



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102355904 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 15

(21) 申请号 200980154015. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 11. 09

A61K 38/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/112, 578 2008. 11. 07 US

12/497, 305 2009. 07. 02 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 07. 06

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/063732 2009. 11. 09

(87) PCT申请的公布数据

W02010/054316 EN 2010. 05. 14

(71) 申请人 UAB 研究基金会

地址 美国阿拉巴马州

(72) 发明人 H-W·全 M·库沙瓦哈

B·C·布鲁特 P·安德森

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司

11285

代理人 张广育 姜建成

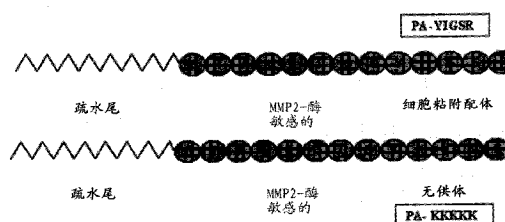
权利要求书 3 页 说明书 50 页 附图 19 页

(54) 发明名称

模仿内皮的纳米基质

(57) 摘要

本发明公开了用于产生模仿天然内皮的纳米基质的肽两亲物。所公开的模仿天然内皮的纳米基质可用于包裹医疗装置例如血管支架以促进内皮化并抑制再狭窄和血栓形成。本摘要意图作为用于具体领域检索目的的扫描途径,而并非意在限制本发明。



1. 一种肽两亲物,包括亲水肽序列和疏水尾,其中所述亲水肽序列包括降解序列以及第一细胞粘附序列和生成一氧化氮的供体序列中的一种或多种,其中所述第一粘附序列是不与平滑肌细胞和 / 或血小板结合的内皮细胞粘附序列。

2. 权利要求 1 的肽两亲物,其中所述亲水肽序列包括下式:

DS---CA,

其中 --- 是直接或间接的共价键,

其中“DS”是降解序列;并且

其中“CA”是内皮细胞粘附序列。

3. 权利要求 1 的肽两亲物,其中所述亲水肽序列包括下式:

DS---KK,

其中 --- 是直接或间接的共价键,

其中“DS”是降解序列;并且

其中“KK”是生成一氧化氮的供体序列。

4. 权利要求 1 的肽两亲物,其中所述亲水肽序列包括下式:

DS---CA---KK,

其中 --- 是直接或间接的共价键,

其中“DS”是降解序列;

其中“CA”是内皮细胞粘附序列;并且

其中“KK”是生成一氧化氮的供体序列。

5. 权利要求 1 的肽两亲物,其中所述亲水肽序列包括下式:

DS---KK---CA,

其中 --- 是直接或间接的共价键,

其中“DS”是降解序列;

其中“CA”是内皮细胞粘附序列;并且

其中“KK”是生成一氧化氮的供体序列。

6. 权利要求 1 的肽两亲物,其中所述降解序列包括经历细胞介导的蛋白水解性降解的序列。

7. 权利要求 6 的肽两亲物,其中所述降解序列包括基质金属蛋白酶(MMP)特异性切割位点。

8. 权利要求 7 的肽两亲物,其中所述降解序列包括基质金属蛋白酶-2(MMP2)特异性切割位点。

9. 权利要求 1 的肽两亲物,其中将所述两亲物包裹在纳米纤维上。

10. 权利要求 9 的肽两亲物,其中所述纳米纤维包括聚酯。

11. 权利要求 10 的肽两亲物,其中所述聚酯是聚己内酯。

12. 权利要求 9 的肽两亲物,其中所述纳米纤维通过电纺制成。

13. 一种组合物,包括第一肽两亲物和第二肽两亲物,所述第一肽两亲物和第二肽两亲物各自独立包括亲水肽序列和疏水尾,其中所述第一肽两亲物的亲水肽序列包括降解序列和内皮细胞粘附序列,并且其中所述第二肽两亲物的亲水肽序列包括降解序列和生成一氧化氮的供体序列。

14. 权利要求 13 的组合物,其中所述第一肽两亲物的亲水肽序列包括下式:
DS---CA,
其中每个 --- 独立为直接或间接的共价键,
其中“DS”是降解序列;并且
其中“CA”是内皮细胞粘附序列;
并且其中所述第二肽两亲物的亲水肽序列包括下式:
DS---KK,
其中“KK”是生成一氧化氮的供体序列。
15. 权利要求 13 的组合物,还包括纳米纤维,其中将所述第一肽两亲物和第二肽两亲物包裹在所述纳米纤维上。
16. 权利要求 15 的组合物,其中所述纳米纤维包括聚酯。
17. 权利要求 16 的组合物,其中所述聚酯是聚己内酯。
18. 一种模仿内皮的纳米基质,包括组装成纳米纤维的一种或多种肽两亲物,其中所述肽两亲物各自均包括亲水肽序列和疏水尾,其中所述亲水肽序列包括降解序列以及第一细胞粘附序列和生成一氧化氮的供体序列中的一种或多种,其中所述第一粘附序列是不与平滑肌细胞和 / 或血小板结合的内皮细胞粘附序列。
19. 权利要求 18 的模仿内皮的纳米基质,其中所述纳米纤维包括具有式 DS---CA 和 DS---KK 的肽两亲物的混合物。
20. 权利要求 19 的模仿内皮的纳米基质,其中所述 DS---CA 和 DS---KK 肽两亲物以约 1 : 9 至约 9 : 1 的比例存在于所述纳米纤维中。
21. 权利要求 18 的模仿内皮的纳米基质,其中所述纳米纤维还包括聚己内酯。
22. 一种组合物,包括用模仿内皮的纳米基质包裹的医疗装置,所述模仿内皮的纳米基质包括组装成纳米纤维的一种或多种肽两亲物,其中所述肽两亲物各自均包括亲水肽序列和疏水尾,其中所述亲水肽序列包括降解序列以及第一细胞粘附序列和生成一氧化氮的供体序列中的一种或多种,其中所述第一粘附序列是不与平滑肌细胞和 / 或血小板结合的内皮细胞粘附序列。
23. 权利要求 22 的组合物,其中所述医疗装置是血管支架、血管移植物、导管、起搏器或心瓣膜。
24. 权利要求 22 的组合物,其中所述纳米纤维包括所述两亲物在其上包裹形成所述纳米基质的聚己内酯纳米纤维。
25. 一种制备肽两亲物的方法,包括以下步骤:
a) 提供亲水肽,所述亲水肽包括降解序列以及内皮细胞粘附序列和生成一氧化氮的供体序列中的一种或多种;
b) 用疏水部分烷基化所述亲水肽的 N 端。
26. 权利要求 25 的方法,其中所述烷基化包括用疏水羧酸进行酰胺化。
27. 权利要求 26 的方法,其中所述疏水羧酸为脂肪酸。
28. 权利要求 25 的方法,还包括诱导一种或多种肽两亲物自组装成纳米纤维。
29. 权利要求 25 的方法,还包括使所述一种或多种肽两亲物与一氧化氮反应以形成经二醇二氮烯鎓修饰的肽 $[K[N(O)NO]]_5$ 。

30. 一种治疗心血管疾病受试者的方法,包括给予所述受试者一种或多种肽两亲物。
31. 权利要求 30 的方法,其中所述肽两亲物各自均包括亲水肽序列和疏水尾,其中所述亲水肽序列包括降解序列以及第一细胞粘附序列和生成一氧化氮的供体序列中的一种或多种。
32. 权利要求 30 的方法,其中将所述肽两亲物包裹在聚酯纳米纤维上。
33. 权利要求 32 的方法,其中所述聚酯纳米纤维是聚己内酯纳米纤维。
34. 权利要求 30 的方法,其中所述心血管疾病是动脉粥样硬化。
35. 权利要求 30 的方法,其中将所述肽两亲物经医疗装置给予所述受试者。
36. 权利要求 35 的方法,其中所述医疗装置是血管支架、血管移植物、导管、起搏器或心瓣膜。
37. 一种改善移植物通畅性的方法,包括给予移植物受体一种或多种肽两亲物。
38. 权利要求 37 的方法,其中所述肽两亲物各自均包括亲水肽序列和疏水尾,其中所述亲水肽序列包括降解序列以及第一细胞粘附序列和生成一氧化氮的供体序列中的一种或多种。
39. 权利要求 37 的方法,其中将所述肽两亲物包裹在聚酯纳米纤维上。
40. 权利要求 39 的方法,其中所述聚酯纳米纤维是聚己内酯纳米纤维。
41. 权利要求 37 的方法,其中所述移植物是动脉、静脉、血管支架、导管、起搏器或心瓣膜。

模仿内皮的纳米基质

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2008 年 11 月 7 日提交的美国临时申请 No. 61/112, 578 和 2009 年 7 月 2 日提交的美国非临时申请 No. 12/497, 305 的优先权, 每一个申请在此通过引用全文并入本文。

背景技术

[0003] 心血管疾病 (CVD) 在美国是第一死亡原因。它们每年导致大约一百万人死亡并花费超过 4000 亿美元。CVD 的主要原因是由动脉内壁胆固醇沉积导致的动脉阻塞。这被称为动脉粥样硬化 (atherosclerosis) (Silverthorn DU, 2004)。

[0004] 为了治疗动脉粥样硬化, 在二十世纪七十年代引入了一种被称为气囊血管成形术的非侵入性技术, 该技术为冠状动脉旁路移植提供了有吸引力的替代方案。该技术使用在血小板处被插入和被膨胀的细长折叠气囊导管。膨胀时, 气囊压缩并破碎血小板, 去除阻塞。该技术为患者提供了直接的缓解。然而, 该技术受到抽出导管后动脉急速闭合问题的限制 (Windecker S, 等, 2000)。这些挑战导致设计新的生物医疗解决方案, 例如裸金属支架。

[0005] 为了防止动脉急速闭合, 在二十世纪九十年代引入了称为裸金属支架 (BMS) 的栅格形可扩展金属管。将配有折叠支架的末端带有气囊的导管与导向导管和导线一块插入。当气囊在血小板部位膨胀时, 支架扩展、锁定该位置并形成支持动脉开放的支撑架 (scaffold)。与气囊血管成形术相比, BMS 的使用降低了再狭窄速率。虽然它们成功防止了动脉弹性回缩, 但是 BMS 存在再狭窄的问题 (即, 动脉再次闭合) (Sheiban I, et al. 2002)。

[0006] 图 1 显示了再狭窄的原理机制的示意图, 所述机制包括弹性回缩、消极血管重塑和新内膜增生 (Dobesh PP, et al. 2004)。BMS 实际上可消除弹性回缩 (Sheiban I, et al. 2002, Ozaki Y, et al. 1996) 和消极血管重塑 (Sheiban I, et al. 2002) 的问题。然而, BMS 中再狭窄的主要机制是新内膜增生 (Violaris AG, et al. 1997)。新内膜增生是由支架撑杆穿入血管壁所导致的内皮剥落引起的。可以想象, 破碎的血小板使血管壁血栓形成内容物暴露于内腔, 导致血小板粘附、激活和血栓形成的级联。此外, 内皮剥落导致抗血栓因子损失。激活的血小板释放促进平滑肌细胞增殖和迁移的因子。同时, 平滑肌细胞形态也从收缩型变为合成型。这可以导致平滑肌细胞迁移和细胞外基质 (ECM) 合成增加, 这导致新内膜增生和支架内再狭窄 (Bauters C, et al. 1997)。因此, BMS 仍然受到高速支架内再狭窄的限制。因此, 需要对 BMS 生物学设计的进一步改进, 例如整合定位药物递送。

[0007] 基于导管的药物递送的主要挑战是实现药物定位于血管损伤部位以减少新内膜增生的形成。因此, 已经将受控药物递送系统应用于支架, 导致药物洗脱支架 (DES) 的产生。DES 于 2003 年开始在美国可从商业途径获得 (Ong AT, et al. 2005)。它们用单个或多个生物活性剂包裹, 其在植入后在血流和周围组织中递送。这些支架被设计为释放通过靶向新内膜增生的生化途径而干扰新内膜增生过程的药物。已经为 DES 考察了几种药物递送策略, 例如扩散控制的方法、溶解 / 降解控制的方法和基于离子交换的方法 (Acharya G, et

al. 2006)。已经显示 DES 与 BMS 相比可减少再狭窄 (de ManFH, et al. 2007)。它们已经在 2004 年至 2006 年间被植入超过 6 百万患者中 (Colombo A, et al. 2007)。

[0008] 支架市场仅由两种药物洗脱支架分享：(1) Cordis CYPHER™，西罗莫司洗脱支架和 (2) Boston Scientific TAXUS™，紫杉醇洗脱支架。(FDA 在 2003 年 4 月批准了 Cypher 支架并在 2004 年 3 月批准了 Taxus 支架)。西罗莫司和紫杉醇都是通过抑制细胞周期而发挥作用。西罗莫司是促进激酶激活的免疫抑制药物，导致对细胞生长阶段的抑制。紫杉醇结合分裂中细胞的微管并使它们装配，从而防止有丝分裂 (Wessely R, et al. 2006)。已经表明，这些 DES 的使用使再狭窄风险降低了至少 80%，这通过许多随机控制试验 (Morice MC, et al. 2002; Moses JW 等. 2003) 和荟萃分析 (meta-analyses) (Roiron C, et al. 2006) 证明。然而，在 DES 和 BMS 之间没有观察到死亡率差异 (Roiron C, et al. 2006; Babapulle MN, et al. 2004)。这可能归因于晚期支架血栓或血凝块的出现，这在第一代 DES 中正引起关注 (Camenzind E, et al. 2007; Webster MW, et al. 2007; Van Belle E, et al. 2007; Jaffe R, et al. 2007; Leon MB. 2007)。这种晚期血栓似乎与中断的抗血小板疗法 (Zimarino M, et al. 2005) (作为对药物反应的局部过敏的罕见病例) 和 DES 的“标识外使用”有关。依照 FDA 标准，DES 仅被批准用于具有之前未治疗的长度小于 30mm 的冠状动脉狭窄且参考血管直径在 2.50mm 至 3.70mm 的患者 (Win HK, et al. 2007; Melikian N, et al. 2006)。美国心脏病学会的研究报导，“标识外使用”是常见的并且频率随时间增加 (Rao SV, et al. 2006)。此外，研究表明，与 BMS 植入位点相比，由于持续的纤维素沉积和差的内皮化，DES 可导致动脉愈合的显著延迟 (Finn A, et al. 2007)。血管镜结果显示西罗莫司洗脱支架的不完全新内膜覆盖 (Kotani J, et al. 2006)。而且，诸如糖尿病、肾衰竭和之前并发症等患者危险因素促进了接受 DES 的患者中晚期血栓的发生 (Jaffe R, et al. 2007)。

[0009] 这些关注导致了理想支架的想法，所述理想支架应该被设计为控制并指导手术后的血管修复，而不引发不希望的炎症反应并最终导致再内皮化的血管壁。

发明内容

[0010] 根据本发明目的，如本文示例和广泛描述的，本发明涉及用于产生模仿天然内皮的纳米基质的肽两亲物。所公开的模仿天然内皮的纳米基质可用于包裹医疗装置，例如血管支架。所公开的方法和组合物的其他优点将部分地在随后描述中提出，并且将部分地根据描述理解，或者可以通过实施所公开的方法和组合物而了解。所公开的方法和组合物的优点将借助在所附权利要求书中具体指出的要素和组合来实现和达到。应理解，前述总体描述和下述详细描述都仅是示例性和解释性的，并不是限制要求保护的发明。

附图说明

[0011] 并入并构成本说明书一部分的附图示例说明了所公开的方法和组合物的一些实施方案，并且与说明书一起用于解释所公开的方法和组合物的原理。

[0012] 图 1 显示了再狭窄的机制和时间表。新内膜增生是裸金属支架 (BMS) 中再狭窄的主要原因。参见 Dobesh, P. P. et al. (2004). Pharmacotherapy. 24(11):1554-77。

[0013] 图 2A 显示了二醇二氮烯鎓 (diazoniumdiolate) 的化学结构。图 2B 显示了通过亲核胺 (X-) 与 NO 反应而形成二醇二氮烯鎓。图 2C 显示了二醇二氮烯鎓在质子化时解离

以释放游离 NO。图 2D 显示了赖氨酸的结构。它具有两个悬垂胺基团用于 NO 结合。

[0014] 图 3 显示了 PA 的分子结构。YIGSR(SEQ ID NO :2) 是细胞粘附配体,而 KKKKK(SEQ ID NO :3) 是 NO 供体。

[0015] 图 4 显示了蒸发诱导的自组装纳米纤维的 TEM 图像。显示了 PA-YIGSR(A)、PA-KKKKK(B)、PA-YK(C) 和 PA-YK-NO(D)。

[0016] 图 5 显示了 HUVEC 和 AoSMC 在 PA-YK(摩尔比为 9 : 1 的 PA-YIGSR 和 PA-KKKKK) 纳米基质上的最初附着。将细胞附着相对于在玻璃上的附着进行标准化。*HUVEC 在 2 小时后显示比 AoSMC 显著更高的附着 ($p < 0.05$)。误差棒代表平均值 $\pm$ 标准偏差, $n = 12$ 。

[0017] 图 6 显示了 HUVEC 和 AoSMC 在 PA-YK 包被上的最初铺展。*HUVEC 在 2 小时后显示比 AoSMC 显著更高的铺展 ($p < 0.01$)。误差棒代表平均值 $\pm$ 标准偏差, $n = 12$ 。

[0018] 图 7 显示了使用钙黄绿素 AM 2 小时后, HUVEC 和 AoSMC 在 PA-YK 上的荧光图像。图 7A 显示了 HUVEC 在 2 小时内达到其规则铺展形态。图 7B 显示了 AoSMC 保持圆形形状。

[0019] 图 8 显示了在与人血液孵育 15 分钟后,在胶原、PA-YK 和 PA-YK-NO 纳米基质上的血小板附着。与 PA-YK 或 I 型胶原包裹的膜相比,血小板在 PA-YK-NO 膜上的粘附显著更低。数据表示三个样品的平均值。误差棒代表平均值 $\pm$ 标准偏差 (*:与 I 型胶原相比 $p < 0.05$;#:与 PA-YK 相比 $p < 0.05$)。

[0020] 图 9 显示了接种在 PA-YK 和 PA-YK-NO 纳米基质上的 HUVEC 和 AoSMC 在 48 小时后的增殖,通过 PCNA 染色定量地评估。PA-YK-NO 增强 HUVEC 增殖,但是减少 AoSMC 增殖。结果表示为 PCNA 阳性细胞的百分比。数据表示为四个样品的平均值。误差棒代表平均值 $\pm$ 标准偏差 (*, #: $p < 0.05$)。

[0021] 图 10 显示了在 37°C 下 HBS(pH 7.4) 中从 PA-YK-NO 膜的 NO 释放。所释放的总 NO 的 53%显示经一个月的多阶段曲线。数据表示四个样品的平均值。误差棒代表平均值 $\pm$ 标准偏差。

[0022] 图 11 显示了使用纳米基质的支架包裹技术的示意图。

[0023] 图 12 显示了临床医生处理之后 0.1wt% PAYK 包裹的支架的 SEM 图像。注意在处理(安装在血管成形术气囊和扩展)后保持原状的平滑均一的包裹表面。

[0024] 图 13A 显示了在兔髂动脉中的气囊膨胀以展开支架。图 13B 显示了在植入 4 周后 1wt% 纳米基质包裹的支架的组织学切片。在纳米基质包裹的支架表面上发现几乎无新内膜增生且无血栓。

[0025] 图 14 显示了在 2 周时的新内膜厚度。观察到高剂量支架中与对照相比有更小的 NI 厚度的明显趋势。每组 $N = 2$ 支架。

[0026] 图 15 显示了在 4 周时的新内膜厚度。NI 比在 2 周时更大,但是在低剂量组和高剂量组中与对照相比更小 NI 的趋势都表现为持续。每组 $N = 2$ 支架。

[0027] 图 16 显示了在 2 周时的炎症评分。所有研究组的平均炎症评分低于 0.5。每组 $N = 2$ 支架。

[0028] 图 17 显示了在 4 周时的炎症评分。所有研究组的平均炎症评分低于 0.5。每组 $N = 2$ 支架。

[0029] 图 18 显示了 4 周时的血栓评分。所有支架组的平均血栓评分低于 0.1,组间没有显著差异。每组 $N = 2$ 支架。

[0030] 图 19 显示了释放 NO 的杂合仿生纳米基质的制造。图 19A 显示了直径 8nm 的释放 NO 的肽两亲物 PA-YK-NO 被包裹在直径 300-500nm 的 ePCL 纳米纤维上,以产生杂合纳米基质 ePCL-PA-YK-NO。图 19B 显示了 YIGSR 配体的存在和 NO 的释放可促进内皮细胞的粘附、铺展和增殖,而同时可限制平滑肌细胞的粘附、铺展和增殖。

[0031] 图 20 显示了杂合纳米基质在 5000 $\times$ 下的 SEM 图像。(A) ePCL。(B) ePCL+PA-YK。(C) ePCL+PA-YK-NO。

[0032] 图 21 显示了混合纳米基质在 67000 $\times$ 下的 TEM 图像,显示成功的自组装。(A) ePCL。(B) ePCL+PA-YK。(C) ePCL+PA-YK, 倾斜至 21 $^{\circ}$ 。(D) ePCL+PA-YK-NO。(E) ePCL+PA-YK-NO,倾斜至 21 $^{\circ}$ 。

[0033] 图 22 显示了 HUVEC 粘附随 PA-YIGSR 浓度的增加而增加。ePCL-PA-YK75(*) 和 ePCL-PA-YK90(#) 与 ePCL-PA-YK50、ePCL-PA-YK25 和 ePCL 相比显示了显著的 HUVEC 粘附增加。

[0034] 图 23 显示了经 28 天的 NO 释放谱。

[0035] 图 24 显示了在 2 小时时 (A) ePCL (B) ePCL-PA-YK (C) ePCL-PA-YK-NO 上的 HUVEC 形态。比例尺 = 20 μ m。

[0036] 图 25 显示了在 2 小时时 (A) ePCL (B) ePCL-PA-YK (C) ePCL-PA-YK-NO 上的 AoSMC 形态。比例尺 = 20 μ m。

[0037] 图 26 显示了在 2 小时时杂合纳米基质上的细胞粘附。HUVEC 与 ePCL 相比显示了在 (*) ePCL+PA-YK 和 (#) ePCL-PA-YK-NO 上显著的粘附增加。

[0038] 图 27 显示了杂合纳米基质上增殖细胞的百分比。HUVEC 与在 ePCL+PA-YK(*) 上相比显示了在 ePCL+PA-YK-NO 上显著更大的增殖。AoSMC 与在 ePCL+PA-YK(#) 上相比显示了在 ePCL+PA-YK-NO 上显著更低的增殖。

具体实施方式

[0039] 通过参考下述对本文包括的具体实施方案和实施例的详细描述和附图及其之前和下面的描述,可以更容易地理解所公开的方法和组合物。

[0040] 本发明公开了可用于所公开的方法和组合物的材料、组合物和组分,可与所公开的方法和组合物结合使用的材料、组合物和组分,可用于制备所公开的方法和组合物的材料、组合物和组分,或者所公开的方法和组合物的产物。这些和其他材料在本文公开,并且应理解,当公开这些材料的组合、子集、相互作用、组等时,尽管可能没有明确公开这些化合物的每种不同的个体和集合组合和代替的具体提及,但每种均被本文明确涵盖和描述。例如,如果肽被公开并讨论,并且讨论了可以对包括肽在内的许多分子做出的许多修饰,则除非明确指明相反,否则肽和可能修饰物的每种和所有结合和变换被明确涵盖。因此,如果一类分子 A、B 和 C 被公开以及一类分子 D、E 和 F 和一个组合分子的实例 A-D 被公开,则即使每个均没有被单独提出,但每个均被单独和集合涵盖。因此,在该实例中,组合 A-E、A-F、B-D、B-E、B-F、C-D、C-E 和 C-F 的每一个被明确涵盖并且应该被认为因 A、B 和 C ;D、E 和 F ;以及示例组合 A-D 的公开而公开。同样,这些的任何子集或组合也明确被涵盖和公开。因此,例如 A-E、B-F 和 C-E 的亚组被明确涵盖并应该被认为因 A、B 和 C ;D、E 和 F ;以及示例组合 A-D 的公开而公开。这一概念适用于本说明书的所有方面,包括但不限于制备和使用

所公开的组合物的方法的步骤。因此,如果有可进行的许多其他步骤,那么应理解,这些其他步骤的每一个可以用所公开方法的任何具体实施方案或实施方案的组合来进行,并且每个这种组合被明确涵盖并应该被认为是公开的。

[0041] 本领域技术人员将理解或者能够仅使用常规实验而确定本文所述方法和组合物的具体实施方案的很多等同替代。此类等同替代意欲被所附权利要求书涵盖。

[0042] 应理解,所公开的方法和组合物不限于所描述的具体方法、方案和试剂,因为这些可以改变。还应理解,本文使用的术语仅用于描述具体实施方案,并不旨在限制本发明的范围,本发明范围仅有所附权利要求书限定。

[0043] 本文提到的所有出版物通过引用并入本文,以公开和描述所述出版物所引用的方法和/或材料。本文讨论的出版物仅因其在在本申请申请日之前公开而提供。本文没有任何内容被解释为承认本发明不能因为在先发明而先于此类出版物。而且,本文提供的出版日期可不同于实际出版日,实际出版日需要独立确认。参考文献的讨论陈述了其作者声称的内容,申请人保留质疑所引用文件的准确性和适当性的权利。

[0044] A. 定义

[0045] 可以参考本发明的下面详细描述和其中包括的实施例而更容易地理解本发明。

[0046] 在公开和描述本发明化合物、组合物、物品、系统、装置和/或方法之前,应理解,除非另外指明,它们不限于具体的合成方法,或者除非另外指明,不限于具体试剂,因为这些当然可以改变。还应理解,本文使用的术语仅为描述具体方面而不旨在限制。尽管与本文描述的那些类似或等同的任何方法和材料可用于实施或试验本发明,但现在描述了示例方法和材料。

[0047] 必需注意,除非上下文明确另外指明,本文和所附权利要求书所使用的单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指代对象。因此,例如,对“一种肽”的提及包括多个此类肽,对“该肽”的提及是对一种或多种肽以及本领域技术人员已知的其等同物的提及,依此类推。

