297] 反应性基团可任选地包括可例如用于附接反应性基团的反应性部分至部分(基团, moiety)的非反应性部分(例如，烷基)。

[0298] 在示例性实施方式中，连接体包括选自羰基、胺、或巯基、或羧酸基团。

[0299] 在一些实施方式中，连接体可创建促进其它官能团另外充当亲核基团的中间基团。

[0300] 在一些实施方式中，术语“无机连接体”指代无机结合体，非限制地如硅烷醇基团。

[0301] 在一些实施方式中，复合材料的特征在于如下厚度：例如，100nm、200nm、300nm、400nm、500nm、600nm、700nm、800nm、900nm、1μm、5μm、10μm、20μm、30μm、40μm、50μm、60μm、70μm、80μm、90μm、100μm、200μm、300μm、400μm、500μm、600μm、700μm、800μm、900μm、1mm、10mm、50mm、100mm，包括其间任何数值或范围。

[0302] 在一些实施方式中，复合材料的特征在于如下厚度：例如，至少100nm、至少200nm、至少300nm、至少400nm、至少500nm、至少600nm、至少700nm、至少800nm、至少900nm、至少1μm、至少5μm、至少10μm、至少20μm、至少30μm、至少40μm、或至少50μm。

[0303] 在一些实施方式中，本公开的纤维附接至金属表面或聚合物材料。在一些实施方式中，本公开的纤维涂覆金属或聚合物材料。

[0304] 如本文所用，术语“涂覆”用于确定外部被涂覆部分(基材)的至少10%、20%、30%、50%、60%、70%、80%、90%、或100%覆盖。

[0305] 在一些实施方式中，利用涂覆法在至少部分基材表面上沉积本公开的纤维。

[0306] 涂覆方法的非限制性实例包括浸涂、喷涂、刷涂、刮涂、辊涂、卷到卷(reel-to-reel)涂覆、旋涂、印涂、丝网印刷和铸模。如下文实施例部分中进一步描述，在一些实施方式中，通过电纺工艺施加本公开的纤维在metric(支架)上的涂层。

[0307] 制品

[0308] 根据本发明一些实施方式的方面，提供了包括本文描述的复合材料的制品(例如，制造制品)。

[0309] 在一些实施方式中，制品是医疗装置。在一些实施方式中，短语“医疗装置”指代对象(优选地，人对象)的治疗中可利用的任何装置。

[0310] 在一些实施方式中，医疗装置是可植入的医疗装置。医疗装置可用于植入、注射、或以其他方式完全或部分置于身体中，因此期望该装置是药物洗脱装置。在一些实施方式中，医疗装置用于对象中的经皮和/或局部施加。这种医疗装置应在用于治疗给定组织时造成最小限度的组织刺激，并且因此其包含药物是有益的。在一些实施方式中，医疗装置是可植入的医疗装置，用于植入对象的身体器官中。

[0311] 短语“可植入的装置”在本文中用于描述适于长时期(例如，从几小时至几年和甚至终生)置于体腔中的任何医疗装置。

[0312] 示例性非限制性的可植入装置包括、板、网、螺杆、销、平头钉、杆、缝合锚、主动脉移植物、动脉管、人工关节、血液氧合膜、血液氧合管、身体植入物、导管、透析膜、药物递送系统、内用假体、气管内管、引导线、心脏瓣膜、主动脉内球囊、起搏器、起搏器引线、支架、超滤膜、脉管移植物、脉管管、静脉管、线类、矫形植入物、可植入的扩散泵和注射端口。

[0313] 可用于经皮应用的示例性装置非限制地包括缝线、粘性膏药和皮肤贴剂。可用于局部应用的进一步示例性装置非限制地包括缝线、粘合带、绷带、粘性膏药、伤口敷料和皮肤贴剂。

[0314] 另外的非限制性示例性装置包括吻合夹或塞、牙齿植入物或装置、主动脉动脉瘤移植物装置、房室分流器、血液透析导管、骨折愈合装置、骨置换装置、关节置换装置、组织再生装置、血液透析移植物、留置动脉导管、留置静脉导管、针、隔膜闭合装置、支架例如，脉管支架、气管支架、食管支架、尿道支架、直肠支架、支架移植物、缝线、线、管、脉管动脉瘤封堵器、脉管夹、脉管假体过滤器、脉管鞘和药物递送端口、静脉瓣膜和丝线。

[0315] 医疗装置可植入的身体位点的实例非限制地包括皮肤、头皮、毛发、真皮层、眼、耳、小肠组织、大肠组织、肾、胰、肝、消化道组织或腔、呼吸道组织或腔、骨、关节、骨髓组织、脑组织或腔、粘膜、鼻膜、血液系统、血管、肌肉、肺组织或腔、腹组织或腔、动脉、静脉、毛细管、心脏、心腔、男性生殖器官、女性生殖器官和内脏器官。

[0316] 如上所述，在一些实施方式中，可植入的医疗装置是支架。支架可以是各种类型、形状和材料。目前或未来任何市售的支架可根据本发明的实施方式来使用。

[0317] 在一些实施方式中，可植入的医疗装置是人工脉管移植物。在一些实施方式中，可植入的医疗装置是人工心脏泵隔膜、可植入的心脏瓣膜小叶。在一些实施方式中，可植入的医疗装置是组织骨架。

[0318] 在一些实施方式中，可植入的医疗装置是矫形植入物。在一些实施方式中，可植入的医疗装置选自而不限于，牙齿植入物、腔填充物和正畸装置。

[0319] 本发明的复合材料和包含其的制品可进一步用于动力威胁防护。制品可具有选自而不限于下列的形状：装甲板、防弹背心、身体护具、门板、地板、墙板、强化窗、管、头盔，玻璃、座位、飞机、装甲车和摩托车。例如，制品可用于保护物体免遭动力威胁。即，本公开的复合材料（和/或包括其的制品）可提供如步枪子弹多次击中的动力威胁的防护。保护物体免遭动力威胁的方法，包括给物体提供本文描述的制品——即，如上所述包括复合材料。

[0320] 在一些实施方式中，制品选自：丸剂、片剂、胶囊和凝胶胶囊。根据本发明的制品的其它非限制性实例包括医用粘合带、皮肤移植物、置换韧带、和外科网片；和宽范围的工业和商业产品、如服装织物、防弹背心衬里、容器织物、包袋或钱包带、缆线、绳索、钓鱼线、粘合剂结合材料、非粘合剂结合材料、捆扎材料、汽车覆盖物和部件、飞机构建材料、耐候材料、柔性隔离材料、运动器材；和事实上几乎任何用途的、高拉伸强度和弹性作为期望特征的纤维或织物。本发明还考虑其它形式的稳定纤维产品如干喷涂层、珠状颗粒的适应性和应用、或在与其它组合物的混合物中的应用。

[0321] 在一些实施方式中，制品如上所述在生理条件下是稳定的（例如，生物稳定的）。

[0322] 在一些实施方式中，制品包括织物。在一些实施方式中，术语“织物”指代由本发明的蛋白质纤维制成的编织或非编织人工制品。任选地，织物被制成具有受控的形状、尺寸，孔隙率和/或孔尺寸。

[0323] 在一些实施方式中，制品的特征在于热绝缘。在一些实施方式中，制品由具有高度热阻并因此用于热绝缘的刚性聚氨酯塑性材料构成。这种材料作为热绝缘的应用是本领域已知的，如冷藏电器和车辆中包括的热绝缘。

[0324] 在再进一步实施方式中，本公开的制品或复合材料可以是美容组合物。术语“美容组合物”涉及具有有益皮肤或其它浅表组织美学性质的组合物，如改善或提高皮肤色调和颜色、增强角蛋白结构、改善毛发和指甲和眼睫毛光滑度、厚度、毛发颜色和光泽、毛发拉直、隐藏浅表组织瑕疵如缺陷和疤痕、或预防未来或累积性伤害如阳光伤害和皮肤衰老。在此，“改善”还意为包括增强、着色、增长、和增厚。

[0325] 根据本发明的用于治疗的皮肤用或美容组合物作为油膏发膏剂、洗液、乳膏剂和凝胶被局部施用于表皮上，和作为水乳液如乳膏剂、洗液或凝胶被施用于粘膜上。可利用这种组合物生产的美容产品，包括诸如下列的产品：剃须膏、护手霜、洗发水、肥皂、护发素(conditioner)、身体乳、皮肤防晒品、面霜、或润肤露。美容组合物中的组分比例可根据美容组合物的目的应用来调节。

[0326] 其它制品选自但不限于，用于3D打印材料的添加剂如墨相关材料、用于FDM(熔融沉积建模)的热塑性聚合物和用于SLS(选择性激光烧结)的聚合物粉末、扩音器隔膜、过滤器、和弦(strings)。

[0327] 方法

[0328] 本发明还提供制备本公开的复合材料的方法，包括如下步骤：将蛋白质混合物附接至聚合物，从而形成复合材料。

[0329] 在一些实施方式中，方法包括如下步骤：熔融聚合物以产生熔融聚合物，和将蛋白质混合物转化到熔融聚合物中。总体上，将熔融聚合物转化成最终形式(包括冷却熔融聚合物)，使得形成聚合物-蛋白质复合材料或基质的期望结构。

[0330] 将复合材料塑形成期望形状的示例性方法包括聚合物领域已知的方法，如熔融聚合物的模塑、注塑、压缩模塑和挤出。

[0331] 在一些实施方式中，将蛋白质混合物附接至聚合物包括使蛋白质混合物与聚合物接触，从而致使蛋白质混合物粘附至聚合物——例如通过复合(compounding)，如下文实施例部分所述。在两组分(即，聚合物和蛋白质混合物)相互粘附时或例如在聚合物的仅接触表面局部化熔融就产生蛋白质和聚合物的充分粘韧附接以产生例如整体(一体，unitary)复合材料时，这种实施方式是有用的。

[0332] 在一些实施方式中，附接聚合物和蛋白质混合物包括将蛋白质转化到熔融聚合物中，和保持聚合物和蛋白质混合物的接触。在一些实施方式中，聚合物被置于模具中，或熔融聚合物被布置用于模塑。

[0333] 在一些实施方式中，附接聚合物和蛋白质混合物包括利用至少一种粘合剂(例如，热固性树脂(聚合物)或热塑性树脂，如上文所述)协助聚合物与蛋白质混合物的附接。在一些实施方式中，利用粘合剂包括施加粘合剂——例如通过在两组分的一者或两者上喷射粘合剂、漆涂(painting)粘合剂、刷涂粘合剂、沉积粘合剂、倾注粘合剂或铺设粘合剂层。在一些实施方式中，随后将两组分汇合并紧密固定到位(in place)——一般但不一定通过加热，直到粘合剂固化。

[0334] 在一些实施方式中，粘附促进剂被施加至聚合物的接触表面，从而增加粘合剂与

聚合物的粘附的粘韧性。在一些实施方式中，聚合物包括至少一种粘附促进剂。在一些实施方式中，蛋白质混合物包括一种或多种粘附促进剂。在实施方式中，至少一种粘附促进剂被加入熔融聚合物。在本发明的实施方式中，至少一种粘附促进剂被加入粘合剂。在一些实施方式中，聚合物包括至少一种冲击改性剂。在一些实施方式中，蛋白质混合物包括至少一种冲击改性剂。在一些实施方式中，至少一种冲击改性剂被加入熔融聚合物。在一些实施方式中，附接蛋白质混合物与聚合物的步骤包括溶解聚合物以产生溶解的聚合物，和将蛋白质混合物转化到溶解的聚合物中。

[0335] 在一些实施方式中，方法通过下列完成：将聚合物溶解——例如在水溶液或有机溶液(或溶剂)中，和使蛋白质与其中溶解了聚合物的溶液接触，然后溶剂蒸发，从而产生最终产品，(被称为“溶剂浇铸”)。在一些实施方式中，该方法然后是熔体挤出。

[0336] 在一些实施方式中，蛋白质混合物被溶解在例如水混溶性溶剂中——在多种肽与聚合物和水溶液接触前。

[0337] 在一些实施方式中，聚合物、或聚合物和蛋白质混合物是电纺的。电纺已知适于制造各种类型的聚合物结构，非限制地如，纳米线和微米线。电纺法用于制造本实施方式的复合材料的一个优点是这种生产方法可在相对低温下进行，因此能够在方法早期阶段掺入蛋白质混合物。另一优点是电纺聚合物能够携带相对高量的蛋白质混合物。

[0338] 本实施方式的进一步优点是电纺法可给电纺聚合物，因此还给本实施方式的复合材料，提供提高的机械性质，远超传统复合材料的机械性质。

[0339] 机械性质取决于制造过程中可控的几个变量。一个变量是聚合物的化学属性。此变量可通过用于例如电纺法的聚合物(一种或多种)的适当选择来控制。另一变量是体液和电纺聚合物之间的接触面积，这可例如通过改变电纺聚合物纤维的自由表面来控制。

[0340] 电纺法参数，例如电压、注入速度和收集器速度，可允许控制可根据需求定制的终端产品的特征。电纺法还可用于涂覆前述医疗装置(例如，导管)。将理解，各种涂覆方法可用于生产本公开的纤维，非限制地包括旋涂、湿纺、干纺和凝胶纺丝。

[0341] 细胞生长和培养

[0342] 在一种实施方式中，在带有或不带有聚合物的情况下，纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合作为可植入的或可生物相容的(生物相容性，biocompatible)材料使用，或连同可植入的或可生物相容的材料一起使用。在一种实施方式中，在带有或不带有聚合物的情况下，纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合用于细胞繁殖。在一种实施方式中，在带有或不带有聚合物的情况下，纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合用于保持、保留和/或引起细胞成活力。在一种实施方式中，在带有或不带有聚合物的情况下，纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合用于减少和/或最小化细胞死亡。在一种实施方式中，在带有或不带有聚合物的情况下，纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合用于引起细胞迁移。在一种实施方式中，在带有或不带有聚合物的情况下，纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合用于引起细胞附接。在一种实施方式中，组织骨架包括纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合——带有或不带有聚合物。在一种实施方式中，纤维是本文描述的纤维。

[0343] 在一种实施方式中，本文提供了组合物，其包括可生物相容的材料和纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合——带有或不带有聚合物。在一种实施方式中，

可生物相容的材料是活体可植入的材料。在一种实施方式中,可生物相容的材料是适于接触细胞或组织的材料。在一种实施方式中,可生物相容的材料是促进细胞或组织成活力的材料。

[0344] 在一种实施方式中,在带有或不带有聚合物的情况下,纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合用于引起骨再生。在一种实施方式中,骨再生组合物或骨架包括纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合——带有或不带有聚合物。在一种实施方式中,本文提供了组合物,其包括:(1)细胞;和(2)纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合——带有或不带有聚合物。在一种实施方式中,本文提供了组合物,其包括:(1)细胞-培养基;和(2)纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合——带有或不带有聚合物。在一种实施方式中,本文提供了组合物,其包括:(1)非生物材料;和(2)纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合——带有或不带有聚合物。

[0345] 在一种实施方式中,本文提供了伤口愈合组合物,其包括:纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合——带有或不带有聚合物。在一种实施方式中,本文提供了药物组合物,其包括:纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合——带有或不带有聚合物。

[0346] 在一种实施方式中,本文提供了适于接触身体组织的医疗装置,其包括:纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合——带有或不带有聚合物。在一种实施方式中,本文提供了适于在损伤或手术后将身体组织固定在一起的医疗装置,其包括:纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合——带有或不带有聚合物。在一种实施方式中,本文提供了外科缝线,其包括:纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合——带有或不带有聚合物。在一种实施方式中,本文提供了涂覆有下列的外科缝线:纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合——带有或不带有聚合物。在一种实施方式中,本文提供了伤口护理敷料,其包括:纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合——带有或不带有聚合物。在一种实施方式中,本文提供了无菌垫或敷布(compress),其包括:纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合——带有或不带有聚合物。

[0347] 在一种实施方式中,本文提供了组合物,其包括:(1)细胞、细胞培养基或两者;和(2)纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合——带有或不带有聚合物。在一种实施方式中,本文提供了使细胞保持或生长的方法,包括使细胞与组合物接触,该组合物包括:纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合——带有或不带有聚合物。在一种实施方式中,本文提供了组装多层细胞培养物的方法,包括使细胞与组合物接触,该组合物包括:纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合——带有或不带有聚合物。在一种实施方式中,本文提供了组装多层细胞培养物的方法,包括使细胞与表面接触,该表面包括:纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合——带有或不带有聚合物。

[0348] 在一种实施方式中,本文提供了组装预定数量的细胞层的方法,包括使细胞与表面接触,该表面包括:预定量的:纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合——带有或不带有聚合物。在一种实施方式中,预定量的:纤维、蛋白质混合物、“m”种类

型的蛋白质或其任何组合——带有或不带有聚合物——是适于接触细胞的预定厚度的表面。在一种实施方式中，本文描述的组合物或方法中的细胞3D交叉相互作用(cross-interact)。在一种实施方式中，本文提供了制造设定数量的细胞层的方法，其中细胞交叉相互作用。在一种实施方式中，本文提供了制造设定数量的细胞层的方法，其中细胞交叉相互作用并且结合至纤维。

[0349] 在一种实施方式中，“预定数量的细胞层”或“设定数量的细胞层”根据以下确定：施加于细胞生长表面上的纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合(带有或不带有聚合物)的量，如但不限于细胞生长板或细胞生长皿。在一种实施方式中，“预定数量的细胞层”或“设定数量的细胞层”根据以下确定：施加于细胞生长表面如生物相容性材料上的纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合(带有或不带有聚合物)的量。

[0350] 在一种实施方式中，根据本文描述的方法和组合物， 1×10^3 个纤维/cm²至 8×10^5 个纤维/cm²在涂覆有纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合(带有或不带有聚合物)的表面的至少70%或80%上保持仅单个细胞层。在一种实施方式中，根据本文描述的方法和组合物， 1×10^2 个纤维/cm²至 1×10^6 个纤维/cm²在涂覆有纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合(带有或不带有聚合物)的表面的至少70%或80%上保持仅单个细胞层。在一种实施方式中，根据本文描述的方法和组合物， 4×10^5 个纤维/cm²至 18×10^5 个纤维/cm²在涂覆有纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合(带有或不带有聚合物)的表面的至少70%或80%上保持两个细胞层。在一种实施方式中，根据本文描述的方法和组合物， 8×10^5 个纤维/cm²至 14×10^5 个纤维/cm²在涂覆有纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合(带有或不带有聚合物)的表面的至少70%或80%上保持两个细胞层。在一种实施方式中，根据本文描述的方法和组合物， 10×10^5 个纤维/cm²至 14×10^5 个纤维/cm²在涂覆有纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合(带有或不带有聚合物)的表面的至少70%或80%上保持两个细胞层。在一种实施方式中，根据本文描述的方法和组合物， 15×10^5 个纤维/cm²或更多在涂覆有纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合(带有或不带有聚合物)的表面的至少70%或80%上保持三个或更多个细胞层。在一种实施方式中，根据本文描述的方法和组合物， 18×10^5 个纤维/cm²或更多在涂覆有纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合(带有或不带有聚合物)的表面的至少70%或80%上保持三个或更多个细胞层。在一种实施方式中，根据本文描述的方法和组合物， 20×10^5 个纤维/cm²或更多在涂覆有纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合(带有或不带有聚合物)的表面的至少70%或80%上保持三个或更多个细胞层。在一种实施方式中，根据本文描述的方法和组合物， 24×10^5 个纤维/cm²或更多在涂覆有纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合(带有或不带有聚合物)的表面的至少70%或80%上保持三个或更多个细胞层。在一种实施方式中，多层、多细胞层或多于两个的细胞层导致各层内的3D细胞-与-细胞相互作用。在一种实施方式中，多层、多细胞层或多于两个的细胞层导致各层内和层间的3D细胞-与-细胞相互作用。

[0351] 在一种实施方式中，SS机械地保护细胞。在一种实施方式中，SS为结合于SS的细胞提供机械保护。在一种实施方式中，SS为SS包封的细胞提供机械保护。

[0352] 在一种实施方式中，多层、多细胞层或多于两个的细胞层导致各层内的3D细胞-与-细胞相互作用和3D细胞-与-SS相互作用。在一种实施方式中，多层、多细胞层或多于两

个的细胞层导致各层内的3D细胞-与-细胞相互作用和3D细胞-与-SS相互作用。

[0353] 在一种实施方式中,本文提供了筏,其由下列构成:(1)纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合——带有或不带有聚合物;(2)粘附至该筏的细胞。在一种实施方式中,本文提供了筏,其由下列构成:(1)纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合——带有或不带有聚合物;(2)粘附至该筏的孤独细胞。在一种实施方式中,该筏包封细胞。在一种实施方式中,细胞附接至该筏。

[0354] 在一种实施方式中,本文提供了使孤独细胞生长、保持或扩增的方法,包括混合细胞与纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合——带有或不带有聚合物。在一种实施方式中,本文提供了使需要细胞表面附接的孤独细胞生长、保持或扩增的方法,包括混合细胞与纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合——带有或不带有聚合物。在一种实施方式中,使孤独细胞生长、保持或扩增的方法是体外方法。

[0355] 在一些实施方式中,纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或任何组合需要至少6个重复段(n)。在一些实施方式中,纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合需要至少7个重复段。在一些实施方式中,本文描述的纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合需要至少8个重复段。在一些实施方式中,本文描述的纤维、蛋白质混合物、“m”种类型的蛋白质或其任何组合需要:6-70、7-8-70、9-70、10-70、11-70、12-70、13-70、14-70、15-70、16-70、17-70、18-70、19-70、或20-70个重复段(“n”如上文限定)。

[0356] 在一种实施方式中,本文描述的方法是体外方法。在一种实施方式中,本文描述的方法是离体方法。

[0357] 一般情况

[0358] 如本文所用,术语“约”指代±10%。术语“包括”、“包含”、“具有(includes、including)”和其词形变化意为“包括但不限于”。术语“由……组成”意为“包括并且限于”。术语“主要由……组成”意为组合物、方法或结构可包括另外的成分、步骤和/或部分——但仅仅在该另外的成分、步骤和/或部分不实质上改变所述组合物、方法或结构的基础和新特征的情况下。

[0359] 词语“示例性”在本文中用于表示“充当实例、案例或示例”。作为“示例性”描述的任何实施方式不一定被解释为相对于其它实施方式优选或有益和/或排除来自其它实施方式的特征的并入。词语“任选地”在本文中用于表示“在一些实施方式中被提供并且在其它实施方式中不被提供”。本发明的任何具体实施方式可包括多个“任选的”特征,除非这种特征冲突。

[0360] 如本文所用,单数形式“一”、“一个/一种”和“所述”包括复数指代,除非上下文明确另有指示。例如,术语“一种化合物”或“至少一种化合物”可包括多种化合物,包括其混合物。

[0361] 贯穿本申请,本发明的各种实施方式可以范围形式展示。应理解,范围形式的描述仅为方便和简练起见,而不应被解释为对本发明范围的僵硬限制。因此,范围描述应被解释为已具体地公开了该范围内的所有可能的子范围以及个体数值。例如,范围如1至6的描述应被解释为已具体地公开了子范围如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等,以及该范围内的个体数值,例如、1、2、3、4、5、和6。这无论范围宽度地适用。无论何时本文指示了数值范围,其均意为包括所示范围内的任何引用数值(分数或整数)。短语“第一指示数值和第二指

示数值之间的范围”和“从第一指示数值至第二指示数值的范围”在本文中可互换使用，并且意为包括第一和第二指示数值和其间的所有分数和整数值。

[0362] 如本文所用，术语“方法”指代完成给定任务的方式、手段、技术和程序，包括但不限于，化学、药理学、生物学、生物化学和医疗领域从业者已知的或根据已知的方式、手段、技术和程序容易开发的那些方式、手段、技术和程序。如本文所用，术语“治疗”包括消除、显著抑制、减缓或逆转状况的进展，显著减轻状况的临床或审美症状或显著预防状况的临床或审美症状的表现。

[0363] 将理解，为清楚起见在单独实施方式的环境中描述的本发明某些特征也可在一个实施方式中被组合提供。相反，为简练起见在单个实施方式的环境中描述的本发明各种特征也可被单独提供，或以任何适当的子组合提供，或在适当时在本发明的任何其它所述实施方式中提供。某些在各种实施方式的环境中描述的特征不被认为是那些实施方式的必要特征，除非该实施方式没有那些要素就不可工作。

[0364] 上文描述的和所附权利要求书部分中要求的本发明的各种实施方式和方面得到下列实施例的支持。

[0365] 实施例

[0366] 材料和方法

[0367] 质粒：获自Geneart (Regensburg, 德国) 的PCR-ScriptAmpSK (+) 质粒中的DNA序列。pFastBacHTa获自Invitrogen。

[0368] 限制酶：PstI, HindIII, NsiI, 获自 (New England Biolabs, MA, USA)。

[0369] 转染和转化：感受态大肠杆菌 (E. coli) DH10BAC细胞，包含杆粒和辅助质粒 (Invitrogen) 。ESCORT转染反应剂 (Sigma-Aldrich)。

[0370] 培养基：ESF 921昆虫细胞培养基，无血清，获自表达系统，或SF-900 II SFM；无血清，获自GIBCO；Propidium Iodide (SIGMA, ISRAEL)；钙黄绿素AM (Cayman, USA)；和DAPI (ibidi, Germany)。

[0371] 成像：逆相差显微镜，EVOS XL, Life Technologies。关于共聚焦照片：Olympus BX51荧光显微镜。Magnafire SP照相机来自Optronics。

[0372] 形成蛋白质混合物的实验程序：

[0373] 拖丝蜘蛛丝蛋白的单个重复单元的编码序列的合成：设计35个氨基酸长度的序列，其代表构成ADF-4 (Genbank条目U47856) 的重复性区域的15个重复段的平均共有序列。该平均共有序列肽序列是：SGPGGYGPSSQGPSPGGYGPGGPGSSAAAAAAA (SEQ ID NO.14)，其由下列105DNA碱基对序列编码：5'-TCTGGTCCTGGAGGTTATGGCCCAGGAAGCCAAGGACCATCTGGTCCA GGAGGATATGGTCCAGGCCGGACCTGGCTTAGTGCAGCAGCTGCCGCAGCAGCTGCA-3' (SEQ ID NO:15)。上述合成DNA在PCR-ScriptAmpSK (+) 质粒中获得。该序列根据草地贪夜蛾的密码子使用被优化以表达，草地贪夜蛾的细胞用于合成蜘蛛丝蛋白和纤维。

[0374] 供体质粒构建：用Xba I和Xho I切除ScriptAmpSK (+) 质粒，并将包含侧接Nsi I和Pst I限制位点的基本重复序列的136-bp序列分离，并克隆到杆状病毒供体质粒 pFastBacHTa的多个克隆位点 (MCS) 中。因此，生成编码人工49氨基酸N端结构域和35氨基酸核心结构域的基本供体质粒。

[0375] 单个重复段的多聚：蜘蛛丝蛋白的一个重复段(单体)的基本模块侧接相容的限制

酶位点NsiI和PstI。在第一步中,将单体通过双重限制释放,并在框中插入用PstI切割了的相同供体质粒。只有插入物以正确的正义方向(correct sense orientation)连接时,双重切割才会释放二聚体[两重复段之间的限制位点在连接后消除]。在第二步中,将二聚体释放,然后以相同方式重新插入,以获得具有四个重复段的载体。在后续步骤中,此程序再重复以获得包含单个合成重复段的供体质粒。来自所用分子生物学工具的约束和序列的重复属性限制了相同重复段的可实现的最大数量。

[0376] 合成重复段下游天然C端结构域的连接:ADF4 114氨基酸的C端结构域的插入利用PCR以下列引物进行:正义引物,具有序列5'-ATATGCTGCAGGCCCTAGTGGTCCTGGA-3' (SEQ ID NO:16),包含PstI限制位点(下划线);和反义引物,具有序列5'-TCGACAAGCTGGTACCGCA-3' (SEQ ID NO:17),编码3'HindIII限制位点(下划线)。具有不同数量的重复段的供体质粒载体和PCR产物用PstI和HindIII切除,纯化和连接,产生pFastBacHTa供体质粒——其编码His6标签(其是人工N端结构域的一部分),然后是不同数量的相同重复段(发明人获得了包含该核酸序列的1、2、4、8、12、16、20、24、32重复段的构建体)和天然C端结构域。

[0377] 细胞培养:使Sf9细胞在27℃下在ESF 921无血清昆虫细胞培养基中繁殖。使Sf9细胞在6孔板中的盖玻片上作为单层生长或在130rpm搅动的摇瓶中生长。

[0378] 重组杆状病毒的制备:包含杆粒(杆状病毒穿梭载体质粒)和辅助质粒的感受态大肠杆菌DH10BAC细胞按照制造商的方案(Invitrogen)用于生成重组杆粒。基因在杆粒中的插入通过PCR验证。在6孔板中利用ESCORT转染反应剂,用重组杆粒DNA转染Sf9细胞。将细胞在27℃下培育5h,漂洗和再培育72h。收集培养基,离心,并将含病毒的上清液用于2-3次连续感染,导致病毒体滴度的扩增。

[0379] 合成ADF-4系蛋白质的表达:在0.1至10范围内的各种MOI(感染复数)下用重组病毒感染Sf9细胞(3×10^6 个细胞/ml)。感染后4天,通过在16000g下离心10min来收集细胞。

[0380] 聚合物的性质富集:在产品开发过程中,将几种潜在的材料用本公开蜘蛛丝测试性质富集。目的是富集某些材料性质,以解决工业需求和困难,即,较高韧性、较高抗冲击性、较高破裂韧性和较高应力和模量。

[0381] 从环氧树脂延伸的具有不同用途的多种材料用于复合材料、热塑性聚合物和热固性聚氨酯片材和膜和生物相容性水凝胶——包括pHEMA、3D打印工业的喷墨材料。

[0382] 测试材料列举:

[0383] 1. 环氧树脂: (a) EP-520, Polymer Gvulot; 和 (b) EP-502, Polymer Gvulot

[0384] 2. 热塑性聚氨酯(TPU): (a) Tecoflex®SG-93A, Lubrizol; (b) EG-72, Lubrizol; 和 (c) PE399, Huntsmann