[0048] “任选的”或“任选地”表示随后描述的事件、环境或材料可能或可能不发生或存在,并且该描述包括其中所述事件、环境或材料发生或存在的情况以及其中所述事件、环境或材料不发生或不存在的状况。

[0049] 范围在本文中可以被表示为从“约”一个具体值和/或到“约”另一个具体值。当表达这样一个范围时,另一个实施方案包括从所述一个具体值和/或到所述另一个具体值。类似地,当将值通过使用之前的“约”表示为近似值时,应理解,所述具体值形成另外一个实施方案。还应理解,每个范围的端点与另一个端点相关以及独立于另一个端点都是有效的。还应理解,本文公开了许多值,每个值除了所述值本身外在本文还公开为“约”该具体值。例如,如果公开了值“10”,则还公开了“约 10”。还应理解,当公开一个值时,本领域技术人员容易理解,还公开了“小于或等于”该值、“大于或等于该值”和值间可能的范围。例如,如果公开了值“10”,则还公开了“小于或等于 10”以及“大于或等于 10”。还应理解,本申请全文中,数据以许多不同形式提出,并且该数据代表端点和起始点以及数据点的任何组合的范围。例如,如果公开了具体数据点“10”和具体数据点 15,要理解,也认为公开了大于、大于或等于、小于、小于或等于和等于 10 和 15 以及 10 至 15。还应理解,两个具体单位之间的每个单位也被公开。例如,如果公开了 10 和 15,则也公开了 11、12、13 和 14。

[0050] 本说明书的说明书和权利要求书全文中,词语“包括”及该词语的变体例如“包含”和“含有”意思是“包括但不限于”并且不旨在排除例如其他添加物、组分、整数或步骤。

[0051] 本文使用的术语“治疗”指对患者的医疗处理,预期要治愈、缓解、稳定或预防疾病、病态或疾患。该术语包括积极治疗,即明确目的为改善疾病、病态或疾患的治疗,还包括病因治疗,即目的为去除相关疾病、病态或疾患的病因的治疗。此外,该术语包括:姑息治疗,即,设计为缓解症状而不是治愈疾病、病态或疾患的治疗;预防性治疗,即,目的是最小化或者部分或全部地抑制相关疾病、病态或疾患的发展的治疗;和支持性治疗,即,用于支持另外一个目的为改善相关疾病、病态或疾患的具体疗法的治疗。还应理解和本文涵盖的是,治疗不必一定导致疾病或病症的完全消除,而可以指疾病或病症或其症状的存在的任何减少,使得观察到优于患有所述疾病或病症的受试者的未治疗状态的改善。因此,治疗可以指疾病或病症的任何症状或潜在病因改善 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 100%。例如,施用某种组合物或装置之后导致 artio 血小板相对于施用所述组合物或装置之前的阻塞量减少 10%,则所述组合物或装置将是治疗。

[0052] 本文使用的术语“预防”或“防止”指阻止、避免、排除、阻碍、停止或妨碍某些事情发生,特别是通过事先行动。应理解,当本文使用减少、抑制或预防时,除非另外明确指明,其他两个词的使用也被明确地公开。

[0053] 本文使用的术语“给予”和“给药”指向受试者提供药物制品的任何方法。此类方法是本领域技术人员公知的,并且包括但不限于口服给药、透皮给药、吸入给药、经鼻给药、局部给药、阴道内给药、经眼给药、耳内给药、大脑内给药、直肠给药和胃肠外给药,包括注射,例如静脉内给药、动脉内给药、肌内给药和皮下给药。给药可以是连续或间断的。在不同方面,制品可以被治疗性地给予,即,被给予以治疗存在的疾病或病症。在其他不同方面,制品可以被预防性给予,即,被给予以预防疾病或病症。

[0054] 本文使用的“受试者”是给药的目標。本文公开方法的受试者可以是脊椎动物,例如哺乳动物、鱼、鸟、爬行动物或两栖动物。因此,本文公开方法的受试者可以是人、非人灵长类、马、猪、兔、狗、绵羊、山羊、奶牛、猫、豚鼠或啮齿动物。术语不指定具体年龄或性别。因此,成年或新生受试者以及胎儿,无论是雄性还是雌性,都将被涵盖。患者指罹患疾病或疾患的受试者。术语“患者”包括人和兽受试者。

[0055] 本文使用的术语“有效量”指足以实现期望结果或不期望的症状具有效果、但一般不足以导致不良副作用的量。对于任何具体患者的具体有效剂量水平取决于许多因素,包括正在治疗的疾患和疾患的严重度;采用的具体组合物;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;给药时间;给药途径;采用的具体化合物的排泄率;治疗持续时间;与采用的具体化合物组合或同时使用的药物,以及医学领域公知的类似因素。例如,本领域技术人员公知,以低于实现预期效果所需的水平更低的水平开始化合物剂量,然后逐渐增加剂量,直至达到预期效果。如果需要,有效日剂量可以被分成多剂以用于给药。因此,单剂组合物可以含有构成日剂量的量或其部分(submultiple)。剂量可以在发生任何禁忌事件时由个体医师来调整。剂量可以改变,并且可以每天以一个或多个给药剂量来给予,持续一天或几天。指导原则参见文献中用于给定药品类别的适当剂量。在另一方面,制品可以以“诊断有效量”给药,即,有效诊断疾病或病症的量。在另一方面,制品可以以“治疗有效量”给药,即,有效治疗疾病或病症的量。在另一方面,制品可以以“预防有效量”给药,即有效预防疾

病或病症的量。

[0056] 本文使用的术语“药学可接受的载体”指无菌水溶液或非水溶液、分散液、悬浮液或乳液，以及用于在即将使用前复原成无菌注射溶液或分散液的无菌粉末。适合的水性和非水性载体、稀释剂、溶剂或媒介物的实例包括水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等）、羧甲基纤维素及其适合的混合物、植物油（例如橄榄油）和可注射有机酯，例如油酸乙酯。例如，可通过使用包裹材料例如卵磷脂、通过在分散液情况下通过保持所需粒度以及通过使用表面活性剂来保持适当的流动性。这些组合物还可以含有佐剂，例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。对微生物作用的预防可以通过包括各种抗细菌剂和抗真菌剂（例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、酚、山梨酸等）来保证。还可以期望包括等渗剂，例如糖、氯化钠等。对可注射药物形式的长时间吸收可以通过包括延迟吸收的物质例如单硬脂酸铝和明胶来实现。可注射贮库形式是通过在生物可降解聚合物例如聚丙交酯-聚乙交酯、聚（原酸酯）和聚（酸酐）中形成药物的微胶囊基质来制成。根据药物与聚合物的比例和使用的具体聚合物的性质，可以控制药物释放的速率。贮库可注射制剂还可以通过将药物包埋于与机体组织相容的脂质体或微乳中来制备。所述可注射制剂可以被灭菌，例如通过截留细菌的过滤器过滤或者通过加入无菌固体组合物形式的灭菌剂，其可以在即将使用前溶解或分散于无菌水或其他无菌可注射介质中。适当的惰性载体可以包括糖，例如乳糖。期望地，至少 95 重量%的所述活性成分粒子具有 0.01 至 10 微米范围内的有效粒度。

[0057] 本文使用的术语“生物学活性剂”或“生物活性剂”意思是能够在施用其的生物系统中提供局部或全身的生物、生理或治疗效应的物质。例如，生物活性剂可以用于控制感染或炎症、增强细胞生长和组织再生，控制肿瘤生长，用作止痛药，促进抗细胞附着，并增强骨生长等功能。其他适合的生物活性剂可以包括抗病毒剂、激素、抗体或治疗蛋白。其他生物活性剂包括前药，所述前药是当给药时无生物学活性但给药至受试者后通过代谢或一些其他机制转化为生物活性剂的物质。此外，本发明任何组合物可以含有两种或多种生物活性剂的组合。应理解，生物活性剂可用于给药至各种受试者，例如人（即，医疗给药）或动物（即，兽医给药）。

[0058] 本文使用的术语“药学活性剂”包括“药物”或“疫苗”，并且意思是为诊断、治疗、预防医疗或兽医目的给予生物体的分子、分子组、复合物或物质。该术语包括外部和内部给药的局部 (topical)、局部 (localized) 和全身的人用和动物用药物、治疗、药品、营养品、化妆品、生物制品、装置、诊断剂和避孕药，包括用于临床和兽医筛选、防止、预防、治愈、健康、检测、成像、诊断、疗法、手术、监测、美容剂、修复术、法医等。该术语还可以用于指农业、车间、军事、工业和环境治疗剂或药品，包括能够识别细胞受体、膜受体、激素受体、治疗受体、微生物、病毒或选定靶的选定分子或选定核酸序列，所述选定靶包括或能够接触植物、动物和 / 或人。该术语还可以特别包括核酸和包含核酸的化合物，所述核酸产生生物活性效应，例如脱氧核糖核酸 (DNA) 或核糖核酸 (RNA)。药学活性剂包括本文公开的类别和具体实例。所述类别不旨在被具体实例所限制。本领域普通技术人员还应认识到落入所述类别和可根据本发明使用的许多其他化合物。实例包括放射致敏剂、放射致敏剂和化疗剂的结合物、类固醇、黄嘌呤、 β -2-激动剂支气管扩张药、抗炎剂、镇痛药、钙拮抗剂、血管紧张肽转化酶抑制剂、 β -阻断剂、中枢活性 α -激动剂、 α -1-拮抗剂、抗胆碱能药 / 镇痉药、加压素类似物、抗心律不齐药、抗震颤麻痹药 (antiparkinsonian agent)、抗心绞痛药 / 抗高血压药、抗

凝血药、抗血小板药、镇静剂、抗焦虑剂 (anxiolytic agent)、肽剂、生物聚合体剂、抗肿瘤剂、轻泻药、止泻剂、抗微生物剂、抗真菌剂、疫苗、蛋白或核酸。在其他方面, 药学活性剂可以是香豆素、白蛋白、溴莫尼定 (bromolidine)、类固醇例如倍他米松、地塞米松、甲泼尼龙、泼尼松龙、泼尼松、曲安西龙、布地奈德、氢化可的松和药学可接受的氢化可的松衍生物; 黄嘌呤, 例如茶碱和多索茶碱 (doxophylline); β -2- 激动剂支气管扩张剂, 例如沙丁胺醇、非诺特罗、克伦特罗、班布特罗、沙美特罗、非诺特罗; 抗炎剂, 包括平喘抗炎剂、抗关节炎抗炎剂和非甾体抗炎剂, 其实例包括但不限于硫化物、美沙拉秦、布地奈德、柳氮磺吡啶、双氯芬酸、药学可接受的双氯芬酸盐、尼美舒利、甲氧萘丙酸 (naproxene)、对乙酰氨基酚、布洛芬、酮洛芬和吡罗昔康; 镇痛药, 例如水杨酸盐; 钙通道阻断剂, 例如硝苯地平、氨氯地平和尼卡地平; 血管紧张肽转化酶抑制剂, 例如卡托普利、盐酸贝那普利、福辛普利钠、群多普利、雷米普利、赖诺普利、依那普利、盐酸喹那普利和盐酸莫西普利; β -阻断剂 (即, β 肾上腺素能阻断剂), 例如盐酸索他洛尔、马来酸噻吗心安、盐酸艾司洛尔、卡替洛尔、盐酸普萘洛尔、盐酸倍他洛尔、硫酸喷布洛尔、酒石酸美托洛尔、琥珀酸美托洛尔、醋丁洛尔盐酸盐、阿替洛尔、吲哚洛尔和富马酸比索洛尔; 中枢活性 α -激动剂, 例如可乐定; α -1-拮抗剂, 例如多沙唑嗪和哌唑嗪; 抗胆碱能药 / 镇痉药, 例如盐酸双环胺、氢溴酸东莨菪碱、格隆溴铵 (glycopyrrolate)、克利溴铵、黄酮哌酯和奥昔布宁; 加压素类似物, 例如加压素和去氨加压素; 抗心律不齐药, 例如奎尼定、利多卡因、盐酸妥卡尼、盐酸美西律、地高辛、盐酸维拉帕米、盐酸普罗帕酮、醋酸氟卡尼、盐酸普鲁卡因胺、盐酸莫雷西嗪和磷酸丙吡胺; 抗震颤麻痹药, 例如多巴胺、左旋多巴 / 卡比多巴、司来吉兰、双氢麦角隐亭、培高利特、麦角乙脎、阿扑吗啡和溴隐亭; 抗心绞痛药和抗高血压药, 例如单硝酸异山梨酯、二硝酸异山梨酯、普萘洛尔、阿替洛尔和维拉帕米; 抗凝血药和抗血小板药, 例如香豆定、华法林、阿司匹林和噻氯匹啶; 镇静剂, 例如苯 (并) 二氮卓类和巴比妥酸盐类; 抗焦虑剂, 例如劳拉西泮、溴西泮和地西泮; 肽剂和生物聚合体剂, 例如降钙素、醋酸亮丙瑞林和其他 LHRH 激动剂、水蛭素、环孢素、胰岛素、生长抑素、普罗瑞林、干扰素、去氨加压素、生长素、胸腺喷丁、匹多莫德、红细胞生成素、白细胞介素、褪黑激素、粒细胞 / 巨噬细胞-CSF 和肝素; 抗肿瘤剂, 例如依托泊苷、磷酸依托泊苷、环磷酰胺、甲氨喋呤、5- 氟尿嘧啶、长春新碱、阿霉素、顺铂、羟基脲、亚叶酸钙、他莫昔芬、氟他胺、门冬酰胺酶、六甲蜜胺、米托坦和盐酸丙卡巴肼; 轻泻药, 例如番泻叶浓缩物、鼠李蒽酚、便塞停和吡苯氧磺钠; 止泻剂, 例如盐酸地芬诺辛、盐酸洛哌丁胺、呋喃唑酮、盐酸地芬诺酯和微生物; 疫苗, 例如细菌疫苗和病毒疫苗; 抗微生物剂, 例如青霉素、头孢菌素类和大环内酯类, 抗真菌剂例如咪唑衍生物和三唑衍生物; 以及核酸例如编码生物蛋白的 DNA 序列, 和反义寡核苷酸。应理解, 药学活性剂可以用于给药至各种受试者, 例如人 (即, 医疗给药) 或动物 (即, 兽医给药)。

[0059] 说明书和结论权利要求书中使用的化学物质残基指在具体反应方案或随后制剂或化学产品中的所得化学物质产物的部分, 不论该部分实际是否是从所述化学物质获得的。因此, 聚酯中乙二醇残基指聚酯中的一个或多个 $-OCH_2CH_2O-$ 单元, 不论乙二醇是否用于制备聚酯。类似地, 聚酯中的癸二酸残基指聚酯中的一个或多个 $-CO(CH_2)_8CO-$ 部分, 不论该残基是否是通过反应癸二酸或其酯以获得聚酯而获得的。

[0060] 本文使用的术语“取代的”意在包括有机化合物所有允许的取代基。在广义的方面, 所述允许的取代基包括有机化合物的非环状和环状的、支链和无支链的、碳环和杂环的

以及芳族和非芳族的取代基。示例性的取代基包括例如下文描述的那些。对于适当有机化合物而言,所述允许的取代基可以是一个或多个并且相同或不同。为了本公开内容目的,杂原子(例如氮)可以具有氢取代基和/或本文描述的有机化合物的任何允许取代基,所述取代基满足所述杂原子的化合价。本公开内容不旨在以任何方式受到有机化合物的所述允许取代基的限制。而且,术语“取代”或“用……取代”包括隐含的条件:此类取代符合被取代的原子和取代基的允许化合价,并且取代产生稳定的化合物,例如不自发经历转化的化合物,例如通过重排、环化、消除等。

[0061] 在定义各种术语时,本文使用“A¹”、“A²”、“A³”和“A⁴”作为通用符号来表示各种具体取代基。这些符号可以是任何取代基,不限于本文公开的那些,并且当它们在一种情况下被定义为某些取代基时,它们可以在另一种情况下被定义为一些其他取代基。

[0062] 本文使用的术语“烷基”是具有1至24个碳原子的支链或无支链的饱和烃基团,例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、仲戊基、新戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十二烷基、十四烷基、十六烷基、二十烷基、二十四烷基等。所述烷基还可以是取代的或未取代的。所述烷基可以用一个或多个基团取代,所述一个或多个基团包括但不限于本文所述的任选取代的烷基、环烷基、烷氧基、氨基、醚、卤化物、羟基、硝基、甲硅烷基、磺基-氧基或硫醇。“低级烷基”基团是含有1至6个碳原子的烷基基团。

[0063] 本说明书全文中,“烷基”一般用于指未取代的烷基和取代的烷基;然而,还通过指定烷基上具体的取代基而在本文特别指代经取代的烷基基团。例如,术语“卤代烷基”特别指用一个或多个卤化物取代的烷基基团,所述卤化物例如氟、氯、溴或碘。术语“烷氧基烷基”特别指用下文描述的一个或多个烷氧基基团取代的烷基基团。术语“烷基氨基”特别指用下文所述的一个或多个氨基基团等取代的烷基。当在一种情况下使用“烷基”并在另一种情况下使用具体术语例如“烷基醇”时,不意味着术语“烷基”不能指具体术语例如“烷基醇”等。

[0064] 这种做法也用于本文描述的其他基团。即,当术语例如“环烷基”指未取代和取代的环烷基部分时,所述取代的部分可以额外在本文明确指定;例如,特定的取代环烷基可以被称为例如“烷基环烷基”。类似地,取代的烷氧基可以被具体称为例如“卤代烷氧基”,特定的取代烯基可以被称为例如“烯基醇”等。同样,使用上位概念例如“环烷基”和下位概念例如“烷基环烷基”的做法不意味着上位概念不包括下位概念。

[0065] 本文使用的术语“聚亚烷基基团”是具有两个或多个彼此连接的CH₂基团的基团。聚亚烷基可以由式-(CH₂)_a-表示,其中“a”是2至500的整数。

[0066] 本文使用的术语“烷氧基(alkoxy)”和“烷氧基(alkoxyl)”指通过醚键键合的烷基或环烷基基团,即“烷氧基”基团可以被定义为-OA¹,其中A¹是如上定义的烷基或环烷基。“烷氧基”还包括刚描述的烷氧基基团的聚合物;即,烷氧基可以是聚醚,例如-OA¹-OA²或-OA¹-(OA²)_a-OA³,其中“a”是1至200的整数,并且A¹、A²和A³是烷基和/或环烷基基团。

[0067] 本文使用的术语“烯基”是具有2至24个碳原子的烃基基团,该烃基基团具有含有至少一个碳碳双键的结构式。不对称结构例如(A¹A²)C=C(A³A⁴)意在包括E和Z异构体。这可以由其中存在不对称烯的本文结构式推测,或者其可以由键符号C=C清楚表示。烯基基团可以被一个或多个基团取代,所述基团包括但不限于本文描述的任选取代的烷基、

环烷基、烷氧基、烯基、环烯基、炔基、环炔基、芳基、杂芳基、醛、氨基、羧酸、酯、醚、卤化物、羟基、酮、叠氮化物、硝基、甲硅烷基、磺基-氧基或巯基。

[0068] 本文使用的术语“炔基”是具有 2 至 24 个碳原子的烃基基团，该烃基基团具有含有至少一个碳碳三键的结构式。炔基基团可以是未被取代的或被一个或多个基团取代，所述基团包括但不限于本文描述的任选取代的烷基、环烷基、烷氧基、烯基、环烯基、炔基、环炔基、芳基、杂芳基、醛、氨基、羧酸、酯、醚、卤化物、羟基、酮、叠氮化物、硝基、甲硅烷基、磺基-氧基或巯基。

[0069] 本文使用的术语“肽两亲物”指具有亲水部分（例如，亲水肽序列部分）和疏水部分（例如烃部分）的肽化合物。通常与肽两亲物相关的一个特性可以是自组装。

[0070] 本文使用的术语“亲水肽序列”指相对于烃部分具有亲水性质的肽残基序列。亲水肽序列可以包括一个或多个功能肽序列（例如，可降解肽序列、一氧化氮供体和 / 或细胞粘附配体）。

[0071] 本文使用的术语“降解序列”指在生物条件下可以被酶或水解降解的肽残基的序列。

[0072] 本文使用的术语“细胞粘附序列”指能够用作细胞的粘附配体的肽残基的序列。在一个方面，由于肽两亲物的两亲性质，所公开的细胞粘附序列暴露在纳米纤维组装体的外表面；因此，此类细胞粘附序列对于与一种或多种细胞的相互作用是有用的。一个实例是“内皮细胞粘附序列”，它指支持内皮细胞粘附、铺展、迁移和 / 或生长的肽序列。

[0073] 本文使用的术语“生成一氧化氮的供体序列”指能够可逆结合一氧化氮气体或其等同物作为复合物（例如，二醇二氮烯鎓）的肽残基（例如赖氨酸 (K) 或半胱氨酸 (C)）或肽残基的序列（例如，聚赖氨酸 (KKKKK) 或聚半胱氨酸 (CCCCC)）。因此，肽或序列可以用作一氧化氮气体的贮存器并且可以随时间选择性地释放一氧化氮。应理解，该术语可以包括其他一氧化氮供体，例如含有半胱氨酸或胺基团的任何肽序列。

[0074] 本文使用的术语“自组装”指化合物的多个分子的特征，其中无序系统由于分子自身之间的特异性局部相互作用而形成更有组织的结构或模式，无需外部指导。在一个方面，肽两亲物可以是自组装的。在其他方面，化合物的许多分子可以自组装为纳米纤维。在其他方面，肽两亲物可以自组装为纳米纤维。仍在其他方面，肽两亲物可以自组装为纳米纤维而无需交联。

[0075] B. 组合物

[0076] 人工植入物的生物相容性可以通过模拟天然系统来改善。因此，理想的支架应该具有与天然内皮相似的性质。因此，本文公开了模仿天然内皮的纳米基质。

[0077] 天然内皮由包埋入粘弹性胞外基质 (ECM) 中的内皮细胞组成。除了提供结构完整性，ECM 还提供动态的功能环境，这对细胞增殖、分化和迁移而言是关键的 (Ross JM. 1998)。该概念鼓励将 ECM 衍生的细胞粘附配体用于仿生支撑架以控制细胞行为。控制支撑架的降解动力学是另一个重要因素，因为降解速率影响体外 ECM 产生和体内组织形成 (Alsberg E, et al. 2003; Bryant SJ, et al. 2002)。许多不同细胞类型的细胞迁移和增殖取决于细胞粘附 (Ross JM. 1998)。天然 ECM 由许多自组装的纳米结构纤维状蛋白组成。内皮还用于通过释放可溶性因子例如一氧化氮 (NO) 来保持血管的无血栓形成环境。因此，模仿天然内皮的纳米基质可被设计为模仿内皮 ECM 的这种化学和生物复杂性：1) 促进强的内皮细胞保

留和迁移的内皮细胞粘附部分, 2) 用于使内皮细胞迁移入纳米基质以增强内皮化的细胞介导的可降解位点, 3) 与天然 ECM 类似的自组装的纳米纤维状结构, 和 4) 释放 NO 以促进卫星内皮祖细胞归巢并抑制再狭窄和血栓形成。

[0078] 如本文公开的, 模仿天然内皮的纳米基质可以从肽两亲物产生, 肽两亲物包括亲水肽和疏水尾, 其中所述亲水肽包括: 促进强内皮细胞保留和迁移的一种或多种内皮细胞粘附部分, 用于使内皮细胞迁移入纳米基质以增强内皮化的细胞介导的可降解位点, 和释放 NO 以促进卫星内皮祖细胞归巢并抑制再狭窄和血栓形成。

[0079] 因此, 本文提供了一种肽两亲物, 包括亲水肽序列和疏水尾, 其中所述亲水肽序列包括降解序列以及第一细胞粘附序列和生成一氧化氮的供体序列中的一种或多种, 其中第一粘附序列是不与平滑肌细胞和 / 或血小板结合的内皮细胞粘附序列。

[0080] 因此, 所述亲水肽序列可以包括下式:

[0081] DS---CA,

[0082] 其中 --- 是直接或间接的共价键, 其中“DS”是降解序列; 并且其中“CA”是内皮细胞粘附序列。

[0083] 所述亲水肽序列可以包括下式:

[0084] DS---KK,

[0085] 其中 --- 是直接或间接的共价键, 其中“DS”是降解序列; 并且其中“KK”是生成一氧化氮的供体序列。

[0086] 所述亲水肽序列可以包括下式:

[0087] DS---CA---KK,

[0088] 其中 --- 是直接或间接的共价键, 其中“DS”是降解序列; 其中“CA”是内皮细胞粘附序列; 并且其中“KK”是生成一氧化氮的供体序列。

[0089] 所述亲水肽序列可以包括下式:

[0090] DS---KK---CA,

[0091] 其中 --- 是直接或间接的共价键, 其中“DS”是降解序列; 其中“CA”是内皮细胞粘附序列; 并且其中“KK”是生成一氧化氮的供体序列。

[0092] 如本文公开的, 所述肽两亲物可用于形成纳米基质。应理解并且本文考虑到的是, 本文的纳米基质可以包括两亲物包裹的纳米纤维。如本文公开的, 所述纳米纤维可以包括聚酯纤维, 例如, 聚己内酯纤维。因此, 本文公开了例如用本文公开的肽两亲物包裹的聚己内酯纳米纤维。

[0093] 本文还公开了一种包括第一肽两亲物和第二肽两亲物的组合物, 第一肽两亲物和第二肽两亲物各自独立包括亲水肽序列和疏水尾, 其中所述第一肽两亲物的亲水肽序列包括降解序列和内皮细胞粘附序列, 并且其中所述第二肽两亲物的亲水肽序列包括降解序列和生成一氧化氮的供体序列。

[0094] 因此, 所述第一肽两亲物的亲水肽序列可以包括下式:

[0095] DS---CA,

[0096] 其中每个 --- 独立地为直接或间接的共价键, 其中“DS”是降解序列; 并且其中“CA”是内皮细胞粘附序列; 并且其中所述第二肽两亲物的亲水肽序列包括下式:

[0097] DS---KK,

[0098] 其中“KK”是生成一氧化氮的供体序列。

[0099] 所述第一肽两亲物和第二肽两亲物可以约 1 : 20 至约 20 : 1 的比例存在于所公开的组合物,包括约 20 : 1、19 : 1、18 : 1、17 : 1、16 : 1、15 : 1、14 : 1、13 : 1、12 : 1、11 : 1、10 : 1、9 : 1、8 : 1、7 : 1、6 : 1、5 : 1、4 : 1、3 : 1、2 : 1、1 : 1、1 : 2、1 : 3、1 : 4、1 : 5、1 : 6、1 : 7、1 : 8、1 : 9、1 : 10、1 : 11、1 : 12、1 : 13、1 : 14、1 : 15、1 : 16、1 : 17、1 : 18、1 : 19 或 1 : 20。因此,所述第一肽两亲物和第二肽两亲物可以约 1 : 9 至约 9 : 1 的比例存在于所述组合物中。

[0100] 本文公开的组合物可以进一步包括一种或多种其他肽两亲物,所述其他肽两亲物包括降解序列,但不包括内皮细胞粘附序列或生成一氧化氮的供体序列。上述一种或多种其他肽两亲物可以包括其他功能性部分。上述一种或多种其他肽两亲物可以包括非功能性序列。本领域技术人员可以利用这些其他的肽两亲物来控制第一肽两亲物和第二肽两亲物的浓度。例如,其中所述第一肽两亲物和第二肽两亲物以约 9 : 1 的比例存在于所述组合物中,还可以与第三肽两亲物以例如约 9 : 1 : 0.1、9 : 1 : 0.2、9 : 1 : 0.3、9 : 1 : 0.4、9 : 1 : 0.5、9 : 1 : 0.6、9 : 1 : 0.7、9 : 1 : 0.8、9 : 1 : 0.9、9 : 1 : 1、9 : 1 : 2、9 : 1 : 3、9 : 1 : 4、9 : 1 : 5、9 : 1 : 6、9 : 1 : 7、9 : 1 : 8、9 : 1 : 9、9 : 1 : 10 的比例存在于所述组合物中。许多其他此类结合物和混合物可以由本领域技术人员选择并使用常规技术测试最佳性能。

[0101] 本文公开的组合物还可以包括聚酯纳米纤维,例如聚己内酯纳米纤维。因此,例如,本文公开了用第一肽两亲物和第二肽两亲物包裹的聚己内酯纳米纤维,其中所述第一肽两亲物是 PA-YIGSR,而所述第二肽两亲物是 PA-KKKKK;并且其中所述第一肽两亲物与所述第二肽两亲物的比例是 9 : 1。

[0102] 1. 肽两亲物

[0103] 肽两亲物 (PA) 是通常具有与单个疏水尾缀合的亲水短肽序列的两亲结构 (Paramonov SE, et al. 2006)。根据其形状、电荷和环境,这些分子可以自组装成片、球、棒、盘或槽 (Lowik D, et al. 2004)。已知圆锥形的两亲物形成圆柱形胶束,所述圆锥形使得亲水头基比疏水尾更大 (Jun HW, et al. 2006)。PA 的两亲性质是其自组装的原因。在中性溶液中,PA 骨架中带负电荷的氨基酸可以帮助溶解它。为了诱发自组装,由于存在负电荷而产生的排斥力可以被消除。这可以通过降低 PA 溶液的 pH 或加入二价离子来实现 (Hartgerink JD, et al. 2002; Hartgerink JD, et al. 2001; Jun HW, et al. 2005)。在一种自组装纳米纤维结构中,最靠近核心的四个氨基酸可以形成氢键。这些氢键的存在或不存在可以确定所述自组装结构的圆柱形或球形取向 (Paramonov SE, et al. 2006)。

[0104] 两亲性广泛存在于天然生物系统,例如细胞膜中。这是负责生物分子自组装成具有复杂分级次序的超分子结构的主要驱动力。这一概念表明了 PA 用于仿生骨架的用途 (Curtis A, et al. 2001; Barnes CP, et al. 2007)。PA 由像细胞粘附配体或生物可降解序列的各种生物活性序列组成,可以在生理条件下自组装形成类似于天然存在的生物分子的超分子结构。最近,它们已经被广泛研究用于各种生物医疗应用,包括血管生长 (Malkar NB, et al. 2003; Hosseinkhani H, et al. 2006; Rajangam K, et al. 2006) 和骨组织修复 (Hosseinkhani H, et al. 2007; Hosseinkhani H, et al. 2006; Sargeant TD, et al. 2008)。

[0105] PA 是仿生支撑架的有吸引力的模板,因为在其骨架中容易加入不同的细胞粘附和

降解部分 (Jun HW, et al. 2006 ;Jun HW, et al. 2005)。

[0106] 本文公开的肽两亲物在一些方面可以是能够自组装成纳米基质的任何经修饰的肽。在一些方面,公开的肽两亲物包括亲水肽和疏水尾。亲水肽和疏水尾的长度可以被选择为使所述肽两亲物保持自组装成纳米基质的能力。因此,例如,所述疏水尾的长度可以增加以适应所述亲水肽长度增加。本领域技术人员可以利用常规技术来筛选具有选定亲水肽和选定疏水尾的肽两亲物自组装成纳米基质的能力。

[0107] 2. 一氧化氮 (NO)

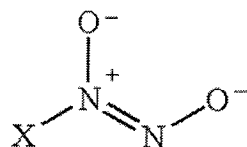
[0108] 已知从内皮释放 NO 阻断再狭窄级联中的许多关键事件。NO 在调节血管壁稳态中起重要作用 (Marin J, et al. 1997 ;Kuo PC, et al. 1995 ;Davies KM, et al. 2001)。NO 在健康内皮细胞中通过酶——一氧化氮合酶——而从氨基酸 L- 精氨酸连续释放。从所述内皮释放的 NO 可刺激可溶性鸟苷酰环化酶,增加环状鸟苷一磷酸 (GMP) 的浓度 (Kuo PC, et al. 1995)。内皮下血管平滑肌细胞中环状 GMP 水平的增加可导致对 GMP 依赖性激酶的活化,所述 GMP 依赖性激酶的活化会降低细胞内钙,导致平滑肌细胞 (SMC) 松弛。SMC 响应于血管突然收缩而局部松弛对于保持血液层流是关键 (Beckman JS. 1996)。释放入血管腔的 NO 还会增加血小板中的环状 GMP 水平。其会减少血小板活化和对内皮表面的粘附,使血管壁变得无血栓形成。NO 通过抑制从血小板释放的生长因子的活性而调节血管内的细胞环境 (Kuo PC, et al. 1995)。考虑到其抗血栓作用,预期 NO 的加入可改善血管修复的生物性质。释放 NO 的聚合物已经被成功开发,例如聚氯乙烯、硅酮橡胶、聚甲基丙烯酸酯和聚氨酯,用作心血管装置的无血栓形成的包被 (Reynolds MM, et al. 2004 ;Verma S, et al. 2005)。例如,NO 已经被以二醇二氮烯鎓 (能够在血液中释放 NO 的一类特殊的化合物) 的形式成功加入血管移植物 (Pulfer SK, et al. 1997)。最初在兔中的研究显示,从载入引导支架 (channelled stent) 中的含 NO 微球中受控释放的 NO 会限制了支架内的再狭窄 (Do Y, et al. 2004)。在另外 28 天的研究中,已经在猪模型中研究了基于支架的来自硝普钠的一氧化氮递送,并显示了新内膜增殖减少 (Hou D, et al. 2005)。除了前述功能,NO 促进内皮细胞生长、存活和迁移的能力也是已知的 (Ziche M, et al. 1994 ;Kawasaki K, et al. 2003)。NO 部分通过募集循环内皮祖细胞还在新血管形成中起关键作用 (Aicher A, et al. 2003)。为了达到该效应,NO 用水凝胶的局部递送已经显示可提高血管再内皮化的速率 (Lipke EA, et al. 2005)。

[0109] NO 的抗血栓形成、体内平衡和前内皮化性质使其成为作为支架上的治疗药物包被的有吸引力的候选。然而,在体内仅几秒钟的短半衰期使 NO 不适合作为系统性药物直接施用 (Miller M, et al. 2007)。而且,NO 气体难以操作,因为必须完全排除氧以防止其氧化。因此,使用 NO 载体来稳定 NO,直到释放时间 (Hanson SR, et al. 1995 ;Miller M, et al. 2007)。目前,临床上使用两种类型的 NO 供体药物:(1) 有机硝酸酯和 (2) 硝普钠 (Miller M, et al. 2007)。硝化甘油是临床上使用的有机硝酸酯。它在透皮贴片中使用以治疗心力衰竭和慢性心绞痛。硝化甘油含有三个硝酰基 (nitroxy)- 酯 (亚硝酸酯) 基团,其经历酶介导的释放。该药物的主要限制因素是在长期的持续使用之后产生耐受性。硝普钠在医院现场使用以在高度敏感的危机时降低血压。它含有与五个氰化物分子和一个 NO 分子配位的铁分子。NO 分子在输注过程中快速释放,而氰化物分子逐渐释放。这些氰化物分子可以在一些情况下达到毒性水平,对该药物应用造成了主要限制 (Gori T, et al. 2002)。

[0110] 本文公开了一类释放 NO 的化合物,称为二醇二氮烯鎓,也称为 NO- 亲核复合体 (NONOate)。这些化合物的化学结构可以从以下名称推导:二氮烯 N = N, 鎓:有效正电荷,二醇 (diolate):两个负氧 (Paramonov SE, et al. 2006 ;Saavedra J, et al. 2000)。

[0111] 以下是二醇二氮烯鎓的化学结构:

[0112]



[0113] 二醇二氮烯鎓可以通过亲核胺 (X-) 与 NO 的反应生成,如以下反应所示:

[0114] $X^- + 2NO \rightarrow X-[N(O)NO]^-$

[0115] 然后二醇二氮烯鎓则在质子化时解离释放游离 NO,如以下反应所示:

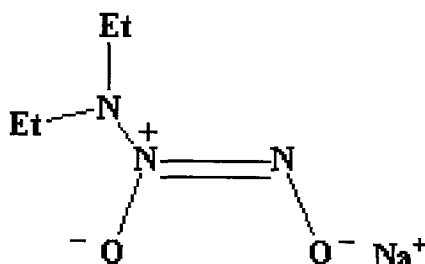
[0116] $X-[N(O)NO]^- \rightarrow X^- + 2NO$

[0117] 由于其电子受体性质,NO 可以与亲核胺反应生成二醇二氮烯鎓。当在缓冲液、血液或细胞培养基中溶解时,二醇二氮烯鎓进行质子化和解离而释放 NO (Saavedra J, et al. 2000 ;Keefer LK, et al. 1996 ;Hrabie JA, et al. 2002)。释放动力学可以受亲核胺的结构控制。二醇二氮烯鎓可以通过在不存在空气的情况下高压下与胺直接反应而被合成。

[0118] 其他释放一氧化氮的二醇二氮烯鎓化合物是本领域中已知的。例如,基于氮和碳的 NO 供体复合物是本领域中可获得的,在生理 pH 下的半衰期范围为从几秒到许多天。

[0119] 最常见的二醇二氮烯鎓通过仲胺和聚胺与一氧化氮在碱性介质中反应而生成。这些是稳定的固体,能够在中性或酸性缓冲液中再生 2 当量的一氧化氮和起始胺。NO 生成的半衰期变化范围从几秒到许多小时,取决于胺。分解为 NO 是在恒定 pH 下自发的一级反应。未衍生化的二醇二氮烯鎓的一个实例:

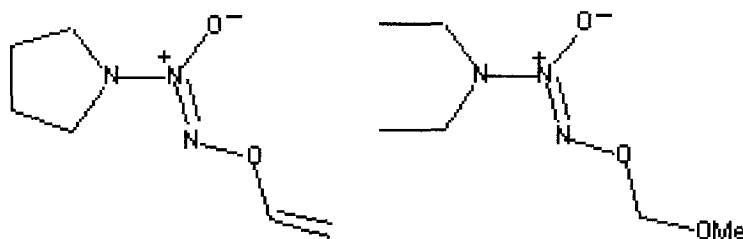
[0120]



[0121] i. O- 衍生化的二醇二氮烯鎓

[0122] 二醇二氮烯鎓阴离子与亲电试剂反应产生稳定的共价化合物。这些化合物具有用作前药的能力,仅当其被代谢转化为二醇二氮烯鎓阴离子时释放一氧化氮。此类的几种化合物已经通过烷基或芳基卤化物、硫酸酯、环氧化物等与离子型二醇二氮烯鎓的反应而被合成。O- 衍生化的二醇二氮烯鎓的实例:

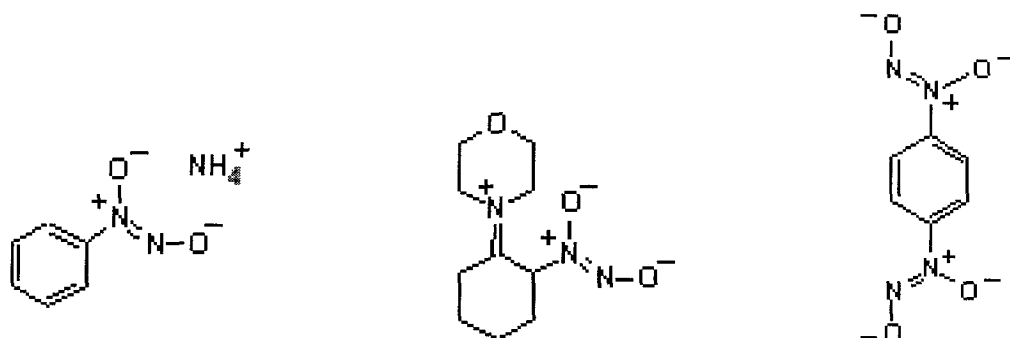
[0123]



[0124] ii. 基于 C 的二醇二氮烯鎓

[0125] 含有与碳结合的二醇二氮烯鎓基团的化合物为人们所知已有 100 多年, 名称例如“异白刺淋胺 (isonitramines)”和“亚硝基胍 (nitrosohydroxylamine)”, 尽管这些不是对许多 X 射线结构测定所示的键合的准确描述。虽然与碳的连接显然带来了柔性的巨大优点, 所述柔性可用于设计新 NO 供体, 但是必须认识到, 不是所有的这些材料均自发地产生 NO。这些化合物的反应性范围占据从如此稳定以致于从未产生 NO 的材料 (罕见) 到剧烈分解的材料 (也罕见) 的全量表。许多还产生 NO 和 N_2O 的混合物, 而非纯的 NO。基于 C 的二醇二氮烯鎓的实例:

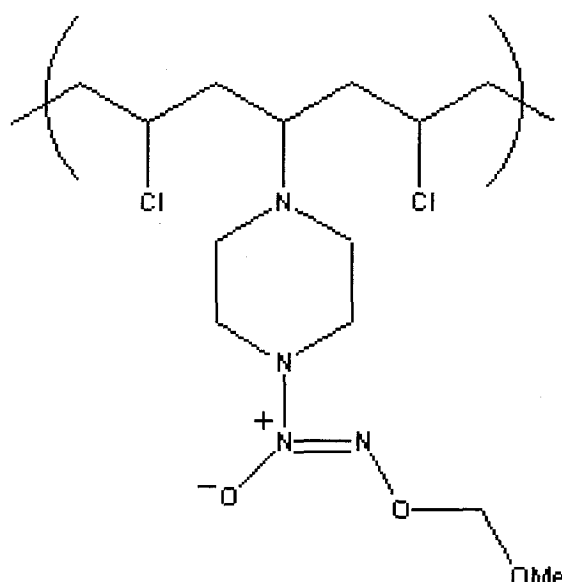
[0126]



[0127] iii. 基于聚合物的二醇二氮烯鎓

[0128] 为了调节 NO 释放的时程并限制对于机体的选定部位的 NO 暴露, 二醇二氮烯鎓官能团可以被加入聚合物基质中。释放 NO 的聚合物范围从膜、微球和凝胶到粉末和可塑树脂。聚合物二醇二氮烯鎓已经显示可改善动脉内装置的血栓抗性并且可以用作心血管研究的重要工具。基于聚合物的二醇二氮烯鎓的实例:

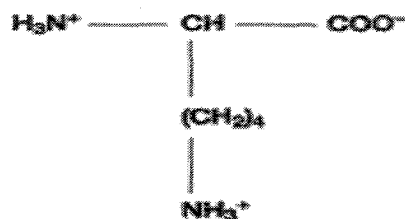
[0129]



[0130] iv. 赖氨酸

[0131] 优选地,亲核胺位于氨基酸(天然的或人工的)侧链(R基团)上。例如,亲核胺可以在赖氨酸的侧链(R基团)上。如下所示,赖氨酸具有两个悬垂胺基团用于NO结合。

[0132]



[0133] NO从基于赖氨酸的聚合物的受控释放已经被证实会减少血小板附着和平滑肌细胞增殖,血小板附着和平滑肌细胞增殖是再狭窄的主要原因(Jun H, et al. 2005; Bohl KS, et al. 2000; Jun HW, et al. 2005)。赖氨酸残基可以具有悬垂胺基团,所述悬垂胺基团与NO反应生成二醇二氮烯鎓修饰的肽 $[K[N(O)NO]]_n$ 。

[0134] 因此,生成一氧化氮的供体序列可以包括一个或多个二醇二氮烯鎓修饰的赖氨酸残基。因此,生成一氧化氮的供体序列可以包括所述二醇二氮烯鎓修饰的氨基酸 $[K[N(O)NO]]_n$, 其中“n”是1至20。在一些方面, n 是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更大。因此,生成一氧化氮的供体序列可以包括二醇二氮烯鎓修饰的肽 $[K[N(O)NO]]_5$ 。

[0135] 生成一氧化氮的供体序列可以包括一个或多个赖氨酸残基,所述赖氨酸残基包括与NO反应生成二醇二氮烯鎓修饰的肽的悬垂胺基团。因此,所述生成一氧化氮的供体序列可以包括氨基酸序列 Lys-Lys-Lys-Lys-Lys (SEQ ID NO:3), 其中一个或多个赖氨酸残基包括与NO反应生成二醇二氮烯鎓修饰的肽的悬垂胺基团。

[0136] 生成一氧化氮的供体序列可以包括一个或多个半胱氨酸残基,所述半胱氨酸残基包括与NO反应生成经修饰的肽的悬垂巯基基团。因此,所述生成一氧化氮的供体序列可以包括氨基酸序列 Cys-Cys-Cys-Cys-Cys (SEQ ID NO:17), 其中一个或多个半胱氨酸残基包括与NO反应生成经修饰的肽的悬垂巯基基团。

[0137] 应理解,每个赖氨酸残基均可以是两个一氧化氮分子的供体。因此,赖氨酸残基

或二醇二氮烯鎓修饰的赖氨酸残基的数目可以根据所需 NO 的量来选择。这可以进一步通过技术人员选择包括这些赖氨酸残基的肽两亲物的量或浓度来调节。例如,本文公开了包括 9 : 1 比例的第一 PA 和第二 PA 的模仿内皮的基质,所述第一 PA 包括内皮细胞粘附序列 (“PA-YIGSR”),所述第二 PA 包括 NO 供体序列 (“PA-KKKKK”),其中 PA-KKKKK 包括五个二醇二氮烯鎓修饰的赖氨酸残基。因此,技术人员可以通过增加第二肽两亲物中二醇二氮烯鎓修饰的赖氨酸残基的数目并同时增加第一 PA 与第二 PA 的比例 (> 9 : 1) 来实现相同的结果。

[0138] 因此,在本文中应理解,NO 释放的速率和持续时间可以通过以下方式调节,通过增加或减少第二 PA 中赖氨酸的数目或改变第一肽两亲物与第二肽两亲物的比例,使得赖氨酸数目的增加或第二两亲物比例的增加增加了 NO 释放的速率和 / 或持续时间。因此,例如 NO 释放的速率和 / 或持续时间可以通过将第二两亲物中的赖氨酸数目从 PA-KKKKK 改变至例如 PA-KKKKKK、PA-KKKKKKK、PA-KKKKKKKK、PA-KKKKKKKKK 或 PA-KKKKKKKKKK 来增加。而且,通过增加第二两亲物相对于第一两亲物的比例,NO 释放的持续时间和 / 或速率可以被增加。因此,NO 释放的速率和 / 或持续时间将通过将 PA-YIGSR 与 PA-KKKKK 的比例从 9 : 1 改变至例如 9 : 2、3 : 1、9 : 4、2 : 1、9 : 5、3 : 2、9 : 7、9 : 8、1 : 1、9 : 10、9 : 11、3 : 4、3 : 5、1 : 2、3 : 7、3 : 8、1 : 3 或其间任何比例来增加。

[0139] 类似地,NO 释放的速率和 / 或持续时间可以通过减小 PA-YIGSR 与 PA-KKKKK 的比例或从 PA-KKKKK 去除赖氨酸而减少。因此,与 9 : 1 的比例相比,10 : 1、11 : 1、12 : 1、13 : 1、14 : 1、15 : 1、16 : 1、17 : 1、18 : 1、19 : 1、20 : 1 或其间任何比例的 PA-YIGSR 与 PA-KKKKK 的比例将减少 NO 释放的速率和 / 或持续时间。而且,将 PA-KKKKK 中的赖氨酸数目从 5 开始减少将减少 NO 释放的速率和 / 或持续时间 (即,PA-KKKK、PA-KKK、PA-KK 或 PA-K)。

[0140] 3. EC 粘附

[0141] DES 腔中内皮细胞的保留对于其性能是关键。内皮化导致在暴露的支架表面上形成无血栓形成的包裹物,其缺乏使支架的支撑架直接接触流动的血液并最终导致血栓形成。层粘连蛋白是基底膜的主要的非胶原糖蛋白组分并且是细胞粘附、迁移、生长和分化的介导体 (Beck K 等, 1990)。YIGSR (SEQ ID NO : 2) 是层粘连蛋白衍生的细胞粘附序列,已知可增强内皮细胞的粘附、铺展和迁移 (Hubbell JA, et al. 1991)。经由 YIGSR (SEQ ID NO : 2) 的细胞铺展是由 67-kDa 细胞膜相关的受体介导 (Massia SP, et al. 1993)。使用 YIGSR (SEQ ID NO : 2) 修饰像聚对苯二甲酸乙二醇酯和聚四氟乙烯的表面被证实可选择性增强 EC 粘附、铺展、迁移 (Massia SP, et al. 1991; Fittkau MH, et al. 2005) 并促进 EC 集落形成。

[0142] 将 YIGSR (SEQ ID NO : 2) 序列加入聚氨酯已被证实可增强内皮细胞粘附和铺展 (Jun H, et al. 2004)。通过在聚氨酯中加入基于赖氨酸的二醇二氮烯鎓而开发了释放 NO 的聚氨酯 (Jun HW, et al. 2005)。该聚合物已经被证实显著减少血小板粘附并抑制平滑肌细胞增殖,同时刺激内皮细胞粘附。而且,已经发现,将 YIGSR (SEQ ID NO : 2) 序列加入释放 NO 的聚合物骨架增强了内皮细胞增殖,同时抑制血小板附着 (Taite LJ, et al. 2008)。

[0143] 因此,所公开的亲水肽可以包括选择性结合内皮细胞并因此选择性促进内皮细胞与包括所公开的肽两亲物的纳米基质结合的第一粘附序列。因此,所公开的亲水肽可以包括第一粘附序列,该第一粘附序列包括与内皮细胞结合但基本不结合平滑肌细胞和 / 或血

小板的内皮细胞粘附序列。因此,所公开的亲水肽的内皮细胞粘附序列可以包括氨基酸序列 Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg(YIGSR;SEQ ID NO:2)。

[0144] 所公开的肽两亲物的亲水肽还可以包括一个或多个其他的细胞粘附序列。在一些方面,所述一个或多个其他的细胞粘附序列可结合内皮细胞并因此促进内皮细胞与包括所公开的肽两亲物的纳米基质的结合。因此,所述一个或多个其他的细胞粘附序列可以是 Arg-Gly-Asp(SEQ ID NO:8)、Arg-Gly-Asp-Ser(SEQ ID NO:9)、Asp-Gly-Glu-Ala(SEQ ID NO:10)、Val-Ala-Pro-Gly(SEQ ID NO:11)、Arg-Glu-Asp-Val(SEQ ID NO:12)、Asp-Gly-Glu-Ala(SEQ ID NO:13) 和 Lys-Arg-Ser-Arg(SEQ ID NO:14) 中的一个或多个。包括内皮细胞粘附序列(选择性和非选择性的)的其他此类细胞粘附序列是已知的并且可以用于所公开的肽两亲物。本领域技术人员可以使用常规的体外方法筛选包括候选细胞粘附序列的肽两亲物。

[0145] 4. 降解序列

[0146] 降解序列可以包括进行细胞介导的蛋白水解性降解的氨基酸序列。

[0147] 在一些方面,降解序列包括基质金属蛋白酶(MMP)特异性切割位点。MMP是锌依赖性内肽酶,属于被称为锌金属蛋白酶(metzincin)超家族的较大蛋白酶家族。

[0148] 最常用的MMP分组部分地基于MMP底物特异性的历史评估,并且部分地基于MMP的细胞定位。这些组有胶原酶、明胶酶、基质降解酶和膜型MMP(MT-MMP)。

[0149] 胶原酶能够降解三重螺旋纤维胶原成为不同的3/4和1/4片段。这些胶原是骨和软骨的主要组分,并且MMP是唯一已知的能够降解它们的哺乳动物酶。传统上,胶原酶有MMP1、MMP8、MMP13和MMP18。此外,MMP14已经被证明可切割纤维胶原,并且更引起争议的是,存在MMP2能够进行溶解胶原的证据。

[0150] 明胶酶的主要底物是IV型胶原和明胶,这些酶可通过存在插入催化结构域中的其他结构域来加以区别。这些明胶结合区域刚好位于锌结合基序之前,并且形成独立的折叠单元,所述折叠单元不破坏催化结构域的结构。明胶酶有MMP2和MMP9。

[0151] 基质降解酶表现出切割细胞外基质蛋白的广泛能力,但不能切割三重螺旋的纤维胶原。该组的三个典型成员是MMP3、MMP10和MMP11。

[0152] 所有六个膜型MMP(MMP14、MMP15、MMP16、MMP17、MMP24和MMP25)在前肽中具有弗林蛋白酶切割位点,这也是MMP11共有的特征。

[0153] 其他MMP切割位点的实例是已知的并且记载于例如Handbook of proteolytic enzymes, Edited by Alan J. Barrett, Neil D. Rawlings, J. Fred Woessner, Academic Press。

[0154]

表 1: MMP

MMP	组	切割位点	SEQ ID NO:
MMP1	胶原酶	GPQGIWGQ	SEQ ID NO: 16
MMP2	明胶酶	GTAGLIGQ 或 GPQGLLGA	SEQ ID NO: 1 SEQ ID NO: 15

[0155] 因此,降解序列包括基质金属蛋白酶-2(MMP2)特异性切割位点。例如,降解序列可以包括氨基酸序列 Gly-Thr-Ala-Gly-Leu-Ile-Gly-Gln(SEQ ID NO:1)。