[0385] 3. 热固性聚氨酯(PU): (a) -2047, Polymer Gvulot

[0386] 4. 尼龙12, 托板形式, 由PolyRam供应

[0387] 5. 尼龙12, 粉末形式, 由ARAN供应

[0388] 6. pHEMA, 由Sigma Aldrich供应

[0389] 7. Butvar (B-98), 由Sigma Aldrich供应

[0390] 8. EVOH (EVAL F101B), 由Kuraray供应

[0391] 9. PLA (2003D), 由NatureWorks LLC. 供应

[0392] 10. PCL (CAPA 80), 由CAPA 80 Perstorp供应

- [0393] 11.PCL (80Mn) ,由Sigma Aldrich供应
- [0394] 12.Silicon-Sylgard 184,由Dow Corning供应
- [0395] 13.VeroClear-Acrylic UV固化喷墨,由Stratasys供应
- [0396] 测试了几种样本制备和分析的加工技术,包括:溶剂浇铸、模铸、溶剂电纺和熔体复合。
- [0397] 实施例1
- [0398] 包括环氧树脂的复合材料
- [0399] 测试双组分系统,作为复合材料的基质。目的是改善基质性质,以实现整个系统更好的机械性质。将定制的PTFE模具用于材料制备。
- [0400] 环氧化物系双组分系统的实验:
- [0401] 在示例性程序中,按照制造商的建议,将部分A-树脂基材和B-硬化剂称重。将蜘蛛丝("SS",贯穿本文还称为"SSS")纤维以不同负载百分比0、1% 和2% w/w称重,并倾注到模具中。固化谱线是室温下24h,然后80℃下3h。将样品从模具取出,并通过拉伸测试仪测试关于样本拉伸强度、模量、应变和失效前效能的机械性质。每个测试组由5-6个样品组成,以建立统计学数据。
- [0402] Polymer Gvulot的环氧化物-EP-520:杨氏模量改善(增加)约10% (图1)。纤维-基质的粘附似乎不良(如图2左图的SEM图像所示)。虽然在一些情况下检测到纤维周围无腔洞时粘附更佳(图2右图:显示具有3.165μm长度和约215nm直径的SS纤维)。
- [0403] 测量通过FEI显微镜在不同分辨率和10–30keV的不同电子加速度下完成,HRSEM模式用于更好地可视化和测量纤维长度和直径。
- [0404] 环氧化物-EP-502:机械测试结果(SS的拉伸强度、杨氏模量、和屈服点、1% 富集)显示在图3中(并且与1% CNT富集进行比较,以及总结在下文表1中)。

[0405] 表1

[0406]

杨氏模量改善[%]	314%
拉伸强度改善[%]	47%
屈服点改善[%]	133%

[0407] 弯曲结果:在另外的示例性程序中,对对照和1% 富集样本进行弯曲实验测试。

[0408] 样品类型尺寸是63.5*12.7*13.1mm。

[0409] 结果总结在下表24中,尤其显示1% 富集样品的弯曲杨氏模量提高和失效效能降低。

[0410] 表2

	弯曲杨氏模量 (MPa) 对照	弯曲杨氏模量 (MPa) 1%SS			最大弯曲应力 (MPa) 对照	最大弯曲应力 (MPa) 1%SS
[0411]	平均值	2943.98	3271		平均值	111.4
	SD	177.08	160.49		SD	5.64
	变化 [%]	6.01%	5%		变化 [%]	5.06%
		最大断裂应变对照	最大断裂应变 1%SS		失效效能 (Nmm) 对照	失效效能 (Nmm) 1%SS
	平均值	0.09	0.03		平均值	1164.98
	SD	0	0		SD	136.69
	变化 [%]	4.28%	8.41%		变化 [%]	11.73%
						8.04%

[0412] 实施例2

[0413] 包括热塑性和热固性聚氨酯(PU)的复合材料

[0414] 测试几种聚氨酯。评价抗撕裂性和拉伸强度的改善。热固性PU主要是二组分系统，而热塑性PU以片材形式或丸粒供应并溶解在添加了SS纤维的有机溶剂中。将溶液模铸并使其蒸发。

[0415] 热塑性聚合物的示例性实验程序：

[0416] 将供应的片材溶解在几种有机溶剂中，以测试溶解率。溶解还影响最终样品产生的最终机械性质。所有样本的制备方法一致。

[0417] 将来自HUNTSMAN的Pe-399(脂肪族聚氨酯聚合物)以按重量计10%溶解在1,4二𫫇烷中，然后留置蒸发24小时。在蒸发结束后，将膜切割成8mm宽度和80mm长度的条带，并通过拉伸测试仪伸展。拉伸测试按照ASTM D-882。样本尺寸是7cm长度&0.8cm宽度的条带。

[0418] 图4A-D展示了拉伸测试结果，包括杨氏模量(图4A)、30%伸长时的应力(图4B)和30%伸长时的韧性(图4C)、100%伸长时的应力(图4D)和100%伸长时的韧性(图4E)。全部均对对照和SS富集膜进行，如各图的嵌图所示。结果展示为平均值±SD(n=5，关于各条件，相同膜的不同条带)。

[0419] 图5A展示了SS富集后的撕裂强度结果——各条形表示一种样品的结果。图5B展示了一般的撕裂测试图，显示对照、3%和5%富集膜。

[0420] 纤维在浓液(dope solution)和固化膜中已达到充分分散(参见图4A和4B)。如图4A所示，杨氏模量增加了34%-150%，并且30%和100%伸长时(图4B-E)的应力和韧性表现也已显著增加。如图5A-B所示，随着膜中纤维浓度增加，撕裂强度和破裂韧性以剂量依赖性方式增加了40-105%。

[0421] 将Lubrizol的Tecoflex®SG-93A(脂肪族聚醚系热塑性聚氨酯)10%w/v溶解在以下几种溶剂中：THF、甲苯，氯仿和二𫫇烷，然后留置蒸发24小时。然后，将膜切割成8mm宽度和80mm长度的条带，并通过拉伸测试仪伸展。

[0422] 撕裂测试结果:结果显示在图6A-C中,杨氏模量和撕裂强度增加。

[0423] 热固性聚氨酯的示例性实验程序:

[0424] U-2047二组分聚氨酯化合物-基材(部分A-多元醇)&固化剂(部分B-HDI)。由Polymer G-Formulating Success供应。两组分的制备按照制造商的说明。在纤维富集的情况下,在与部分B混合前,将纤维与部分A混合。将混合物在1000RPM下离心4分钟以脱气,然后在100mBar下抽真空7分钟以再脱气。固化谱线是室温下24h,然后固化后在80℃下3h。实验以下列批次进行:对照、1%、2%&3%SS批次。测量的全部4个参数中观察到改善的性质,通过LLOYD拉伸测试仪测试。

[0425] 结果展示在图7和8中,并且进一步总结在下表3中,显示下列改善率:杨氏模量、拉伸强度、断裂应变、和失效前效能。

[0426] 表3

[0427]

	改善率		
	1%	2%	3%
杨氏模量	23%+	40%+	49%+
拉伸强度	17%+	26%+	48%+

[0428]

断裂应变	8%+	3.5%+	32%+
失效前效能	15%+	40%+	52%+

[0429] 撕裂测试:在示例性程序中,Trouser撕裂测试方法根据ASTM D-1938方案进行。

[0430] 材料:热固性聚氨酯2047,由供应"Polymer G Ltd"。样品的尺寸是60mm*20mm*0.8mm。在示例性程序中,使用两对照样品(1%载荷的样品)。结果显示在下表4A-B中,证明载荷样品的撕裂强度的244%改善。

[0431] 表4A

[0432]

	对照	1%载荷	改善率[%]
撕裂强度[N/mm]	74	254.7	244%+

[0433] 表4B

[0434]

	改善率		
	%1	%2	%3
杨氏模量	+%22.5	+%39.5	+%48.5
拉伸强度	+%17	+%26	+%48
断裂应变	+%5.5	+%1	+%28.5
失效前效能	+%20.4	+%46.5	+%59.5

[0435] 实施例3

[0436] 包括尼龙的复合材料——通过复合和通过注塑制备

[0437] 尼龙6、尼龙6,6和尼龙12的使用在工业中是普遍的。通过用蜘蛛丝强化尼龙，显示出机械性质的显著改善。第一测试对收到时状态的丸粒进行。这导致在大丸粒不完全熔融并且与SS的充分混合实现不了时混合阶段中的问题。进一步测试对精细粉末形式的尼龙12进行。在示例性程序中，复合在DSM Xplore双螺杆微型复合器(DSM, Heerlen, 荷兰)上进行。制备程序如下：利用微型复合器获得直径约100 μm 的细丝，并测试其机械性质。测试了5个样品。

[0438] 结果展示在图9A中，并且下表5中展示了2%、4%纤维富集与CNT比较的机械性质改善(杨氏模量、150%伸长时的应力、和屈服点)。

[0439] 表5

[0440]

杨氏模量改善[%]	96%
应力@150%伸长改善[%]	32%
屈服点改善[%]	75%

[0441] 值得注意的是，即使所示富集百分比是4%，有效载荷百分比是低于其的。在制备过程中，纤维的一些部分留在复合器的进料器上。此外，复合材料中的纤维团聚，因此其对复合材料强度的贡献减少。假设实际富集百分比处于约2%。

[0442] 图9A展示了具有直径140和250 μm 的纤维(2%富集，通过挤出)的尼龙12的应力-应变测量。图9B展示了2%富集的尼龙12中的纤维的横截面的代表性SEM图像，显示具有约120nm至180nm直径的SS纤维。可见，蜘蛛丝粘附良好的几个点，并且图9B的中图显示没入聚合物基质中的拉伸的纤维。

[0443] 利用Hakke的Minijet Pro系统，利用注塑制造尼龙12。利用尼龙12的精细粉末注入狗骨样品。制备2%SS富集的样本，以在拉伸测试仪系统中进行评价，结果显示在图9C-E中。

[0444] 在另外的程序中，根据下列参数以聚乳酸(PLA；130 μm 直径)进行复合：

[0445]

挤出器温度	螺杆速度[R.P.M.]	收集器速度[R.P.M.]	混合时间[min.]
185°C	50/30	250-300	0.5-1

[0446] 结果展示在图9F中，2%SS富集的PLA样本的应力-应变曲线改善。

[0447] 实施例4

[0448] 通过电纺覆以蜘蛛丝

[0449] 电纺是可通过溶解在有机溶剂中的聚合物和纤维的电场加速来制备极细线的方法。该方法通过如下工作：通过内容物朝向在30kV电压下带负电的收集器加速，导致溶剂快速蒸发。高电位差形成电场——该电场将聚合物和溶剂的液滴内容物吸向收集器，溶剂快速蒸发，并且聚合物在收集器上固化以及根据系统设置参数允许纳米至微米的纤维形成。

[0450] 在示例性程序中，产生的复合材料纤维具有1-10 μm 的直径。测试的聚合物基质：TPU(热塑性聚氨酯)和PCL(聚己内酯)；和以收到的不同孔隙率和筛目浓度(mesh thickness)测试几种富集百分比。TPU富集：SG-60，TPU购自Tecoflex并以收到时状态使用。

[0451] 浓液制备：在示例性程序中，将TPU(SG60D)溶解在DMF和THF(7:3(w/w))混合物中，

获得9、11、或13% (w/w) 的溶液。将各配置以1、2、或3%蜘蛛丝百分比富集,构建12种配置的基质测试物。

[0452] 纺丝过程:在示例性程序中,对照溶液设置是:i. 流速0.9mL/h; ii. 静电场~1.2kV/cm; iii. 温度26°C; iv. 湿度~60%; 和v. 吐丝器(针23G);

[0453] 在示例性程序中,富集溶液设置是:i. 流速0.9 1.2mL/h; ii. 静电场~1.2kV/cm; iii. 温度26°C; iv. 湿度~60%; v. 吐丝器(针23G)

[0454] 机械性质评价:通过利用拉伸测试仪Lloyd和500N载荷细胞、在室温下的拉伸测试,考察电纺垫。样本为约20mm长、5mm宽、和0.15mm厚。在1mm/min伸展速率下记录应力-应变曲线。根据下列方程式,根据样本有效面积计算应力:

[0455] $\sigma = F / (A \cdot \rho_{\text{垫}} / \rho_{\text{本体}})$,

[0456] 其中F是测量的力,A是测量的横截面,表观密度是 $\rho_{\text{垫}} / \rho_{\text{本体}}$,其中 $\rho_{\text{本体}}$ 是淀粉振实粉末密度(starch tapped powder density),和 $\rho_{\text{垫}}$ 是纤维垫密度。

[0457] 浓液的流变学:通过流变仪TA Discovery 2研究溶液的流变学。

[0458] PCL富集:PCL,80000Mn,购自Sigma,并且以收到时的状态使用。

[0459] 在示例性程序中,溶液以CHCl₃:DMF 6:4比例制成,并且制备下列:对照-10w/w PCL; 9.75PCL和0.7蜘蛛丝; 9.5PCL和1.33蜘蛛丝; 或9.25PCL和1.77蜘蛛丝(数值表示相对于聚合物固体的wt. %)。电纺设置与上文关于SG60D的所述类似。

[0460] TPU结果:

[0461] 电纺法:电纺法产生具有平均直径0.8um的纤维的TPU 12% (w/w) 稳定过程(stable process),和具有平均直径3.0um的纤维的TPU 16% (w/w) 稳定过程。发现富集溶液具有过度粘性,因此稀释至约10.5%。

[0462] 图10展示了电纺11% (w/w) TPU纤维,作为对照批次。图11展示了电纺纤维~10.5% (w/w) TPU+~2% (w/w) 填充剂。图12展示了SG-60固体含量为9、11、和13% w/w时的对照批次的流变行为。图13A-B证明在增加加入到SG-60的填充剂量时,粘度增加,但流变行为不受影响。

[0463] 机械性质结果总结在表6中,显示杨氏模量改善。

[0464] 表6

[0465]

		孔隙率	SD	模量(MPa)	SD	拉伸强度(MPa)	SD	韧性(J/m ³)	SD
9%	对照	43%	4%	19.8	0.08	36.415	0.377	25.729	1.856
	1%	40%	13%	19.77	3.88	24.143	4.349	12.149	2.384
	2%	22%	8%	33.79	1.41	35.101	1.51	19.739	2.046
	3%	14%	6%	38.34	2.53	37.704	1.458	26.578	3.894
11%	对照	36%	3%	31.26	8.23	37.222	2.394	33.795	6.29
	1%	14%	9%	44.8	1.75	33.488	1.727	42.358	6.587
	2%	20%	7%	50.23	4.65	27.593	3.063	33.707	5.494

[0466] 图14展示了杨氏模量结果。左侧图像展示了9%TPU固体含量的模量结果,其中可见在2%和3%的SS载荷时达到显著富集。右侧图像展示了11%TPU固体含量的模量结果,其

中可见在2%SS载荷时达到显著富集。

[0467] 应力-应变曲线在此被进一步展示:图15展示了9%w/w配置的应力-应变曲线。

[0468] 图16展示了11%w/w配置的应力-应变曲线。

[0469] 图17展示了11%w/w配置的弹性区域的放大。在弹性区域中,富集网具有较高值,其后存在掉换并且对照网具有较高值。

[0470] PCL结果:关于PCL电纺测试,PCL电纺测试结果总结在下表7中:

[0471] 表7

[0472]

	对照		9.75PCL-0.7SS		9.5PCL-1.33SS		9.25PCL-1.77SS	
		SD		SD		SD		SD
有效杨氏模量(MPa)	232.337	13.39	116.23	16.538	241.661	50.347	216.09	38.934
断裂应变百分比	84.669	6.374	81.47	4.352	96.075	6.009	82.534	9.934

[0473]

有效拉伸强度(MPa)	83.069	5.297	43.421	4.04	108.467	8.908	94.747	13.028
-------------	--------	-------	--------	------	---------	-------	--------	--------

[0474] 应力-应变曲线在此被进一步展示。图18显示PCL电纺批次的应力-应变曲线,证明1.33%蜘蛛丝富集产生最佳的结果。图19展示了PCL电纺的结果统计。

[0475] 溶剂系统、极性、纤维溶解和蒸发:纤维可溶于六氟异丙醇(HFIP)、浓硫酸或间甲酚。这是因为强氢键和致密的晶体纤维形态。基于实验数据,选择用于充分溶解纤维的溶剂是HFIP——因为其具有高蒸气压和极性,使得其是杰出的电纺载体。在充分溶解后,将样本置于连接有Luer lock 22G针的注射器中。

[0476] 注射泵速度:在0.001-1.0ml/min的范围之间考察注射泵速度。在示例性程序中,制备了4-5% (wt/vol) 冻干纤维的HFIP溶液。溶解过程耗时约2h,以溶解和形成澄清的粘性溶液。然后使HFIP在排气罩(hood) 中蒸发,直到体积减少并且浓度处于8-13% (wt/vol) 。电压设定为30kV。

[0477] 在另外的示例性程序中,对纤维溶液进行电纺,最初形成网——在铝箔或旋转心轴上收集的。然后,在支架上收集纤维,以证明在医疗装置上涂覆的可行性。制备了两种类型的纤维溶液。参照物是Bombyx Mori (BM) 纤维——溶解在HFIP中,而另一个是合成蜘蛛丝(SS) 纤维——在制备后冻干并且再溶解在HFIP中用于电纺。

[0478] 图20展示了照片图像,显示篮状物(从插入动脉的细中空管露出同时折叠),其涂覆有纳米纤维,形成纳米网。涂覆利用Bombyx Mori纤维在说明性支架(stating stent) 上进行。

[0479] 图21展示了光学显微图像,显示篮状物,其涂覆有纳米纤维,形成纳米网。

[0480] 在另外的示例性程序中,利用蜘蛛丝(SS)溶液实施涂覆技术,以涂覆篮状物杆。如图22所示,微涂层利用电纺涂层技术形成,并且通过光学显微可见,涂层由纳米纤维构成。

[0481] 在另外的示例性程序中,考察了另一在纤维HFIP溶液中浸涂支架的技术。

[0482] 图23展示了膜涂覆支架——利用篮状物在BM HFIP溶液中的浸涂,显示了涂覆整个支架的均匀薄膜。

[0483] 扫描电子显微(SEM)分析:参照电纺是溶解在HFIP中的Bombyx Mori(BM)纤维,并且另一者是合成蜘蛛丝(SS)纤维——在制备后冻干并且再溶解在HFIP中用于电纺。利用高分辨率扫描电子显微(HR-SEM;Sirion,FEI Company Eindhoven,荷兰)分析涂层表面形态。聚合物样本的HR-SEM显微图利用3-7kV电压范围获得。在分析前,将样本溅射涂覆60秒,形成约10nm金/铂层,从而防止充电。超高空间分辨率用于结构和高分辨率分析。能量色散X射线光谱(EDAX)测量用于微量分析,以检测电子显微镜中生成的特征x射线值。显微图显示在以下图中:图24是Bombyx Mori,和图25是合成蜘蛛丝纤维。下表8总结了利用SEM显微图测量的测量纤维直径。

[0484] 表8

	Bombyx Mori	蜘蛛丝	
	平均直径[nm]	STDEV[nm]	平均直径[nm]
[0485]	205	166	54
			38

[0486] 由HR-SEM分析证明,两种材料均允许形成均匀纤维。BM纤维较厚,平均直径为205±166nm,而SS纤维显示平均直径为54±38nm。SS纤维网由高密度小直径纤维构成,并且可高效能作用于多种应用。

[0487] 可得到如下结论:这种技术可用于制备支架和网的纤维涂层,是涂覆纤维和由溶液再制纤维的有效手段,并且显示出良好的表面粘附。结果是纳米级厚度的纤维,并且纤维密度足够高以进行用于各种应用的有益涂覆。注意,对于这种装置的涂覆,电纺纤维复合材料比纯BM丝或溶解在HFIP中的SS更有益,因为纤维的机械性质可在HFIP增溶过程中受损。

[0488] 实施例5

[0489] 包括BUTVAR、EVOH、PHEMA、和UV固化的丙烯酸酯配方的复合材料

[0490] 为表征通过合成纤维强化的聚合物基质的合成纤维样本的机械性质,进行了制备。选择研究的聚合物基质是:

[0491] ●pHEMA(聚甲基丙烯酸羟基乙酯)

[0492] ●聚乙烯醇缩丁醛树脂(Butvar B-98)

[0493] ●Vero Clear(喷墨材料,UV固化,由Stratasys供应)

[0494] 将纤维分散在聚合物溶液中,然后通过聚合使溶液固化。使样本以0-5%之间的各种富集百分比富集。在固化后,将样本切成80mm长度、8mm宽度和0.9mm厚度的条带。将VeroClear样本注射在固定在2个玻璃片之间模具上。UV固化过程通过150W汞灯保持10-15分钟固化时间。在固化后,将样本从模具释放,并切成80mm长度、8mm宽度和1-2mm厚度的条带。通过拉伸测试仪(Instron 4502,按照ASTM D628——具有所需改动)使样品伸展。结果详述于下表9A-E中。

[0495] 表9A(pHEMA 48%)

[0496]

杨氏模量改善[%]	44%
拉伸强度改善[%]	78%
伸长改善[%]	59%

[0497] 表9B (pHEMA 50%)

[0498]

屈服点改善[%]	100%
拉伸强度改善[%]	38%
伸长改善[%]	47%

[0499] 表9C (pHEMA 60%)

[0500]

杨氏模量改善[%]	55%
-----------	-----

[0501] 表9D (Butvar)

[0502]

杨氏模量改善[%]	37%
拉伸强度改善[%]	71%

[0503] 表9E (Vero Clear)

测试	参数	富集结果
拉伸测试	模量 (MPa)	%33
	断裂拉伸强度 (MPa)	-17%
	断裂伸长率	-55%
挠曲测试	模量 (MPa)	%15
	断裂拉伸强度 (MPa)	%38
	断裂伸长率	-67%

[0505] 杨氏模量基于Vero Clear结果并按照混合物规则(Rule of Mixtures)计算:

$$E_C = E_M V_M + E_F V_F$$

[0507] 由于纤维在基质中的无规分散,可假设在1%富集的情况下,大约仅0.7%在张力轴上有贡献。据此,计算将是:

$$E_F = \frac{561 - (420 * 0.993)}{0.007} = 14143 \text{ MPa}$$

[0509] 纤维杨氏模量的获得数值是14GPa。

[0510] 图26展示了pHEMA中的纤维聚集体。图27展示了纤维在VeroClear中的2%富集。图28展示了冻干纤维的SEM图像。图29A-C展示了样本参照物的VeroClear富集的动态机械分析(DMA) (储能模量vs温度)。各图显示~3°的玻璃化转变偏移,如在Tanδ图的峰上可见。相同的整体行为源自小富集量。总体上,改善的模量源自富集。

[0511] 实施例6

[0512] 合成纤维的交联

[0513] 另外的示例性程序的目的是创建基于蜘蛛丝的较长连续纤维,从而达到允许编织成线、缆线等的纺织品最终性质。该方法基于湿化学,利用在不同pH水平的基于无机缓冲剂

的溶液中的交联剂。将纤维加入缓冲剂以分散，然后加入交联剂。过程参数，如pH水平、交联剂浓度、温度、培育时间，影响实现的交联度。方法参数，如不同注入速度的注入方法，允许交联剂接触纤维，从而创建纤维制备的连续过程。作为基于吐丝器的方法的其它方法，如湿纺、干纺、凝胶纺丝也可用作纤维生产的生产方法。下列交联剂用于水基反应，一些利用有机溶剂进行，如下文详述。

[0514] EDC/NHS的示例性程序：

[0515] 材料：EDC (1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸酯)；NHS (N-羟基琥珀酰亚胺)；缀合缓冲剂：磷酸缓冲盐水 (PBS)，100mM 钠；磷酸盐，150mM NaCl；pH 7.2；和活化缓冲剂：0.1M MES, 0.5M NaCl, pH 6.0。

[0516] 方法：在示例性程序中，通过将~5mg量浸入活化缓冲剂，制备用于交联的蛋白质混合物。然后将EDC和NHS加入缓冲剂，以产生反应性酯基团，允许与该基团的胺反应，产生酰胺键。将缀合缓冲剂加入缓冲剂，以增加pH和反应效率。反应时间是在RT (25 °C) 下10分钟。

[0517] 结果：由于交联和聚集可导致相似的行为，对照批次也被制备和考察。虽然聚集物可通过载片 (slide) 上的涡流或小冲击而分解，但交联蛋白质保持稳定。

[0518] 图30展示了反应前活化缓冲剂中的纤维的显微镜检查 (比例条是400μm)。图31展示了反应10min后缀合缓冲剂中的纤维的显微镜检查 (比例条是400μm)。图32展示了30min后缀合缓冲剂中的纤维的显微镜检查 (比例条是400μm)。图33展示了对活化缓冲剂执行涡流后的显微镜检查。纤维形状和尺寸未观察到变化 (比例条是400μm)。

[0519] 实施例7

[0520] 共价涂覆

[0521] 材料和方法：

[0522]

材料	制造商
EDC (1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸) ,	Merck Milipore
NHS (N-羟基琥珀酰亚胺)	Merck Milipore
CDI	Merck Milipore
MES缓冲剂, 0.1M, 0.15%NaCl	自制
PBS缓冲剂, 0.1M	BI

[0523] 对基材表面涂覆共价键合的蜘蛛丝。在示例性程序中，将硅表面通过食人鱼溶液 (piranha solution) 活化，然后3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (APTES) 处理用于胺基团锚定。在示例性程序中，食人鱼溶液通过缓慢混合30ml H₂SO₄ 98% 和10ml H₂O₂ (30%) 来制备。将待处理表面浸入食人鱼溶液以表面活化30分钟，然后用双蒸水 (DDW) 洗涤。通过水滴测试来测试表面活化。

[0524] APTES表面处理：通过下列配方制备溶液：68.25ml乙醇；3.75ml DDW；3ml乙酸。在浸没载片前，加入2ml APTES。将待处理表面浸入溶液，然后置于60 °C、100毫巴的真空烘箱20分钟，120 °C、100毫巴的真空烘箱1h，然后用乙醇洗涤，干燥和放回烘箱中。在另外的示例性程序中，然后将基材表面插入双蒸水 (DDW)，如下文描述。

[0525] 水相纤维浓液：将10mg蜘蛛丝纤维置于5ml PBS 0.1M缓冲剂中。将3个载片浸没

30min,伴以持续搅拌。

[0526] 有机相纤维浓液:将10mg蜘蛛丝纤维加入5ml DMSO。将3个载片浸没30min,伴以持续搅拌。

[0527] 交联水相溶液:将5ml MES 0.1M+0.15M NaCl, pH6加入200mg EDC和130mg 碘基-NHS。

[0528] 在打开容器前,使EDC、NHS或碘基-NHS平衡至室温。将3个载片浸没过夜,伴以持续搅拌。

[0529] 交联有机相溶液:在5ml二甲基亚砜(DMSO)中添加50mg CDI。在打开容器前,使CDI平衡至室温。然后将3个载片浸没过夜,伴以持续搅拌。

[0530] 图34展示了涂覆硅的显微镜图像(有机相在左,水相在右)。图35展示了涂覆硅的显微镜图像的更近视图(有机相在左,水相在右)。

[0531] 实施例8

[0532] ESEM中SS的润湿研究

[0533] 材料和方法:制备几种样本:分散在乙醇中,沉积在盖玻片上,并空气干燥的冻干SS纤维;铺散在碳带上的冻干SS纤维;铺散在石英片上的冻干SS纤维;和作为对照实验分散在乙醇中并沉积在盖玻片上的纤维素纤维。

[0534] 测量在FEI Quanta 200F ESEM上进行,其中在进入真空室时水滴铺散在样本周围。通过增加室压,使水蒸发和凝结在样本容器(holder)上,允许测量动态润湿行为。

[0535] 结果:用于高空间分辨率的润湿性研究的两种主要成像方法是原子力显微(AFM)和环境扫描电子显微(ESEM)。AFM提供纳米级液滴在固体表面上的润湿性研究,限于几分钟的时间分辨率,而ESEM润湿研究通常限于微米尺寸液滴,在大表面上,1s时间分辨率。

[0536] ESEM中在光滑和纹理化大表面上的原位凝结和蒸发实验,通过因电子-样品相互作用导致的反射的二次电子的分析,提供了静态接触角以及阻滞角和前进角。

[0537] ESEM提供了高空间分辨率和数十微米的相对大的景深——这是原位液滴凝结之前和之后的纤维材料粗糙表面表征所需的。通过在样本邻近滴加几个水滴和通过增加室压,可使水在测量过程中凝结在样本上,能够实现在小表面上接触角的测量。为了准确分析液滴的形状和角度,水滴的视角至关重要。液滴的体积不等,然而当足量液滴用于计算时,可研究变化(差异, variation)。

[0538] 为准确计算接触角,图像的角从侧面观察,而非液滴正上方。而且,考虑几种假设,包括情况并非总是液滴球形形状。

[0539] 在开始研究SS在动态润湿中的行为时观察到,纤维表面上无液滴形成,表明润湿角极小或纤维充当“海绵”吸收样本容器中的凝结水的吸湿行为,如图36所示。图36中的各行表示不同的时间线,其中随着时间推移可观察到液滴尺寸增加。发现几个观察结果:在液滴到达纤维表面时,其立即分裂并润湿其;水凝结在基材表面上发生,而不是在纤维上发生,如几个图像所示,产生如下结论:纤维吸收水滴或其体积过大而不能在SS的纳米细丝基结构上凝结(参见图37);随着时间推移,水到达和集结在纤维周围,导致更深暗的表观,直到实现充分浸入(参见图38)。纤维素对照观察到相似的行为,导致相同的结论可见于图39中。纤维素在润湿阶段中的相似行为符合这个结论:多孔结构难以测量润湿角。然而,纤维素纤维周围有白色的光环(halo),而SS纤维吸水——可见为更深暗的区域,如图38和39所示。此

润湿实验显示,SS纤维是“海绵样”纤维,与纤维素相比具有极高的吸水亲和力。

[0540] 实施例9

[0541] 蜘蛛丝上3D细胞生长的评估

[0542] 在示例性程序中,蜘蛛丝上3D细胞生长的评估以下列几个方面进行:形态、附接、增殖、和与细胞在未涂覆培养皿和胶原蛋白涂覆培养皿上的2D生长的比较。

[0543] 材料、器材和一次性用品:

[0544]