[0156] 在所述 PA 骨架中加入 MMP 特异性序列,例如 MMP-2 特异性序列,可以保证纳米基质进行细胞介导的蛋白水解性降解,实现穿过纳米基质的细胞迁移并且最终用天然 ECM 重塑 (Jun HW, et al. 2005 ;Giannelli G, et al. 1997)。对于 MMP2,这种切割预期在甘氨酸和亮氨酸残基之间发生 (Jun HW, et al. 2005)。

[0157] 5. 疏水尾

[0158] 所述疏水尾可以包括具有任选取代的 C4 或更大烷基链的部分。因此,所述疏水尾可以包括具有任选取代的 C6 至 C28 或更大烷基链的部分。因此,所述疏水尾可以包括具有任选取代的 C10 至 C25 或更大烷基链的部分。因此,所述疏水尾可以包括具有任选取代的 C5、C5、C6、C7、C8、C9、C10、C11、C12、C13、C14、C15、C16、C17、C18、C19、C20、C21、C22、C23、C24、C25、C26、C27、C28 或更大烷基链的部分。因此,所述疏水尾可以包括具有任选取代的 C16 烷基链的部分。

[0159] 6. 具体实施方案

[0160] 所述亲水肽序列可以包括氨基酸序列 Gly-Thr-Ala-Gly-Leu-Ile-Gly-Gln (SEQ ID NO :1) 和氨基酸序列 Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (SEQ ID NO :2)。因此,所述亲水肽序列可以包括氨基酸序列 Gly-Thr-Ala-Gly-Leu-Ile-Gly-Gln-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (SEQ ID NO :4)。

[0161] 所述亲水肽序列可以包括氨基酸序列 Gly-Thr-Ala-Gly-Leu-Ile-Gly-Gln (SEQ ID NO :1) 和氨基酸序列 Lys-Lys-Lys-Lys-Lys (SEQ ID NO :3),其中赖氨酸残基包括与 NO 反应生成二醇二氮烯鎇修饰的肽的悬垂胺基团。因此,所述亲水肽序列可以包括氨基酸序列 Gly-Thr-Ala-Gly-Leu-Ile-Gly-Gln-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys (SEQ ID NO :5),其中赖氨酸残基包括与 NO 反应生成二醇二氮烯鎇修饰的肽的悬垂胺基团。

[0162] 所述亲水肽序列可以包括氨基酸序列 Gly-Thr-Ala-Gly-Leu-Ile-Gly-Gln (SEQ ID NO :1)、氨基酸序列 Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (SEQ ID NO :2) 和氨基酸序列 Lys-Lys-Lys-Lys-Lys (SEQ ID NO :3),其中赖氨酸残基包括与 NO 反应生成二醇二氮烯鎇修饰的肽的悬垂胺基团。因此,所述亲水肽序列可以包括氨基酸序列 Gly-Thr-Ala-Gly-Leu-Ile-Gly-Gln-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys (SEQ ID NO :6),其中赖氨酸残基包括与 NO 反应生成二醇二氮烯鎇修饰的肽的悬垂胺基团。因此,所述亲水肽序列可以包括氨基酸序列 Gly-Thr-Ala-Gly-Leu-Ile-Gly-Gln-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (SEQ ID NO :7),其中赖氨酸残基包括与 NO 反应生成二醇二氮烯鎇修饰的肽的悬垂胺基团。

[0163] 7. 电纺

[0164] 能够形成纤维的液体和 / 或溶液的电纺技术 (在纤维形成工业还称为静电纺丝) 是公知的并且已记载于许多专利和一般文献中。通常,电纺过程一般包括在液体表面产生电场。由该过程产生的纤维已经用于许多应用并且根据美国专利 No 4,043,331 和 4,878,908 已知特别用于形成无纺结构。得到的电力产生带有电荷的液体射流。因此,所述液体射流可能被吸引到处于适合电势的其他带电物体上。随着液体射流拉长和移行,它将硬化并干燥。拉长的液体射流的硬化和干燥可能是由以下原因导致的:液体冷却,即,所述液体在室温下正常为固体;溶剂蒸发,例如通过脱水 (物理诱导的硬化);或者通过固化机制 (化学诱导的硬化)。产生的纤维被收集在适当定位的带相反电荷的接收器上,随后根据

需要将其从接收器取出,或者直接应用到带相反电荷的广泛的靶区域。

[0165] 在一个方面,电纺(ES)是利用静电场和流体之间的相互作用的液体雾化过程。在一个方面,所述流体可以是导电流体。在电纺过程中,借助静电势将微米或亚微米大小直径的纤维从聚合物溶液挤出(参见Formhals的美国专利No. 1,975,504)。当向流体(例如,半稀释聚合物溶液或聚合物熔体)施加外部静电场时,悬浮的圆锥形液滴与电场处于平衡。当静电场强大到足以克服液体表面张力时发生静电雾化。然后所述液滴变得不稳定并且小射流从所述液滴表面被喷射。当它到达接地靶时,材料可以被收集为互联的网,该网含有相对精细即小直径的纤维。从这些小直径纤维得到的薄膜(或膜)具有非常大的表面积体积比(surface area to volume ratio)和小的孔径。该过程通常产生由非常易柔的圆形纤维构成的无纺席或毡。由于其大的表面积和良好的机械特征,电纺网常规在过滤和复合加固(compositereinforcement)中应用。由于非常相同的原因,生物相容聚合物(例如聚乳酸及其与羟乙酸的共聚物和其他聚酯)衍生的毡和网被开发作为组织工程中细胞缔合的基底(支撑架)(参见Kenawy, et al, Biomaterials, 2003, 24(6), 907, 描述了通过电纺过程从含有乙烯-乙烯醇、70%丙醇和30%水的单相系统制备纤维)。此类柔性多孔介质特别适合皮肤、血管和神经修复工程。

[0166] 可以在ES过程中改变的参数是电场、“泰勒锥”与靶之间的距离以及聚合物溶液粘度(Fridrikh, et al, G. C. Phys Rev Lett. 2003, 90(14), 144502)。由于纤维形成过程的复杂性,已经进行了非常少的尝试来改变电纺纤维的几何形状。最近,Reneker和同事已经发现在一些溶剂系统中形成分支状和带状纤维,并且已将这归因于由于类似于园艺胶管中看到的弯曲不稳定性造成的聚合物皮肤的折叠(参见Koombhongse, et al, Polym. Sci. :Part B :Polym. Phys. 2001, 39, 2598-2606)。然而,此类纤维的形成不能在公知的ES操作条件下以可预见的方式实现。Bornat的美国专利No. 4,323,525和4,689,186(在此通过引用并入)涉及通过静电纺丝含有纤维形成材料的液体来产生管状产品的方法。

[0167] ES是借助静电势将具有微米或亚微米大小直径的纤维从聚合物溶液挤出的过程(图5)。在典型的ES过程中,所述聚合物溶液在接受高压DC电场(例如,5-30kV)时通过喷嘴喷射。在此类条件下,所述聚合物溶液爆发成“泰勒锥”,因为所述液滴经受称为“Raleigh不稳定性”的现象,这导致聚合物射流抖动。随着射流被推进,溶剂蒸发和射流薄化会促进纤维形成。可以被改变而影响纤维形态的参数包括电场强度、“泰勒锥”与靶之间的距离以及聚合物溶液粘度。由于“泰勒锥”形成的复杂性,控制纤维形态的大部分尝试集中于控制聚合物溶液性质。这可以通过增加聚合物浓度或分子量或者增加有机溶剂挥发性来实现;所有这些会加速聚合物纤维在纺丝过程中凝固的速率。一般而言,增加的粘度和溶剂挥发性导致纤维增厚。

[0168] 常规方法的限制在于,它们不能改变其他纤维性质,例如长径比(更圆纤维相对于更平纤维)和纤维孔径,两者都可以通过增加表面积而严重影响细胞相互作用,这可能是细胞接触应用和组织工程(TE)中需要的性质。

[0169] 良好的机械性质、高的表面积重量比(surface area to weight ratio)和柔韧性使得电纺纤维成为用于过滤和复合加固中许多应用的纤维候选物。这些特征结合具体的聚合物性质也使得电纺毡成为对于组织工程支撑架和药物递送装置是理想的。电纺材料通常具有高的长径比,这可能是各种应用所需的性质,例如组织工程(TE)应用。

[0170] 纤维直径通常是通过改变电场强度（通过改变外加电压或头与靶的距离）、改变蒸发速率（通过改变纺丝环境或使用具有不同挥发性的溶剂）或者通过改变聚合物浓度来控制。最后的方法特别受研究者欢迎，因为聚合物浓度是容易控制的变量，并且可以对纤维直径具有可重复和显著的效应。该方法通过改变溶剂量以及通过改变溶液粘度并由此改变“泰勒锥”形成和最终射流直径而起作用，所述溶剂必须在固体纤维从所述溶液沉淀出之前蒸发。

[0171] 常规方法中，电纺纳米纤维的表面几何形状和形态更难改变。典型的电纺纤维采用环形横截面，尽管在几种聚合物 / 溶剂系统中已经发现多孔和平面纤维形态，但是控制这些形态的研究很少成功。用于改变纤维横截面形状的常用技术是共纺丝聚合物并选择性地去除某些聚合物相。最近的方法已经通过使用不混溶的第二相和同轴纺丝器成功产生了中空纤维形态。两种技术都包括复杂的加工步骤和专门的电纺设备来实现所需的最终形状。

[0172] 常规电纺技术中最常调节的参数之一包括改变所溶解的聚合物的浓度。这通常具有以下作用：能够通过改变电纺过程中纤维形成过程和时程来控制最终纤维直径。与聚合物浓度相关的更重要的参数之一是溶液粘度。粘度在“泰勒锥”形成和稳定性中起较大作用。

[0173] 然而，改变聚合物溶液浓度具有两个限制。低浓度溶液可能缺乏适当形成“泰勒锥”的粘度。在常规技术中，不是从纺丝器抽出单一带电射流，而是将射流破碎成多个液滴。该过程被称为电喷雾并且用于诸如应用表面包裹物和喷墨印刷的过程。

[0174] 本文公开的 PA 可以被包裹至电纺纳米纤维，例如聚酯纳米纤维（例如电纺聚己内酯（ePCL）纳米纤维）。本文公开的 PA 可以几种方式之一被包裹至 ePCL。可以以注射器形式使用压力梯度。可以将 ePCL 纳米纤维盘放在注射器筒中，并且将 PA 溶液推过它。这可以从另一侧重复。或者，ePCL 纳米纤维可以用旋转技术以 PA 包裹。可以将 ePCL 纳米纤维安装在轴柄上并旋转，同时将它们部分浸入 PA 溶液中。

[0175] 适合纳米纤维形成的聚合物包括适合于电纺的那些。例如，聚合物可以是聚酯、聚酰胺、聚氨酯、聚烯烃或聚碳酸酯。在一个方面，聚合物可以是无定形的生物可降解聚酯。应理解，聚合物可以是支链或直链的。还考虑到共聚物，包括嵌段共聚物和接枝共聚物。聚合物混合物也可以用于所公开的方法和组合物。

[0176] 在一个方面，适合的聚合物包括聚酯；聚酸酐；聚原酸酯；聚磷腈；聚磷酸盐；聚磷酸酯；聚二氧环己酮（polydioxanone）；聚膦酸酯；聚羟基链烷酸酯；聚碳酸酯；聚烷基碳酸酯；聚原碳酸酯；聚酰胺酯；聚酰胺；多胺；多肽；聚氨酯；聚醚酯；聚烷撑二醇；聚环氧烷；多肽；多糖；聚乙烯吡咯烷酮及其结合物。

[0177] 在另一方面，适合的聚合物包括聚丙交酯-共-聚环氧烷；聚（丙交酯-共-乙交酯）-共-聚环氧烷；聚（丙交酯-共-己内酯）-b-聚环氧烷；和聚（丙交酯-共-乙交酯-共-己内酯）-b-聚环氧烷。

[0178] 在又一方面，适合的聚合物包括聚丙交酯；聚乙交酯；聚己内酯；聚戊内酯；聚羟基丁酸酯；聚（丙交酯-共-乙交酯）；聚（丙交酯-共-己内酯）；聚（丙交酯-共-戊内酯）；聚（乙交酯-共-己内酯）；聚（乙交酯-共-戊内酯）；聚（丙交酯-共-乙交酯-共-己内酯）；和聚（丙交酯-共-乙交酯-共-戊内酯）。

[0179] 在另一方面,适合的聚合物包括聚丙交酯-共-聚乙烯基吡咯烷酮;聚(丙交酯-共-乙交酯)-共-聚乙烯基吡咯烷酮;聚(丙交酯-共-己内酯)-b-聚乙烯基吡咯烷酮;和聚(丙交酯-共-乙交酯-共-己内酯)-b-聚乙烯基吡咯烷酮。

[0180] 在一个方面,所述聚合物纤维可以包括本领域技术人员已知的任何生物相容性聚合物。在又一方面,所述聚合物纤维包括聚乳酸、聚羟乙酸或聚 ϵ -己内酯或者其共聚物或其混合物。在又一方面,所述纤维聚合物可以是聚乙烯和/或聚氨酯。在再一方面,聚合物可以是聚(乙交酯-共-丙交酯)、聚乳酸、聚羟乙酸、聚(glaxanone)、聚原酸酯、聚吡咯酸(poly(pyrolic acid))和聚磷腈。可以使用的其他聚合物包括但不限于聚烷撑聚合物和共聚物、氟碳聚合物和共聚物、聚酯聚合物和共聚物、聚醚聚合物和共聚物、硅酮聚合物和共聚物以及聚氨酯聚合物和共聚物。可以使用的其他聚合物包括但不限于聚乙烯、聚丙烯、聚四氟乙烯、聚(四氟乙烯-共-六氟丙烯)、经修饰的乙烯-四氟乙烯共聚物、乙烯-三氟氯乙烯共聚物、聚偏氟乙烯、聚氧化乙烯、聚对苯二甲酸乙二酯、硅酮、聚氨酯、聚醚嵌段酰胺和聚醚酯。在另一方面,所述聚合物可以是一种或多种聚合物,例如聚吡咯、聚苯胺、聚噻吩、聚对苯撑乙烯、聚对二甲苯(polyparalene)或其混合物。在再一方面,聚合物可以是聚(乙烯-乙酸乙烯酯)。

[0181] 在一方面,所述聚合物是生物相容性聚合物。在一方面,所述聚合物是聚己内酯。在又一方面,所述聚己内酯用作两亲合成嵌段共聚物的疏水嵌段。

[0182] 在一方面,所述聚合物是可降解聚合物。所谓的“可降解”表示所述聚合物在某些条件下一段时间后分解。在又一方面,所述聚合物是“生物可降解”聚合物,在生理条件下一段时间后分解。在另一方面,所述聚合物是不可降解的和/或非生物可降解的。例如,所述聚合物可以包括一个或多个可水解的键。可水解的键的存在可以促进生物系统中纳米纤维的降解。在再一方面,所述聚合物不包括一个或多个可水解的键。

[0183] 8. ECM 模仿纳米基质

[0184] 本文公开了模仿内皮的纳米基质,包括被组装成纳米纤维的一种或多种本文公开的肽两亲物。所述纳米纤维可以包括具有式 DS---CA 和 DS---KK 的肽两亲物的混合物。

[0185] DS---CA 和 DS---KK 肽两亲物可以以约 1 : 20 至约 20 : 1 的比例存在于纳米纤维中,包括约 20 : 1、19 : 1、18 : 1、17 : 1、16 : 1、15 : 1、14 : 1、13 : 1、12 : 1、11 : 1、10 : 1、9 : 1、8 : 1、7 : 1、6 : 1、5 : 1、4 : 1、3 : 1、2 : 1、1 : 1、1 : 2、1 : 3、1 : 4、1 : 5、1 : 6、1 : 7、1 : 8、1 : 9、1 : 10、1 : 11、1 : 12、1 : 13、1 : 14、1 : 15、1 : 16、1 : 17、1 : 18、1 : 19 或 1 : 20。因此,所述纳米纤维可以包括具有式 DS---CA 和 DS---KK 的肽两亲物的混合物。DS---CA 和 DS---KK 肽两亲物可以以约 1 : 9 至约 9 : 1 的比例存在于纳米纤维中。如本文公开的,该比例可以由本领域技术人员部分根据一种或多种肽两亲物中二醇二氮烯鎓修饰的赖氨酸残基的数目和所需要的 NO 释放来选择。

[0186] 所公开的模仿内皮的纳米基质的 DS---CA 肽两亲物可以包括氨基酸序列 Gly-Thr-Ala-Gly-Leu-Ile-Gly-Gln(SEQ ID NO :1) 和氨基酸序列 Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg(SEQ ID NO :2)。因此,所公开的模仿内皮的纳米基质的 DS---CA 肽两亲物可以包括氨基酸序列 Gly-Thr-Ala-Gly-Leu-Ile-Gly-Gln-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg(SEQ ID NO :4)。

[0187] 所公开的模仿内皮的纳米基质的 DS---KK 肽两亲物可以包括氨基酸序列 Gly-Thr-Ala-Gly-Leu-Ile-Gly-Gln(SEQ ID NO :1) 和一个或多个赖氨酸残基,所述氨基酸残基含

有可以与一氧化氮反应以生成二醇二氮烯鎓修饰的肽的悬垂胺基团。因此,所公开的模仿内皮的纳米基质的 DS---KK 肽两亲物可以包括氨基酸序列 Gly-Thr-Ala-Gly-Leu-Ile-Gly-Gln (SEQ ID NO :1) 和氨基酸序列 Lys-Lys-Lys-Lys-Lys (SEQ ID NO :3),其中所述赖氨酸残基包括可以与一氧化氮反应以生成二醇二氮烯鎓修饰的肽的悬垂胺基团。因此,所公开的模仿内皮的纳米基质的 DS---KK 肽两亲物可以包括氨基酸序列 Gly-Thr-Ala-Gly-Leu-Ile-Gly-Gln-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys (SEQ ID NO :5),其中所述赖氨酸残基包括可以与一氧化氮反应以生成二醇二氮烯鎓修饰的肽的悬垂胺基团。在一些方面,所述 DS---KK 肽两亲物与一氧化氮反应以生成二醇二氮烯鎓修饰的肽 $[K[N(O)NO]]_n$ 。在一些方面,n 可以是 1 至 20。在一些方面,n 是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或更大。在一些方面,所述 DS---KK 肽两亲物与一氧化氮反应以生成二醇二氮烯鎓修饰的肽 $[K[N(O)NO]]_5$ 。

[0188] 所公开的模仿内皮的纳米基质的纳米纤维可以包括具有式 DS---CA---KK、DS---KK---CA 或其组合的肽两亲物。例如,所述 DS---CA---KK 和 DS---KK---CA 肽两亲物可以包括氨基酸序列 Gly-Thr-Ala-Gly-Leu-Ile-Gly-Gln (SEQ ID NO :1)、氨基酸序列 Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (SEQ ID NO :2) 和氨基酸序列 Lys-Lys-Lys-Lys-Lys (SEQ ID NO :3),其中所述赖氨酸残基包括可以与 NO 反应以生成二醇二氮烯鎓修饰的肽的悬垂胺基团。例如,所述 DS---CA---KK 肽两亲物可以包括氨基酸序列 Gly-Thr-Ala-Gly-Leu-Ile-Gly-Gln-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys (SEQ ID NO :6),其中所述赖氨酸残基包括可以与 NO 反应以生成二醇二氮烯鎓修饰的肽的悬垂胺基团。所述 DS---KK---CA 肽两亲物可以包括氨基酸序列 Gly-Thr-Ala-Gly-Leu-Ile-Gly-Gln-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (SEQ ID NO :7),其中赖氨酸残基包括可以与 NO 反应以生成二醇二氮烯鎓修饰的肽的悬垂胺基团。

[0189] 在一些方面,所公开的模仿内皮的纳米基质的肽两亲物与一氧化氮反应以生成二醇二氮烯鎓修饰的肽 $[K[N(O)NO]]_n$ 。在一些方面,n 是 1 至 20。在一些方面,n 是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或更大。因此,在一些方面,肽两亲物与一氧化氮反应以生成二醇二氮烯鎓修饰的肽 $[K[N(O)NO]]_5$ 。

[0190] 本文公开了杂合纳米基质,包括用释放 NO 的肽两亲物 (PA) 包裹的电纺聚己内酯 (ePCL) 纳米纤维。最近,电纺因为其制备具有纳米级范围的直径的均一聚合物纤维的能力受到了许多关注 (Li WJ, et al. 2003 ;Choi JS, et al. 2008 ;Zhang Y, et al. 2005 ;Matthews JA, et al. 2002 ;和 Heydarkhan-Hagvall S, et al. 2008)。这些纤维结构上类似于纳米纤维 ECM 蛋白,例如胶原蛋白。然而,这些纳米纤维受限于其生物活性的缺乏,这对于与细胞相互作用以及促进其粘附和增殖而言是关键的。如本文公开的,可以通过用肽两亲物 (PA) 包裹这些 ePCL 纳米纤维而赋予它们该生物活性。这些 PA 可以带有酶介导的可降解位点和细胞粘附配体,并且因此可以模仿 ECM 的生化方面。将 PA 包裹在 ePCL 纳米纤维上构成了杂合仿生纳米基质,如图 19 所示。该研究中使用的 PA 由基质金属蛋白酶 -2 (MMP-2) 可降解位点 Gly-Thr-Ala-Gly-Leu-Ile-Gly-Gln (GTAGLIGQ) 组成。MMP 由健康细胞组成型地产生,因此,该位点的存在可促进细胞对纳米基质的重塑 (Jun, et al. 2005 ;Massia SP and Hubbell JA :1991 ;和 Andukuri A, et al. 2009)。PA 还含有已知会促进内皮细胞粘附和铺展的层粘连蛋白衍生的 Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) 序列和用作 NO 供体的聚赖氨酸 (KKKKK) 序列。

预期将 NO 供体残基加入 PA 可使 NO 从杂合纳米基质受控释放进入局部血流,其中它将限制平滑肌细胞增殖和血小板粘附,同时增强再内皮化。

[0191] 9. 支架

[0192] 本文还公开了包括用本文公开的模仿内皮的纳米基质包裹的医疗装置。所述医疗装置可以是已知或标示为在受试者体内使用的任何装置。优选地,所述医疗装置是被插入心血管系统的装置。所述医疗装置可以包括适合用作外科植入物的任何材料。

[0193] 大部分支架由 316L 不锈钢制作。当前实例包括 Cordis Palmaz-Schatz 支架、Cordis Crossflex 支架、Guidant MultiLink 支架和 Medtronic Bestent。不锈钢支架的缺点包括支架血管区段的亚急性血栓形成和再狭窄、出血并发症、腐蚀和再扩张的高发。

[0194] 长期以来认为金是高度可视的、生物相容性的和常用的惰性金属。镀金的杂合支架表现出良好的可视性和柔韧性,但是也相当昂贵。

[0195] 目前,Conichrome®、Phynox™ 和 Elgiloy® 是钴-铬-镍-钼-铁合金的商品名。该钴铬合金可以用于生产诸如 Schneider Wallstent 的支架。

[0196] 第 73 号元素钽是一种有光泽、柔软且高度射线不透的金属。尽管比不锈钢更脆,但是钽表现出高度延展性和抗腐蚀性。钽支架的当前实例包括 Medtronic 的 Wiktor 支架和 Tantalum Cordis 支架。

[0197] 镍钛记忆合金(来自“Nickel Titanium Naval Ordinance Laboratory”)是生物相容的超弹性形状记忆合金的实例。因为形状记忆合金由 55% 镍和 45% 钛组成,所以镍钛记忆合金具有在其相变之后加热至某温度时恢复特定形状的能力。形状记忆合金在冷却时其晶体结构发生相变,从其较强的、较高温度形式的奥氏体相到其较弱的、较低温度形式的马氏体相。镍钛记忆合金还具有弹性“橡胶状”性质,这允许它是超弹性的并在其奥氏体温度下扭曲。镍和钛之间强的金属间键具有非常低的反应速率,即使在镍具有增加的敏感性的患者中。这可防止强的免疫反应并减少腐蚀。本实施例包括 Boston Scientific 的 Nitinol-self-expanding Radius 支架。Boston Scientific 的 Symbiot 支架可在欧洲获得,包括在两侧覆盖有 16 微米厚的 ePTFE 层的镍钛记忆合金。

[0198] 聚合物支架材料包括与聚合物腔内涂膜偶联的生物可降解支架以及形状记忆聚合物。硅酮是被选择用于支架的第一个有机材料。硅酮是由交替的硅酮和氧原子形成的缩合聚合物,所述氧原子会诱导较低的组织损伤率。然而,硅酮具有差的生物耐久性、拉伸和卷曲强度以及内外径比。

[0199] 使用聚乙烯或聚氨酯的纯弹性胆道支架已经用于患者。然而,聚乙烯在 20-30% 的患者中诱导胆泥,并且会促进蛋白粘附和生物膜形成,并捕获胆汁晶体和食物颗粒。相反,聚氨酯具有良好的拉伸和卷曲强度和良好的生物耐久性,但是它也是可获得的最具反应性的材料之一。

[0200] 生物可降解的和生物可吸收的支架还包括用于支架的活力材料。尽管生物降解、生物吸收和生物侵蚀经常被不正确地用作同义词,但是它们具有不同的定义。在生物降解中,诸如酶或微生物的生物物质是降解过程的主导组分。生物可降解植入物通常用于短期或临时应用。生物再吸收和生物吸收暗示所述降解产物是通过细胞活性(例如吞噬)在生物环境中去除。相反,生物可侵蚀的聚合物是水不溶性的聚合物,所述聚合物在生理条件下被转化为水溶性材料。不管侵蚀过程中涉及的物理机制如何,这都会发生。这种情况下,前

缀“生物”指生理条件下发生的侵蚀,与通过高温、强酸或碱或天气的侵蚀不同。

[0201] 因为支架对受损血管的临时结构性支撑,所以生物可降解聚合物可视为生物相容的且容易处理的材料,对于药物递送系统而言是理想的。一些生物可降解聚合物(例如聚酯、聚原酸酯和聚酸酐)也可以调节药物的局部递送并且也可以经过水解和其他机制“安全地”降解。生物可降解的药物递送系统需要稳定的降解、渗透性和中等的拉伸强度。在支架中,结构性支持物必须伴有生物相容性、血液相容性和良好的血液动力学。当前,生物可降解支架通常会诱导血栓形成和血管损伤。

[0202] Duke 生物可吸收支架是第一个生物可降解支架。其他人还尝试了通过从纯化的牛 Achilles 腱形成 I 型胶原而将天然聚合物加入无有槽侧面的管中,所述管被化学交联以利于结构稳定性。胶原是相当血液相容的,因为它带有固有的负电荷。胶原产品在其整个生命周期是生物相容的,并且显示血栓形成的减少。而且,抗凝血剂和纤维蛋白溶解剂可以直接结合到胶原,这有助于其药物递送的容量。Cordis Corporation 也开发了由聚交酯和三亚甲基碳酸酯的混合物制成的生物可降解支架原型。

[0203] 加速聚合物降解的一些因素包括给所述产品提供更亲水的骨架、更亲水的端基、较低的结晶性、更高的多孔性和较小的总尺寸。最常用的化学官能团是酯、酸酐、原酸酯和酰胺。

[0204] 最终的可能聚合物是形状记忆聚合物。一旦合成所述聚合物,它可以被加热或冷却成无数形状。一旦引入适合的刺激,所述聚合物将从其临时状态转变为记忆的永久形状。这些聚合物的大部分是用适合的区段产生,主要通过筛选现有的脂肪族聚酯、特别是聚酯酯、以及 L, L- 二丙交酯、二乙交酯和对二氧环己酮的性质来确定。大二醇 (Macrodiol) 可以基于这些已经批准的单体来合成。

[0205] 因此,本文公开的医疗装置例如支架可以包括钛合金。所述医疗装置可以包括钴 - 铬 (cromium)。医疗装置可以包括镍 - 钛。医疗装置可以包括生物可降解的聚合物。

[0206] 在一些方面,所述医疗装置是血管支架。在一些方面,所述支架是药物洗脱支架。例如,所述支架可以是西罗莫司洗脱支架或紫杉醇洗脱支架。

[0207] 本领域技术人员可以理解用于所公开的模仿内皮的纳米基质的其他医疗装置。优选地,所述医疗装置是给予正常情况下包括天然内皮的机体组织或器官的装置。例如,在一些方面,所述医疗装置是血管移植物。在一些方面,所述医疗装置是导管。在一些方面,所述医疗装置是起搏器。在一些方面,所述医疗装置是心瓣膜。

[0208] 还公开了将所公开的经包裹的医疗装置植入受试者的方法。因此,在一个方面,一种方法包括如下步骤:提供包括用模仿内皮的纳米基质包裹的医疗装置(例如,支架、血管移植物、导管、起搏器或心瓣膜)的组合物,并且将所述经包裹的基质植入受试者。在又一方面,提供了一种用模仿内皮的纳米基质包裹医疗装置。在另一方面,一种方法包括在植入受试者之前用模仿内皮的纳米基质包裹医疗装置的步骤。在再一方面,一种方法包括在植入受试者之后用模仿内皮的纳米基质包裹医疗装置的步骤。

[0209] 10. 治疗方法

[0210] 本文公开的肽两亲物可以用作纳米基质的一部分以包裹支架或其他医疗装置,例如心瓣膜。类似地,所述肽两亲物可与血管移植物(例如动脉或静脉移植物)结合使用以防止所述移植物再狭窄。因此,本文公开了治疗心血管疾病的方法,包括给予心血管疾病受

试者本文公开的肽两亲物。

[0211] 应理解,本文公开的肽两亲物可以通过应用以所述肽两亲物包裹的医疗装置(例如血管支架、血管移植物、导管、起搏器或心瓣膜)来给予。还应理解,所述肽两亲物在其用于医疗装置时可用作纳米基质(例如聚己内酯纳米纤维)的一部分。因此,例如本文公开了通过向受试者给予用一种或多种肽两亲物包裹的纳米纤维(如聚酯纳米纤维,例如聚己内酯纳米纤维)的支架来治疗动脉粥样硬化症的方法。应理解,本文公开的肽两亲物中的任何一个均可以用于所公开的方法,例如,一种或多种肽两亲物,其中每种两亲物包括亲水肽序列和疏水尾,其中所述亲水肽序列包括降解序列以及第一细胞粘附序列和生成一氧化氮的供体序列中的一种或多种。

[0212] 类似地,如果使用移植物,治疗心血管疾病的挑战之一是预防进一步阻塞。具体地是移植物的阻塞。移植物通畅性(graft patency)指移植物保持开放或非闭塞的能力。因此,本文公开了增加移植物通畅性的方法,包括向受试者给予用一种或多种本文公开的肽两亲物包裹的移植物。

[0213] 11. 肽

[0214] 如本文讨论的,存在许多已知并被本文考虑到的功能性肽/蛋白的变体。蛋白变体和衍生物是本领域技术人员公知的并且可以包括氨基酸序列修饰。例如,氨基酸序列修饰通常落入三个类别中的一个或多个:置换、插入或缺失变体。插入包括氨基和/或羧基末端融合以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。插入物通常是比上述氨基或羧基末端融合物更小的插入物,例如在1至4个残基级别。免疫原性融合蛋白衍生物(例如实施例中描述的那些)是通过将足够大以赋予免疫原性的多肽与靶序列通过以下方式融合而制备:通过体外交联或通过用编码所述融合体的DNA转化的重组细胞培养物。缺失的特征为将一个或多个氨基酸残基从蛋白序列去除。通常,在所述蛋白分子内任何一个位点处缺失不超过约2至6个残基。这些变体通常通过以下方式制备:对编码所述蛋白的DNA中核苷酸进行位点特异性诱变,从而产生编码所述变体的DNA,并之后在重组细胞培养物中表达所述DNA。用于制备在具有已知序列的DNA中预定位点处的置换突变的技术是公知的,例如M13引物诱变和PCR诱变。氨基酸置换通常是单个残基,但是可以同时许多不同位置发生;插入通常在约1至10个氨基酸残基的级别;而缺失的范围是约1至30个残基。缺失或插入优选以相邻的对的形式进行,即,缺失2个残基或插入2个残基。置换、缺失、插入或其任何组合可以被组合以得到最终的构建体。所述突变一定不能将序列置于读码框之外并且优选不产生可能产生二级mRNA结构的互补区。置换变体是其中至少一个残基被去除并且一个不同的残基插入其位置的那些。此类置换一般根据下表2进行并且称为保守性置换。

[0215] 表2:氨基酸置换

[0216] 原始残基示例性保守置换,其他是本领域

[0217] 中已知的

[0218]	Ala	Ser
	Arg	Lys; Gln
	Asn	Gln; His
	Asp	Glu
	Cys	Ser
	Gln	Asn; Lys
	Glu	Asp
[0219]	Gly	Pro
	His	Asn; Gln
	Ile	Leu; Val
	Leu	Ile; Val
	Lys	Arg; Gln
	Met	Leu; Ile
	Phe	Met; Leu; Tyr
	Ser	Thr
	Thr	Ser
	Trp	Tyr
	Tyr	Trp; Phe
	Val	Ile; Leu

[0220] 功能或免疫标识的实质性改变可通过选择保守性小于表 2 中的那些的置换来进行,即,选择以下作用更加显著不同的残基,所述作用为保持:(a) 置换区中多肽骨架的结构,例如,片层或螺旋构象,(b) 分子在靶位点处的电荷或疏水性,或(c) 侧链体积。一般预期使蛋白性质产生最大改变的置换将是如下的那些:其中(a) 亲水残基例如丝氨酰基或苏氨酰基置换(或被置换为)疏水残基例如亮氨酰基、异亮氨酰基、苯丙氨酰基、缬氨酰基或丙氨酰基;(b) 半胱氨酸或脯氨酸置换(或被置换为)任何其他残基;(c) 具有电正性侧链的残基例如赖氨酰基、精氨酰基或组氨酰基置换(或被置换为)电负性残基例如谷氨酰基或天冬氨酰基;或(d) 具有大侧链的残基例如苯丙氨酸置换(或被置换为)没有侧链的残基例如这种情况下为精氨酸,(e) 通过增加硫化和/或糖基化的位点数目。

[0221] 例如,本领域技术人员已知一个氨基酸残基被生物学和/或化学上类似的另一个氨基酸残基的代替为保守性置换。例如,保守性置换是用一个疏水残基代替另一个疏水残基或者用一个极性残基代替另一个极性残基。置换包括组合,例如 Gly、Ala;Val、Ile、Leu; Asp、Glu;Asn、Gln;Ser、Thr;Lys、Arg;和 Phe、Tyr。每个明确公开的序列的此类保守性置换变化包括在本文提供的嵌合多肽(mosaic polypeptide)内。

[0222] 置换或缺失诱变可用于N-糖基化(Asn-X-Thr/Ser)或O-糖基化(Ser或Thr)的插入位点。半胱氨酸或其他不稳定残基的缺失可能也是合乎需要的。对潜在蛋白水解位点(例如Arg)的缺失或置换可以例如通过缺失碱性残基之一或者通过谷氨酰胺基或组氨酰胺基置换一个碱性残基来完成。

[0223] 某些翻译后衍生化是由于重组宿主细胞对所表达的多肽的作用。谷氨酰胺基和天冬酰胺基残基常常被翻译后脱酰胺为相应的谷氨酰胺基和天冬氨酰胺基残基。可选地,将这些残基在温和酸性条件下脱酰胺。其他翻译后修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化;丝氨酰胺基或苏氨酰胺基残基的羟基的磷酸化;赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基基团的甲基化(T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 第79-86页[1983]), N末端胺的乙酰化和在一些情况下、C末端羧基的酰胺化。

[0224] 应理解,确定本文公开的蛋白的变体和衍生物的一种方式是根据对具体已知序列的同源性/同一性确定变体和衍生物。特别地公开了与所述序列具有至少70%或75%或80%或85%或90%或95%同源性的这些或其他蛋白序列的变体。本领域技术人员容易理解如何确定两个蛋白的同源性。例如,同源性可以在比对所述两个序列以使得同源性达到其最高水平之后来计算。

[0225] 计算同源性的另一种方式可以通过所公开的算法来进行。用于比较的序列最佳比对可以通过以下来进行:Smith and Waterman *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981)的局部同源性算法,Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443(1970)的同源性比对算法,通过Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:2444(1988)的相似性检索方法,通过这些算法的计算机化工具(GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA, Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI),或者通过检查。

[0226] 可以通过例如Zuker, *M. Science* 244:48-52, 1989; Jaeger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7706-7710, 1989; Jaeger et al. *Methods Enzymol.* 183:281-306, 1989中公开的算法获得核酸的相同类型的同源性,上述文献在此通过引用并入至少与核酸比对相关的内容。

[0227] 应理解,对保守性突变和同源性的描述可以以任何组合形式结合,例如与具体序列具有至少70%同源性的实施方案,其中所述变体是保守性突变。

[0228] 当本说明书讨论各种蛋白和蛋白序列时,应理解,还公开了可编码那些蛋白序列的核酸。这将包括与具体蛋白序列相关的所有简并序列,即,具有编码一个具体蛋白序列的序列的所有核酸以及编码所述蛋白序列的公开变体和衍生物的所有核酸,包括简并核酸。因此,虽然每个具体核酸序列可能未在本文写出,但应理解,每一个序列事实上通过所公开的蛋白序列而在本文中被公开和描述。

[0229] 应理解,存在可加入所公开的组合物的大量氨基酸和肽类似物。例如,存在许多D氨基酸或具有不同于天然氨基酸的功能取代基的氨基酸。公开了天然存在的肽的相反立体异构体以及肽类似物的立体异构体。这些氨基酸可以通过用选定的氨基酸使tRNA分子荷电和经工程改造基因构建体而被容易地加入多肽链中,所述经工程改造的基因构建体利用琥珀密码子将类似氨基酸以位点特异性方式插入肽链(Thorson et al., *Methods in Molec. Biol.* 77:43-73(1991), Zoller, *Current Opinion in Biotechnology*, 3:348-354(1992);

Ibba, *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 13:197-216(1995), Cahill et al, *TIBS*, 14(10):400-403(1989); Benner, *TIBTech*, 12:158-163(1994); Ibba and Hennecke, *Bio/technology*, 12:678-682(1994), 上述所有文献在此通过引用并入至少与氨基酸类似物相关的内容)。

[0230] 可以产生与肽类似但不经天然肽键连接的分子。例如, 氨基酸或氨基酸类似物的键可以包括 $\text{CH}_2\text{NH--}$ 、 $\text{--CH}_2\text{S--}$ 、 $\text{--CH}_2\text{--CH}_2\text{--}$ 、 --CH=CH-- (顺式和反式)、 $\text{--COCH}_2\text{--}$ 、 $\text{--CH(OH)CH}_2\text{--}$ 和 --CHHSO-- (这些和其他可以见于 Spatola, A.F. in *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, B. Weinstein eds., Marcel Dekker, New York, p. 267(1983); Spatola, A.F., *Vega Data* (March 1983), Vol. 1, issue 3, *Peptide Backbone Modifications* (general review); Morley, *Trends Pharm Sci* (1980) pp. 463-468; Hudson, D. et al., *Int J Pept Prot Res* 14:177-185(1979) ($\text{--CH}_2\text{NH--}$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{--}$); Spatola et al. *Life Sci* 38:1243-1249(1986) ($\text{--CH H}_2\text{--S}$); Hann J. *Chem. Soc Perkin Trans. I* 307-314(1982) (--CH--CH-- , 顺式和反式); Almquist et al. *J. Med. Chem.* 23:1392-1398(1980) ($\text{--COCH}_2\text{--}$); Jennings-White et al. *Tetrahedron Lett* 23:2533(1982) ($\text{--COCH}_2\text{--}$); Szelke et al. *European Appln*, EP 45665CA(1982):97:39405(1982) ($\text{--CH(OH)CH}_2\text{--}$); Holladay et al. *Tetrahedron. Lett* 24:4401-4404(1983) ($\text{--C(OH)CH}_2\text{--}$); 和 Hruby *Life Sci* 31:189-199(1982) ($\text{--CH}_2\text{--S--}$); 每一篇文献在此通过引用并入。特别优选的非肽键合是 $\text{--CH}_2\text{NH--}$ 。应理解, 肽类似物可以在所述键原子之间具有超过一个原子, 例如 b- 丙氨酸、g- 氨基丁酸等。

[0231] 氨基酸类似物和肽类似物通常具有增强的或合乎需要的性质, 例如更经济的生产、更大的化学稳定性、增强的药理性质 (半衰期、吸收、效价、效力等)、改变的特异性 (例如, 广谱的生物活性)、减少的抗原性等。

[0232] D- 氨基酸可以用于产生更稳定的肽, 因为 D 氨基酸不被肽酶等识别。用相同类型的 D- 氨基酸全面置换共有序列的一个或多个氨基酸 (例如 D- 赖氨酸替代 L- 赖氨酸) 可用于产生更稳定的肽。半胱氨酸残基可用于环化或连接两个或更多肽。这可能有益于将肽限制于具体构象 (Rizo and Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61:387(1992), 在此通过引用并入)。

[0233] 12. 核酸

[0234] 存在许多基于核酸的本文公开的分子, 包括例如编码例如本文公开的肽两亲物的核酸。所公开的核酸可以构成例如核苷酸、核苷酸类似物或核苷酸替代物。这些和其他分子的非限制性实例在本文讨论。应理解, 例如, 当载体在细胞中表达时, 所表达的 mRNA 通常由 A、C、G 和 U 构成。同样, 应理解, 如果例如反义分子是通过例如外源递送被引入细胞或细胞环境中, 那么有利的是, 反义分子是由核苷酸类似物构成, 所述核苷酸类似物可降低所述反义分子在细胞环境中的降解。

[0235] 核苷酸是含有碱基部分、糖部分和磷酸部分的分子。核苷酸可以通过其磷酸部分和糖部分连接在一起, 产生核苷间键合。核苷酸的碱基部分可以是腺嘌呤 -9- 基 (A)、胞嘧啶 -1- 基 (C)、鸟嘌呤 -9- 基 (G)、尿嘧啶 -1- 基 (U) 和胸腺嘧啶 -1- 基 (T)。核苷酸的糖部分是核糖或脱氧核糖。核苷酸的磷酸部分是五价磷酸。核苷酸的非限制性实例是 3' -AMP (3' - 腺苷一磷酸) 或 5' -GMP (5' - 鸟苷一磷酸)。存在许多种本领域中可用和本文中可用的这些类型的分子。

[0236] 核苷酸类似物是含有对碱基部分、糖部分和 / 或磷酸部分的某种类型的修饰的核苷酸。对核苷酸的修饰是本领域中公知的并且包括例如 5- 甲基胞嘧啶 (5-me-C)、5- 羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤和 2- 氨基腺嘌呤以及在糖部分或磷酸部分处的修饰。存在许多种在本领域中可用和本文中可用的这些类型的分子。

[0237] 核苷酸替代物是具有与核苷酸类似的功能性质但不含磷酸部分的分子例如肽核酸 (PNA)。核苷酸替代物是以 Watson-Crick 或 Hoogsteen 方式识别核酸但通过不同于磷酸部分的部分连接在一起的分子。当与适当的靶核酸相互作用时,核苷酸替代物能够符合双螺旋型结构。存在许多种在本领域中可用和本文中可用的这些类型的分子。

[0238] 还可能将其他类型的分子 (缀合物) 与核苷酸或核苷酸类似物连接以增强例如细胞摄取。缀合物可以化学方法连接至核苷酸或核苷酸类似物。此类缀合物包括但不限于脂质部分,例如胆固醇部分 (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556)。存在许多种在本领域中可用和本文中可用的这些类型的分子。

[0239] Watson-Crick 相互作用是至少一种与核苷酸、核苷酸类似物或核苷酸替代物的 Watson-Crick 面的相互作用。核苷酸、核苷酸类似物或核苷酸替代物的 Watson-Crick 面包括基于嘌呤的核苷酸、核苷酸类似物或核苷酸替代物的 C2、N1 和 C6 位置以及基于嘧啶的核苷酸、核苷酸类似物或核苷酸替代物的 C2、N3 和 C4 位置。

[0240] Hoogsteen 相互作用是发生在核苷酸或核苷酸类似物的 Hoogsteen 面上的相互作用,所述核苷酸或核苷酸类似物暴露于双链 DNA 的大沟中。Hoogsteen 面包括嘌呤核苷酸的 N7 位置和 C6 位置处的反应性基团 (NH₂ 或 O)。

[0241] 存在许多与参与本文公开的信号传导途径的蛋白分子相关的序列,它们全部由核酸编码或者是核酸。这些基因的人类似物以及其他类似物、这些基因的等位基因、剪接变体和其他类型变体的序列可在许多蛋白和基因数据库 (包括 Genbank) 中获得。在本申请提交时可在 Genbank 获得的那些序列以及其中含有的个体子序列在此通过引用整体并入本文。Genbank 可以在 <http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgi> 访问。本领域技术人员理解如何解决序列偏差和不同以及如何调整涉及具体序列或其他相关序列的组合物和方法。考虑本文中公开和本领域中已知的信息,可以为任何给定序列设计引物和 / 或探针。

[0242] C. 制备 ECM 模仿纳米基质的方法

[0243] 还公开了一种制备模仿内皮的纳米基质的方法,包括诱导一种或多种本文公开的肽两亲物自组装成纳米纤维。所述自组装可以通过例如在固体表面上干燥包括一种或多种肽两亲物的液体组合物来诱导。诱导肽两亲物自组装的其他方法是本领域中已知的并且可用于所公开的方法中。例如,组装可以由二价离子 (氯化钙) 或 pH 诱导。

[0244] 所公开的方法还可以包括将一种或多种肽两亲物与一氧化氮反应生成二醇二氮烯鎓修饰的肽。例如,二醇二氮烯鎓修饰的肽可以包括序列 $[K[N(O)NO]]_n$ 。在一些方面,n 是 1 至 20。在一些方面,n 是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或更高。因此,二醇二氮烯鎓修饰的肽可以包括序列 $[K[N(O)NO]]_5$ 。

[0245] D. 使用 ECM 模仿纳米基质的方法

[0246] 还公开了一种包括用本文公开的模仿内皮的纳米基质包裹医疗装置的方法。该方法可以包括诱导本文公开的一种或多种肽两亲物在医疗装置上自组装成纳米纤维。例如,该方法可以包括在医疗装置上干燥包含所述一种或多种肽两亲物的液体组合物。

[0247] 所述医疗装置可以是已知或标示为在受试者体内使用的任何装置。优选地,所述医疗装置是被插入心血管系统中的医疗装置。

[0248] 所述医疗装置可以包括适合用作外科手术植入物的任何材料。例如,所述医疗装置可以包括钛合金。所述医疗装置可以包括钴-铬(cromium)。所述医疗装置可以包括镍-钛。所述医疗装置可以包括生物可降解的聚合物。

[0249] 在一些方面,所述医疗装置是血管支架。例如,所述支架可以是裸金属支架。在一些方面,所述支架是药物洗脱支架。例如,所述支架可以是西罗莫司洗脱支架或紫杉醇洗脱支架。

[0250] 在一些方面,所述医疗装置是血管移植物。在一些方面,所述医疗装置是导管。在一些方面,所述医疗装置是起搏器。在一些方面,所述医疗装置是心瓣膜。

[0251] 还考虑到,所公开的模仿内皮的纳米基质组合物可以进一步包括一种或多种生物活性剂。例如,在一个方面,模仿内皮的纳米基质可以包括有效量的一种或多种生物活性剂。

[0252] 还考虑到,所公开的模仿内皮的纳米基质组合物可以进一步包括一种或多种药学活性剂。例如,在一个方面,模仿内皮的纳米基质可以包括有效量的一种或多种药学活性剂。

[0253] E. 制备亲水肽的方法

[0254] 除非另外明确说明,本文公开的组合物和进行所公开的方法必需的组合物可以使用本领域技术人员已知的用于该具体试剂或化合物的任何方法制备。

[0255] 1. 肽合成

[0256] 产生所公开的蛋白(例如 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:11)的一种方法是通过蛋白质化学技术将两种或多种肽或多肽连接在一起。例如,肽或多肽可以使用目前可用的实验室设备以化学方法合成,使用 Fmoc(9-苄基甲氧羰基)或 Boc(叔丁基氧羰基)化学法(Applied Biosystems, Inc., FosterCity, CA)。本领域技术人员可以容易地理解,例如,对应于所公开蛋白的肽或多肽可以通过标准化学反应合成。例如,肽或多肽可以被合成并且不从其合成树脂切下,而肽或蛋白的其他片段可以被合成并随后从所述树脂切下,从而暴露在其他片段上被功能性阻断的末端基团。通过肽缩合反应,这两个片段可以通过分别在其羧基末端和氨基末端的肽键共价结合形成抗体或其片段(Grant GA(1992)Synthetic Peptides:A User Guide.W.H.Freeman and Co.,N.Y.(1992);Bodansky M and Trost B.,Ed.(1993)Principles of Peptide Synthesis.Springer-Verlag Inc.,NY(其在此通过引用并入至少与肽合成相关的内容)。或者,所述肽或多肽如本文所述在体内独立合成。一经分离,这些独立的肽或多肽可以通过类似的肽缩合反应连接形成肽或其片段。

[0257] 例如,克隆或合成的肽区段的酶促连接允许结合相对短的肽片段以产生较大的肽片段、多肽或完整蛋白结构域(Abrahmsen L et al.,Biochemistry,30:4151(1991))。或者,合成肽的天然化学连接可以被用于从较短的肽片段以合成方法构建大的肽或多肽。该方法由两步化学反应组成(Dawson et al.Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation.Science,266:776-779(1994))。第一步是未保护的合成肽-硫酯与含有氨基末端 Cys 残基的另一个未保护的肽区段的化学选择性反应,产生硫酯连接的中间体作为最初的共价产物。在不改变反应条件的情况下,该中间体发生自发的快速分子内反应以在

连接位点形成天然肽键 (Baggiolini M 等. (1992)FEBSLett. 307 :97-101 ;Clark-Lewis I et al., J.Biol.Chem., 269 :16075(1994) ;Clark-Lewis I et al., Biochemistry, 30 : 3128(1991) ;Rajaratnam K et al., Biochemistry 33 :6623-30(1994))。

[0258] 或者,未保护的肽区段是以化学方法连接的,其中在所述肽区段之间由于化学连接而形成的键是非自然(非肽)的键(Schnolzer,M et al.Science,256 :221(1992))。该技术用于合成具有完全生物活性的蛋白结构域的类似物以及大量相对纯的蛋白质(deLisle Milton RC et al.,Techniques in ProteinChemistry IV.Academic Press,New York,第 257-267 页(1992))。

[0259] 2. 核酸合成

[0260] 产生所公开的蛋白(例如 SEQ ID NO :1 至 SEQ ID NO :11)的另一种方法是产生编码与表达控制序列可操作连接的所公开蛋白的核酸。此类核酸可以使用标准化学合成方法制备,或者可以使用酶促方法或任何其他已知方法制备。此类方法可以包括从标准酶促消化、随后进行核苷酸片段分离的方法(参见例如,Sambrook et al.,Molecular Cloning: A Laboratory Manual,第 2 版(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor, N. Y.,1989)第 5、6 章)至纯合成的方法,例如通过使用 Milligen 或 Beckman System 1PlusDNA 合成仪(例如,Milligen-Biosearch,Burlington, MA 的 8700 型自动化合成仪,或 ABI Model 380B)的氰基乙基亚磷酰胺法。用于制备寡核苷酸的合成方法还记载于 Ikuta et al.,Ann.Rev.Biochem. 53 :323-356(1984)(磷酸三酯和亚磷酸三酯方法)和 Narang et al.,Methods Enzymol.,65 :610-620(1980)(磷酸三酯方法)。蛋白核酸分子可以使用已知方法例如由 Nielsen et al.,Bioconjug. Chem. 5 :3-7(1994)中描述的那些方法制备。

[0261] F. 制备肽两亲物的方法

[0262] 本文还公开了一种制备肽两亲物的方法,包括如下步骤:a) 提供亲水肽,该亲水肽包括降解序列以及内皮细胞粘附序列和生成一氧化氮的供体序列中的一种或多种;和 b) 用疏水部分烷基化所述亲水肽的 N 端。在另一方面,烷基化可以包括用疏水羧酸酰胺化。疏水羧酸可以是脂肪酸。脂肪酸可以是棕榈酸。