材料	制造商	目录编号
NCTC 克隆 929 (L929)	ATCC	CCL-1
MEM-NEAA, Earle 盐, 非必需氨基酸	Biological Industries	01-040-1A
供体马血清 (DHS)	Biological Industries	04-004-1A
磷酸缓冲盐水 (PBS)	Biological Industries	02-023-1A
丙酮酸钠	Biological Industries	03-042-1B
L-谷氨酰胺	Biological Industries	03-020-1B
青霉素-链霉素-两性霉素	Biological Industries	03-033-1B
胰蛋白酶 EDTA 溶液 B(0.25%), EDTA (0.05%)	Biological Industries	03-052-1B
台盼蓝, 5mg/ml 在盐水中	Biological Industries	03-102-1B
器材	制造商	型号/目录编号
层流柜, 生物危害	Labcono	Purifier class ii biosafety cabinet delta series
逆相差显微镜	Life Technologies	EVOS XL
培育器, 37°C, 加湿, 5% CO ₂	Heraeus	Hera Cell
水浴, 37°C	QSR Technologies	VMS-20
血细胞计数器	Marienfeld	Neubauer -improved
Nunc™ 细胞培养物处理的 EasYFlasks™	Thermo Fisher Scientific	156472
96 孔组织培养微量滴定板-涂覆有 SS	Seevix Material Sciences Ltd.	NA
24 孔组织培养板-涂覆有 SS	Seevix Material Sciences Ltd.	NA
移液器	Eppendorf	Research Plus
8-12 通道移液器	Labnet International, Inc.	BioPette PLUS
移液器附件	VMR	Accurvette
1 ml、5 ml、10 ml 一次性聚苯乙烯血清移液器	Greiner Bio One	07-200-571, 07-200-573, 07-200-574
10 μl、100 μl、1000 μl 移液器头	Axygen	T-10-CRS , T-200-CRS , T-1000-CRS

[0545] 培养L929和其它细胞:在示例性程序中,将L929培养在补充有10% DHS、2mM L-谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠、100U/ml青霉素、0.1mg/ml链霉素和0.25μg/ml两性霉素的MEM-NEAA

培养基中。

[0546] 通过酶促消化从培养烧瓶皿移除细胞:在示例性程序中,将培养基用血清移液器从T75烧瓶中培养的细胞移除并丢弃。将细胞单层用4ml PBS洗涤以去除血清。向细胞单层加入2ml胰蛋白酶/EDTA,并漩涡烧瓶以覆盖整个表面。将烧瓶放回培育器5-10分钟,直到细胞分离。将细胞重悬浮于10ml新制含血清培养基以使胰蛋白酶失活,并用血清移液器捣碎5次以使细胞彼此分离。

[0547] 将50 μ l细胞与50 μ l的5mg/ml台盼蓝混合,并将10 μ L混合物施加于血细胞计数器。验证细胞大部分分离并且成活力>95% (死细胞与活细胞的区别在于其摄入台盼蓝染色)。然后将细胞计数。

[0548] 在蜘蛛丝 (SS) 涂覆板上接种细胞:

[0549] 96孔板:将细胞用新制培养基稀释至200,000L929细胞/ml的密度。将200 μ l细胞悬浮液加入指定孔,并置于加湿的37°C培育器中,5%CO₂(最终接种浓度:40,000细胞/孔)。

[0550] 24孔板:将细胞用新制培养基稀释至240,000L929细胞/ml的密度。将1ml细胞悬浮液加入指定孔,并置于加湿的37°C培育器中,5%CO₂(最终接种浓度:240,000细胞/孔)。作为正常细胞生长的对照,将细胞以相同浓度接种在胶原蛋白涂覆的或未涂覆的板上。

[0551] 使培养物生长上至10天。对于强粘附细胞的长期培养,每2-3天半更换细胞培养基。将板倾斜,并将一半旧培养基用移液器头非常小心地吸走并丢弃。每孔加入等量的新制培养基。

[0552] 细胞在SS上的3D生长的评估:

[0553] 接种在SS上的细胞分裂并侧向地以及以三维结构生长,形成活细胞集群(簇, clusters)。每天利用倒置显微镜检查培养物的生长和形态。利用显微镜在不同放大率和不同焦平面下观察细胞。从培养皿底部开始,缓慢转动表盘以聚焦在更高平面上。在几个焦平面上观察接种在SS上的细胞形成的集群,揭示不同细胞在各焦水平上的轮廓。

[0554] 获自这些实验的结果表明,胶原蛋白支持单层细胞的生长,而SS支持2-5层细胞的生长。(参见图40A、40B和图41A-B、42),并且取决于施加至板的SS厚度(图43A-C)。因此,本系统允许预先制造设定数量的细胞层,其中细胞交叉相互作用。具体地,显示覆以1-6 \times 10⁵纤维/cm²的板仅支持单层,其中12 \times 10⁵纤维/cm²支持两层细胞的生长(两层中至少80%的层组织化(organized))。24 \times 10⁵纤维/cm²支持平均3.7层细胞的生长(3-4层中至少80%的层组织化)。再次,在这些设置中,胶原蛋白涂覆板仅产生单层——无论胶原蛋白的施加厚度(数据未显示)。

[0555] 如图44所示,接种在涂覆有SS的板上的细胞,与对照板内的孤独细胞组织化(接种等量细胞)相比,不仅形成细胞与细胞相互作用的多层,而且实际上以结缔组织结构或微结构组织化。在这组实验中清楚显示,SS上细胞生长的运动性是胶原蛋白涂覆的聚苯乙烯组织培养皿上的细胞生长的至少2倍(还参见图49A-C)。

[0556] 如图45所示。在SS存在的情况下接种在球状体诱导板上的细胞发育成球状体,该球状体显著大于在胶原蛋白存在的情况下或无补充物情况下接种(以等量细胞)的细胞。在培育7天后,与胶原蛋白-球状体或无补充物对照球状体相比,含SS的球状体保持约多4.7的活细胞(about 4.7 more viable cells)。有SS时生长的球状体的表面积是有胶原蛋白时或无补充物时培养的球状体的面积的大约4.1倍。这些实验不仅显示SS强烈支持细胞增殖,而

且抑制球状体内细胞死亡,如图46A-C所示。

[0557] 总之,这些数据提供了关于SS在生长和保持细胞方面的预料不到的益处的结论性证据。惊人地发现,为保持细胞成活力和增殖需要至少4个重复段(n)。最新结果还表明,为最大化细胞生长参数,优选采用8个或更多个重复段。

[0558] 实施例10

[0559] 在涂覆板的蜘蛛丝(SS)上接种细胞和在无涂覆板上接种与SS混合的细胞

[0560] 将HEK293细胞接种在涂覆有SS的板上和接种在裸板上——其中SS与细胞培养基混合。

[0561] 使用下列细胞培养材料:

[0562]

材料	制造商	目录编号
SS-蜘蛛丝悬浮液, 无菌, 150,000 单位/ μ l	Seevix Material Sciences Ltd.	NA
HEK293 细胞	ATCC	CRL-1573
Dulbecco 修改型 Eagle Medium, 无 L-谷氨酰胺	Biological Industries	01-055-1A
磷酸缓冲盐水 (PBS)	Biological Industries	02-023-1A
胎牛血清 (FBS)	Biological Industries	04-121-1A
L-谷氨酰胺	Biological Industries	03-020-1B
青霉素-链霉素-两性霉素	Biological Industries	03-033-1B
胰蛋白酶 EDTA 溶液 B (0.25%), EDTA (0.05%)	Biological Industries	03-052-1B
台盼蓝, 5mg/ml 在盐水中	Biological Industries	03-102-1B

[0563]

器材	制造商	型号/目录编号
层流柜, 生物危害	Labconco	Purifier class ii biosafety cabinet delta series
逆相差显微镜	Life Technologies	EVOS XL
培育器, 37°C, 加湿, 5% CO ₂	Heraeus	Hera Cell
水浴, 37°C	QSR Technologies	VMS-20
血细胞计数器	Marienfeld	Neubauer -improved
Nunc™细胞培养物处理的 EasY 烧瓶™	Thermo Fisher Scientific	156472
96 孔组织培养微量滴定板-涂覆有 SS	Seevix Material Sciences Ltd.	NA
24 孔组织培养板-涂覆有 SS	Seevix Material Sciences Ltd.	NA
移液器	Eppendorf	Research Plus
8-12 通道移液器	Labnet International, Inc.	BioPette PLUS
移液器附件	VMR	Accurvette
1 ml、5 ml、10 ml 一次性聚苯乙烯血清移液器	Greiner Bio One	07-200-571 , 07-200-573 , 07-200-574
10 μl、100 μl、1000 μl 移液	Axygen	T-10-CRS , T-200-CRS ,

[0564]

器头	T-1000-CRS
----	------------

[0565] HEK293细胞培养程序:在补充有10%FBS、2mM L-谷氨酰胺、100U/ml青霉素、0.1mg/ml链霉素和0.25μg/ml两性霉素Dulbecco修改型Eagle培养基中培养HEK293。通过酶促消化从培养瓶皿移除细胞。然后洗涤和再悬浮于新制含血清培养基,以使胰蛋白酶失活。然后将细胞与台盼蓝混合,并评估成活力。

[0566] 在SS涂覆板上接种细胞:将细胞在新制培养基中稀释至50,000HEK293细胞/ml的密度和200,000细胞/ml的密度。将200μl细胞悬浮液加入指定细胞培养孔并置于加湿的37°C培育器中,5%CO₂(最终接种浓度:10,000细胞/孔和40,000细胞/孔)。使细胞生长上至6天,无培养基更换。

[0567] 在SS富集培养基中生长的细胞:将细胞在新制培养基中稀释至50,000HEK293细胞/ml的密度和200,000细胞/ml的密度。将SS加入悬浮细胞,最终浓度为400,000SS单位/ml(2.5μl S/ml)。将200μl SS-细胞悬浮液加入指定细胞培养孔并置于加湿的37°C培育器中,5%CO₂(最终接种浓度:10,000细胞/孔和40,000细胞/孔)。使细胞生长上至6天,无培养基更换。

[0568] 结果

[0569] 接种在SS涂覆板上的细胞:在细胞接种3-4天,观察HEK293集群。接种在ss涂层上的高密度和低密度细胞均显示在接种后5天内以多层3D结构组织化(图47A)。接种在无涂覆板上的对照细胞生长为单层(图47B)。细胞死亡少于5%。在大多数领域,观察到3或更多层

细胞。

[0570] “裸”板上SS富集培养基中生长的细胞：接种后3-4天观察HEK293集群，细胞显示粘附至纤维。如图48A-C所示，很多细胞在无任何与板物理附接的情况下生长。这些细胞粘附至SS。不仅SS支持细胞附接表面，而且细胞粘附至SS，穿过SS纤维增殖，增加集群高度。因此，需要附接的细胞在部分地附接至板或附接至与板附接的其它细胞的纤维上生长。

[0571] 图49A-B展示了接种在聚苯乙烯上的细胞和接种在SS涂覆板上的细胞之间的细胞运动性定量比较。组织培养皿部分地涂覆以SS。L929细胞以70,000细胞/孔的密度接种。在涂覆以SS的部分中细胞集群形成，而无涂覆部分中观察到单层。拍摄两部分的边界的一系列的时间流逝照片，并分析单个细胞的运动性。在SS上培养的细胞的平均运动性是在无涂覆聚苯乙烯表面上培养的细胞的运动性的2.2倍。此外，接种在SS上的细胞的高运动性与细胞集群的密度正相关。

[0572] 虽然本发明已结合其具体实施方式得到描述，但显然多种替代形式、改动和变化对于本领域技术人员是显而易见的。因此，意图包括所有这种落入所附权利要求的精神和宽范围的替代形式、改动和变化。

序列表

<110> 赛威克斯材料科学公司
<120> 包括合成拖丝蜘蛛丝的复合材料
<130> SVX-P-002
<150> 62/293,880
<151> 2016-02-11
<150> 62/317,572
<151> 2016-04-03
<150> PCT/IL2016/050874
<151> 2016-08-10
<160> 17
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工
<220>
<223> 合成
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> X是A或G
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> X是S或G
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10) .. (10)
<223> X是G或E
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11) .. (11)
<223> X是G、S或N
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12) .. (12)
<223> X是Q或Y

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (15) .. (15)

<223> X是G或S

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17) .. (17)

<223> X是P或R

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (20) .. (20)

<223> X是Y或Q

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (27) .. (27)

<223> X是G或S

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (28) .. (28)

<223> X是S或G

<400> 1

Xaa Xaa Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro Xaa Xaa Xaa Gly Pro Xaa Gly

1 5 10 15

Xaa Gly Gly Xaa Gly Pro Gly Gly Pro Gly Xaa Xaa

20 25

<210> 2

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 2

Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Ser Gln Gly Pro Ser Gly Pro

1 5 10 15

Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Gly Pro Gly Ser Ser

20 25

<210> 3

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 3

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro

1 5 10 15

Gly Ser Gln Gly Pro Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Gly Pro

20 25 30

Gly Ser Ser

35

<210> 4

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 4

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro

1 5 10 15

Glu Asn Gln Gly Pro Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Gly Pro

20 25 30

Gly Ser Ser

35

<210> 5

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 5

Met Ser Tyr Tyr His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr

1 5 10 15

Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ala Met Asp Pro Glu Phe Lys Gly

20 25 30

Leu Arg Arg Arg Ala Gln Leu Val

35 40

<210> 6

<211> 50

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 6

Met Ser Tyr Tyr His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr

1 5 10 15

Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ala Met Asp Pro Glu Phe Lys Gly

20 25 30

Leu Arg Arg Arg Ala Gln Leu Val Arg Pro Leu Ser Asn Leu Asp Asn

35 40 45

Ala Pro

50

<210> 7

<211> 54

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 7

Met Ser Tyr Tyr His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr

1 5 10 15

Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ala Met Asp Pro Glu Phe Lys Gly

20 25 30

Leu Arg Arg Arg Ala Gln Leu Val Asp Pro Pro Gly Cys Arg Asn Ser

35 40 45

Ala Arg Ala Gly Ser Ser

50

<210> 8

<211> 97

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> X是A或G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2) .. (2)
<223> X是S或G
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11) .. (11)
<223> X是S或G
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12) .. (12)
<223> X是Q或Y
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15) .. (15)
<223> X是S或G
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17) .. (17)
<223> X是P或R
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20) .. (20)
<223> X是Y或Q
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (27) .. (27)
<223> X是G或S
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (28) .. (28)
<223> X是G或S
<400> 8
Val Ala Ala Ser Arg Leu Ser Ser Pro Ala Ala Ser Ser Arg Val Ser
1 5 10 15
Ser Ala Val Ser Ser Leu Val Ser Ser Gly Pro Thr Asn Gly Ala Ala
20 25 30
Val Ser Gly Ala Leu Asn Ser Leu Val Ser Gln Ile Ser Ala Ser Asn
35 40 45
Pro Gly Leu Ser Gly Cys Asp Ala Leu Val Gln Ala Leu Leu Glu Leu
50 55 60

Val Ser Ala Leu Val Ala Ile Leu Ser Ser Ala Ser Ile Gly Gln Val
 65 70 75 80

Asn Val Ser Ser Val Ser Gln Ser Thr Gln Met Ile Ser Gln Ala Leu
 85 90 95

Ser

<210> 9

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 9

Gly Pro Ser Gly Pro Gly Ala Tyr Gly Pro Ser Pro Ser Ala Ser Ala
 1 5 10 15

Ser Val Ala Ala Ser Arg Leu Ser Ser Pro Ala Ala Ser Ser Arg Val
 20 25 30

Ser Ser Ala Val Ser Ser Leu Val Ser Ser Gly Pro Thr Asn Gly Ala
 35 40 45

Ala Val Ser Gly Ala Leu Asn Ser Leu Val Ser Gln Ile Ser Ala Ser
 50 55 60

Asn Pro Gly Leu Ser Gly Cys Asp Ala Leu Val Gln Ala Leu Leu Glu
 65 70 75 80

Leu Val Ser Ala Leu Val Ala Ile Leu Ser Ser Ala Ser Ile Gly Gln
 85 90 95

Val Asn Val Ser Ser Val Ser Gln Ser Thr Gln Met Ile Ser Gln Ala
 100 105 110

Leu Ser

<210> 10

<211> 555

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 10

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Ser Gly Gly Tyr Gly Pro Glu
 1 5 10 15

Asn Gln Gly Pro Ser Gly Pro Val Ala Tyr Gly Pro Gly Gly Pro Val
 20 25 30

Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ser Gly Pro Gly Gly Tyr

35	40	45
Gly Pro Glu Asn Gln Gly Pro Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro Gly		
50	55	60
Gly Ser Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro		
65	70	75
Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Ser Gln Gly Pro Ser Gly Pro Gly Gly Ser		
85	90	95
Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Ser Gln Gly Pro Ser Gly Pro Gly Ala Ser		
100	105	110
Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly		
115	120	125
Pro Gly Ser Gln Gly Pro Ser Gly Pro Gly Ala Tyr Gly Pro Gly Gly		
130	135	140
Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro Gly		
145	150	155
Ser Gln Gly Pro Ser Gly Pro Gly Gly Ser Gly Gly Tyr Gly Pro Gly		
165	170	175
Ser Gln Gly Pro Ser Gly Pro Gly Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala Ala		
180	185	190
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Ser		
195	200	205
Gln Gly Pro Ser Gly Pro Gly Ala Tyr Gly Pro Gly Gly Pro Gly Ser		
210	215	220
Ser Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Ser Gln Gly		
225	230	235
Pro Ser Gly Pro Gly Ala Tyr Gly Pro Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ala		
245	250	255
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro Gly		
260	265	270
Asn Gln Gly Pro Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Gly Pro Gly		
275	280	285
Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly		
290	295	300
Pro Gly Ser Gln Gly Pro Ser Gly Pro Gly Val Tyr Gly Pro Gly Gly		
305	310	315
Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ser Gly Pro Gly		
325	330	335
Gly Tyr Gly Pro Gly Asn Gln Gly Pro Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly		
340	345	350

Pro Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser
 355 360 365
 Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Ser Gln Gly Pro Ser Gly Pro Gly
 370 375 380
 Gly Ser Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Ser Gln Gly Pro Ser Gly Pro Gly
 385 390 395 400
 Ala Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gly
 405 410 415
 Tyr Gly Pro Gly Ser Gln Gly Pro Ser Gly Pro Gly Ala Tyr Gly Pro
 420 425 430
 Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly
 435 440 445
 Pro Gly Ser Gln Gly Pro Ser Gly Pro Gly Ala Tyr Gly Pro Gly Gly
 450 455 460
 Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gly
 465 470 475 480
 Tyr Gly Pro Gly Ser Gln Gly Pro Ser Gly Pro Gly Gly Ser Arg Gly
 485 490 495
 Tyr Gly Pro Gly Ser Gln Gly Pro Gly Gly Pro Gly Ala Ser Ala Ala
 500 505 510
 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro Gly
 515 520 525
 Ser Gln Gly Pro Ser Gly Pro Gly Tyr Gln Gly Pro Ser Gly Pro Gly
 530 535 540
 Ala Tyr Gly Pro Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser
 545 550 555
 <210> 11
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 合成
 <400> 11
 His His His His His
 1 5
 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 12

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1 5

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 13

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly

1 5 10

<210> 14

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 14

Ser Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Ser Gln Gly Pro Ser Gly Pro