[0263] 应考虑到,所公开的两亲物可以通过用常规合成技术连接疏水部分来制备。例如,疏水部分可以被连接在亲水肽的 N 端。即,疏水性亲电化合物(例如烷基卤化物、羧酸化合物)可以与 N 末端存在的胺官能反应而提供共价键(例如仲胺或叔胺、酰胺)。

[0264] 在其他实例中,疏水部分可以被连接在亲水肽的 C 端。即,疏水性亲核化合物(例如,醇、胺、硫醇)可以与 C 端存在的羧酸官能团反应而提供共价键(例如,酯、酰胺、硫酯)。还应考虑到,C 端存在的羧酸官能团可以在反应之前被衍生化或还原。例如,羧酸官能团可以被还原以生成醇,并随后与一种或多种疏水性亲电化合物(例如,烷基卤化物、羧酸化合物)反应而提供共价连接(例如,醚、酯)。

[0265] 如本领域技术人员容易理解的,肽序列可以包括具有一个或多个悬垂基团的肽残基。在多个方面,悬垂基团可以包括一种或多种亲核部分(例如胺、羟基、巯基)或一种或多种亲电部分(例如羧酸官能团)。此类部分可以这样的方式反应,所述方式类似于上文针对所公开的亲水肽的 N 端和 C 端而公开的方式。

[0266] G. 实施例

[0267] 提出下述实施例以为本领域普通技术人员提供对如何制备和评价本文要求保护的化合物、组合物、物品、装置和 / 或方法的完整公开和描述, 并且将是纯示例性的并且不旨在限制本公开内容。已经做出努力以保证与数字 (例如量、温度等) 相关的准确性, 但是应该考虑一些误差和偏差。除非另外指明, 份是重量份, 温度是℃或者室温, 并且压力是在或接近大气压。

[0268] 1. 实施例 1:

[0269] i. 材料和方法

[0270] a. 肽两亲物的合成

[0271] 两个由 MMP-2 敏感序列 (GTAGLIGQ; SEQ ID NO:1) 与细胞粘附序列 YIGSR (SEQ ID NO:2) (“PA-YIGSR”) 或 NO 供体序列 KKKKK (SEQ IDNO:3) (“PA-KKKKK”) 组成的 13-氨基酸肽使用标准 Fmoc 化学法在 Advanced Chemtech Apex 396 肽合成仪上合成。烷基化是通过使肽的 N 端在室温下与 2 当量的棕榈酸、2 当量的邻苯并三唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯 (HBTU) 和 4 当量的二异丙基乙胺 (DiEA) 在二甲基甲酰胺 (DMF) 中反应 12 小时而获得。在重复烷基化反应之后, 使用 90:1:1:1 比例的三氟乙酸 (TFA)、去离子 (DI) 水、三异丙基硅烷和茴香醚的混合物在室温下进行 PA 的裂解和脱保护 3 小时。将所述溶液使用旋转蒸发器浓缩。将 PA 在冷醚中沉淀、收集并真空干燥。将粗 PA 以 2wt% 的浓度溶解于 DI 水。PA 是通过基质辅助激光解析离子化飞行时间 (MALDI-TOF) 质谱来分析。

[0272] b. 透射电子显微镜 (TEM) 成像

[0273] 对于 TEM 样品, 将 5 μ l 每种 0.1wt% PA 水溶液浇注在碳包裹的聚乙烯醇缩甲醛铜 (formvar copper) 载网 (400 目) 上。该网被干燥过夜。在成像之前, 将干燥的样品用 10 μ l 20% 磷钨酸 (PTA) 负染色 30 秒。将所述样品在 FEI Tecnai T12TEM 显微镜上在 60kV 加速电压下成像 (42000x, 52000x)。

[0274] c. 肽两亲物自组装成纳米纤维

[0275] 在 DI 水 (pH 7.4) 中制备 PA-YIGSR 和 PA-KKKKK 的 0.1wt% 储液并以 9:1 (“PA-YK”) 的摩尔比混合。将 PA-YK 溶液以每孔 50 μ l 放入与盖玻片连接的 12 孔硅酮 flexiPERM 细胞培养室。该室放入化学通风橱中 24 小时以通过溶剂蒸发诱导自组装。将该室在 37℃ 孵育箱中进一步再干燥 48 小时。

[0276] d. 细胞保持

[0277] 将人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 在内皮生长培养基 (EGM) 完全培养基 (0.1% 庆大霉素 / 两性霉素 B) 中生长。该细胞培养基用于所有 HUVEC 实验。细胞通过胰蛋白酶消化 (0.05% 胰蛋白酶 / EDTA) 传代并以 2500-5000 细胞 / cm^2 的密度再培养。将人主动脉平滑肌细胞 (AoSMC) 在平滑肌细胞基础培养基 (SmBM) SingleQuot® 试剂盒完全培养基 (0.1% 庆大霉素 / 两性霉素 B) 中生长。该细胞培养基用于所有 AoSMC 实验。细胞通过胰蛋白酶消化 (0.05% 胰蛋白酶 / EDTA) 传代并以 3500 细胞 / cm^2 的密度再培养。所有细胞培养物保持在标准培养条件下 (37℃、95% 相对湿度和 5% CO_2)。所有细胞和培养基购自 Lonza Inc. (Walkersville, MD)。

[0278] e. HUVEC 和 AoSMC 在 PA-YK 纳米基质上的最初附着和铺展

[0279] 如本文公开的, 准备 PA-YK 纳米基质包裹的培养室。对于最初细胞附着, 将 HUVEC 和 AoSMC 分别以 30,000 细胞 / cm^2 和 15,000 细胞 / cm^2 的密度接种在 PA-YK 纳米基质包裹

的培养室。2 小时孵育之后,将细胞用钙黄绿素 AM 绿色荧光染料和溴化乙锭同二聚体-1 红色荧光染料染色,使用 LIVE/DEAD 存活/细胞毒性试剂盒 (Molecular Probes, Eugene, OR)。每个视野 (20×) 的附着细胞数目是使用荧光显微镜 (Nikon Eclipse E2000) 测定,并且通过平均五个随机视野来平均每个样品。个体细胞铺展是通过图像加工软件 (NIS-elements AR 2.30) 分析。

[0280] f. 在 PA-YK 和 PA-YK-NO 纳米基质上的血小板粘附

[0281] PA-YK 和 PA-YK-NO 溶液是如本文所述制备并通过在 13mm 圆形盖玻片上滴加 150 μ l 所述溶液浇注成膜。2.5mg/ml 胶原 I 的溶液是在 3% 冰醋酸中制备并以相同方式浇注成膜以用作对照表面。来自健康志愿者的全血被收集在 BD Vacutainer® 肝素管 (BD, NJ) 中并与 10 μ M 米帕林混合以荧光标记血小板。在实验之前,将 PA-YK、PA-YK-NO 和胶原膜用 PBS 冲洗。之后,将胶原 I、PA-YK、PA-YK-NO 膜在 37°C 下与米帕林标记的血液单独孵育 15 分钟,然后用 PBS 冲洗。每个视野 (40×) 粘附血小板的数目是使用荧光显微镜 (Nikon Eclipse E2000) 通过平均每个样品的五个随机视野测定。

[0282] g. 洗涤的 NO 的制备

[0283] 首先,NO 溶液可以被涤气 (scrub)。涤气是气体穿过液体的大表面区域以去除气流中不想要的杂质的过程。在这种情况下,将市售一氧化氮通过可溶解不想要的较高氧化氮物质的碱溶液。图 4 所示的设备首先用氩气脱气。将 NO 经 5M NaOH 溶液涤气并收集在含有 PA-YK 溶液的反应容器中。

[0284] h. 释放 NO 的纳米基质的合成 (PA-YK-NO)

[0285] “PA-YK-NO”是通过使 PA-YK 与经涤气的 NO 在氩气下反应来合成。使 0.1wt% PA-YK 水溶液在室温和氩气下于 100mL 圆底烧瓶中与经涤气的 NO 溶液反应过夜。通过将 130 μ l 所得到的 PA-YK 溶液滴加在 13mm 盖玻片上而浇注成膜。将所述膜首先在化学通风橱中干燥 24 小时,然后在 37°C 下再干燥 48 小时。为了确定 NO 释放情况,每个 PA-YK-NO 膜在 24 孔组织培养板 (Corning Inc., Corning, NY) 中于 500 μ l HBS 中孵育。HBS 被收集、冷冻 (-20°C) 并在 1 个月的不同时间点用新鲜 HBS 替代。然后确认来自 PA-YK-NO 纳米基质的 NO 释放,并使用 Greiss 测定法定量,所述测定法含有磺胺和 N-1 萘基乙二胺二盐酸盐 (Promega, WI) 以测量亚硝酸盐含量,其是 NO.56 的主要降解产物。在第 5 天末,将每个收集的样品与 100 μ l Griess 试剂混合。在室温孵育 15 分钟后,将所述样品使用吸光度微板读数器 (ELX800, BIO-TEK Instrument, VT) 在 540nm 读数。

[0286] i. 评估 HUVEC 和 AoSMC 在 PA-YK-NO 纳米基质上的增殖

[0287] PA-YK-NO 和 PA-YK 膜如本文所述制备,并且在 UV 下灭菌 4 小时。通过增殖细胞核抗原 (PCNA) 染色评估 HUVEC 和 AoSMC 的增殖。PCNA 是一种存在于细胞核中的在起始细胞增殖时起作用的 36kDa 非组蛋白的蛋白。其主要存在于细胞周期 S 晚期的细胞核中,使之成为细胞增殖的理想标记物。将 HUVEC 和 AoSMC 分别以 30,000 细胞/cm² 和 15,000 细胞/cm² 的密度接种。细胞在标准培养条件 (37°C、95% 相对湿度和 5% CO₂) 下孵育。48 小时孵育之后,细胞在 10% 中性缓冲的福尔马林溶液 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 中固定并用 PBS 冲洗。然后将细胞在组织学级的甲醇 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 中孵育、随后用 PBS 冲洗而将其透化。3% 过氧化氢溶液被用于阻断内源性过氧化物酶。在用 PBS 冲洗之后,将所述细胞用 tris 缓冲的盐水孵育,随后用在含有 3% FBS 的磷酸盐缓

冲盐水 (PBS) 中 1 : 100 稀释的小鼠 IgG 抗-PCNA 一级抗体 (Dako Corp., Carpinteria, CA) 孵育。在吸出所述一级抗体并用 PBS 冲洗之后, 将所述细胞用在含有 3% FBS 的 PBS 中 1 : 100 稀释的抗小鼠 IgG HRP (Dako Corp., Carpinteria, CA) 孵育, 随后用氨基乙基咔唑 (aminoethylcarbazole) 生色团 (Dako Corp., Carpinteria, CA) 孵育。所述生色团产生红色沉淀物, 表示增殖细胞。然后将所述细胞用 PBS 冲洗, 并用 Mayer 苏木精复染。通过用 37mM 氢氧化铵冲洗样品 2-3 次洗掉过量苏木精。每个视野 (20×) 的增殖细胞百分比是通过在平均每个样品的五个视野后使用相差显微镜 (Nikon Eclipse E2000) 计数所述红色增殖细胞和苏木精染色的蓝色非增殖细胞来确定。

[0288] j. 统计学分析

[0289] 所有数据均是使用 SPSS 软件用单向 ANOVA 检验来比较。低于 0.05 的 p 值被认为是统计学上显著的。

[0290] ii. 结果

[0291] a. 肽两亲物自组装成纳米纤维

[0292] 成功合成 PA-YIGSR 和 PA-KKKKK, 并且通过 MALDI-Tof 质谱确认其分子量。通过混合 9 : 1 摩尔比的 PA-YIGSR 和 PA-KKKKK 的 0.1wt % 溶液, 合成了 PA-YIGSR 和 PA-KKKK (“PA-YK”) 的杂合肽两亲物。PA 自组装成纳米纤维的过程是通过如前所述蒸发溶剂来诱导。释放 NO 的 PA-YK-NO 是通过使 PA-YK 与 NO 在氩气下进一步反应来合成。TEM 图像 (图 4) 证明了 PA 通过溶剂蒸发而成功自组装成纳米纤维。所获得的纳米纤维在尺寸上与之前使用二价离子或 pH 改变的自组装研究中报道的那些相似。

[0293] b. 评价初始细胞附着和铺展

[0294] 将 HUVEC 和 AoSMC 单独接种在 PA-YK 纳米基质上并评估细胞附着, 以确定内皮细胞是否识别纳米基质中的粘附性配体 YIGSR。发现 HUVEC 的初始附着略高于 AoSMC (图 5)。这通过评估 2 小时后 HUVEC 和 AoSMC 在 PA-YK 纳米基质上的铺展来确认 (图 6 和 7)。2 小时后, 发现 HUVEC 的铺展是 AoSMC 的三倍。结果表明, HUVEC 可以识别加入 PA-YK 中的 YIGSR, 意味着 PA-YK 纳米基质可促进 HUVEC 附着和铺展。

[0295] c. 评价血小板在 PA-YK 纳米基质上的附着

[0296] 使用米帕林标记的全血评价血小板在 PA-YK-NO 和 PA-YK 纳米基质上的附着。在 PA-YK 纳米基质上血小板粘附是阳性对照胶原 I 的约 50 分之一。而且, 血液暴露于释放 NO 的 PA-YK-NO 纳米基质导致实际上没有血小板附着 (图 8)。

[0297] d. NO 从 PA-YK-NO 纳米基质释放

[0298] 在一个月的时段内 NO 从 PA-YK-NO 纳米基质的释放情况示于图 10。大多数 NO 在前 24 小时释放, 随后在两周时段内缓慢持续释放, 随后另外一个爆发释放, 导致约 53% NO 的回收。100% NO (8.6 微摩尔) 的值是通过假设 PA-YK 中的每一个赖氨酸残基均与两分子 NO 反应来计算的。

[0299] e. 评价 HUVEC 和 AoSMC 在 PA-YK-NO 纳米基质上的增殖

[0300] 为了检验 NO 对 HUVEC 和 AoSMC 的作用, 将细胞接种在 PA-YK-NO 纳米基质包裹的培养室。在孵育 48 小时后, 使用 PCNA 染色评价细胞增殖。作为对照, 还在 PA-YK 纳米基质上进行了平行增殖实验。如图 9 所示, 发现 PA-YK-NO 上 PCNA 阳性 HUVEC 的百分比 ((66.8 ± 1.94) %) 显著大于 PA-YK ((50.29 ± 3.4) %)。相反, PA-YK-NO 上 PCNA 阳性 AoSMC

的百分比 ($(16.4 \pm 2.8)\%$) 显著小于 PA-YK ($(34.8 \pm 1.9)\%$)。

[0301] 2. 实施例 2: 模仿天然内皮的自组装纳米基质的体内评估

[0302] 将自组装纳米基质包裹的支架植入兔髂动脉并通过用于证明狭窄和血栓的组织形态测定术来评价。

[0303] i. 材料和方法

[0304] a. 支架包裹和鉴定

[0305] 为了用 PA 溶液进行均一包裹, 将市售不锈钢支架安装在以 15rpm 速度旋转的发动机连接的轴柄 (不锈钢丝 -0.018 英寸直径) 上。将所述旋转的支架浸入如图 11 所示的顶开口贮器中含有的 PA 溶液中。所述顶开口贮器促进在支架表面上蒸发诱导的 PA 自组装成纳米基质。支架旋转保证 PA 纳米纤维在支架整个外表面和内表面上的均一包裹。支架两端的塞头 (stopper) 防止支架在轴柄上滑动。将支架在 PA 溶液中旋转 12 小时, 然后使其再干燥 24 小时。图 12 显示在经过临床医师处理之后 $0.1\text{wt}\%$ PAYK 包裹的支架的 SEM 图像。应注意, 平滑均一的包裹表面在处理 (安装在血管成形术气囊上并膨胀) 之后没有被破坏。这一结果表明, PA 纳米基质可以均一包裹在支架上并在处理过程中保持稳定。

[0306] b. 用于体内评估的研究组

[0307] 雄性白色新西兰兔用于该研究。每组使用一只兔, 每只兔植入两个支架。有 2 个不同的纳米基质包裹的和 1 个未包裹的裸金属不锈钢支架被评价。将每种支架类型在 2 周和 4 周时评价, 如下: 对照 (裸金属支架) 2 周、4 周; 低剂量 ($0.1\text{wt}\%$ PAYKNO 包裹的) 2 周、4 周; 和高剂量 ($1\text{wt}\%$ PAYKNO 包裹的) 2 周、4 周。对于两周时间点, 在没有在先气囊损伤的情况下植入所有支架。所有兔在手术之前圈养至少两天。手术方案由 Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC), University of Alabama, Birmingham 批准并在下文描述。

[0308] c. 支架植入

[0309] 操作当天, 将所述兔用氯胺酮 / 甲苯噻嗪 $35/5\text{mg/kg}$ 麻醉。气管导管被插入并连接至呼吸器, 所述呼吸器以每分钟 16 次呼吸的速率、 400ml 呼吸容量运行。使用 2% 异氟烷维持麻醉。使用置于动物舌头上的脉搏血氧测定仪监测心率和血氧饱和度。使用后肢上的套囊连续监测血压。将兔以屈膝背卧位固定至桌子上。在操作前一天开始, 每天经口施用 81mg/天 的阿司匹林, 直至安乐处死。

[0310] 手术暴露右颈动脉并获得血管通路。6 鞘管 (French Sheath) 被插入颈动脉并静脉内施用肝素 (150 单位 / kg)。在透视导向下, 6French JR4 冠状动脉导管经 $0.014''$ 冠状动脉导线向前伸至降主动脉。使用经导管注射的大约 8ccs 泛影葡胺造影剂进行血管造影术。以数字方法记录基线动脉造影照片。在进行血管造影术之后, 安装在递送气囊上的支架经导线向前伸入一个髂动脉。将支架展开为略微过大, 支架与动脉比例为 $1.1 : 1$ 。将第二支架以相同方式展开在另一个髂动脉中。在支架植入后, 导管、导线和动脉套管被去除。颈动脉被连接。缝合伤口。然后使动物在观察中恢复。自操作完成时开始, 每 12 小时肌肉内给药 Buprenex (0.05mg/kg)。

[0311] 每天监测动物的以下情况: 任何显著的食欲不振 / 体重减轻 (超过 20% 的体重减轻) 和下肢中血液循环缺损。

[0312] d. 支架采集

[0313] 在支架植入后 2 周和 4 周进行安乐处死,对支架髂动脉进行压力灌注,用福尔马林固定。取出支架并放入 10%缓冲的福尔马林中以进行组织学研究。

[0314] e. 组织加工

[0315] 将所有固定的支架脱水并埋入异丁烯酸甲酯树脂。在完全聚合后,通过初磨使目的区域接近表面。将所述单元块对侧使用 Technovit 4000 (Exakt Technologies, Inc., Oklahoma City, OK) 固定在载玻片上。使用 ExaktDiamond Saw (Exakt Technologies, Inc., Oklahoma City, OK) 从每个样本切片(约 100 微米厚),其在某种程度上类似带有水冷却和冲洗系统的利用镀钴切割带的大带锯。使用 Exakt Grinding System (Exakt Technologies, Inc., Oklahoma City, OK) 将切片磨成约 20-30 μm ,其产生精确平行的表面,并使用增加粒度的砂纸弄平滑。在获得可研究的样本表面之后,将其用 4000 粒度砂纸抛光以产生尽可能平滑的表面。在支架 25%、50%和 75%的区域制作切片。所有切片用亚甲蓝/碱性品红染剂染色。

[0316] 组织学分析包括损伤、血栓形成、炎症和新内膜的存在情况。对支架区段进行分析并使用 Schwartz 损伤评分对动脉损伤评级。还使用等级量表评估每个支撑物周围的炎症和血栓。每个支撑物的新内膜厚度以微米计量。计算机指导的形态测量是使用数字图像和 Bioquant 图像分析软件 (Bioquant Image Analysis Corp, Nashville, TN) 进行。进行计算机化的测面法。

[0317] ii. 结果

[0318] 图 13A 显示了兔髂动脉中气囊膨胀成功展开的支架。如图 13B 所示,支架总体上被完全展开,并且具有最小的潜在组织损伤。血管是完整和开放的。注意到纳米基质包裹物没有剥落或剥离。在支架支撑物周围发现最小的炎症。值得注意的是,存在非常少的新内膜增生并且纳米基质包裹的支架表面没有发现血栓。

[0319] 为每个支架支撑物指定如下 0 至 3 的损伤评分:0 = 无损伤;1 = 内弹性膜的破裂;2 = 介质的穿孔;和 3 = 外弹性膜到外膜的穿孔。

[0320] 通过将检查部分的损伤评分之和除以支撑物总数,计算每个区段的平均损伤评分。除了 4 周组中的对照支架(平均损伤评分 ~ 0.02),在任何支架中没有发现损伤迹象。

[0321] 新内膜厚度 (NI) 以微米计量。如图 14 所示,在 2 周时,与对照相比,高剂量支架中似乎出现了 NI 厚度减小的趋势。如图 15 所示,在 4 周时的 NI 大于在 2 周时的 NI,但是与对照相比,在低剂量和高剂量组中似乎都有 NI 持续减小的趋势。

[0322] 每个支撑物周围的炎症使用下述等级量表评估:0 = 支撑物周围无炎性细胞;1 = 支撑物周围轻微的非圆周的淋巴组织细胞浸润;2 = 支撑物周围局部的非圆周的中度至密集细胞聚集物;和 3 = 支撑物的圆周的密集的淋巴组织细胞浸润。

[0323] 所有研究组的平均炎症评分小于 0.5,在任何 2 周和 4 周支架组中没有显著差异。而且,发现 2 周和 4 周组的炎症评分相似,如图 16 和 17 所示。

[0324] 每个支撑物周围的血栓评分被分为 0 至 3。在 2 周时,所有支架中发现最小血栓或没有血栓。在 4 周时,所有支架组的平均血栓评分小于 0.1,且各组间没有显著差异。两个高剂量支架之一在 4 周时显示没有血栓,如图 18 所示。

[0325] iii. 结论

[0326] 总之,所有组中的所有动物均存活并且存在最小的与支架展开相关的组织损伤。

支架包裹物似乎是稳定的,因为没有发现纳米基质包裹物的剥落或剥离。在2周和4周时间点发现最小的炎症并且几乎没有血栓。组间的新内膜厚度的比较显示,任何组间没有明显差异,但是与未包裹的对照支架组相比,显示在高剂量和低剂量支架组中有下降的趋势。在包括高剂量支架的组织切片上观察内皮细胞。支撑物周围没有纤维蛋白沉积和没有因此形成的血栓,可能是由于表面上存在内皮细胞衬里所致。

[0327] 3. 实施例3:通过组合电纺PCL纳米纤维和模仿天然内皮的肽两亲物(PA)得到杂合仿生纳米基质

[0328] i. 材料和方法

[0329] a. ePCL纳米纤维的合成

[0330] 将PCL片(Sigma Aldrich, St. Louis, MO; $M_n = 80,000$)溶于1:1(v/v)氯仿:甲醇的溶剂系统中以获得22.5wt%的粘性聚合物溶液并将其转移到配有25-G钝尖针头的注射器。将注射器放入设置为流速1ml/小时的注射泵(KD Scientific, Holliston, MA)中。将针头与高压电源(Gamma High-Voltage Research, Ormond Beach, FL)连接,通过所述高压电源向所述针头施加+21kV电压。所得到的电纺PCL(ePCL)纳米纤维在接地的铝收集器上沉淀,所述接地铝收集器距离针头28cm。将其上带有ePCL层的收集器保存在真空干燥器中2-3天以去除任何残留溶剂。ePCL纳米纤维的形态学是使用扫描电子显微术(SEM)表征。纳米纤维是用金/钨溅射包裹并且在加速电压为20kV的Philips SEM 510下观察其形态。使用用于测量纤维直径的图像分析仪(Image-proplus, Media Cybernetics Co., Silver Spring, MD, USA)分析SEM图像。

[0331] b. 肽两亲物的合成

[0332] 肽可以使用Fmoc化学法在Aapptech Apex 396肽合成仪中合成,如前所述(Jun et al. 2005)。合成两个由MMP-2敏感序列(GTAGLIGQ)与细胞粘附序列YIGSR或NO供应残基KKKKK组成的13-氨基酸肽。将这些肽烷基化以连接至16碳棕榈酰链,从而产生两亲物。因此,合成了两个不同的PA, C_{16} -GTAGLIGQ-YIGSR(PA-YIGSR)和 C_{16} -GTAGLIGQ-KKKKK(PA-KKKKK)。

[0333] c. 细胞保持

[0334] 将人脐静脉内皮细胞(HUVEC)在补充了内皮生长培养基(EGM)(2% FBS、0.1% hEGF、0.1%氢化可的松、0.1%庆大霉素A、0.4%牛脑提取物)的内皮基础培养基(EBM)中培养。该细胞培养基用于所有HUVEC实验。细胞是通过胰蛋白酶消化(0.05%胰蛋白酶/EDTA)进行传代并以2500-5000细胞/cm²的密度进行再培养。人主动脉平滑肌细胞(AoSMC)是在补充了平滑肌细胞生长培养基(SmGM-2) SingleQuot®试剂盒(5% FBS、0.1%胰岛素、0.2% hFGF-B、0.1%庆大霉素A、0.1% hEGF)的平滑肌细胞基础培养基(SmBM)中培养。该细胞培养基用于所有AoSMC实验。细胞是通过胰蛋白酶消化(0.05%胰蛋白酶/EDTA)进行传代并以3500细胞/cm²的密度进行再培养。所有细胞培养物保持在标准培养条件下(37°C、95%相对湿度和5% CO₂)。所有细胞和培养基购自Lonza Inc. (Walkersville, MD)。

[0335] d. PA-YIGSR和PA-KKKKK的比例的优化

[0336] HUVEC以30,000细胞/cm²的密度接种在不同摩尔比的包裹在ePCL上的PA-YIGSR和PA-KKKKK上,称为ePCL-YK 90(90% PA YIGSR, 10% PA KKKKK)、ePCL-YK 75(75% PA YIGSR, 25% PA KKKKK)、ePCL-YK 50(50% PA YIGSR, 50% PA KKKKK)和ePCL-YK 25(25%

PAYIGSR、75% PA KKKKK)。未包裹的 ePCL 用作对照。在 2 小时孵育期之后,吸出培养基;将细胞使用 $400 \mu\text{l}$ 0.25% 纯胰蛋白酶进行胰蛋白酶消化 30 分钟。将经胰蛋白酶消化的细胞用 PBS 以 1 : 1 的稀释收集到 1.5ml eppendorf 管中并贮存在 -80°C 。将由此收集的样品进行 Picogreen DNA 测定法处理以评价与细胞数成正比的 DNA 含量。

[0337] 细胞通过反复冻融循环而被透化。然后,向细胞样品中添加 PicoGreen 染料。PicoGreen 染料可结合细胞中的双链 DNA 并使得其可定量。已知体积的小牛胸腺 dsDNA 用作标准品。在微板荧光读数器中 (Synergy HT, Bio-Tek Instruments, VT) 测量荧光。通过每细胞 8pg DNA 的经验值,将 DNA 的量换算成细胞数目。

[0338] e. 释放 NO 的杂合纳米基质的制备和表征

[0339] 通过使 PA 溶液与纯 NO 在高压下反应过夜而合成释放 NO 的 PA。通过涤气过程获得纯 NO。使市售的 NO 气体通过 5M 氢氧化钾以除去杂质 (例如较高的氧化物物质)。在 NO 涤气之前,通过将氩气通过所述系统来使所述设备脱气。

[0340] 9 : 1 比例的 PA-YIGSR 和 PA-KKKKK 被选作最佳比例。在下文,该混合物被称为 PA-YK。因此,PA-YK 与 NO 反应获得释放 NO 的 PA,这被称为 PA-YK-NO。PA-YK 和 PA-YK-NO 的自组装是通过透射电子显微术表征。进行这以确认 NO 反应不干扰自组装过程。PA-YK-NO 被包裹在 16mm 直径的 ePCL 盘上以获得释放 NO 的杂合纳米基质,称为 ePCL-YK-NO。这按如下进行。

[0341] 使用 Humboldt 镗床 (Fisher Scientific),将 ePCL 层切成 16mm 直径的盘。这些盘用降低浓度的乙醇消毒。这些盘用 $200 \mu\text{l}$ 0.1wt. % PA 包裹。这些支撑架然后被放在摇床上 24 小时,然后通过化学通风橱中干燥 48 小时的溶剂蒸发,使 PA 自组装成 ePCL 纳米纤维。通过 TME 确认 PA 成功自组装成 ePCL 纳米纤维。PCL 被电纺到 600 目六角形 TEM 网上并在真空干燥器中干燥 48 小时。然后将它们用 $5 \mu\text{l}$ 0.1wt % PA 包裹。然后使所述网在化学通风橱中干燥过夜。然后将这些网用 2% PTA 染色 30 秒。然后使用 FEI Technai T12TE 显微镜在 60kV 加速电压下对这些网成像。而且,为保证 PA 不干扰 ePCL 网络,使用 SEM 对 PA 包裹的 ePCL 成像。

[0342] 对于 NO 释放研究,将 16mm ePCL 支撑架用 $200 \mu\text{l}$ 1wt % PA-YK-NO 包裹。这些盘然后被放在摇床上 24 小时,然后通过化学通风橱中放置 48 小时以使 PA 自组装成 ePCL 纳米纤维。然后将这些支撑架在 48 孔组织培养板中于 $400 \mu\text{l}$ HEPES 缓冲的盐水 (HBS) 中孵育。在 0h、2h、4h、6h、24h、48h、4 天、6 天、10 天、14 天、21 天和 28 天时间点收集样品。作为对照,将 ePCL 支撑架用 PA-YIGSR-NO 包裹。通过使 PA-YIGSR 与纯 NO 反应而获得 PA-YIGSR-NO。这是 NO 与 PA 非特异性结合的原因。在样品被收集之后,通过使用 Greiss 测定法 (Promega) 测量亚硝酸盐含量, Greiss 测定法使用磺胺和 N-1 萘基乙二胺二盐酸盐。亚硝酸盐是 NO 的主要降解产物。将 $50 \mu\text{l}$ 样品用 $50 \mu\text{l}$ 磺胺和 $50 \mu\text{l}$ N-1 萘基乙二胺二盐酸盐处理。在孵育 15 分钟之后,使用微板读数器 (EL x 800, BIO-TEK Instrument, VT) 在 540nm 下读数。ePCL-PA-YK-NO 与 ePCL-PA-YIGSR-NO 之间的亚硝酸盐含量差异是 NO 从 PA-KKKKK 的赖氨酸残基释放的原因。这被绘制为 NO 随时间释放的量度。

[0343] f. 评价杂合纳米基质上的细胞行为

[0344] 将 HUVEC 和 AoSMC 分别以 $30,000$ 细胞 / cm^2 和 $15,000$ 细胞 / cm^2 的密度接种到 ePCL-PA-YK-NO 和 ePCL-PA-YK 上。在 2 小时孵育后,将细胞用 LIVE/DEAD 存活 / 细胞毒性试

剂盒 (Molecular Probes, Eugene, OR) 进行形态学染色。通过将 HUVEC 和 AoSMC 接种在以下三种不同的基底上来分析最初的细胞粘附 :ePCL-PA-YK-NO ;ePCL-PA-YK 和 ePCL。HUVEC 以 30,000 细胞 /cm² 接种并且 AoSMC 以 15,000 细胞 /cm² 接种到基底上,所述基底保持在 48 孔组织培养板的孔中。在 2 小时孵育期之后,吸出培养基 ;使用 400 μ l 0.25% 胰蛋白酶对细胞进行胰蛋白酶处理 30 分钟。将经胰蛋白酶处理的细胞用 PBS 以 1 : 1 的稀释收集到 1.5ml eppendorf 管并中贮存在 -80°C。对由此收集的样品进行 Picogreen DNA 测定法处理以评价与细胞数成正比的 DNA 含量。

[0345] 为了评价 NO 对细胞增殖的作用,将 0.1wt% PA-YK-NO 和 PA-YK 包裹在 16mm ePCL 盘上。HUVEC 和 AoSMC 分别以 30,000 细胞 /cm² 和 15,000 细胞 /cm² 的密度接种。通过增殖细胞核抗原 (PCNA) 染色评估 HUVEC 和 AoSMC 的增殖。在 48 小时孵育之后,将细胞固定于 10% 福尔马林,在甲醇中透化,并使用 3% 过氧化氢溶液封闭。然后将细胞与 tris 缓冲盐水孵育,随后用在含有 3% FBS 的 PBS 中以 1 : 100 稀释的小鼠 IgG 抗 -PCNA 一级抗体 (Dako Corp., Carpinteria, CA) 孵育。然后,将细胞用在含有 3% FBS 的 PBS 中以 1 : 100 稀释的抗小鼠 IgG HRP (Dako Corp., Carpinteria, CA) 孵育,随后用氨基乙基咔唑生色团 (Dako Corp., Carpinteria, CA) 孵育。将所述细胞用 Mayer 苏木精复染并用 37mM 氢氧化铵冲洗。每个视野 (20 $\times$) 的增殖细胞百分比是通过使用相差显微镜计数红色增殖细胞和蓝色非增殖细胞来确定。对于所有细胞定量,每个孔成像五个随机视野并平均。而且,每种条件测试四个样品,组成实验。曲线图中显示的结果描述了来自 3 个独立实验 (n = 12) 的超过 120 个图像的平均值。

[0346] g. 统计学分析

[0347] 所有实验独立地进行至少三次。使用 SPSS 软件将所有数据以单向 ANOVA 检验比较来评价统计学显著性。在 ANOVA 分析中,进行 Tukey 多重比较检验来发现配对之间的显著差异。p < 0.05 的值被认为是统计学上显著的。

[0348] ii. 结果和讨论

[0349] 本文公开了杂合仿生纳米基质,其被设计为将天然内皮的性质重构至心血管植入物表面。已知具有生物医疗应用所需特征的 ePCL 纳米纤维被成功制备。如图 20a 中的 SEM 图像显示,ePCL 纤维具有相对均一的形态,具有 200nm-700nm 之间的纳米级直径,并且不含小珠。所有 ePCL 纳米纤维典型的随机交织性质也可从图像中明显可见。此外,大部分纤维具有被测量为在 300nm-400nm 范围内的直径,这类似于天然 ECM 中发现的胶原纤维束 (Elsdale T and Bard J:1972)。模仿 ECM 的纳米纤维形态的这个方面对细胞是有利的。然而,这种具有吸引力的形态特征因在 ePCL 中缺乏生物活性而被否定。ePCL 上细胞识别位点的这种缺乏会防止所述支撑架与细胞的活性相互作用,并因此不能与宿主组织有效整合。因此,本文还公开了对这些 ePCL 纳米纤维赋予生物活性。

[0350] 这种生物活性是通过使用 PA 引入 ePCL 纳米纤维。成功合成了两种不同的 PA, C₁₆-GTAGLIGQ-YIGSR (PA-YIGSR) 和 C₁₆-GTAGLIGQ-KKKKK (PA-KKKKK)。PA 含有酶介导的可降解 MMP-2 敏感序列 (GTAGLIGQ) 以及 YIGSR 或聚赖氨酸 (KKKKK) 基团,以形成 NO 供应残基。还通过混合不同摩尔比的 PA-YIGSR 和 PA-KKKKK 设计了 PA-YK。因此,细胞粘附配体和 NO 的密度可以通过改变 PA-YIGSR 和 PA-KKKKK 的比例来调节。这些 PA-YK 被包裹在 ePCL 上以产生杂合纳米基质 (ePCL-PA-YK),其然后通过 SEM 表征 (图 20b)。显然,用 PA-YK 进行的包

裹不影响 ePCL 纳米纤维形态。ePCL-PA-YK 还通过 TEM 表征 (图 21a)。根据 TEM 图像,观察到主 ePCL 纳米纤维 (直径大约 300nm),它用 PA (直径 7-8nm) 包裹在任一侧。由于 TME 成像缺乏深度,通过以横轴倾斜电子显微镜的平台以获得图像来确认均一包裹 (图 21b)。该图像类似于未倾斜的图像,因此可以推论,ePCL 纳米纤维上的 PA 包裹是均一的。为了确定最佳的基质组成,内皮细胞被接种在多种比例的 ePCL-PA-YK 上,发现使用随着 PA-YIGSR 浓度增加获得显著更大的细胞粘附 (图 22)。因此,ePCL-PA-YK90 (9 : 1mol/mol),后文称为 ePCL-PA-YK,被用于所有进一步的研究。

[0351] 将 PA-YK 与 NO 反应获得 PA-YK-NO。然后,将其包裹在 ePCL 上以制备 ePCL-PA-YK-NO,它是释放 NO 的仿生杂合纳米基质。ePCL-YK-NO 是通过 SEM 表征 (图 19c),还确认 PA-YK-NO 不影响 ePCL 纳米纤维的形态。为了证实均一包裹,然后通过 TEM 对 ePCL-PA-YK-NO 进行成像 (图 21c)。PA-YK-NO 的均一包裹在 ePCL 纳米纤维任一侧可见,并且这可通过在横轴方向倾斜平台之后的成像再次证实 (图 21d)。

[0352] 将 NO 从 ePCL-PA-YK-NO 杂合纳米基质的释放情况使用 Greiss 测定法评价。经 28 天观察到成功的 NO 释放。最初爆发释放发生在前 48 小时,随后持续 4 周的缓慢持续释放,形成 48% NO 回收 (图 23)。最初爆发释放可以解释为 NO 从 ePCL-PA-YK-NO 纳米纤维基质表面的释放,这对于局部递送是容易达到的。这对于限制平滑肌细胞的增殖是特别重要的,平滑肌细胞增殖是再狭窄的关键事件之一,从早至损伤后一天开始 (Weintraub WS:2007)。因此,48 小时的 NO 爆发释放对于阻止新内膜增生是关键。随后的持续释放可以归因于通过扩散和酶降解的组合从混合纳米基质主体释放的 NO。随时间进展,由于存在 MMP-2 可降解位点,ePCL-PA-YK-NO 缓慢降解,并且据认为这可帮助 NO 从基质主体的持续释放。酶介导的可降解位点的存在还被预期会在杂合纳米基质中的产生 NO 浓度梯度。根据本研究,可以发现,3.8 微摩尔 NO 在 4 周时段内从直径 16mm 的 ePCL-PA-YK-NO 盘的释放。该量与从内皮细胞以 $1 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ 速率释放的累积 NO 相当 (Vaughn MW, et al. 1998)。长期的缓慢持续释放是维持平滑肌细胞非增殖状态、血管壁的抗血栓形成性质和促进通常持续数周的恢复过程中的内皮化所必需的。杂合纳米基质的另一特征是所释放的 NO 量可以在未来应用中通过改变 PA-KKKKK 中赖氨酸部分的数目而容易地调节。因此,通过增大 PA-KKKKK 中赖氨酸的数目 (例如,PA-KKKKKKK) 或者通过增加 PA-YK 中 PA-KKKKK 的比例 (例如,PA-YIGSR 与 PA-KKKKK 比例为 9 : 2,3 : 1,9 : 4,2 : 1,9 : 5,3 : 2,9 : 7,9 : 8,1 : 1,3 : 4) 而增加赖氨酸数目可以增加 NO 释放的速率并增加 NO 释放的持续时间。

[0353] 通过在 ePCL-PA-YK-NO 和 ePCL-PA-YK 上接种 HUVEC 和 AoSMC 研究了最初细胞粘附。将未包裹的 ePCL 用作对照。这些细胞被以形态学方法成像,并且可以发现,ePCL-PA-YK-NO 和 ePCL-PA-YK 与 ePCL 相比改进了 HUVEC 的粘附和铺展 (图 24),而 ePCL-PA-YK-NO 和 ePCL-PA-YK 不支持 AoSMC 铺展 (图 25)。根据图 26a,可以看到与未包裹的 ePCL (12490 ± 639) 相比,ePCL-PA-YK-NO (15576 ± 2414) 和 ePCL-PA-YK (16685 ± 808) 显示显著更大的 HUVEC 粘附。根据图 26b,显然,ePCL-PA-YK-NO (9123 ± 1344) 和 ePCL-PA-YK (9404 ± 1259) 显示与 ePCL (9310 ± 561) 相似的粘附,因此不支持 AoSMC 粘附。这些结果清楚显示,杂合纳米基质 (ePCL-PA-YK-NO 和 ePCL-PA-YK) 可促进内皮细胞粘附和铺展,同时不支持平滑肌细胞粘附和铺展。这是由于 PA 以层粘连蛋白衍生的 YIGSR 细胞粘附部分形式赋予 ePCL 纳米纤维内皮细胞特异性的生物活性。

[0354] 在 48 小时孵育之后,使用 Greiss 测定法研究了 NO 对 HUVEC 和 AoSMC 增殖的作用。如图 27 所示,发现 ePCL-PA-YK-NO 纳米基质上 PCNA 阳性 HUVEC 的百分比 ($70 \pm 2\%$) 显著大于 ePCL-PA-YK 纳米纤维 ($57 \pm 3\%$)。然而, ePCL-PA-YK-NO 上 PCNA 阳性 AoSMC 的百分比 ($41 \pm 3\%$) 显著低于 ePCL-PA-YK ($58 \pm 4\%$)。这些结果表明, ePCL-PA-YK-NO 纳米基质可增强内皮细胞生长,但会限制平滑肌细胞生长。在防止平滑肌生长的同时增强内皮化是通过防止内膜增生和再狭窄来改善移植物通畅性的关键步骤。

[0355] 因此,该杂合纳米基质具有很大潜力可用作仿生心血管植入物。常规心血管植入物限于提供结构支持,并且因为其不能密切模仿天然内皮而不能与宿主组织有效整合。此外,它们的特征为缺乏再内皮化、再狭窄和血栓形成。如本文公开的,开发了由电纺 PCL 和 PA 纳米纤维组成的杂合仿生支撑架。ePCL 可提供心血管移植物所需的机械强度和形态结构,所述心血管移植物暴露于规则的搏动力 (pulsatile force)。PA 纳米纤维由内皮细胞粘附性 YIGSR 部分组成,据预期内皮细胞粘附性 YIGSR 部分会募集并促进抗剪切流的内皮细胞粘附。从杂合纳米基质释放的 NO 会抑制平滑肌细胞增殖并赋予所述纳米基质抗血栓形成性质,同时促进内皮细胞增殖。据预期 PA 中存在的酶介导的可降解位点会导致缓慢的细胞导向的基质降解,并且这可帮助 NO 的持续释放。因此,作为该杂合纳米基质的一个应用实例,纳米基质可用于可植入的心血管装置,例如血管移植物和心瓣膜。

[0356] H. 参考文献

[0357] Acharya G, Park K. Mechanisms of controlled drug release from drug-eluting stents. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006 ;58 :387-401.

[0358] Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med.* 2003 ;9(11) :1370-1376.

[0359] Alsberg E, Kong HJ, Hirano Y, Smith MK, Albeiruti A, Mooney DJ. Regulating bone formation via controlled scaffold degradation. *J Dental Res.* 2003 ;82(11) :903-908.

[0360] Andukuri A, Minor WP, Kushwaha M, Anderson JM, Jun HW. Effect of endothelium mimicking self-assembled nanomatrices on cell adhesion and spreading of human endothelial cells and smooth muscle cells. *Nanomedicine* 2009.

[0361] Babapulle MN, Joseph L, Belisle P, Brophy JM, Eisenberg MJ. A hierarchical Bayesian meta-analysis of randomised clinical trials of drug-eluting stents. *Lancet.* 2004 ;364(9434) :583-591.

[0362] Barnes CP, Sell SA, Boland ED, Simpson DG, Bowlin GL. Nanofiber technology : designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007 ;59(14) :1413-1433.

[0363] Bauters C, Isner JM. The biology of restenosis. *Prog Cardiovasc Dis.* 1997 ;40(2) :107-116.

[0364] Beck K, Hunter I, Engel J. Structure and function of laminin : anatomy of a multidomain glycoprotein. *Faseb J.* 1990 ;4(2) :148-160.

[0365] Beckman JS. The physiological and pathological chemistry of nitric

oxide. In :Jr. JRL, ed. Nitric Oxide :Principles and Actions. Sand Diego : AcademicPress Inc. ;1996 :1-71.

[0366] Bohl KS, West JL. Nitric oxide-generating polymers reduce platelet adhesion and smooth muscle cell proliferation. *Biomaterials*. 2000 ;21 : 2273-2278.

[0367] Bryant SJ, Anseth KS. Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels. *J Biomed Mater Res*. 2002 ;59 :63-72.

[0368] Camenzind E, Steg PG, Wijns W. Stent thrombosis late after implantation of first-generation drug-eluting stents. *Circulation*. 2007 ;7(115) :1440-1455.

[0369] Chen K, Pittman RN, Popel AS. Nitric oxide in the vasculature : where does it come from and where does it go ? A quantitative perspective. *Antioxid Redox Signal*. 2008 ;10(7) :1185-1198.

[0370] Choi JS, Lee SJ, Christ GJ, Atala A, Yoo JJ : The influence of electrospun aligned poly(epsilon-caprolactone)/collagen nanofiber meshes on the formation of self-aligned skeletal muscle myotubes. *Biomaterials* 2008, 29 : 2899-2906.

[0371] Colombo A, Chieffo A. Drug-eluting stent update 2007 : Part III : Technique and unapproved/unsettled indications (left main, bifurcations, chronic total occlusions, small vessels and long lesions, saphenous vein grafts, acute myocardial infarctions, and multivessel disease). *Circulation*. 2007 ;116 : 1424-1432.

[0372] Curtis A, Wilkinson C. Nanotechniques and approaches in biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2001 ;19(3) :97-101.

[0373] Davies KM, Wink DA, Saavedra JE, Keefer LK. Chemistry of the diazeniumdiolates. 2. kinetics and mechanism of dissociation to nitric oxide in aqueous solution. *J Am Chem Soc*. 2001 ;123 :5473-5481.

[0374] de Man FH, Stella PR, Nathoe H, Kirkels H, Hamer B, Meijburg HW, Doevendans PA. Stent thrombosis in real-world patients : a comparison of drug-eluting with bare metal stents. *Neth Heart J*. 2007 ;15(11) :382-386.

[0375] Dekker A, Reitsma K, Beugeling T, Bantjes A, Feijen J, van Aken WG : Adhesion of endothelial cells and adsorption of serum proteins on gas plasma-treated polytetrafluoroethylene. *Biomaterials* 1991, 12 :130-138.

[0376] Do Y, Kao E, Ganaha F, Minamiguchi H, Sugimoto K, Lee J, Elkins C, Amabile P, Kuo M, Wang D, Waugh J, Dake M. In-stent restenosis limitation with stent-based controlled-release nitric oxide : Initial results in rabbits. *Radiology*. 2004 ;230 : 377-382.

[0377] Dobesh PP, Stacy ZA, Ansara AJ, Enders JM. Drug-eluting stents : a mechanical and pharmacologic approach to coronary artery disease. *Pharmacotherapy*. 2004 ;

24(11) :1554-1577.

[0378] Elsdale T, Bard J:Collagen substrata for studies on cell behavior.J CellBiol 1972,54 :626-637.

[0379] Finn A,Nakazawa G,Joner M,Kolodogie F,Mont E,Gold H,VirmaniR. Vascular responses to drug eluting stents:importance of delayed healing.Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007 ;27(7) :1500-1510.

[0380] Fittkau MH, Zilla P, Bezuidenhout D, Lutolf MP, Human P, HubbellJA, Davies N.The selective modulation of endothelial cell mobility on RGDpeptide containing surfaces by YIGSR peptides.Biomaterials. 2005 ;26(2) :167-174.

[0381] Giannelli G, Falk-Marzillier J, schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V.Induction of cell migration by matrix metallopretease-2cleavageof laminin-5. Science. 1997 ;277 :225-228.

[0382] Gori T, Parker JD.The puzzle of nitrate tolerance:pieces smallerthan wethought ? Circulation. 2002 ;106(18) :2404-2408.

[0383] Hanson SR, Hutsell TC, Keefer LK, Mooradian DL, Smith DJ.Nitricoxide donors:a continuing opportunity in drug design.Adv Pharmacol. 1995 ;34 :383-398.

[0384] Hartgerink JD, Baniash E, Stupp SI.Peptide-amphiphile nanofibers : Aversatile scaffold for the preparation of self-assembling materials.Proc NatlAcad Sci. 2002 ;99(8) :5133-5138.

[0385] Hartgerink JD, Beniash E, Stupp SI.Self-assembly and mineralization ofpeptide-amphiphile nanofibers. Science. 2001 ;294 :1684-1688.

[0386] Heart Disease and Stroke Statistics-2007Update.Circulation. 2007 ;115 : e69-e171.

[0387] Heydarkhan-Hagvall S, Schenke-Layland K, Dhanasopon AP, Rofail F, Smith H, Wu BM, Shemin R, Beygui RE, MacLellan WR;Three-dimensionalelectrospun ECM-based hybrid scaffolds for cardiovascular tissue engineering.Biomaterials 2008, 29 : 2907-2914.

[0388] Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Khademhosseini A, Kobayashi H, Tabata Y.Enhanced angiogenesis through controlled release of basic fibroblastgrowth factor from peptide amphiphile for tissue regeneration.Biomaterials. 2006 ; 27(34) :5836-5844.

[0389] Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Tian F, Kobayashi H, Tabata Y. Bone regeneration on a collagen sponge self-assembled peptide-amphiphile nanofiberhybrid scaffold. Tissue Eng. 2007 ;13(1) :11-19.

[0390] Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Tian F, Kobayashi H, Tabata Y. Ectopic bone formation in collagen sponge self-assembled peptide-amphiphilenanofibers hybrid scaffold in a perfusion culture bioreactor.Biomaterials. 2006 ;27(29) : 5089-5098.

[0391] Hou D, Narciso H, Kamdar K, Zhang P, Barclay B, March KL. Stent-based

nitric oxide delivery reducing neointimal proliferation in a porcine carotid overstretch injury model. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2005 ;28(1) :60-65.

[0392] Hrabie JA, Keefer LK. Chemistry of the nitric oxide-releasing diazeniumdiolate (“nitrosohydroxylamine”) functional group and its oxygen-substituted derivatives. *Chem Rev*. 2002 ;102(4) :1135-1154.

[0393] Hubbell JA, Massia SP, Desai NP, Drumheller PD. Endothelial cell-selective materials for tissue engineering in the vascular graft via a new receptor. *Bio/Technology*. 1991 ;9 :568-572.

[0394] Jaffe R, Strauss BH. Late and very late thrombosis of drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol*. 2007 ;50(2) :119-127.

[0395] Jaffe R, Strauss BH. Late and very late thrombosis of drug-eluting stents: evolving concepts and perspectives. *J Am Coll Cardiol*. 2007 ;50(2) :119-127.

[0396] Jun H, West J. Development of a YIGSR-peptide-modified polyurethane urea to enhance endothelialization. *J Biomater Sci Polymer Edn*. 2004 ;15(1) :73-94.

[0397] Jun H, West J. Modification of polyurethane urea with PEG and YIGSR peptide to enhance endothelialization without platelet adhesion. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*. 2005 ;72B :131-139.

[0398] Jun HW, Paramonov S, Hartgerink JD. Synthetic ECM mimics. *Soft Matter*. 2006 ;2 :177-181.

[0399] Jun HW, Taite LJ, West JL. Nitric oxide-producing polyurethanes. *Biomacromolecules*. 2005 ;6 :838-844.

[0400] Jun HW, Yuwono V, Paramonov SE, Hartgerink JD. Enzyme-mediated degradation of peptide-amphiphile nanofiber networks. *Adv Mater*. 2005 ;17 :2612-2617.

[0401] Kaul S, Makkar RR, Nakamura M, Litvack FI, Shah PK, Forrester JS, Hutsell TC, Eigler NL. Inhibition of acute stent thrombosis under high-shear flow conditions by a nitric oxide donor, DMHD/NO. An ex vivo porcine arteriovenous shunt study. *Circulation*. 1996 ;94(9) :2228-2234.

[0402] Kawasaki K, Smith RS, Jr., Hsieh CM, Sun J, Chao J, Liao JK. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates nitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis. *Mol Cell Biol*. 2003 ;23(16) :5726-5737.

[0403] Keefer LK, Nims RW, Davies KM, Wink DA. “NONOates” (1-substituted diazenium-1,2-diols) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. *Methods Enzymol*. Vol 268 ;1996 :281-293.

[0404] Kolodgie FD, John M, Khurana C, Farb A, Wilson PS, Acampado E, Desai N, Soon-Shiong P, Virmani R. Sustained reduction of in-stent neointimal growth with the use of a novel systemic nanoparticle paclitaxel. *Circulation*. 2002 ;106 :1195-1198.