1 5 10 15

Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala

20 25 30

Ala Ala Ala

35

<210> 15

<211> 105

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 15

tctggtcctg gaggttatgg cccaggaagg caaggaccat ctggtccagg aggatatgg 60

ccaggcggac ctggctctag tgcagcagct gccgcagcag ctgca 105

<210> 16

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 16

atatgctgca ggccctagtg gtcctgga 28

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 17

tcgacaagct tggtaaccgca 20

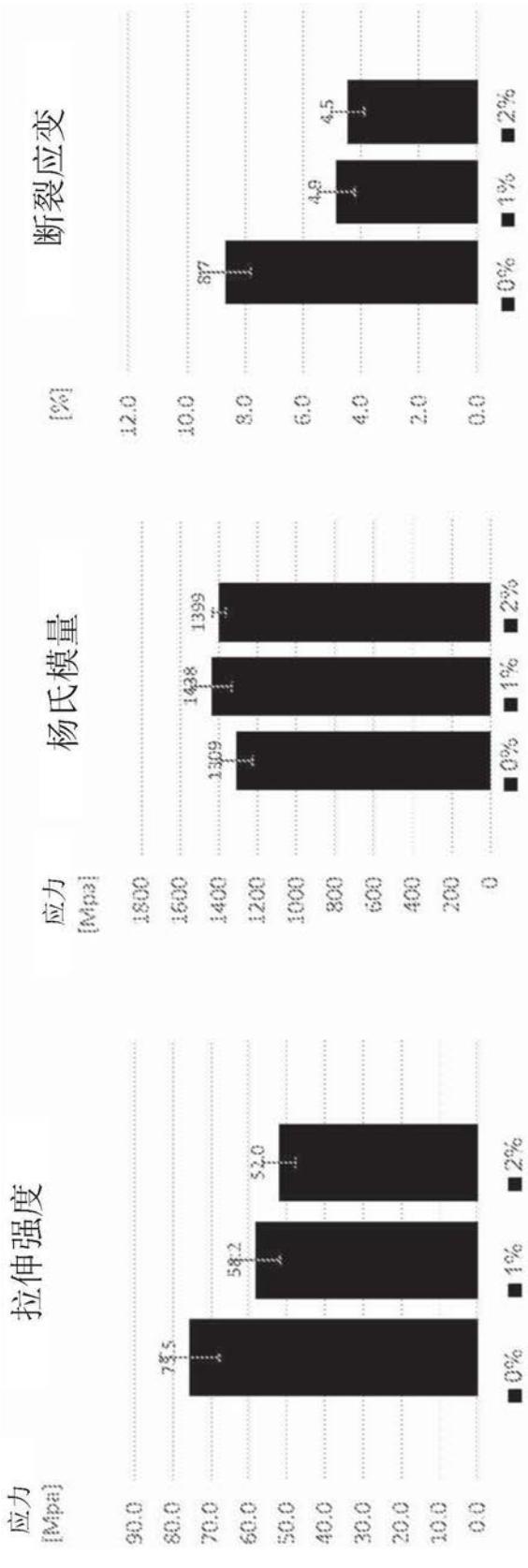


图1

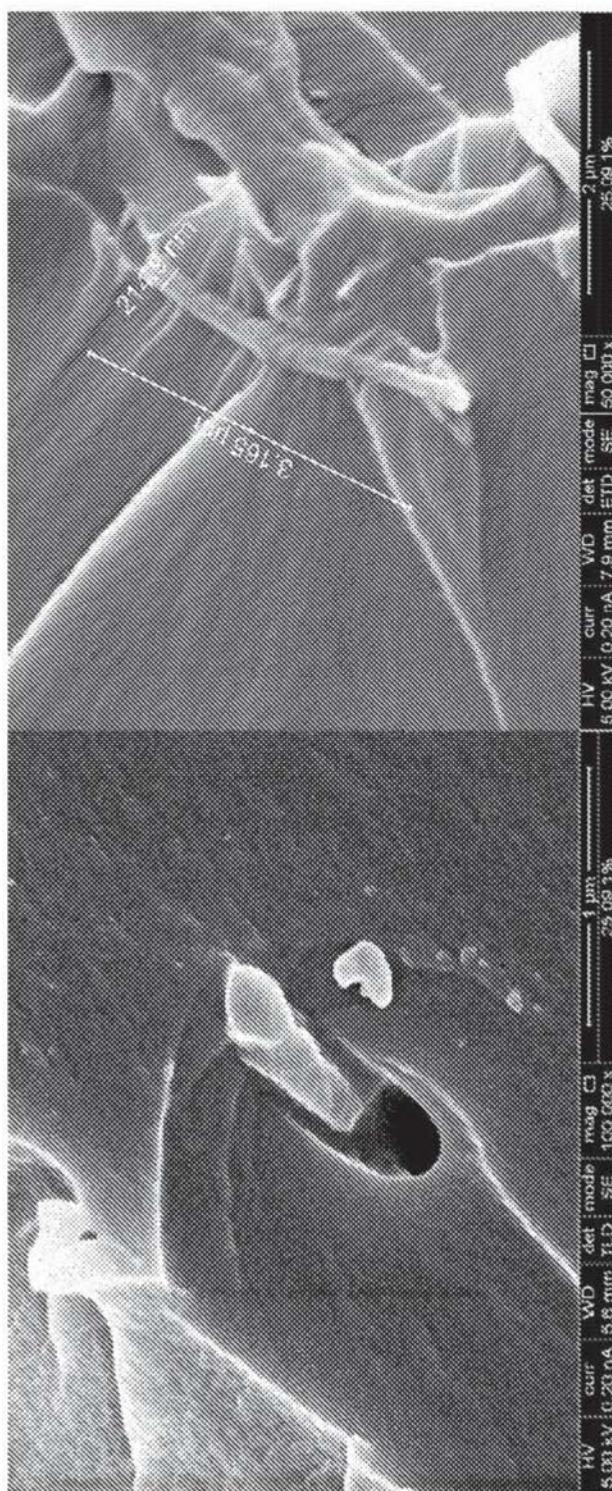


图2

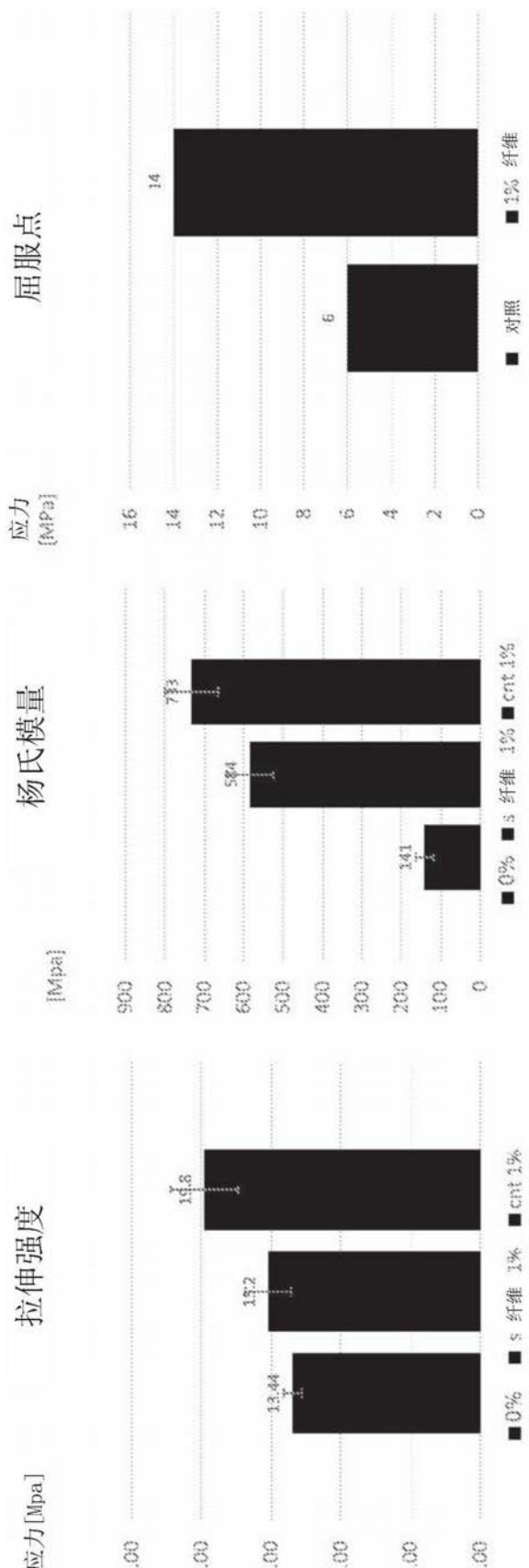


图3

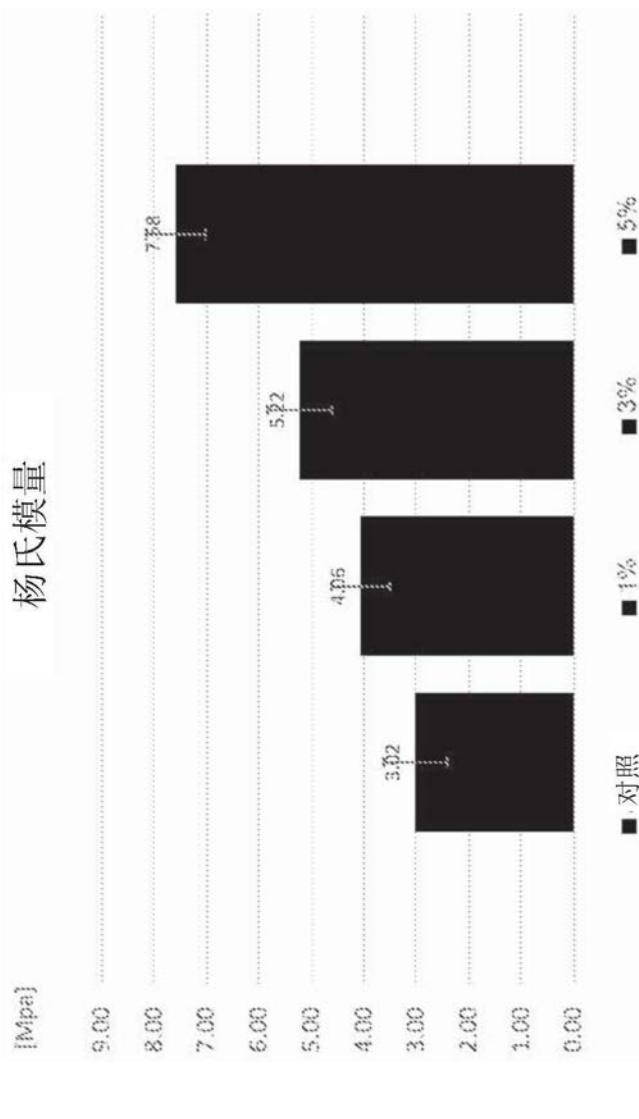


图4A

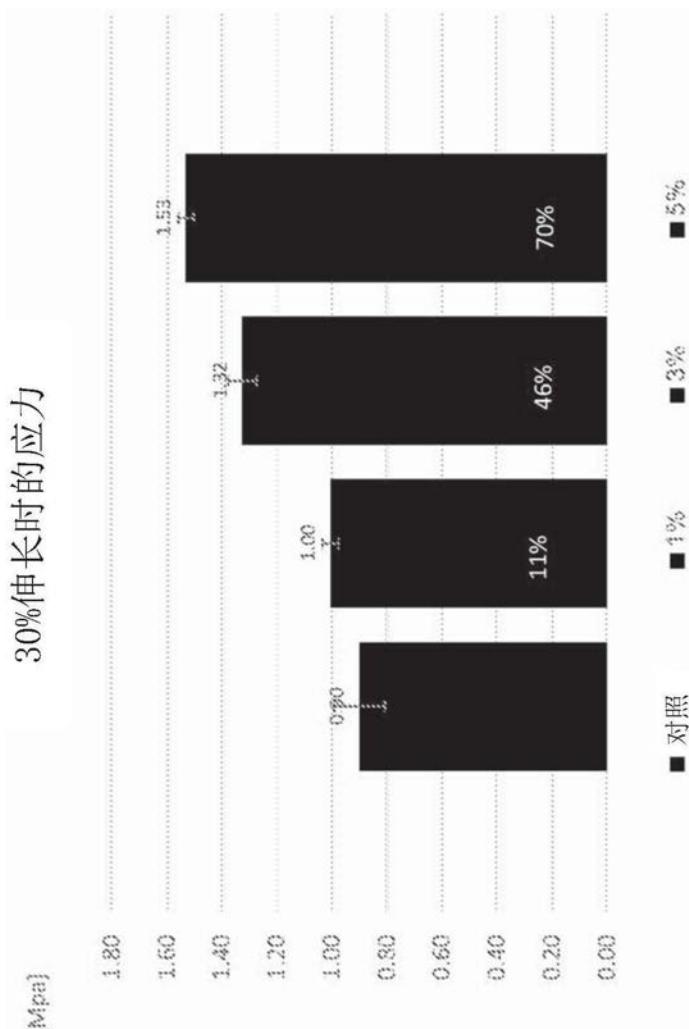


图4B

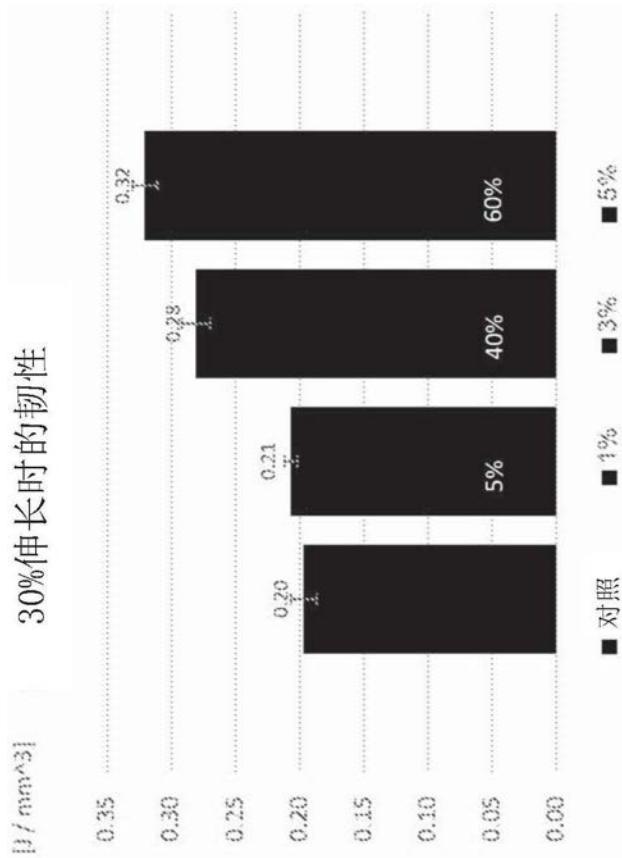


图4C

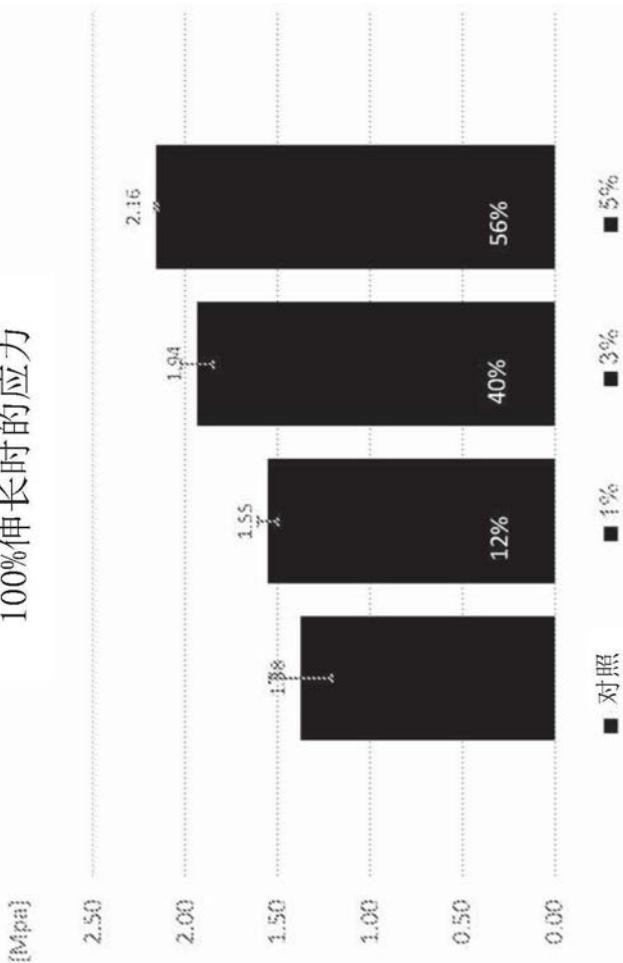


图4D

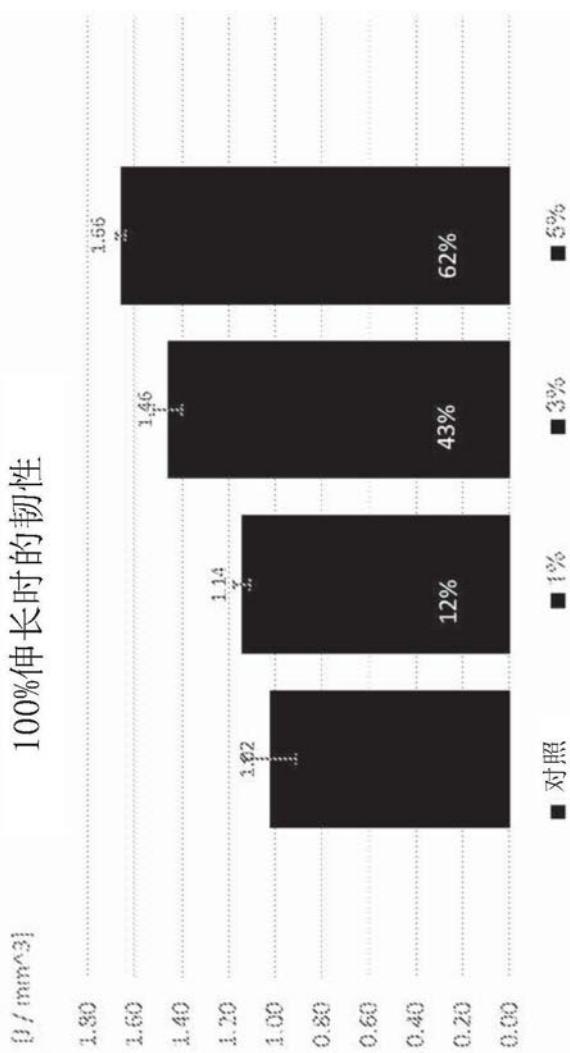


图4E

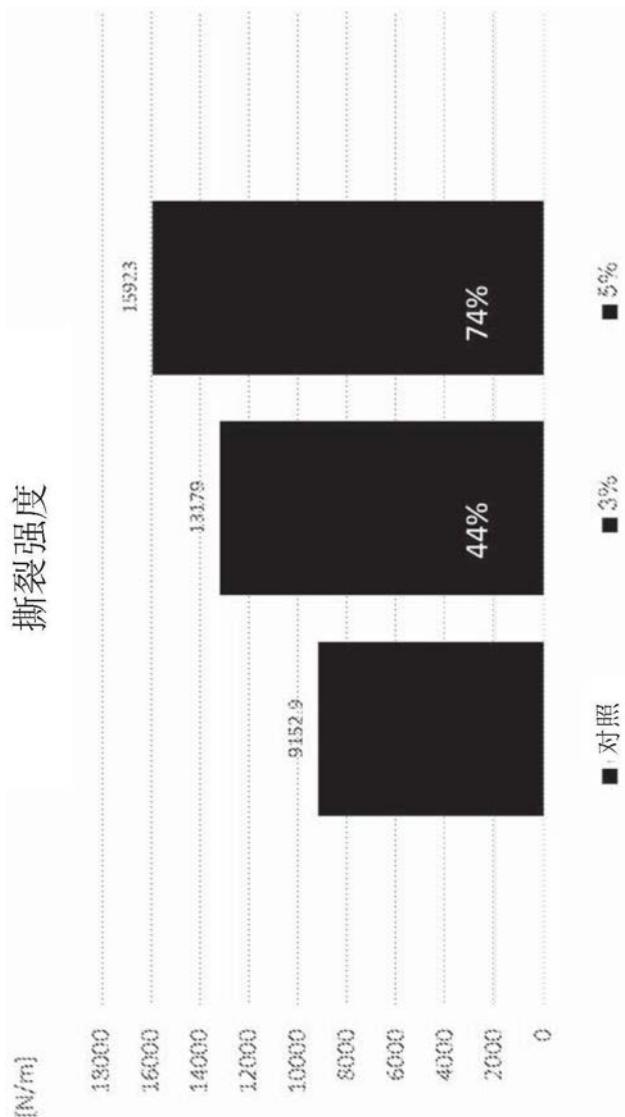


图5A

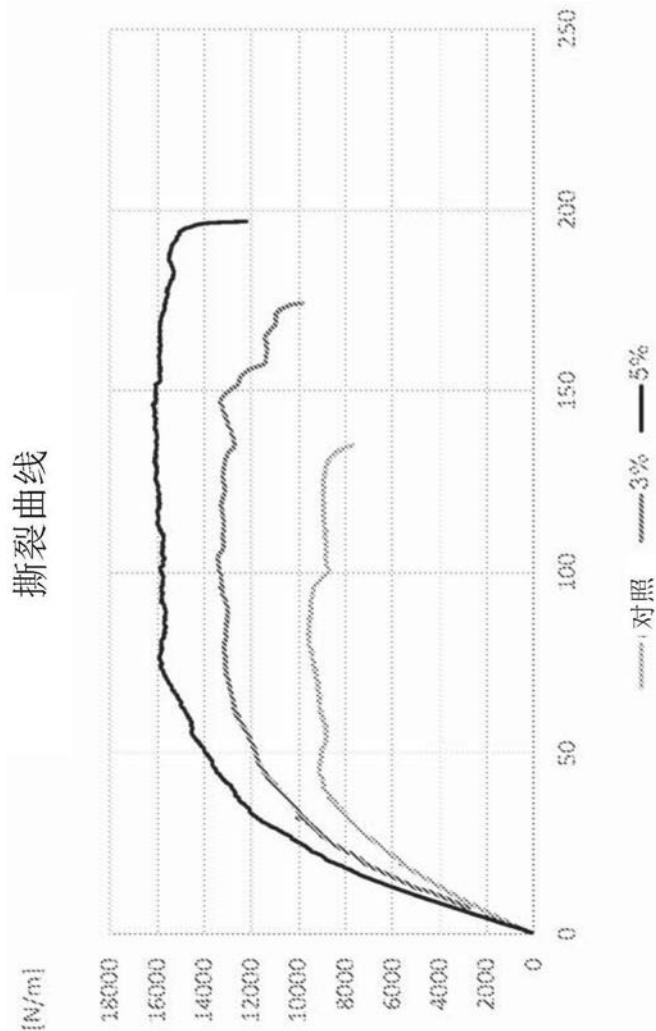


图5B

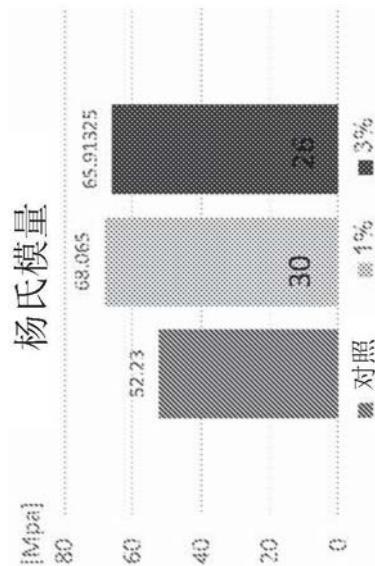


图6A

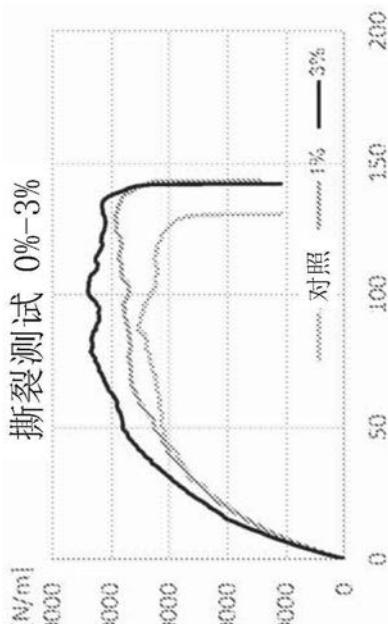


图6B

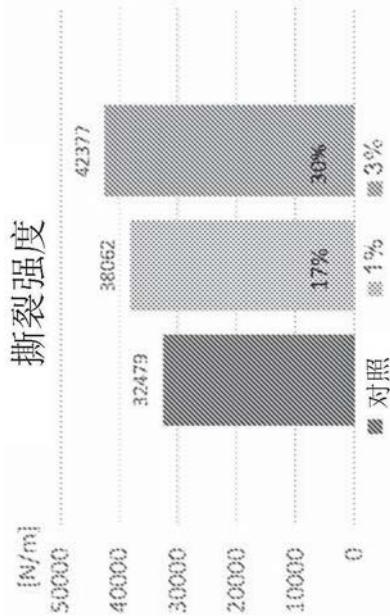


图6C

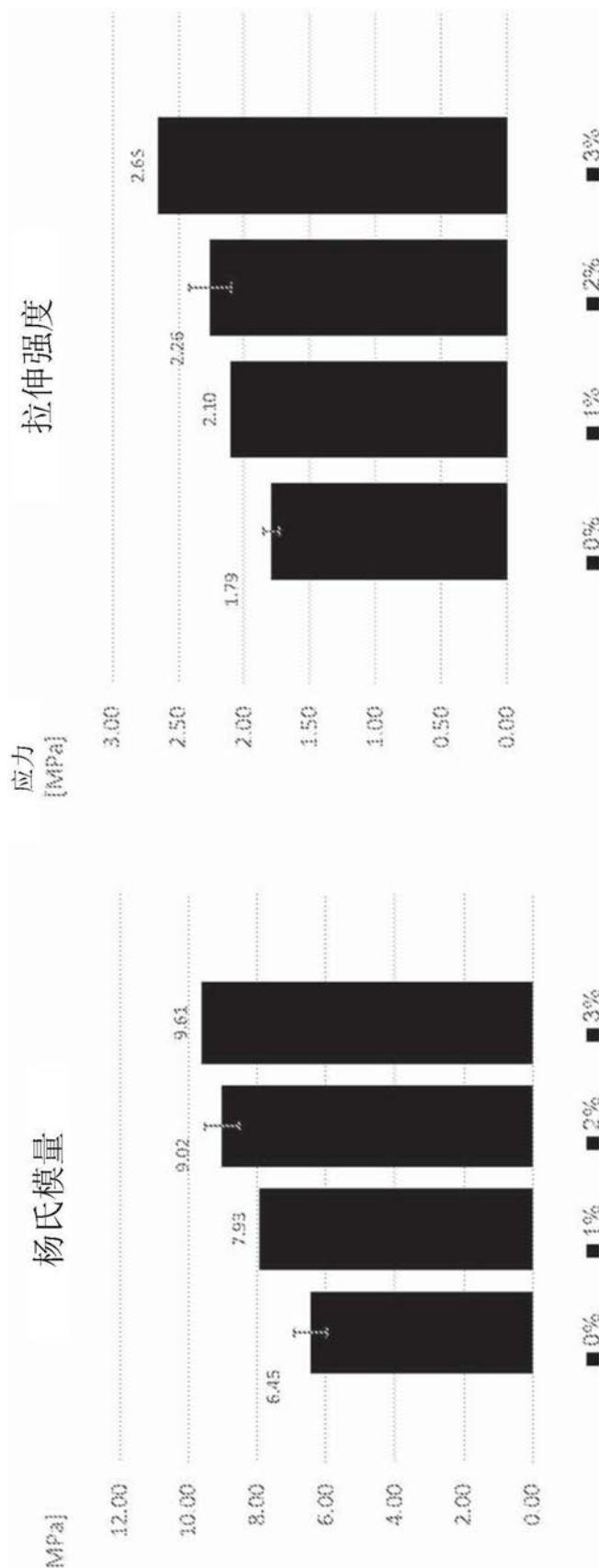


图7

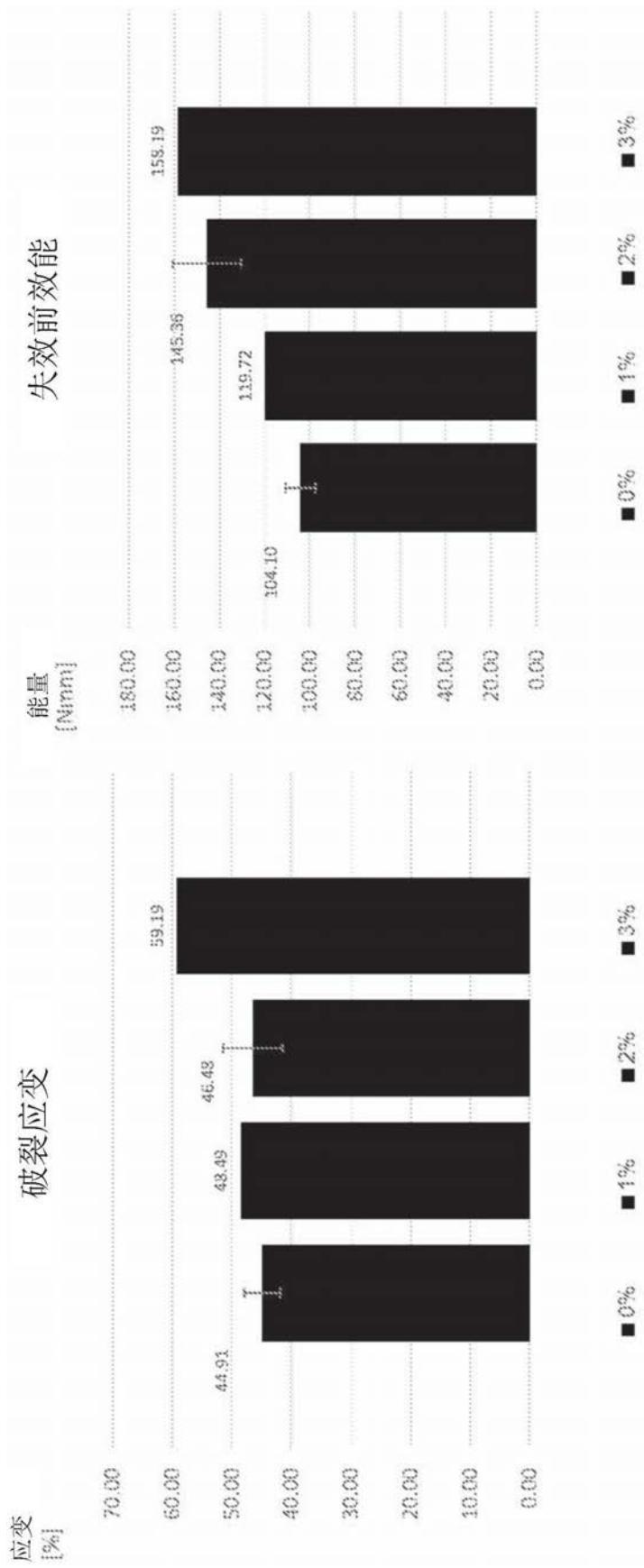


图8

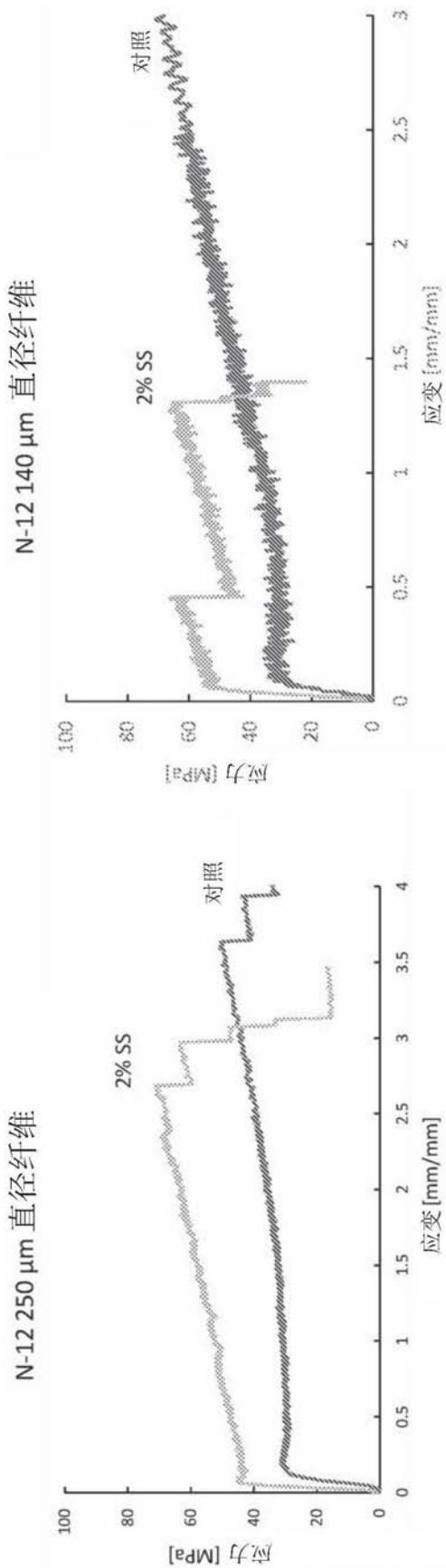


图9A

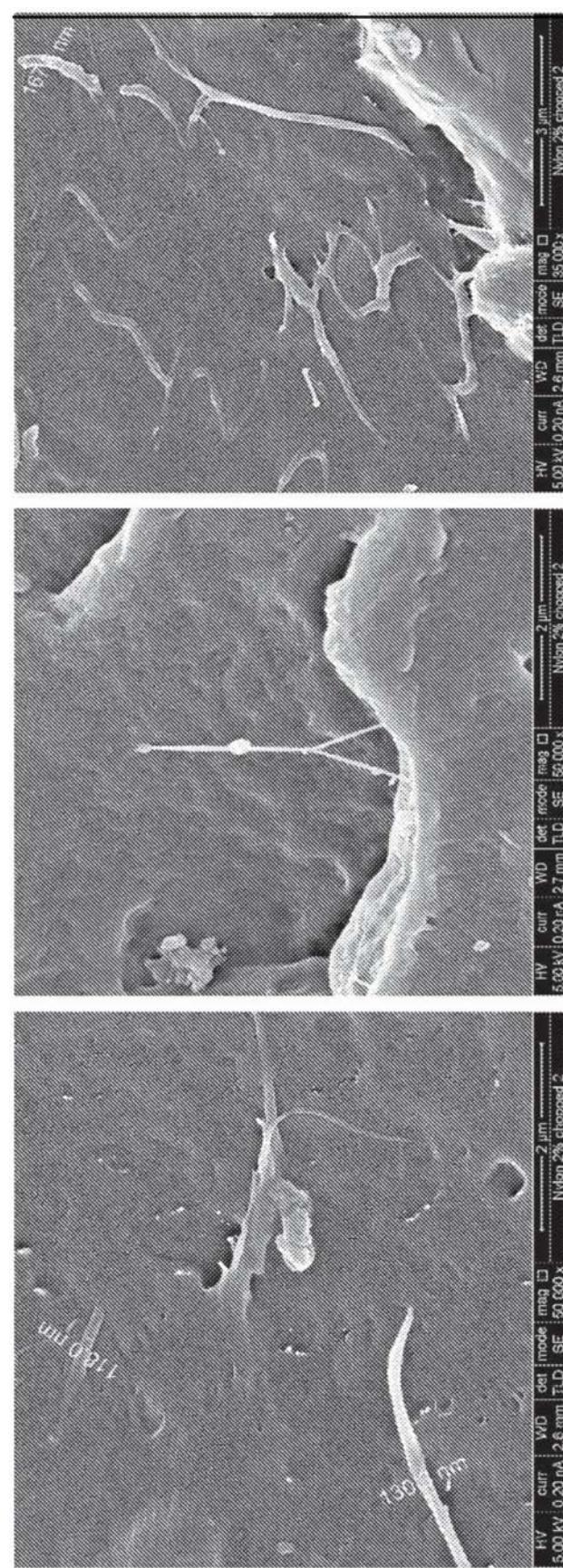


图9B

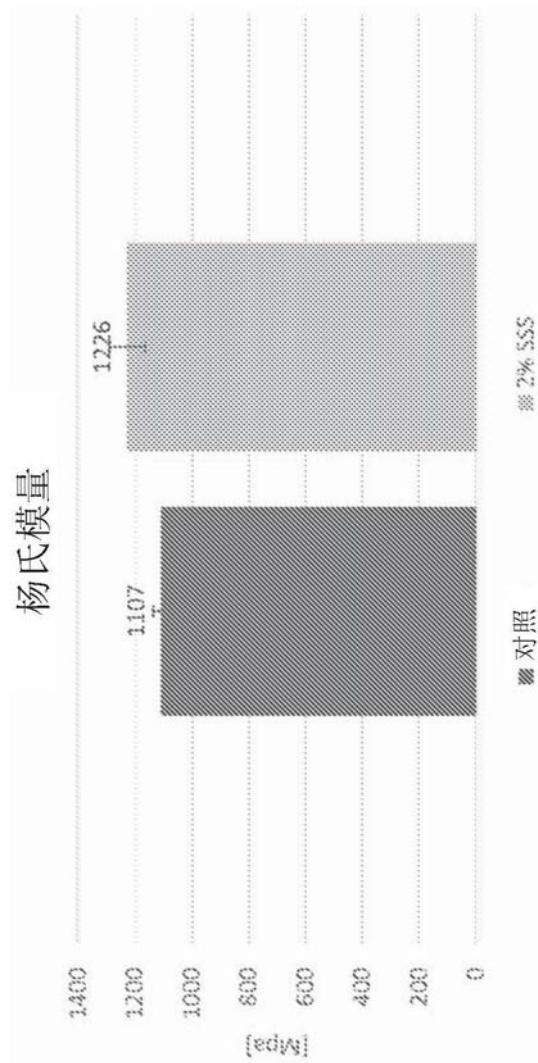


图9C

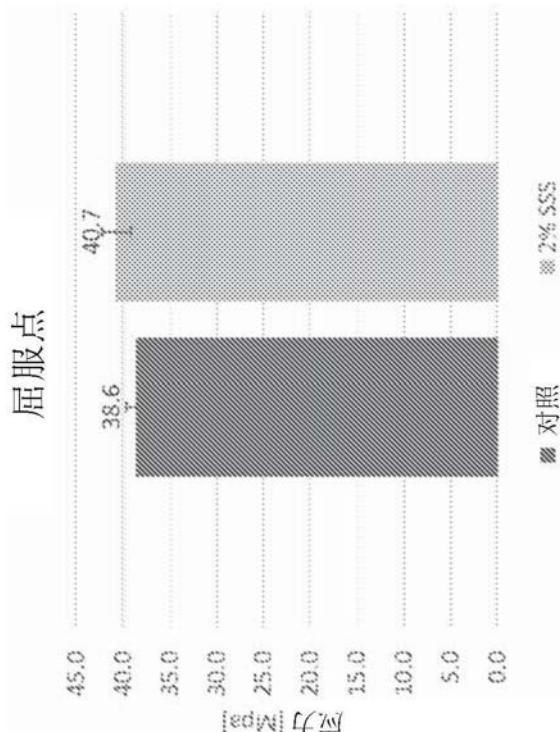


图9D

注入的N-12

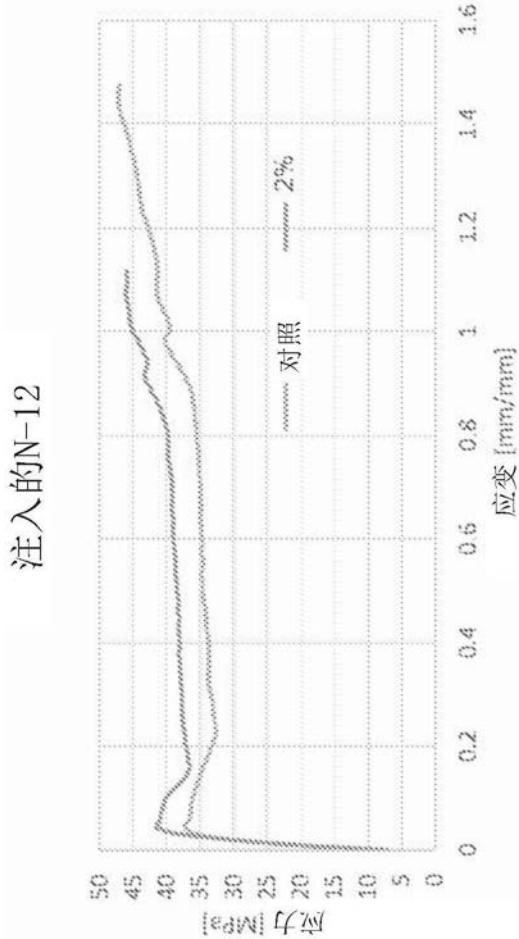


图9E

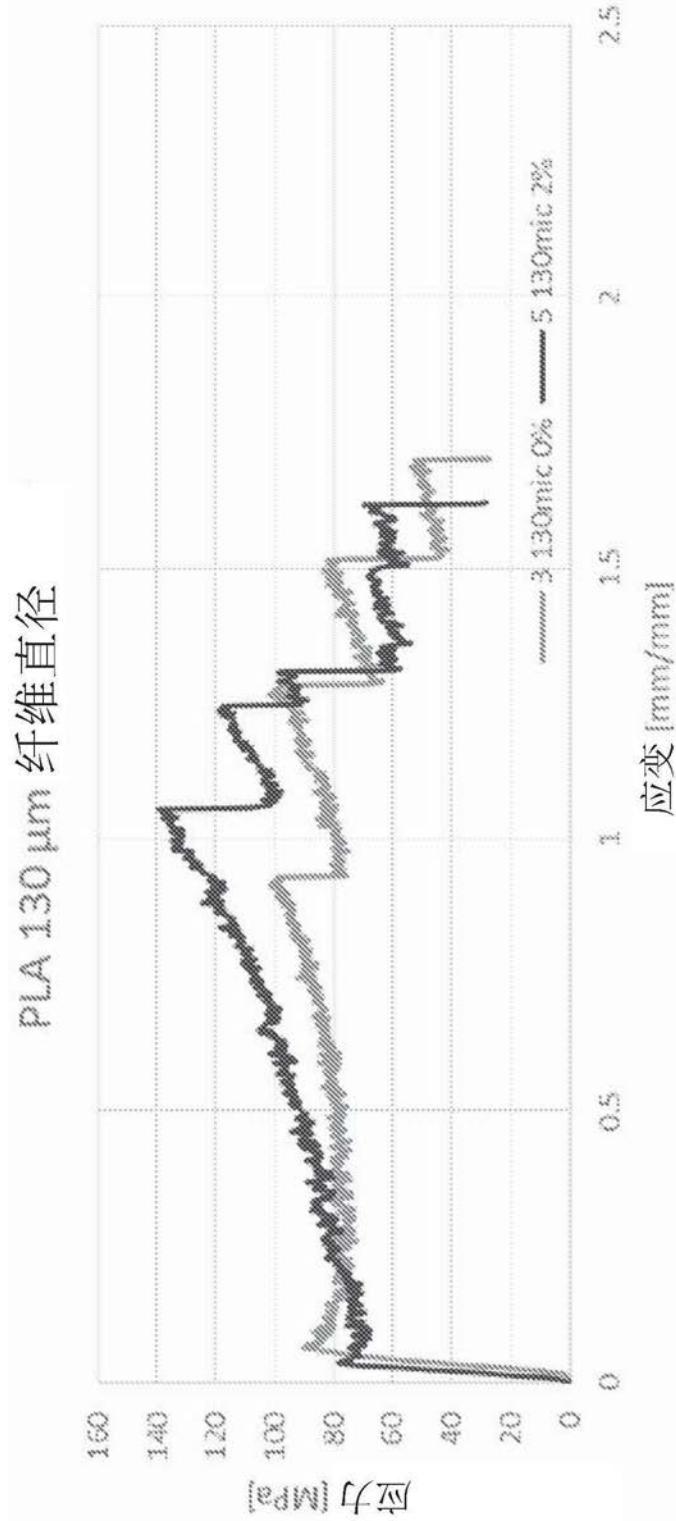


图9F

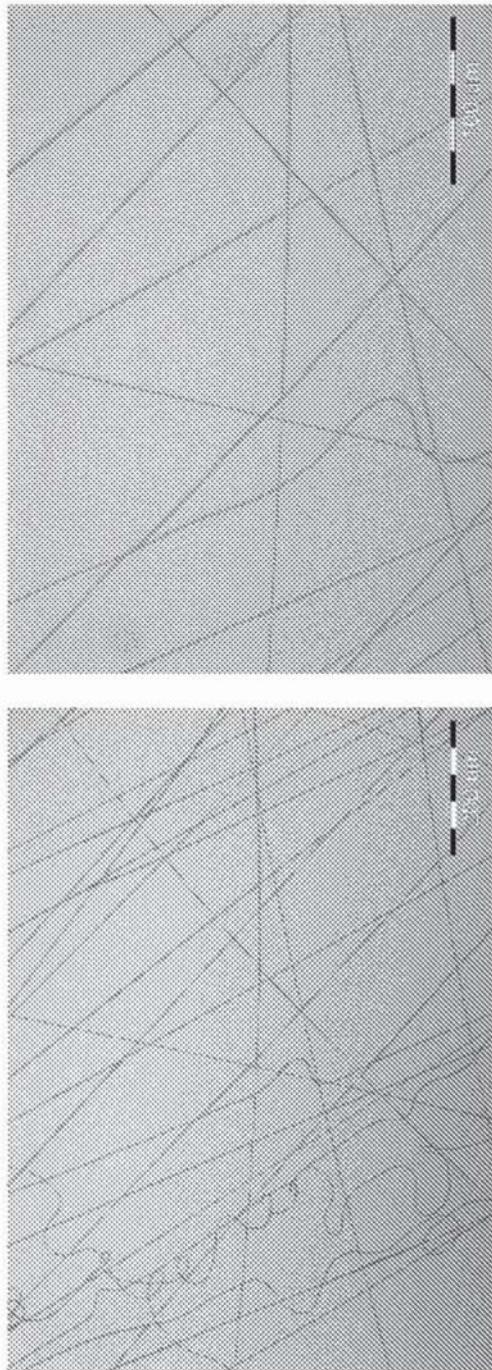


图10

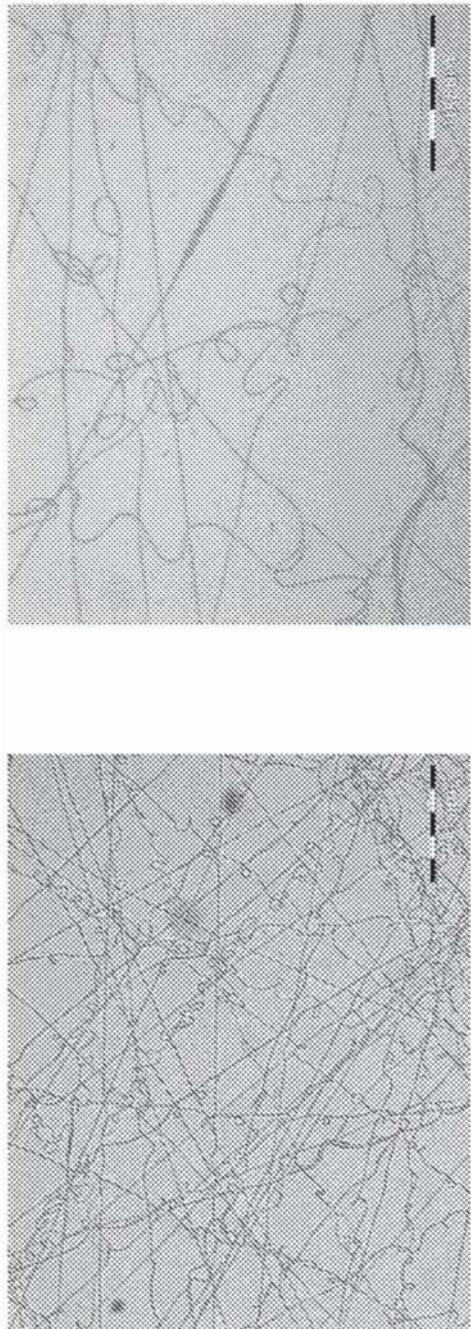


图11

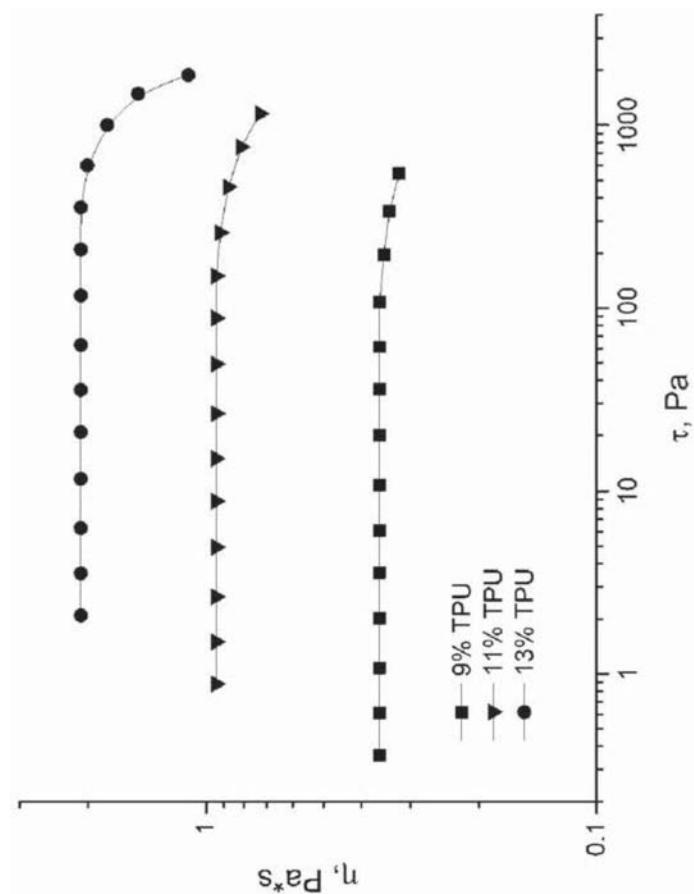


图12

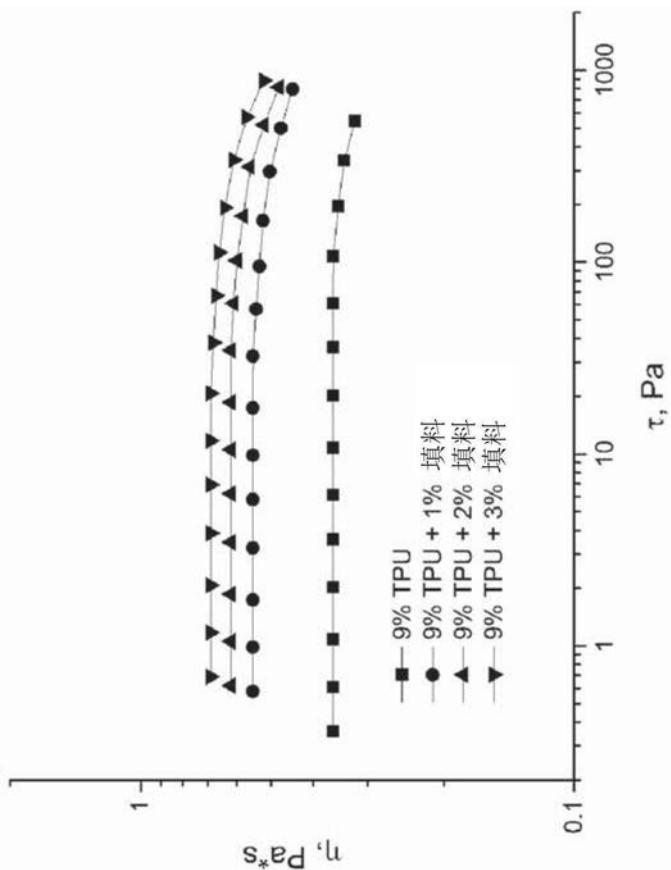


图13A

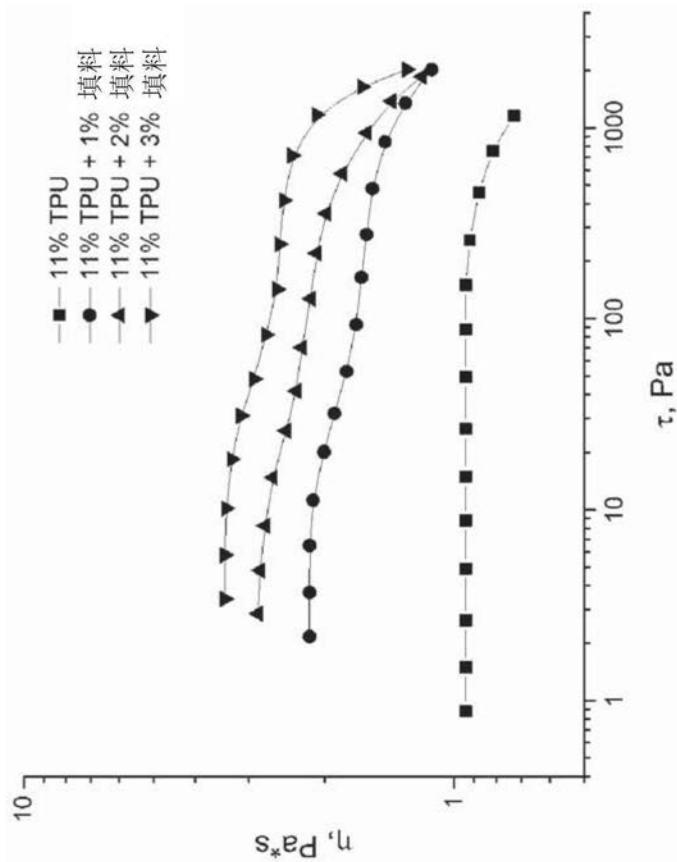


图13B

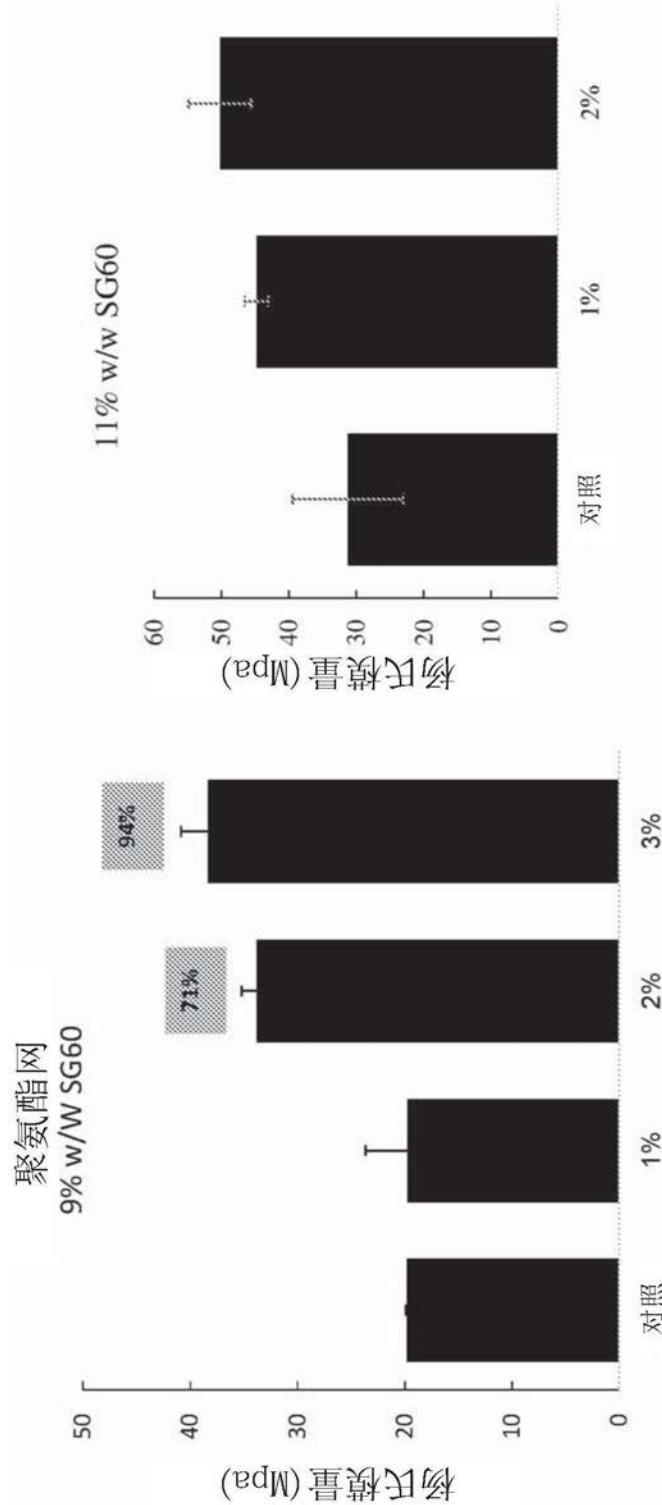


图14

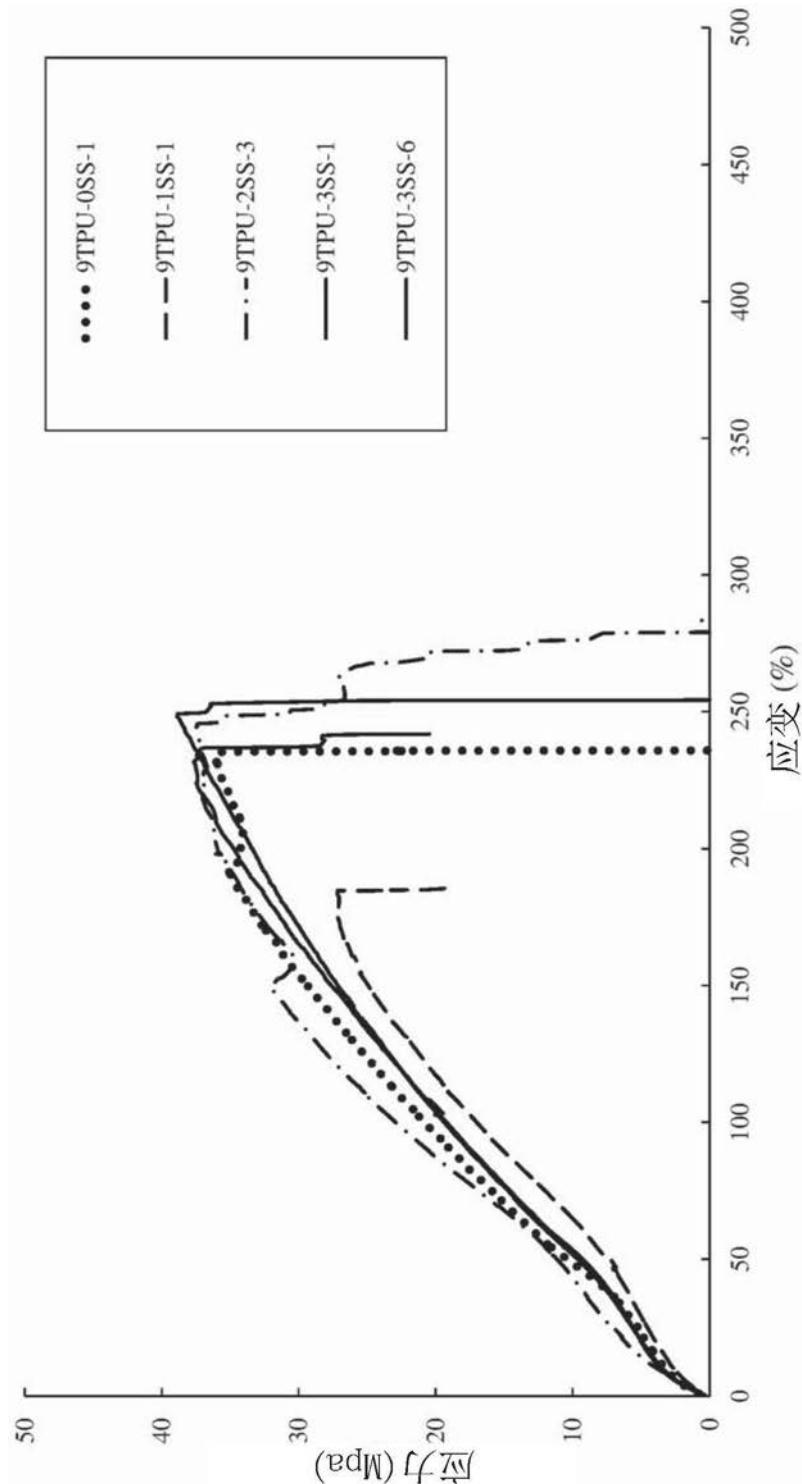


图15

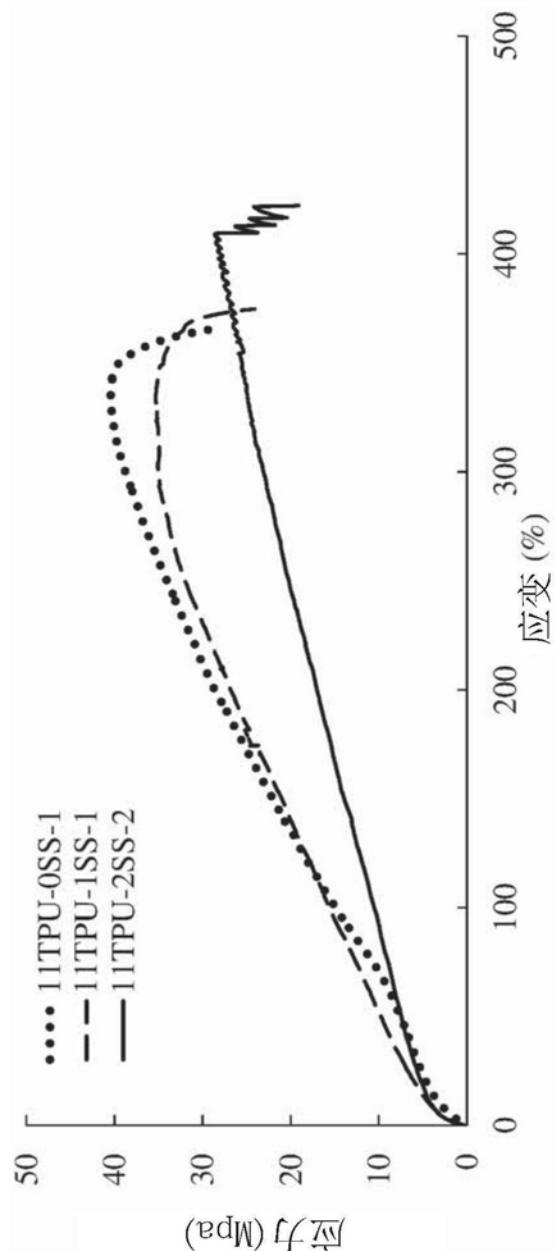


图16

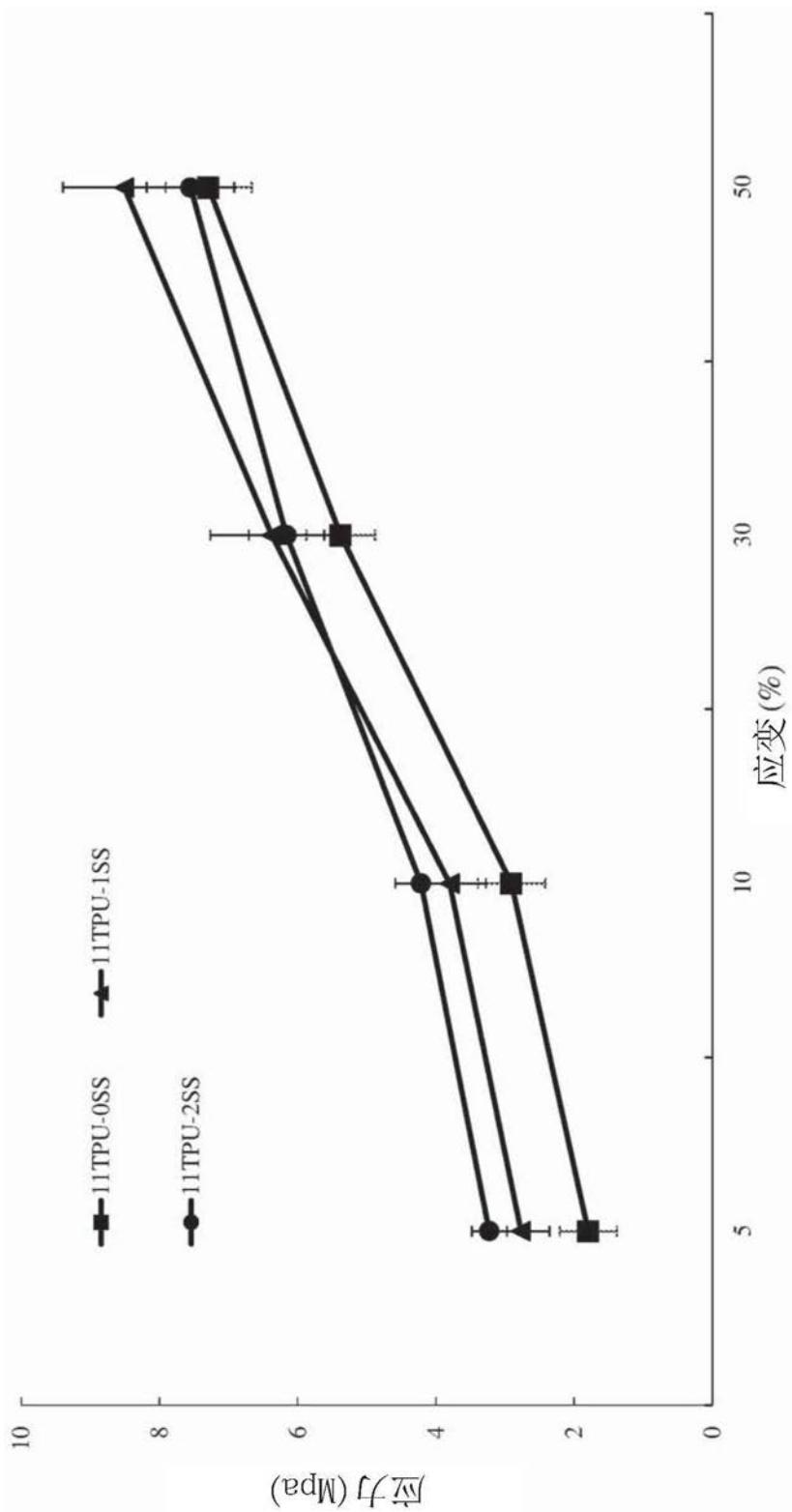


图17

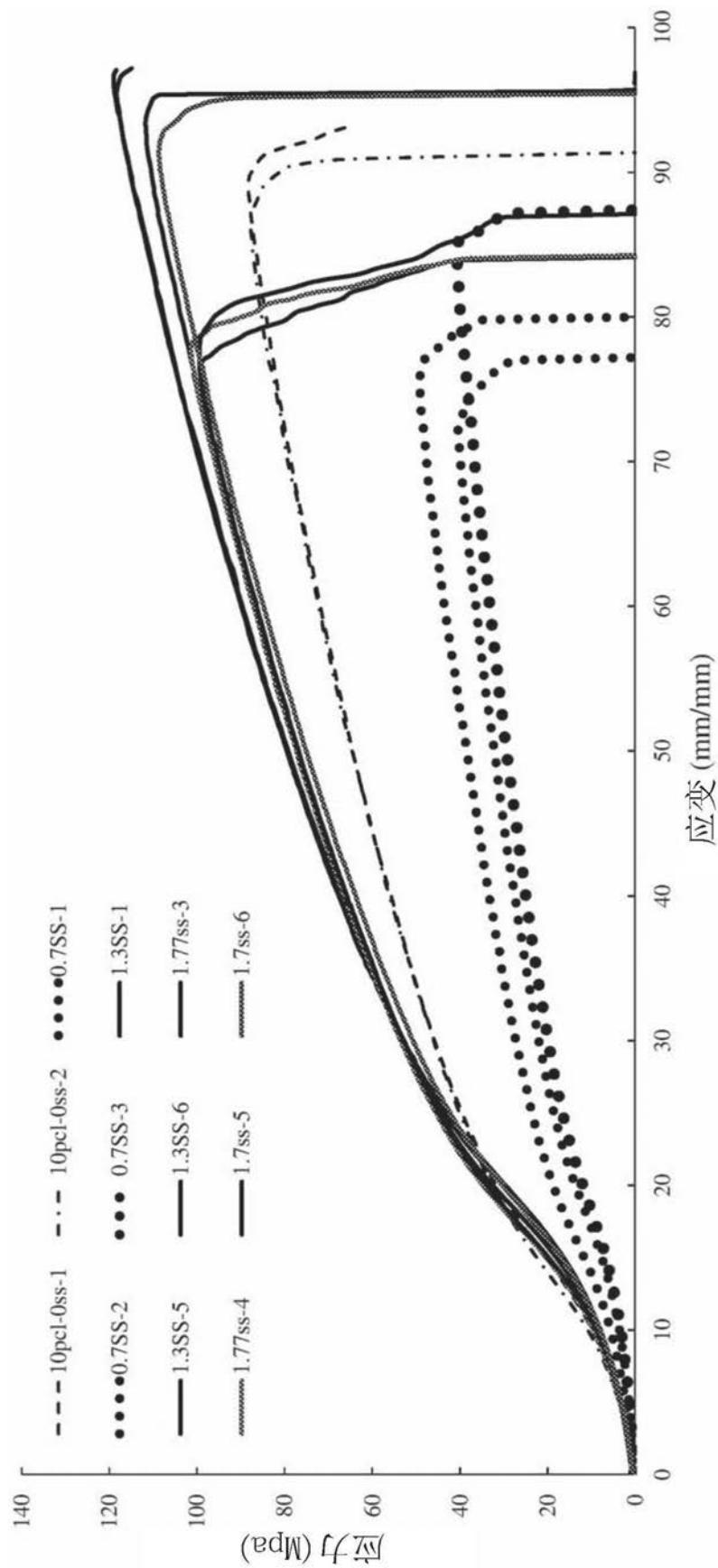


图18

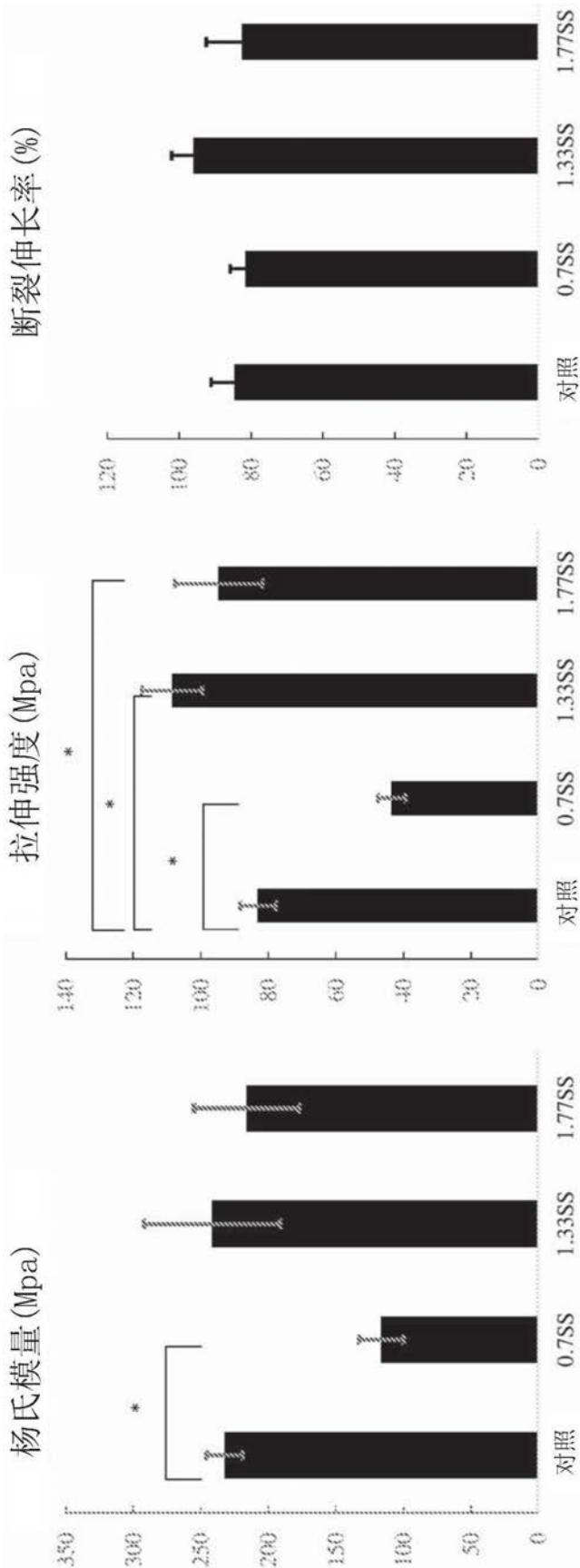


图19

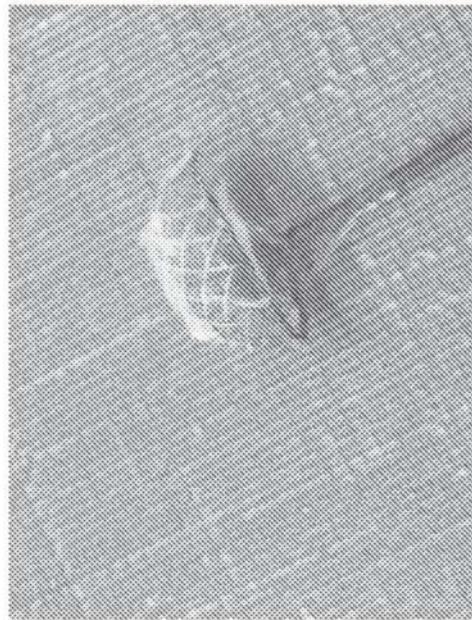


图20

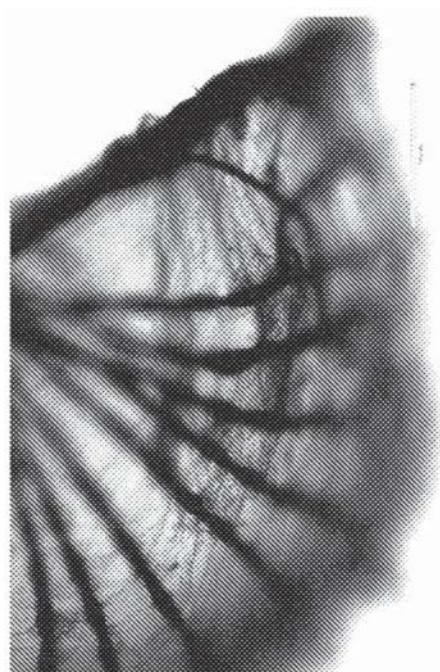


图21

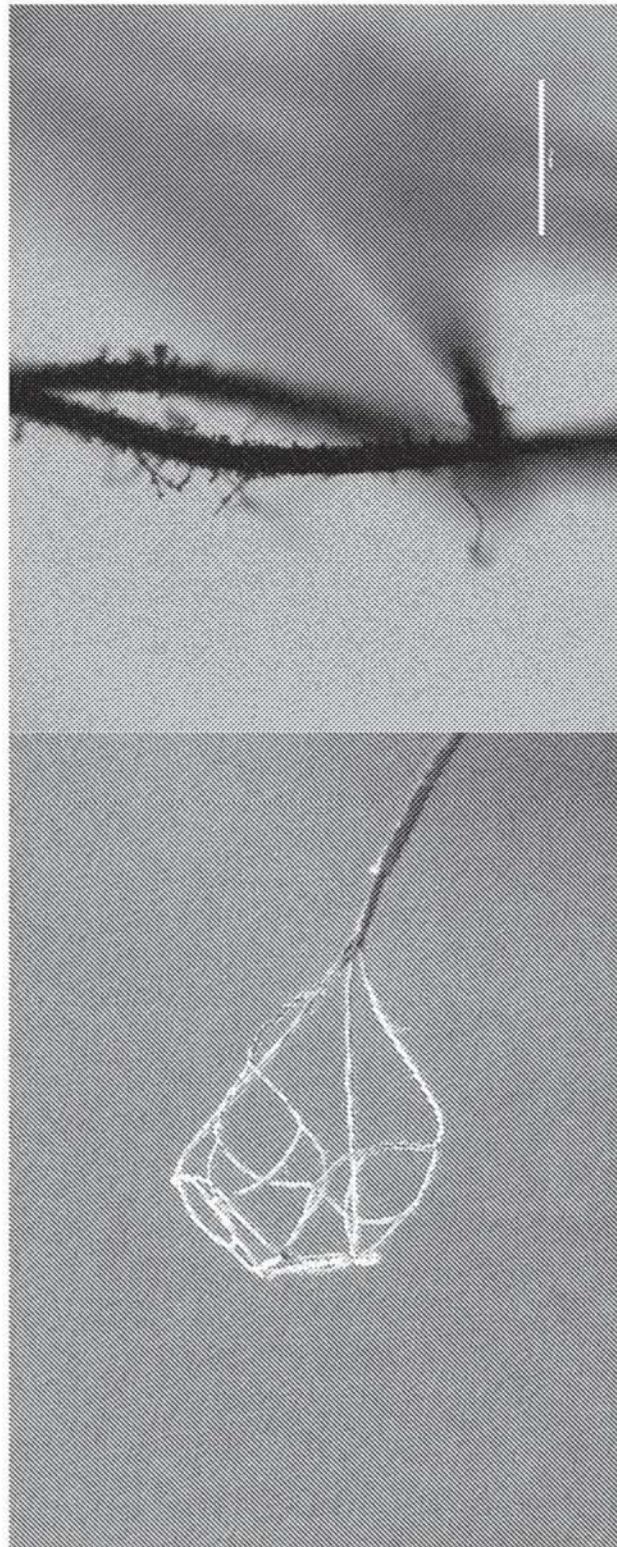


图22

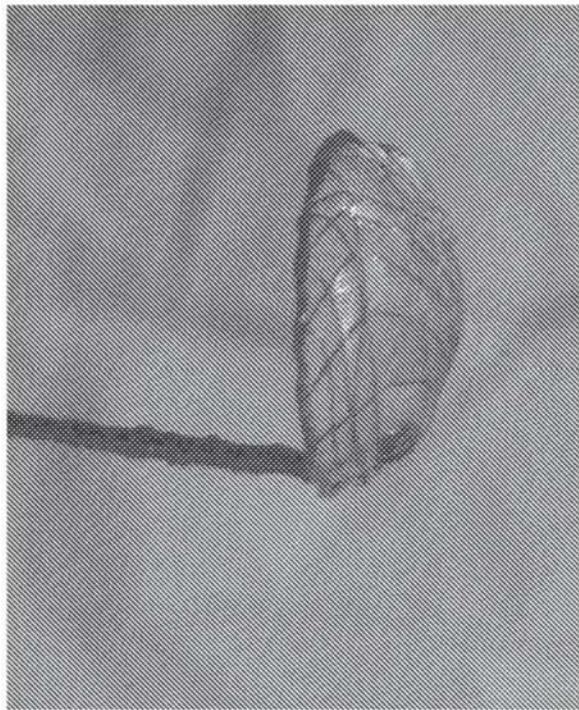


图23

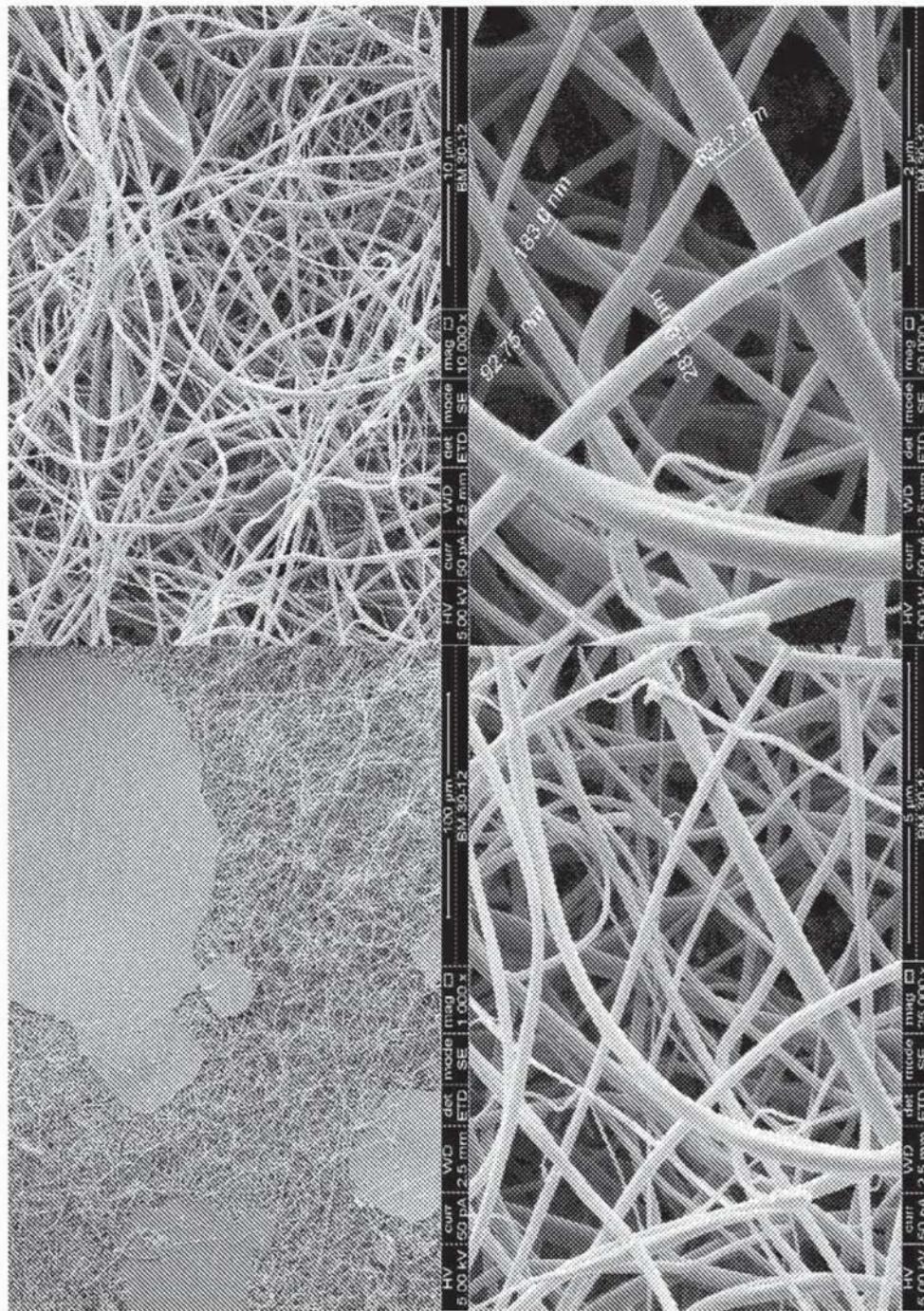


图 24

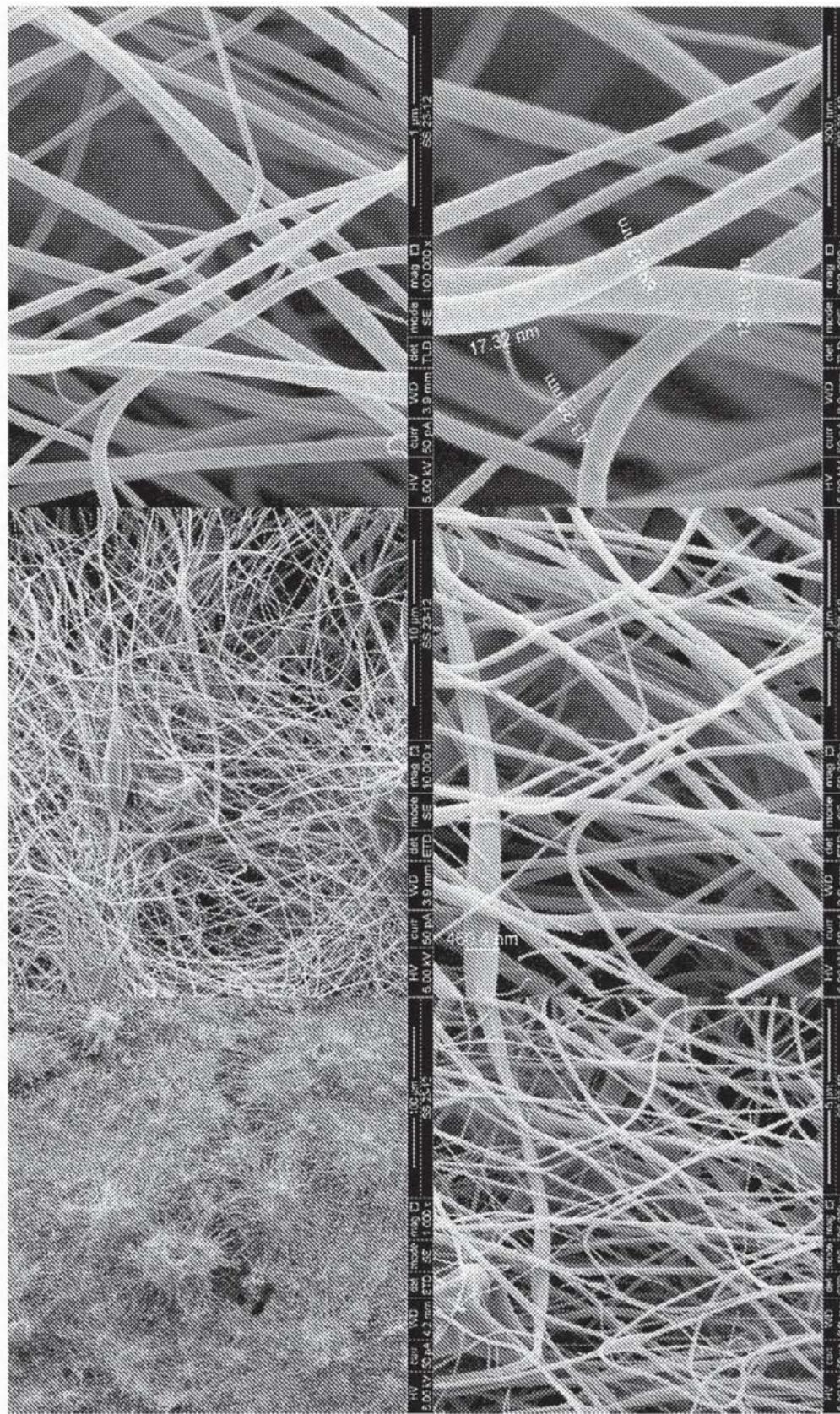


图25

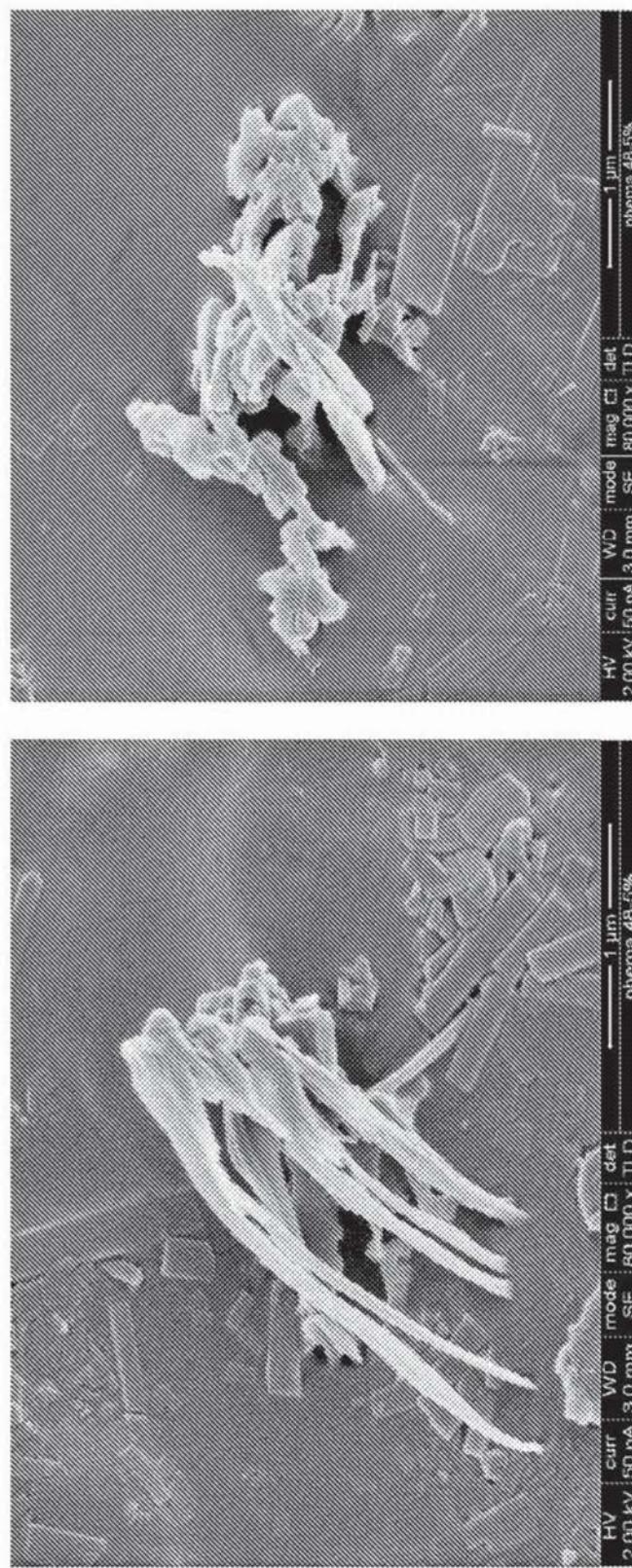


图26

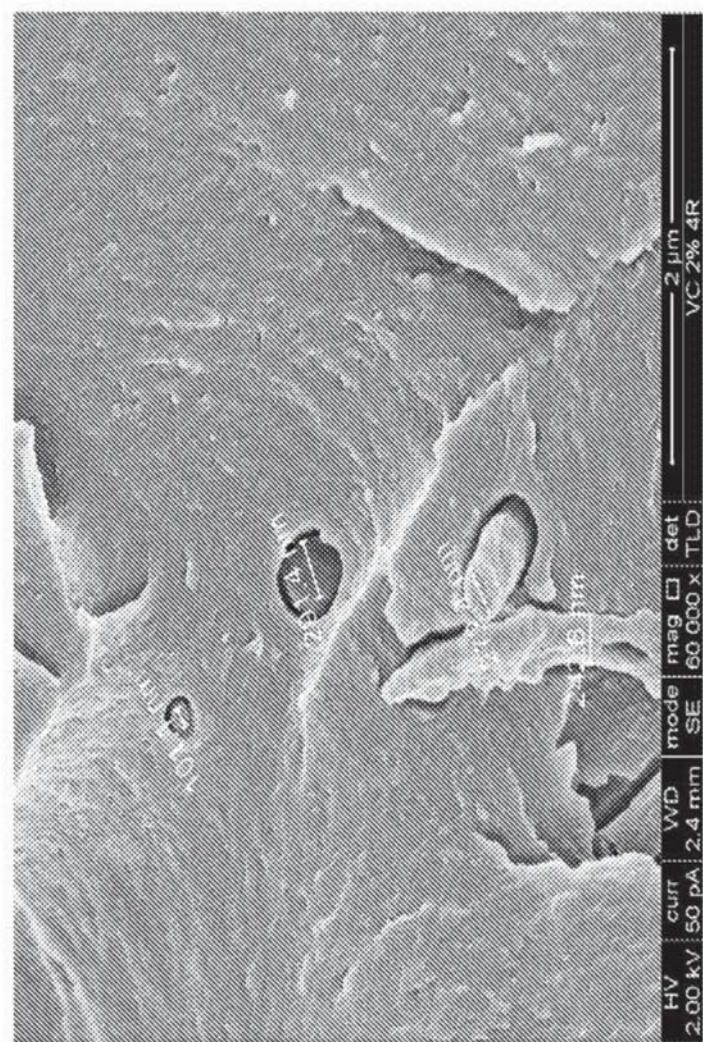


图27

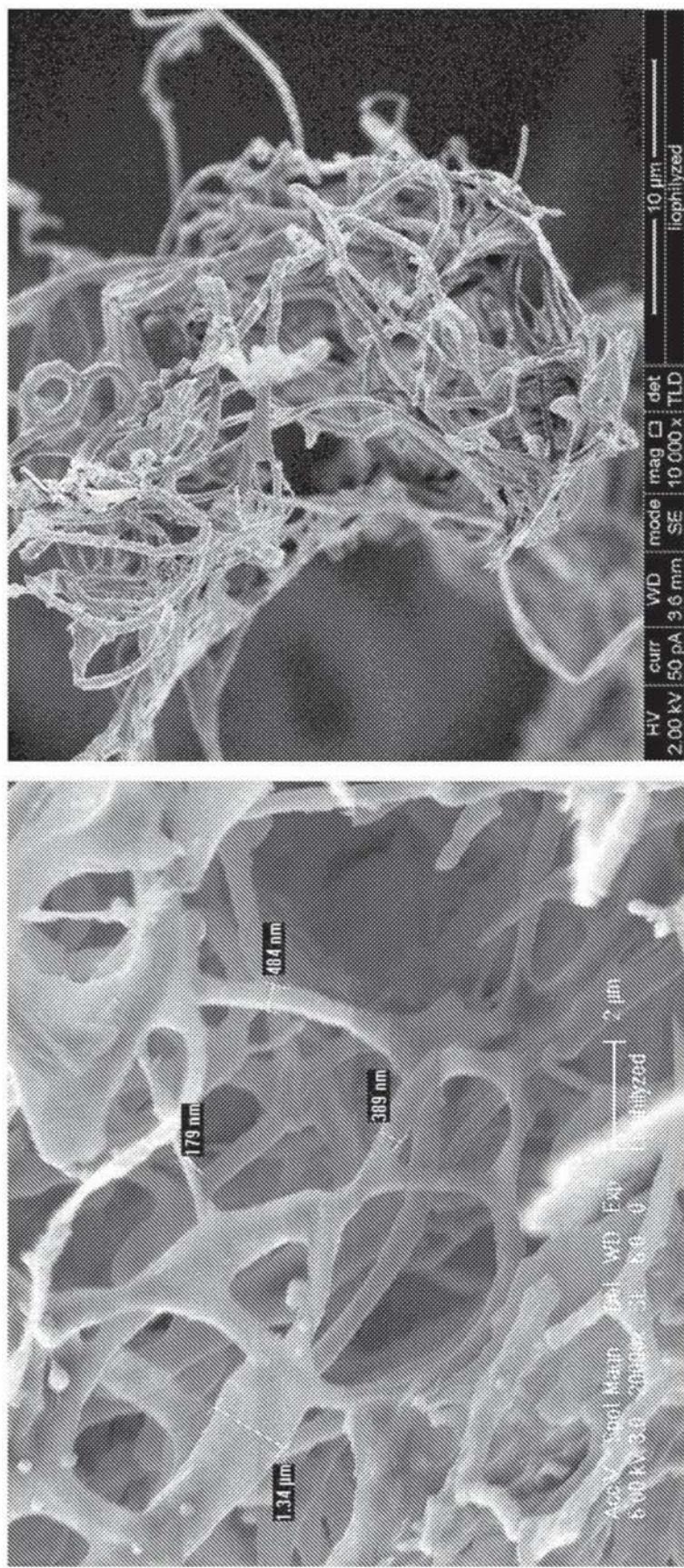


图28

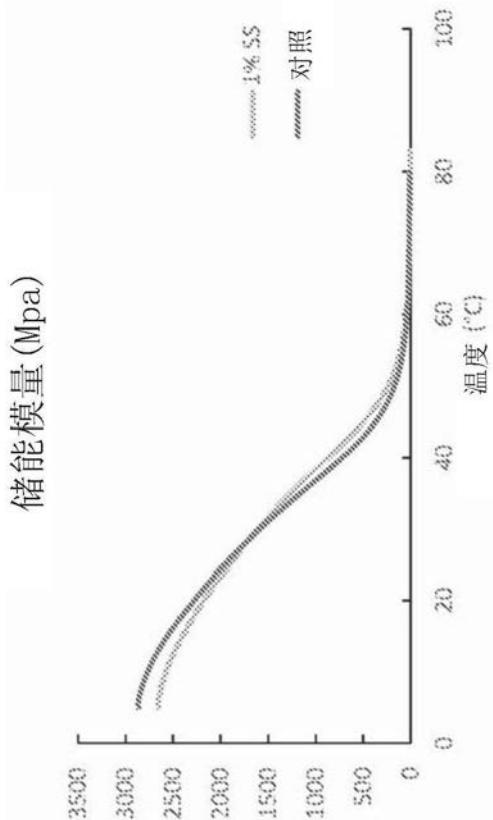


图29A

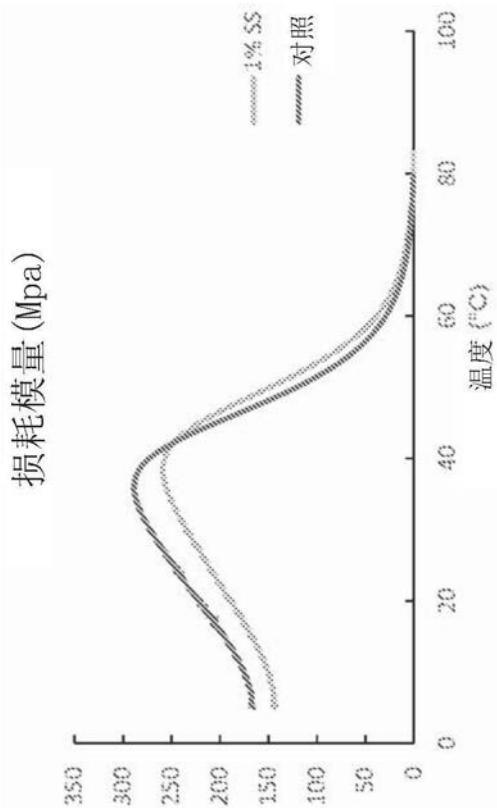


图29B

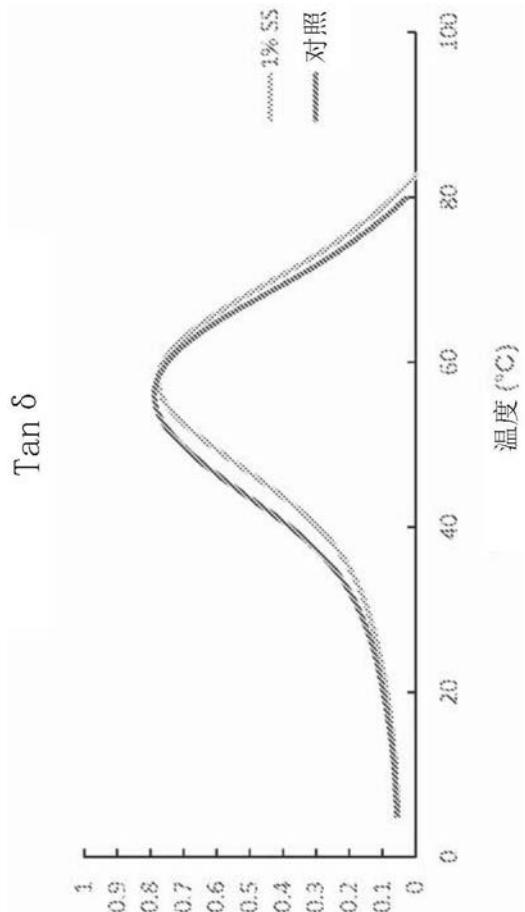


图29C

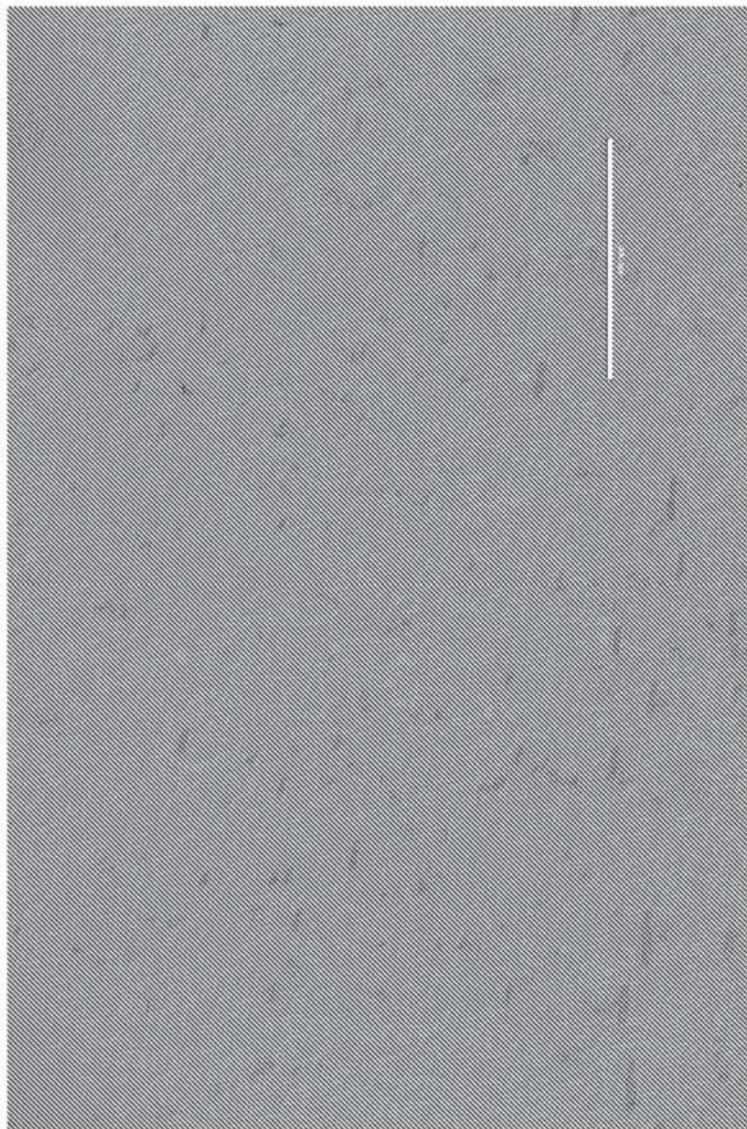


图30

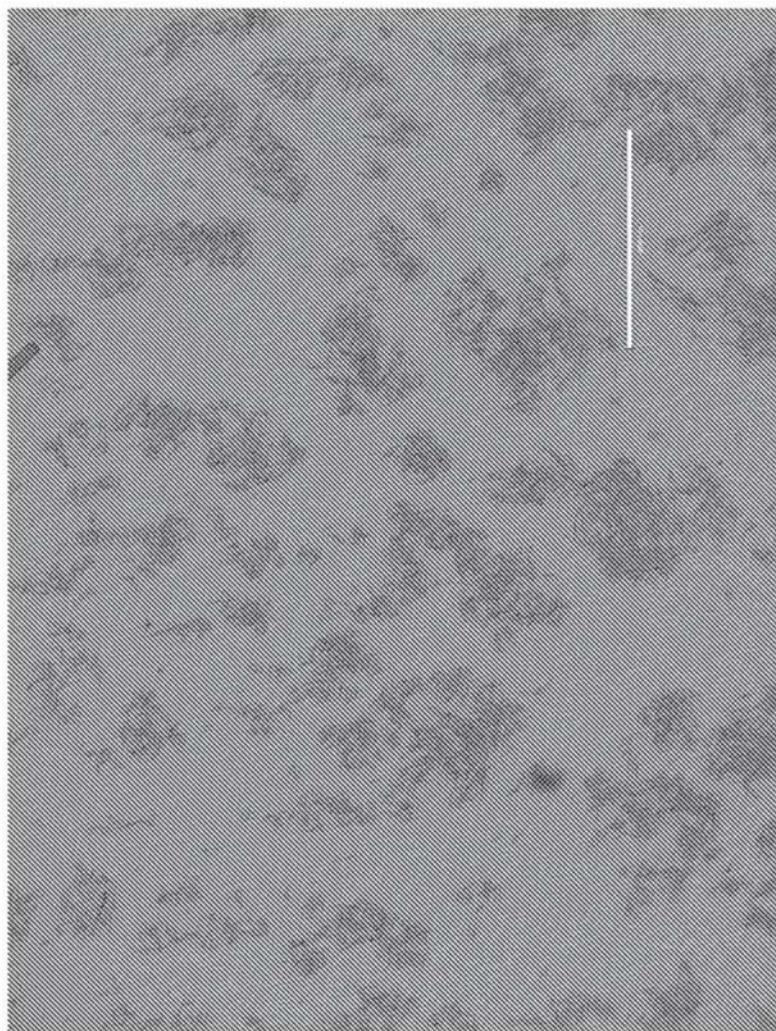


图31



图32



图33

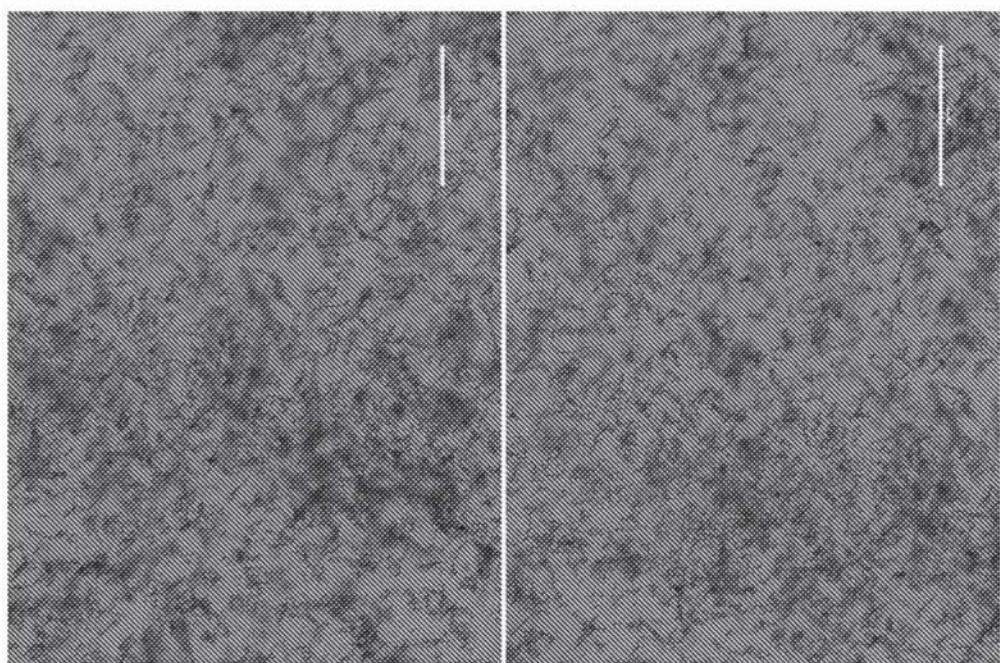
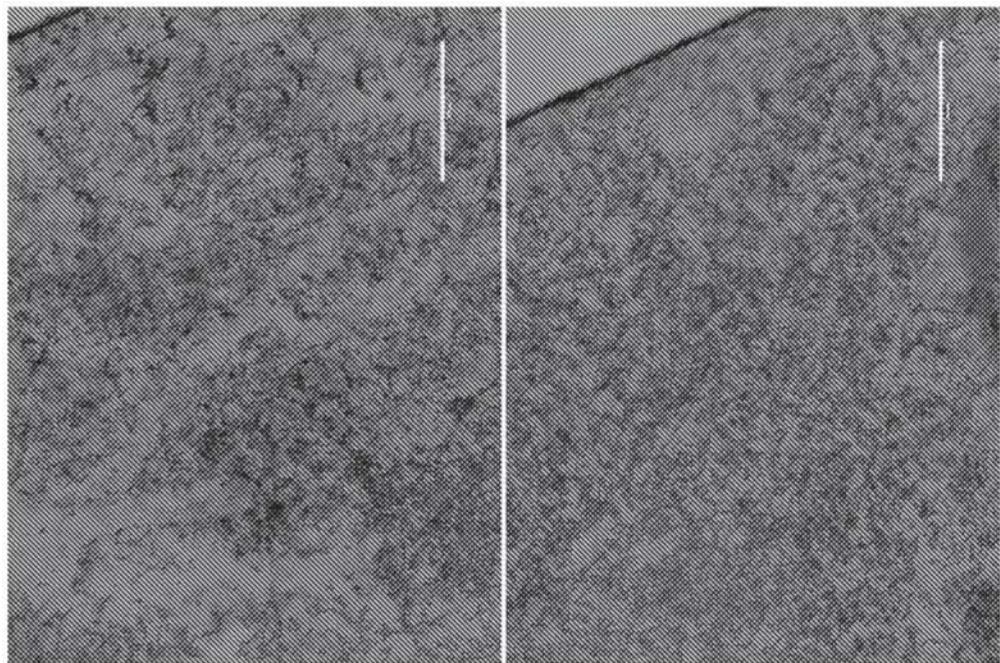


图34

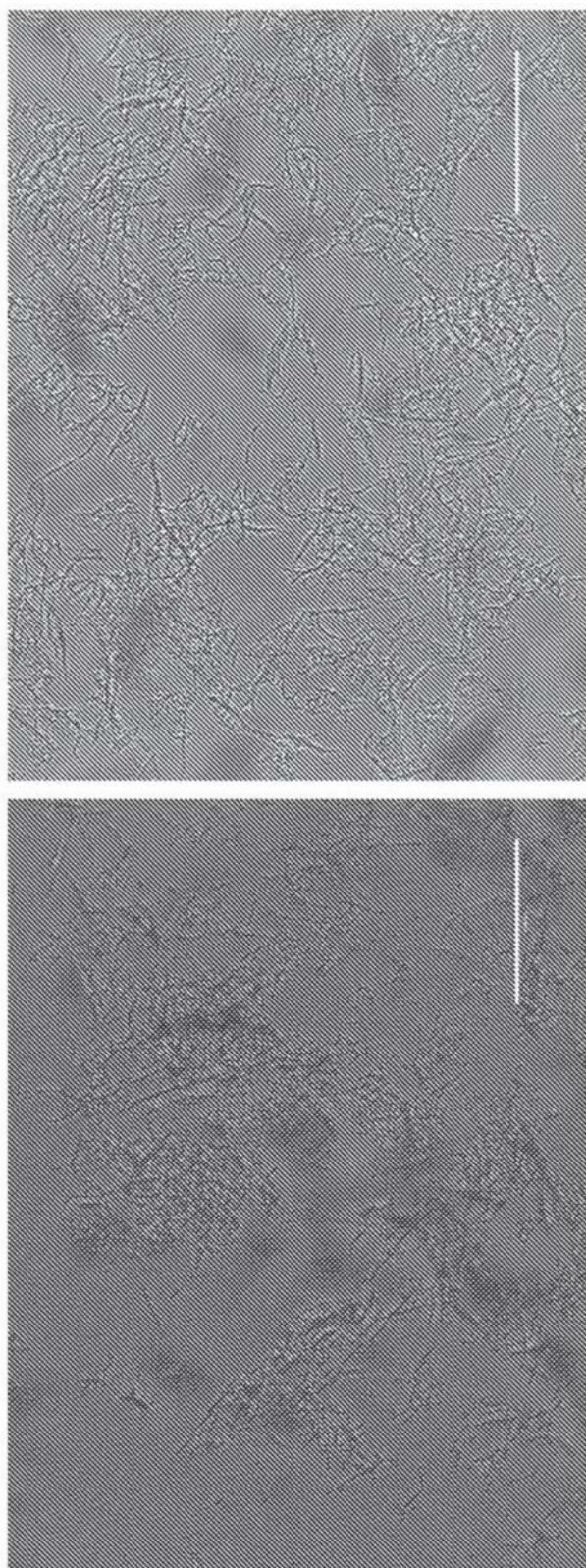


图35

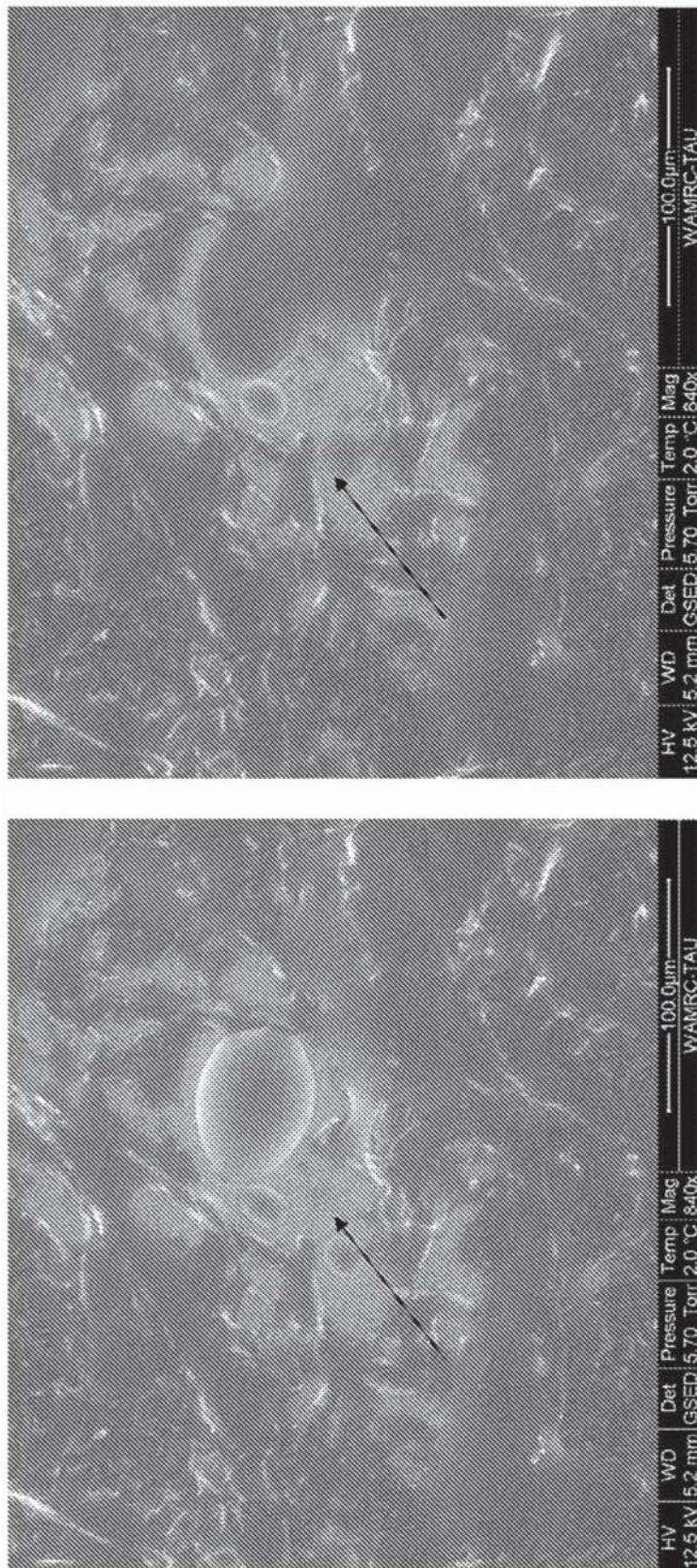


图36

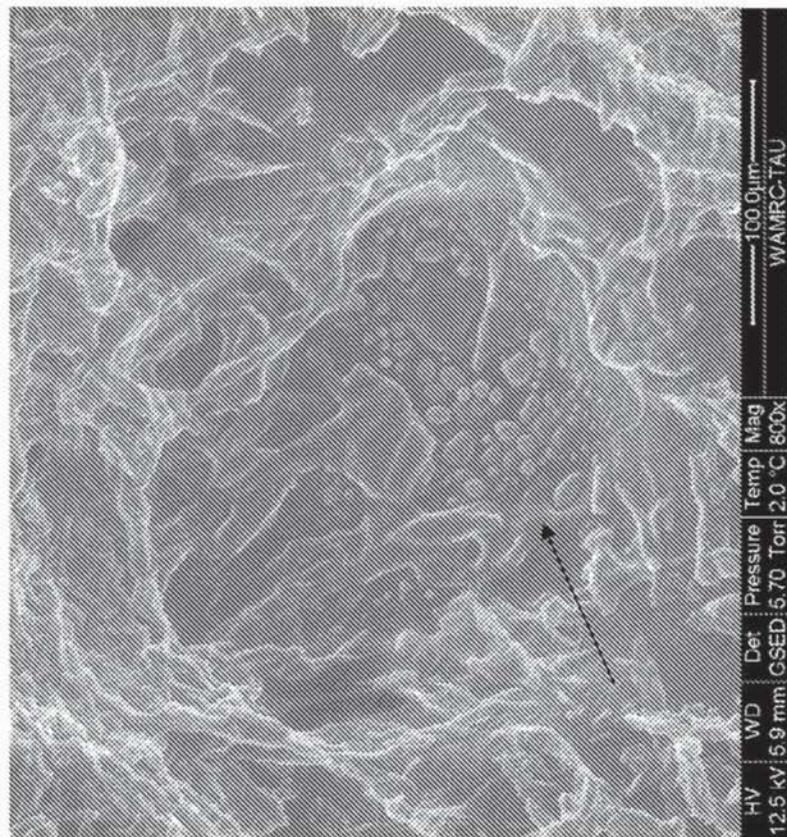
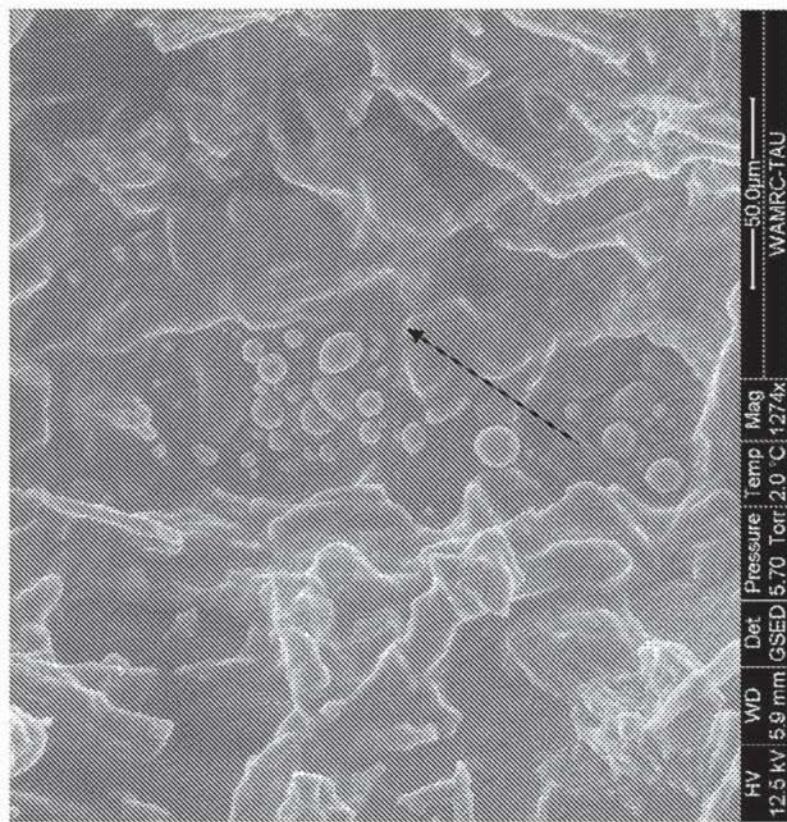


图37

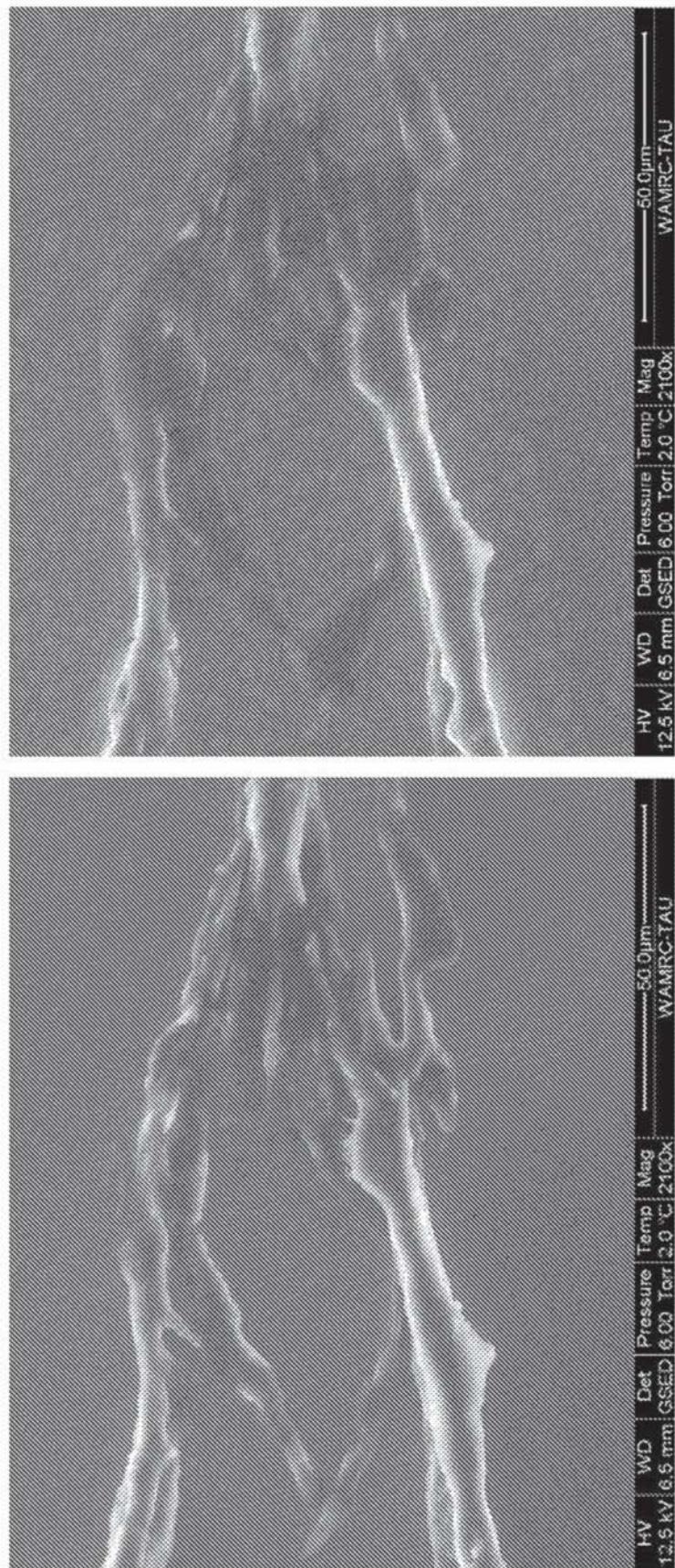


图38

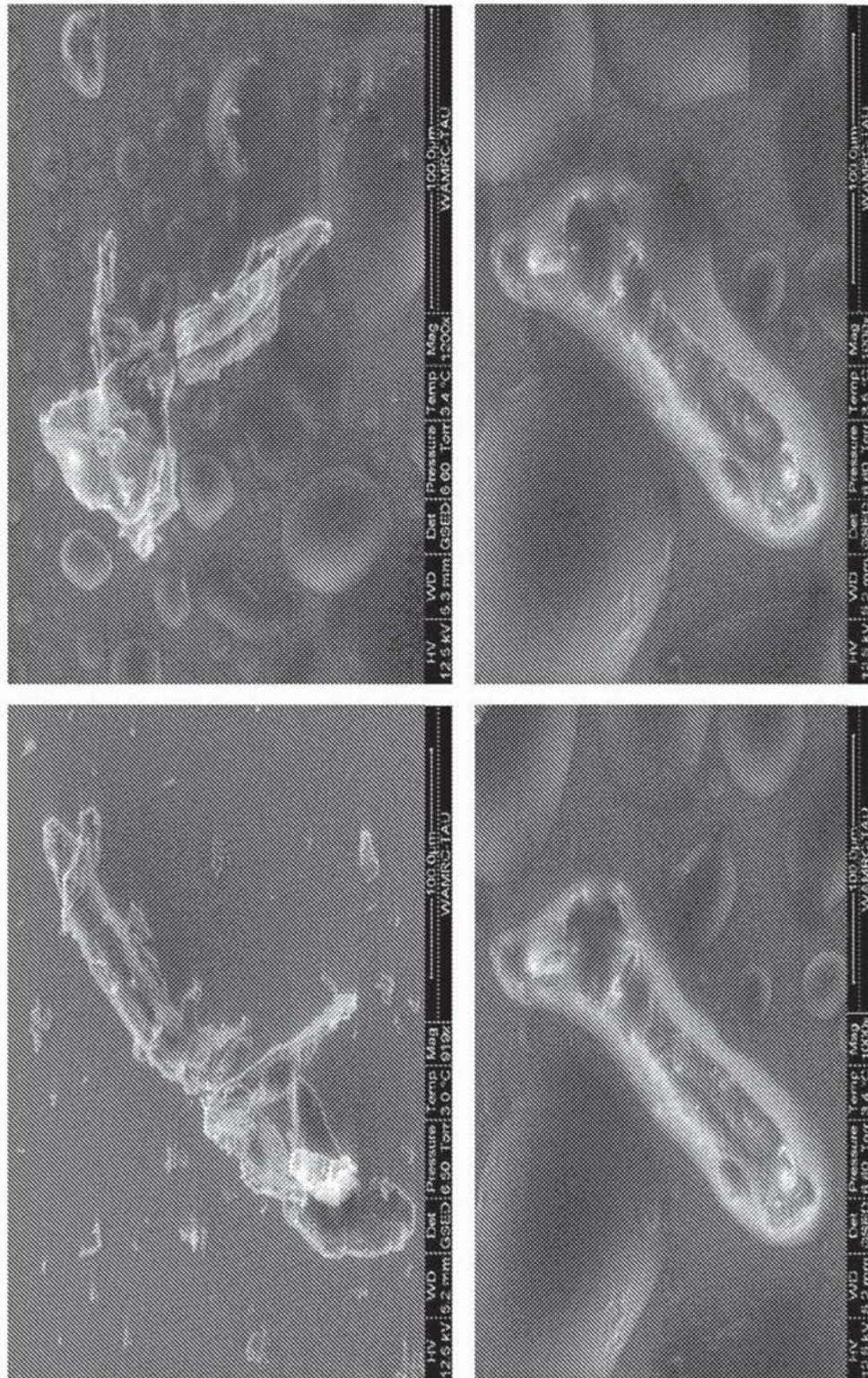


图39



图40A

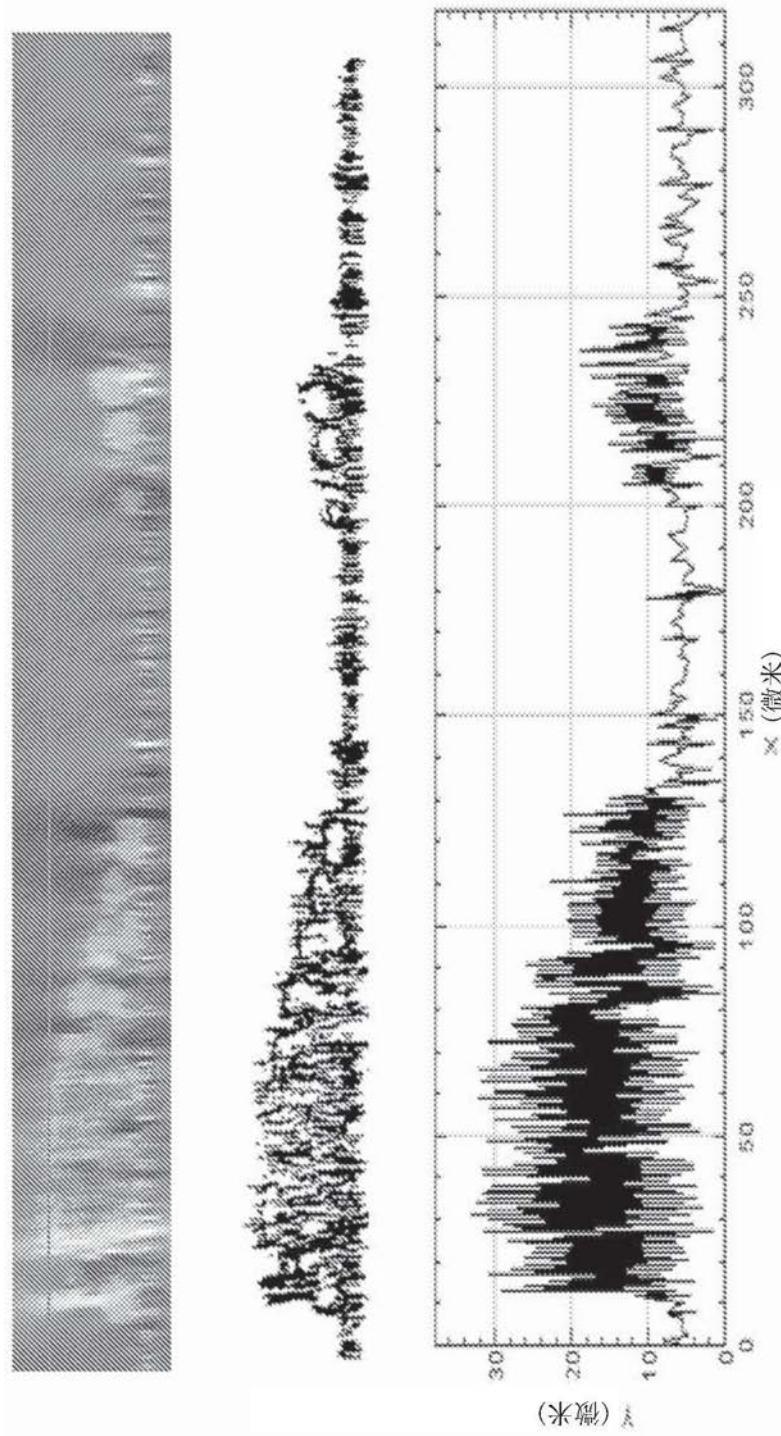


图40B

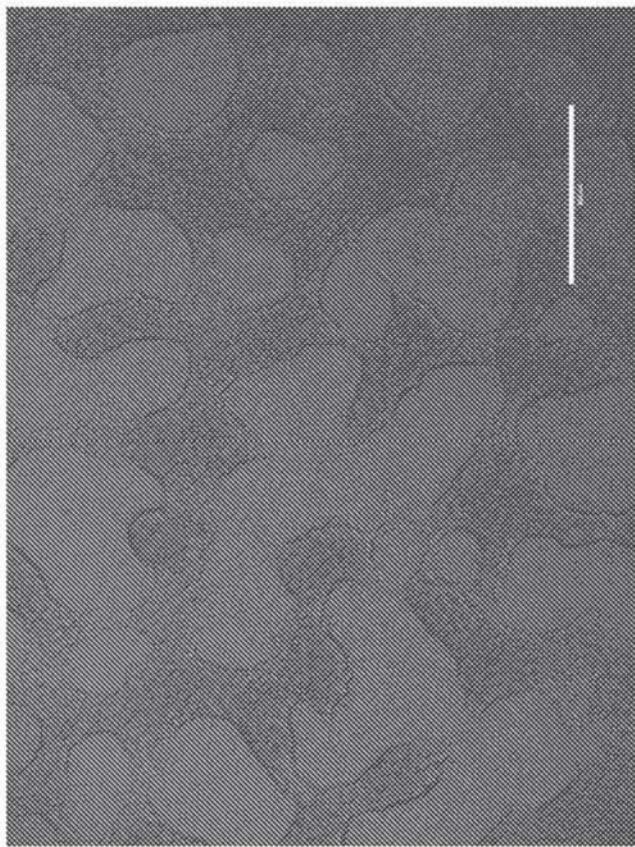


图41A

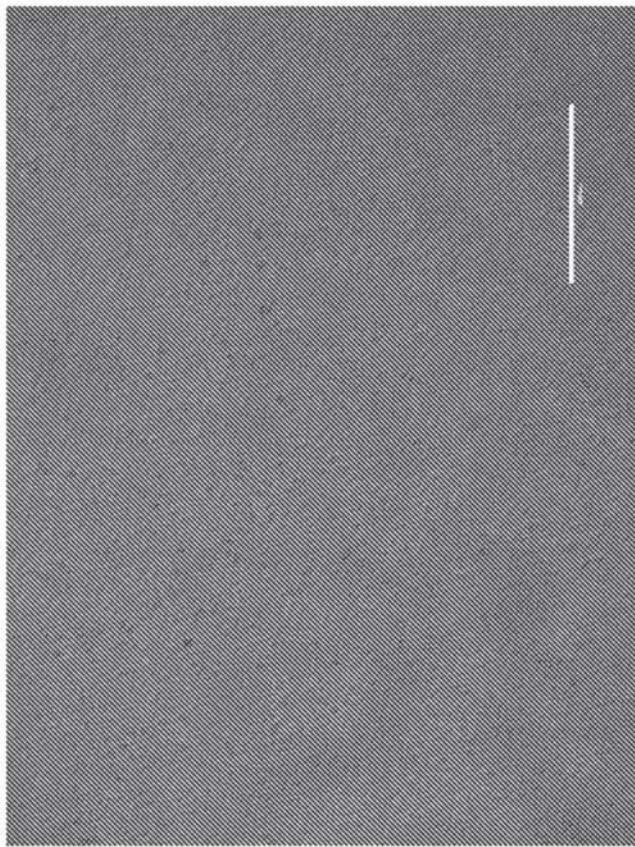


图41B

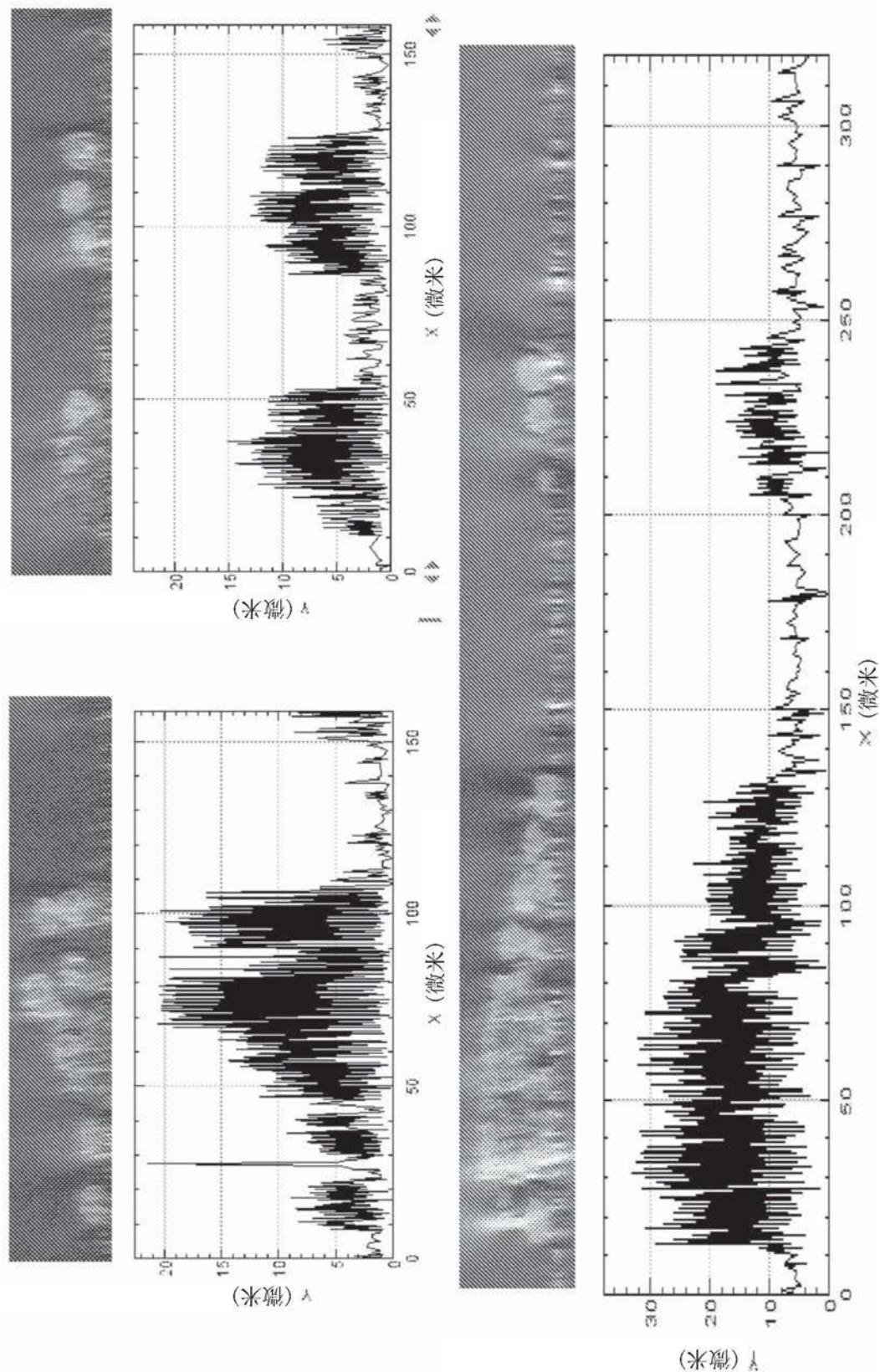


图42

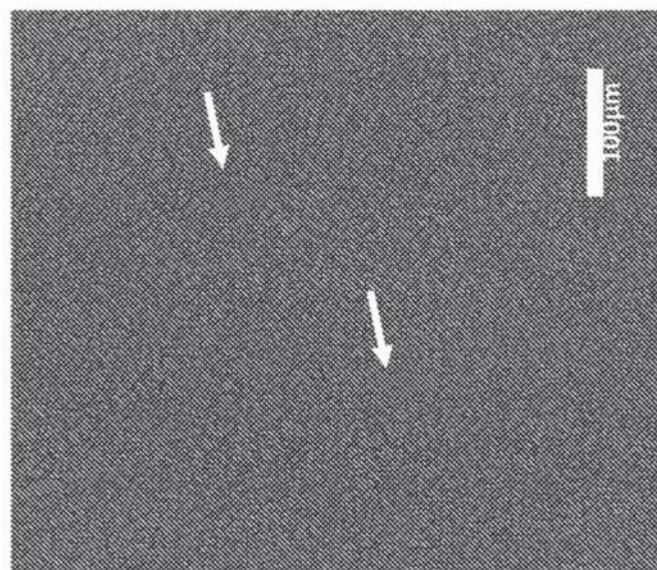


图43A

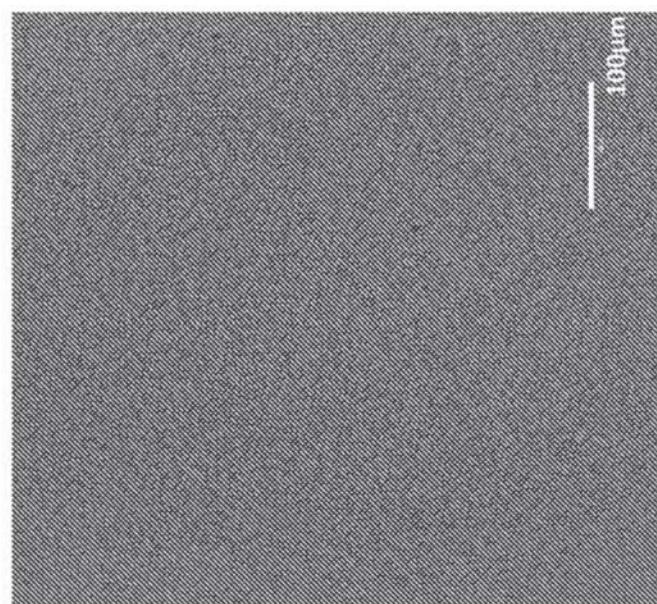


图43B

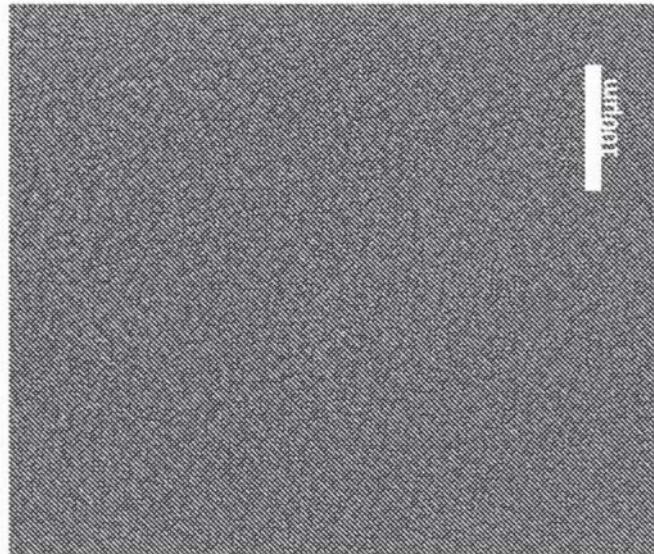


图43C

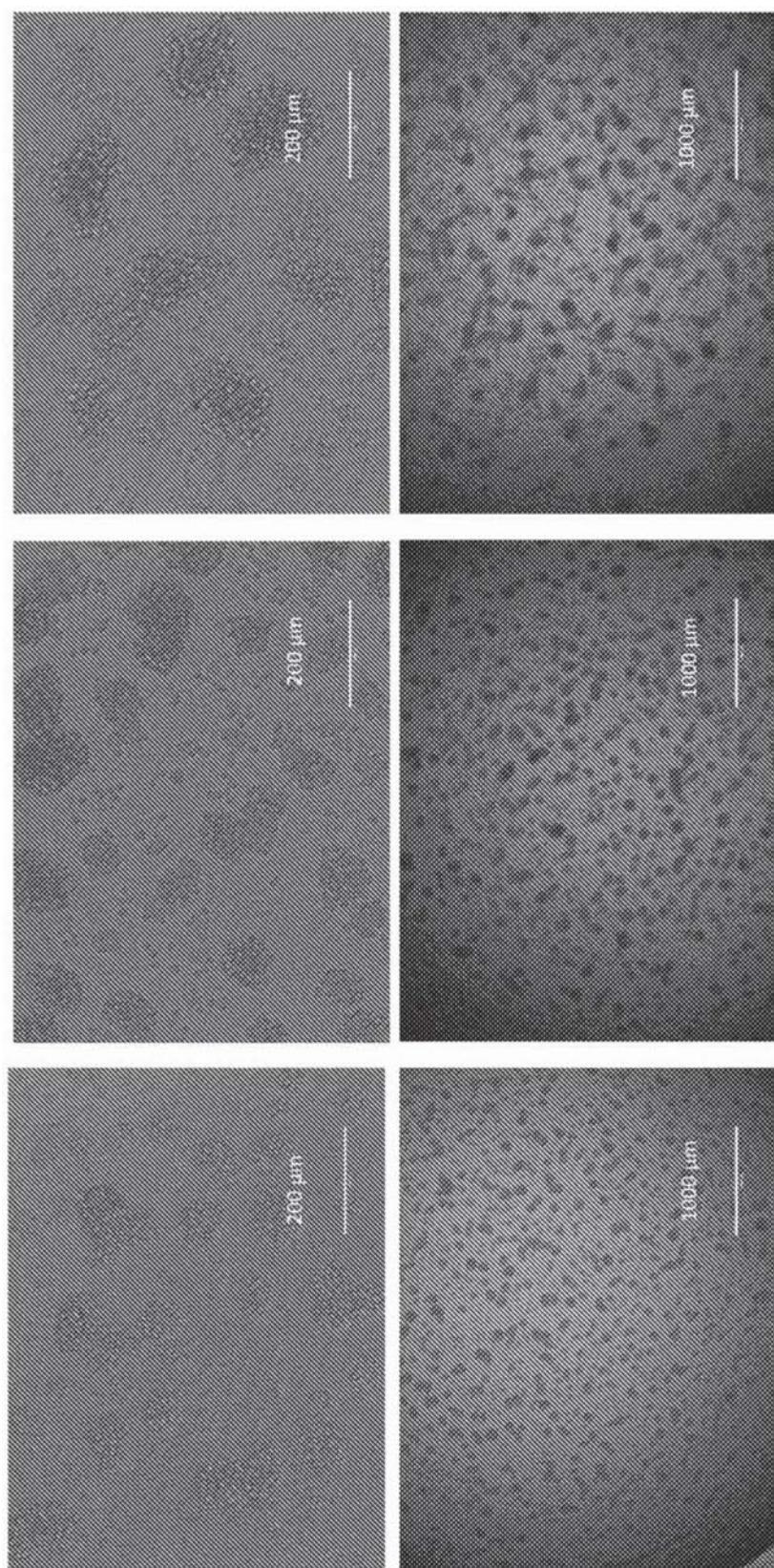


图44

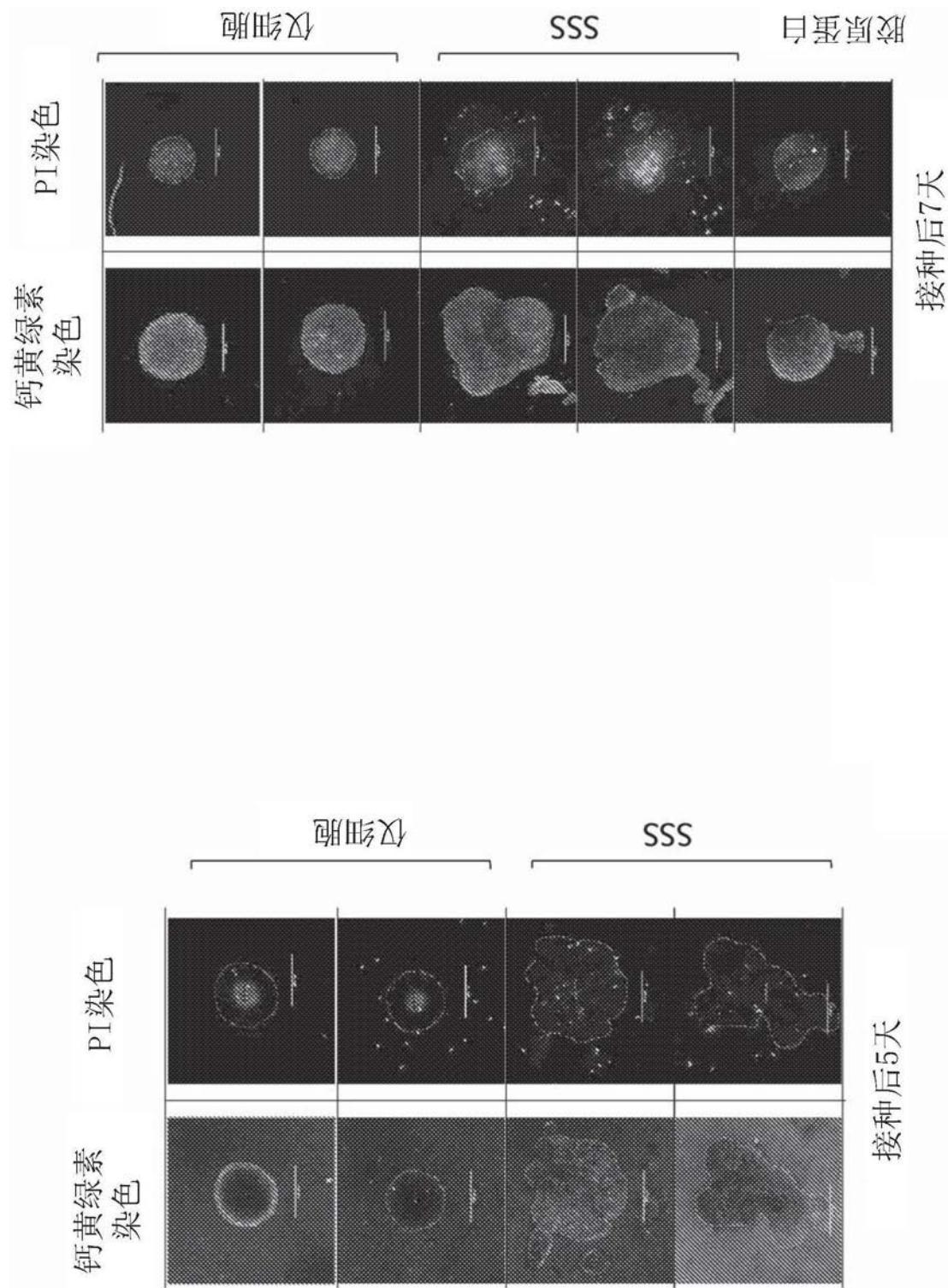


图45

活/死面积比(接种后7天)

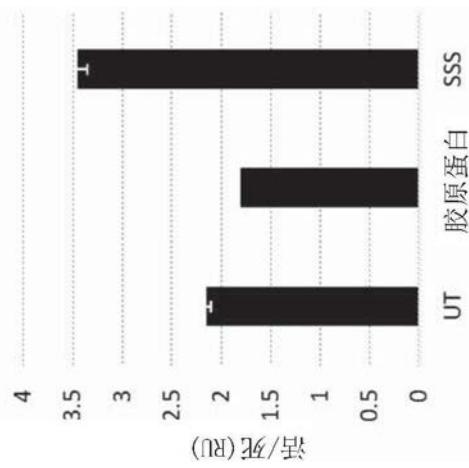


图46A

L929球状体体积

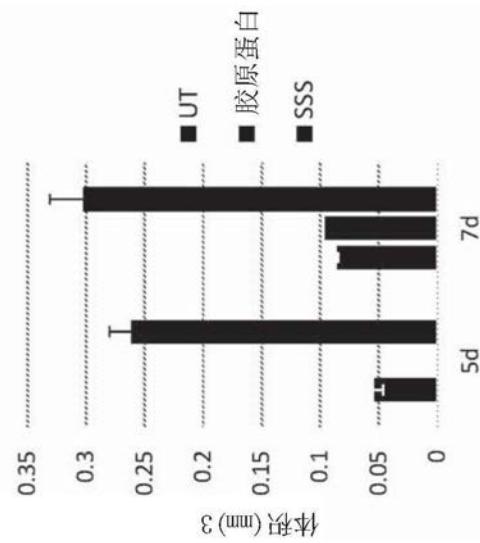


图46B

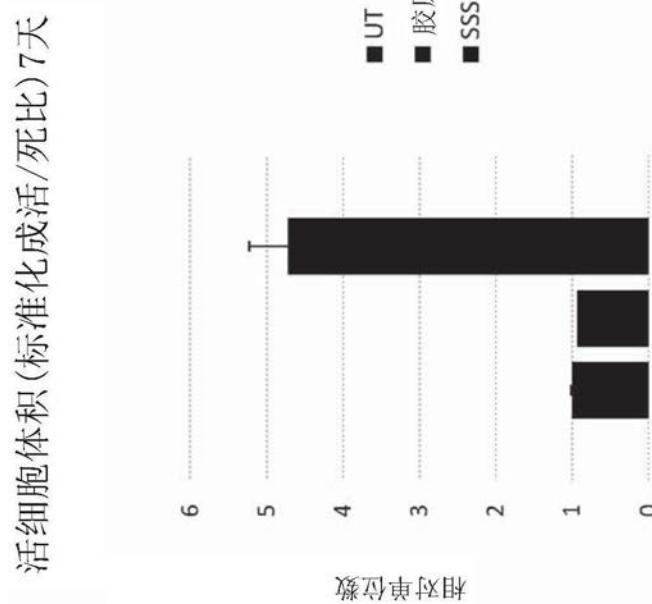


图46C

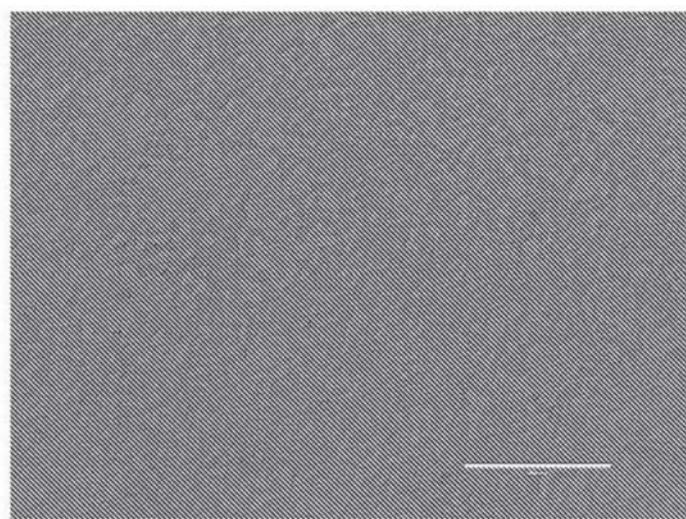


图47A

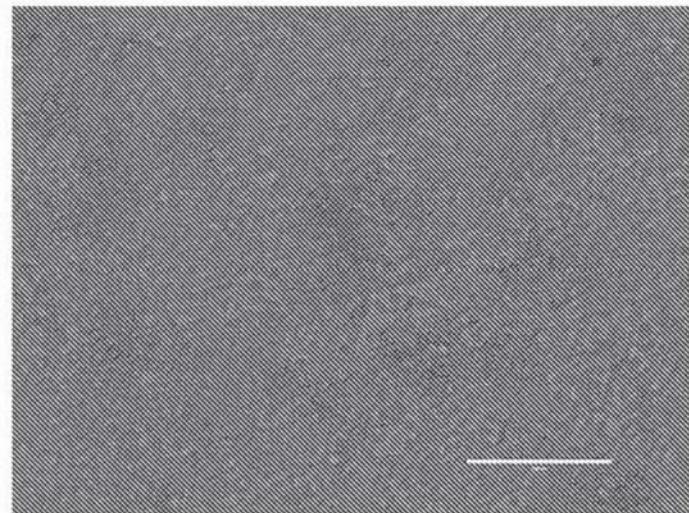


图47B

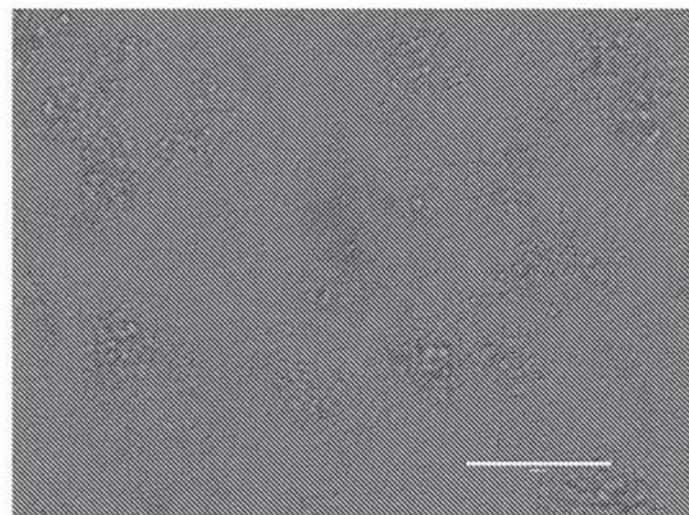


图47C

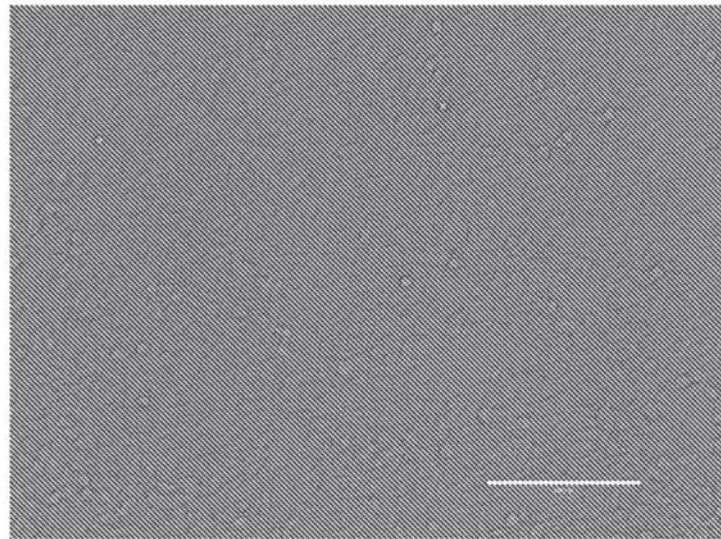


图48A

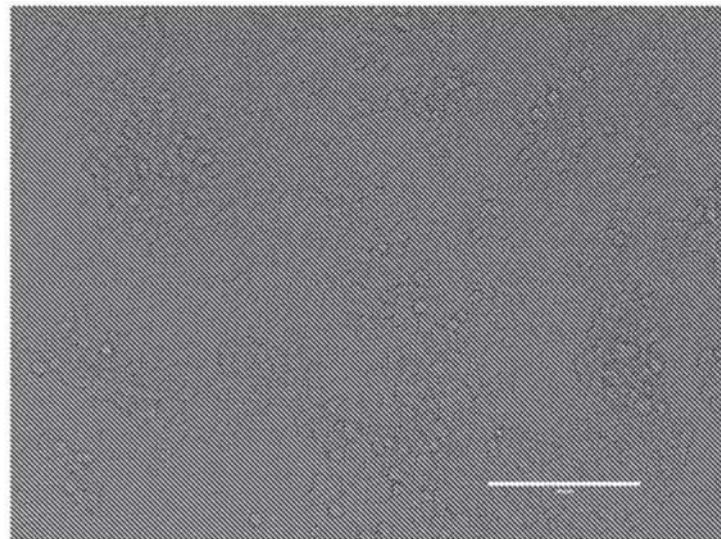


图48B

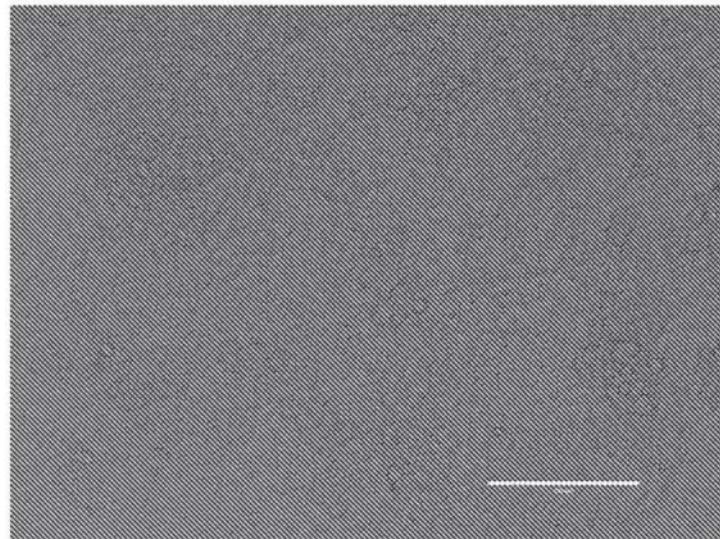


图48C

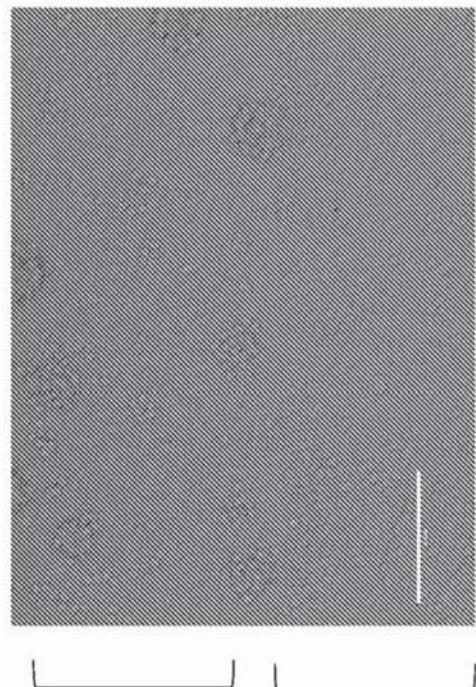


图49A

聚苯乙烯vs SS上的
L929细胞运动性

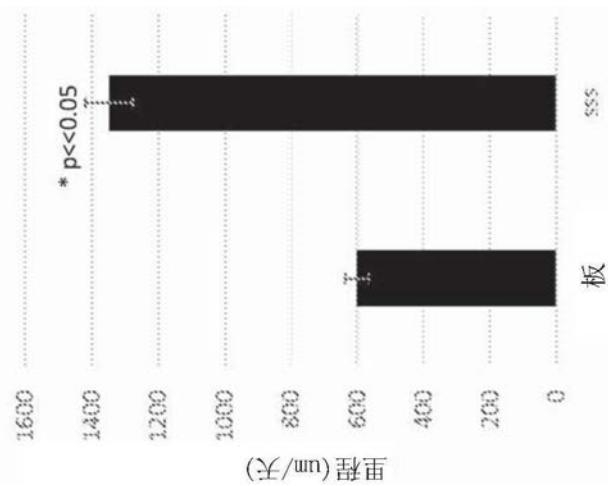


图49B