- [0405] Kotani J, Awata M, Nanto S, Uematsu M, Oshima F, Minamiguchi H, GS GSM, Nagata S. Incomplete neointimal coverage of sirolimus-eluting stents :angiographic findings. J Am Coll Cardiol 2006 ;47(10) :2108-2111.
- [0406] Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide :cytotoxicity versus cytoprotection—how, why, when, and where ? Nitric Oxide. 1997 ;1(2) :107-120.
- [0407] Kuo PC, Schroeder RA. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. Ann Surg. 1995 ;221(3) :220-235.
- [0408] Leon MB. Late thrombosis a concern with drug-eluting stents. J Interv Cardiol. 2007 ;20(1) :26-29.
- [0409] Li WJ, Danielson KG, Alexander PG, Tuan RS :Biological response of chondrocytes cultured in three-dimensional nanofibrous poly(epsilon-caprolactone) scaffolds. J Biomed Mater Res A 2003, 67 :1105-1114.
- [0410] Lipke EA, West JL. Localized delivery of nitric oxide from hydrogels inhibits neointima formation in a rat carotid balloon injury model. Acta Biomaterialia. 2005 ;1(6) :597-606.
- [0411] Liuzzo JP, Ambrose JA, Coppola JT. Sirolimus- and taxol-eluting stents differ towards intimal hyperplasia and re-endothelialization. J Invasive Cardiol. 2005 ;17(9) :497-502.
- [0412] Malkar NB, Lauer-Fields JL, Juska D, Fields GB. Characterization of peptide-amphiphiles possessing cellular activation sequences. Biomacromolecules. 2003 ;4(3) :518-528.
- [0413] Marin J, Rodriguez-Martinez MA. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. Pharmacol Ther. 1997 ;75(2) : 111-134.
- [0414] Massia SP, Hubbell JA. Human endothelial cell interactions with surface-coupled adhesion peptides on a nonadhesive glass substrate and two polymeric biomaterials. J Biomed Mater Res. 1991 ;25(2) :223-242.
- [0415] Massia SP, Hubbell JA : Human endothelial cell interactions with surface-coupled adhesion peptides on a nonadhesive glass substrate and two polymeric biomaterials. J Biomed Mater Res 1991, 25 :223-242.
- [0416] Massia SP, Rao SS, Hubbell JA. Covalently immobilized laminin peptide Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg(YIGSR) supports cell spreading and co-localization of the 67-kilodalton laminin receptor with alpha-actin and vinculin. J Biol Chem. 1993 ;268 : 8053-8059.
- [0417] Matthews JA, Wnek GE, Simpson DG, Bowlin GL :Electrospinning of collagen nanofibers. Biomacromolecules 2002, 3 :232-238.
- [0418] Melikian N, Wijns W. Drug-eluting stents :a critique. Heart. 2008 ;94 : 145-152.
- [0419] Miller M, Megson I. Recent developments in nitric oxide donor drugs. Br J

Pharmacol. 2007 ;151(3) :305-321.

[0420] Miller M, Megson I. Recent developments in nitric oxide donor drugs. Br J Pharmacol. 2007 ;151 :305-321.

[0421] Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G, Molnar F, Falotico R. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. N Engl J Med. 2002 ;346(23) :1773-1780.

[0422] Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O' Shaughnessy C, Caputo RP, Kereiakes DJ, Williams DO, Teirstein PS, Jaeger JL, Kuntz RE. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. N Engl J Med. 2003 ;349(14) :1315-1323.

[0423] Ong AT, Serruys PW. Technology Insight: an overview of research in drug-eluting stents. Nat Clin Pract. 2005 ;2(12) :647-658.

[0424] Ozaki Y, Violaris AG, Serruys PW. New stent technologies. Prog Cardiovasc Dis. 1996 ;39(2) :129-140.

[0425] Paramonov SE, Jun HW, Hartgerink JD. Self-assembly of peptide-amphiphile nanofibers: the roles of hydrogen bonding and amphiphilic packing. J Am Chem Soc. 2006 ;128 :7291-7298.

[0426] Paramonov SE, Jun HW, Hartgerink JD. Self-assembly of peptide-amphiphile nanofibers: the roles of hydrogen bonding and amphiphilic packing. J Am Chemical Soc. 2006 ;128(22) :7291-7298.

[0427] Pulfer SK, Ott D, Smith DJ. Incorporation of nitric oxide-releasing crosslinked polyethyleneimine microspheres into vascular grafts. J Biomed Mater Res. 1997 ;37(2) :182-189.

[0428] Rajangam K, Behanna HA, Hui MJ, Han X, Hulvat JF, Lomasney JW, Stupp SI. Heparin binding nanostructures to promote growth of blood vessels. Nano Lett. 2006 ;6(9) :2086-2090.

[0429] Rao SV, Shaw RE, Brindis RG, Klein LW, Weintraub WS, Peterson ED. On- versus off-label use of drug-eluting coronary stents in clinical practice (report from the American College of Cardiology National Cardiovascular Data Registry [NCDR]). Am J Cardiol. 2006 ;97(10) :1478-1481.

[0430] Reynolds MM, Frost MC, Meyerhoff ME. Nitric oxide-releasing hydrophobic polymers: preparation, characterization, and potential biomedical applications. Free Radic Biol Med. 2004 ;37(7) :926-936.

[0431] Roiron C, Sanchez P, Bouzamondo A, Lechat P, Montalescot G. Drug-eluting stents: an updated meta-analysis of randomised controlled trials. Heart. 2006 ;92(5) :641-649.

[0432] Ross JM. Cell-extracellular matrix interactions. In: Patrick CW, Mikos AG, McIntire LV, eds. Frontiers in Tissue Engineering: Elsevier Science Inc. ;1998.

- [0433] Saavedra J, Fitzhugh A, Keefer L. Chapter 24 :Diazoniumdiolates (Formerly NONOates) in Cardiovascular Research and Potential Clinical Applications. In : Loscalzo J, Vita JA, eds. Nitric oxide and the cardiovascular system. Totowa, N. J. : Humana Press ;2000.
- [0434] Sargeant TD, Guler MO, Oppenheimer SM, Mata A, Satcher RL, Dunand DC, Stupp SI. Hybrid bone implants :self-assembly of peptide amphiphilic nanofibers within porous titanium. Biomaterials. 2008 ;29 (2) :161-171.
- [0435] Sheiban I, Carrieri L, Catuzzo B, Destefanis P, Oliaro E, Moretti C, Trevi GP. Drug-eluting stent :the emerging technique for the prevention of restenosis. Minerva cardiologica. 2002 ;50 (5) :443-453.
- [0436] Silverthorn DU. Blood flow and the control of blood pressure. Human Physiology. 3ed. San Francisco :Benjamin Cummings Inc. ;2004 :490-522.
- [0437] Sneddon JM, Vane JR :Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 1988, 85 :2800-2804.
- [0438] Steffel J, Tanner FC. Biological effects of drug-eluting stents in the coronary circulation. Herz. 2007 ;32 (4) :268-273.
- [0439] Taite LJ, Yang P, Jun HW, West JL. Nitric oxide-releasing polyurethane-PEG copolymer containing the YIGSR peptide promotes endothelialization with decreased platelet adhesion. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2008 ;84 (1) :108-116.
- [0440] Van Belle E, Susen S, Jude B, Bertrand ME. Drug-eluting stents : trading restenosis for thrombosis ? J Thromb Haemost. 2007 ;5 Suppl 1 :238-245.
- [0441] Vaughn MW, Kuo L, Liao JC : Estimation of nitric oxide production and reaction rates in tissue by use of a mathematical model. Am J Physiol 1998, 274 :H2163-2176.
- [0442] Verma S, Marsden P. Nitric oxide-eluting polyurethanes-vascular grafts of the future ? New Engl J Med. 2005 ;353 (7) :730-731.
- [0443] Violaris AG, Ozaki Y, Serruys PW. Endovascular stents :a 'break through technology', future challenges. Int J Card Imaging. 1997 ;13 (1) :3-13.
- [0444] W. P. M. Lowik D, Hest JCMv. Peptide based amphiphiles. Chem Soc Rev. 2004 ;33 :234-245.
- [0445] Webster MW, Ormiston JA. Drug-eluting stents and late stent thrombosis. Lancet. 2007 ;370 (9591) :914-915.
- [0446] Weinberg CB, Bell E :A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. Science 1986, 231 :397-400.
- [0447] Weintraub WS :The pathophysiology and burden of restenosis. Am J Cardiol 2007, 100 :3K-9K.
- [0448] Wessely R, Schomig A, Kastrati A. Sirolimus and Paclitaxel on polymer-based drug-eluting stents :similar but different. J Am Coll

Cardiol. 2006 ;47(4) :708-714.

[0449] Win HK, Caldera AE, Maresh K, Lopez J, Rihal CS, Parikh MA, Granada JF, Marulkar S, Nassif D, Cohen DJ, Kleiman NS. Clinical outcomes and stent thrombosis following off-label use of drug-eluting stents. JAMA. 2007 ;297(18) :2001-2009.

[0450] Windecker S, Meier B. Intervention in coronary artery disease. Heart. 2000 ;83 :481-490.

[0451] Zhang YZ, Venugopal J, Huang ZM, Lim CT, Ramakrishna S; Characterization of the surface biocompatibility of the electrospun PCL-collagen nanofibers using fibroblasts. Biomacromolecules 2005, 6 :2583-2589.

[0452] Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, Geppetti P, Ledda F. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. J Clin Invest. 1994 ;94(5) :2036-2044.

[0453] Zimarino M, Renda G, De Caterina R. Optimal duration of antiplatelet therapy in recipients of coronary drug-eluting stents. Drugs. 2005 ;65(6) :725-732.

[0454] I. 序列

[0455] SEQ ID NO :1

[0456] Gly-Thr-Ala-Gly-Leu-Ile-Gly-Gln

[0457] SEQ ID NO :2

[0458] Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg

[0459] SEQ ID NO :3

[0460] Lys-Lys-Lys-Lys-Lys

[0461] SEQ ID NO :4

[0462] Gly-Thr-Ala-Gly-Leu-Ile-Gly-Gln-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg

[0463] SEQ ID NO :5

[0464] Gly-Thr-Ala-Gly-Leu-Ile-Gly-Gln-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys

[0465] SEQ ID NO :6

[0466] Gly-Thr-Ala-Gly-Leu-Ile-Gly-Gln-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys

[0467] SEQ ID NO :7

[0468] Gly-Thr-Ala-Gly-Leu-Ile-Gly-Gln-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg

[0469] SEQ ID NO :8

[0470] Arg-Gly-Asp

[0471] SEQ ID NO :9

[0472] Arg-Gly-Asp-Ser

[0473] SEQ ID NO :10

[0474] Asp-Gly-Glu-Ala

- [0475] SEQ ID NO :11
[0476] Val-Ala-Pro-Gly
[0477] SEQ ID NO :12
[0478] Arg-Glu-Asp-Val
[0479] SEQ ID NO :13
[0480] Asp-Gly-Glu-Ala
[0481] SEQ ID NO :14
[0482] Lys-Arg-Ser-Arg
[0483] SEQ ID NO :15
[0484] Gly-Pro-Gln-Gly-Leu-Leu-Gly
[0485] SEQ ID NO :16
[0486] Gly-Pro-Gly-Ile-Trp-Gly-Gln
[0487] SEQ ID NO :17
[0488] Cys-Cys-Cys-Cys-Cys

[0489] 对于本领域技术人员明显的是,只要不背离本发明的范围或主旨,可以对本发明进行各种调整和改变。参考本文公开的本发明的说明书和实施,本领域技术人员将清楚本发明的其他实施方案。说明书和实施例应解释为仅仅是示例性的,本发明的真实范围和主旨由所附权利要求给出。

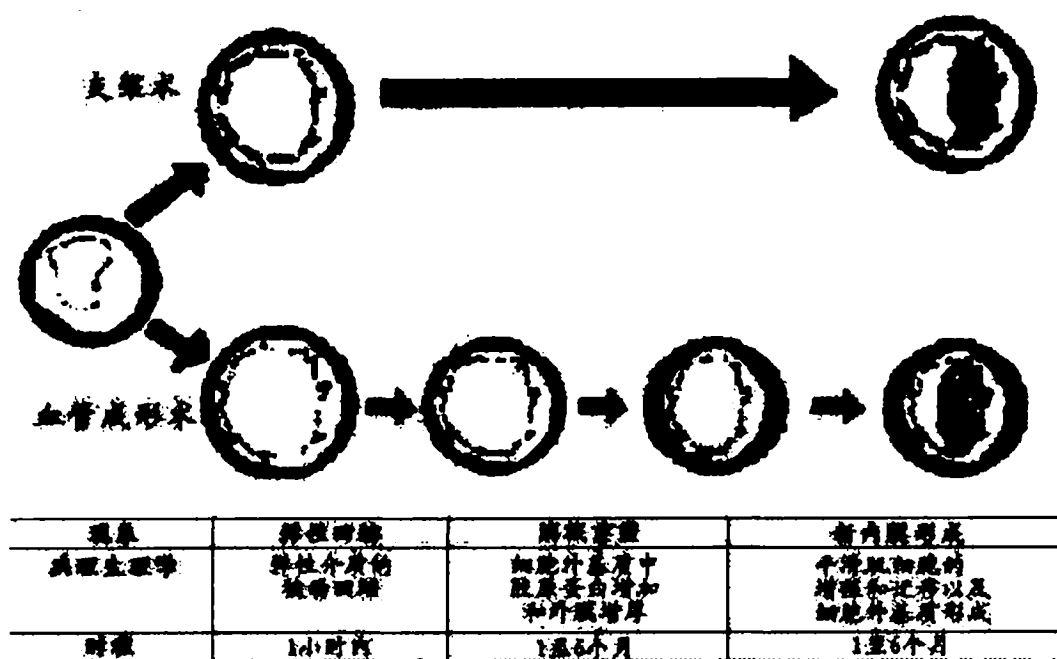


图 1

A.

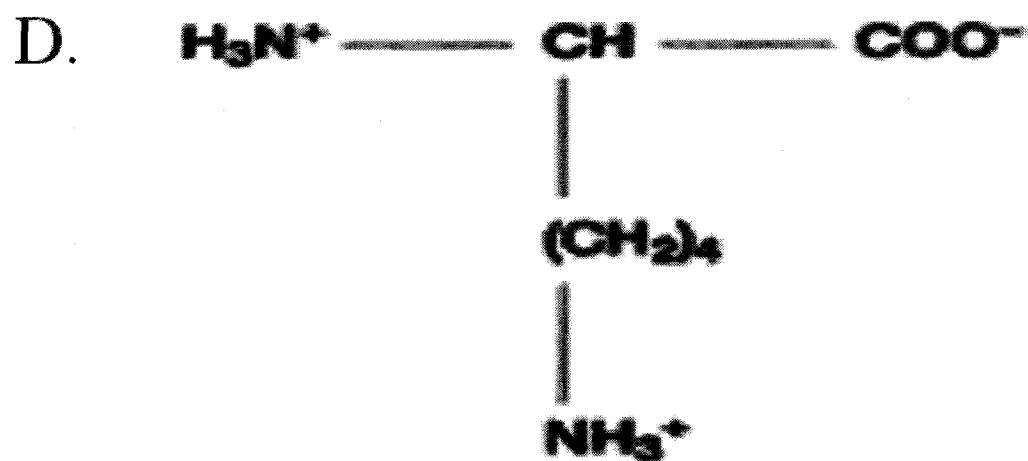
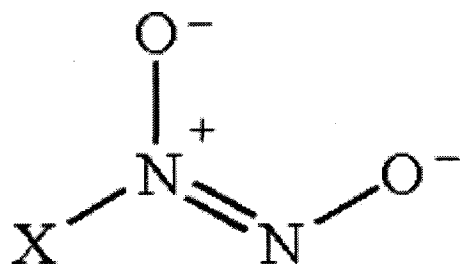


图 2

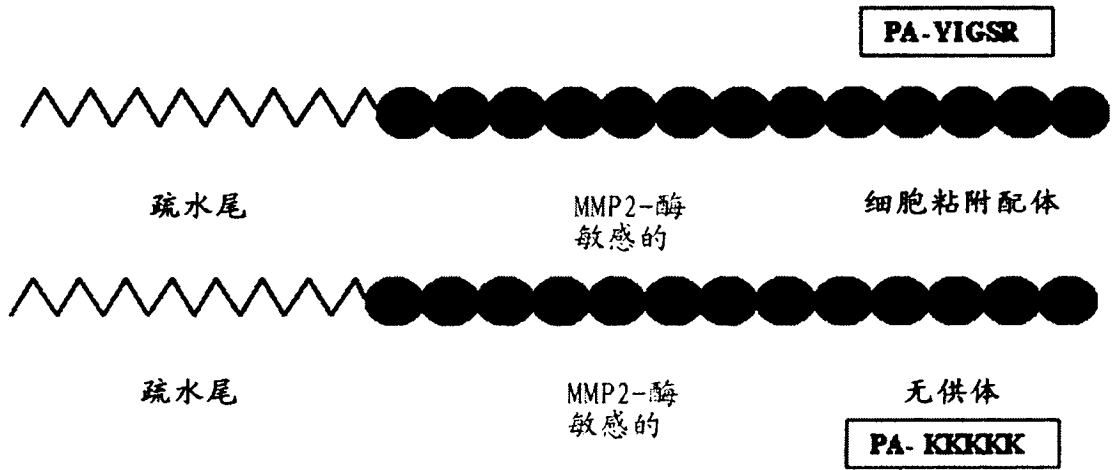


图 3

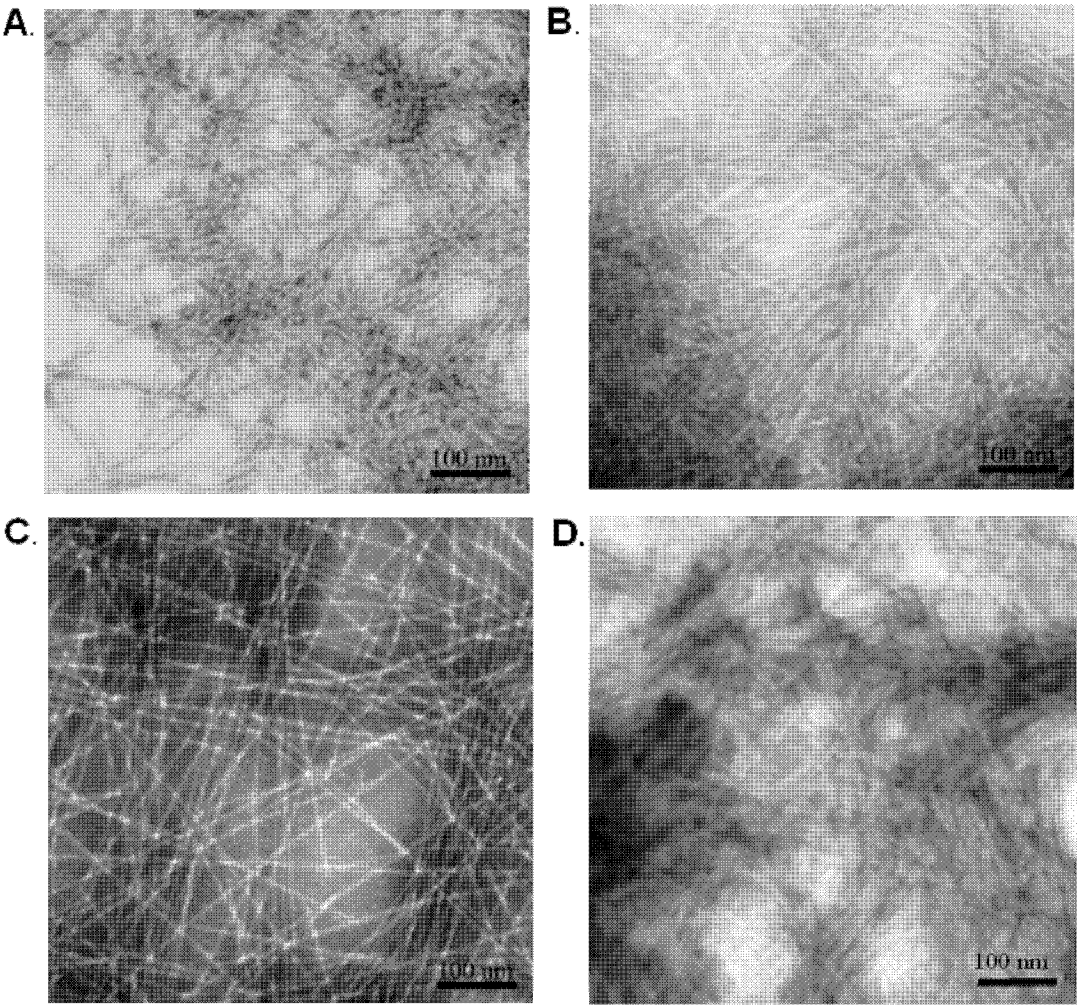


图 4

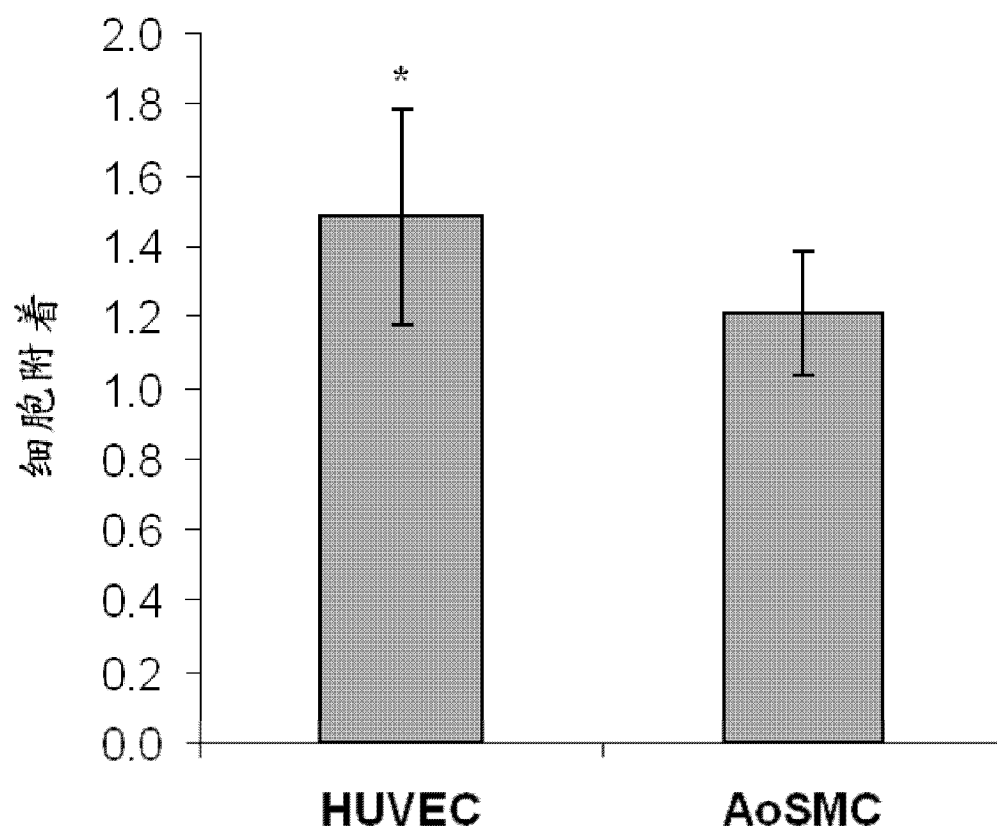


图 5

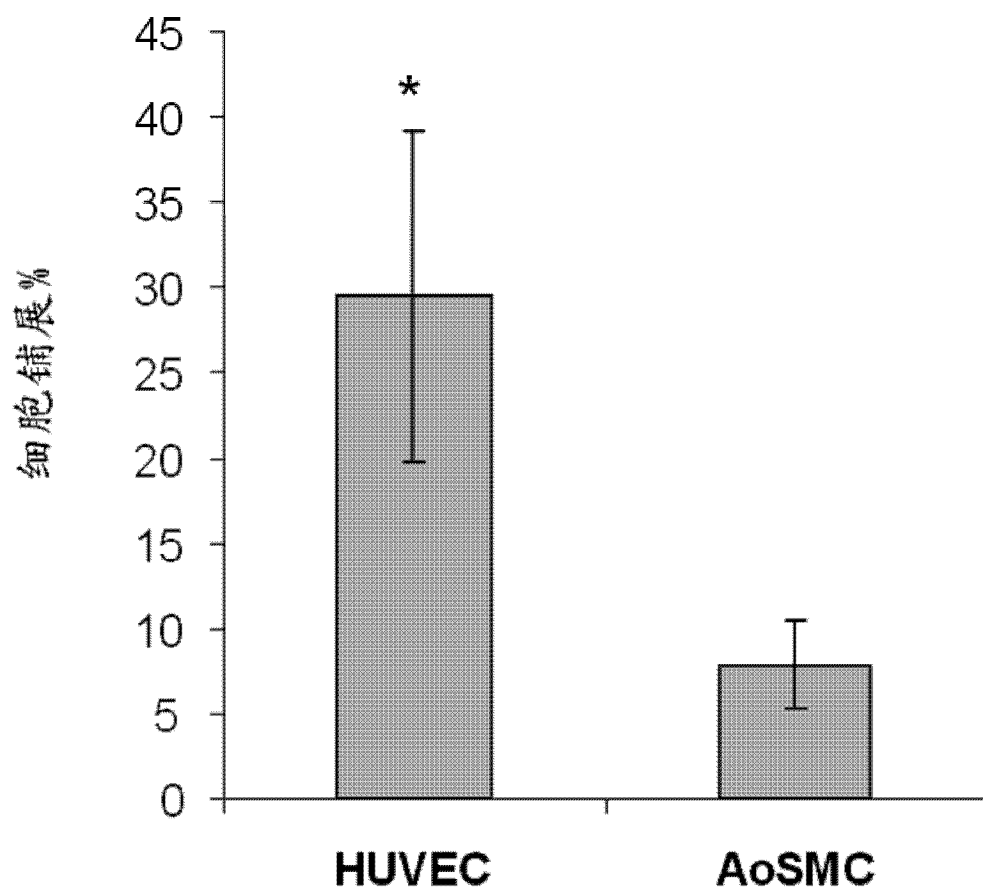


图 6

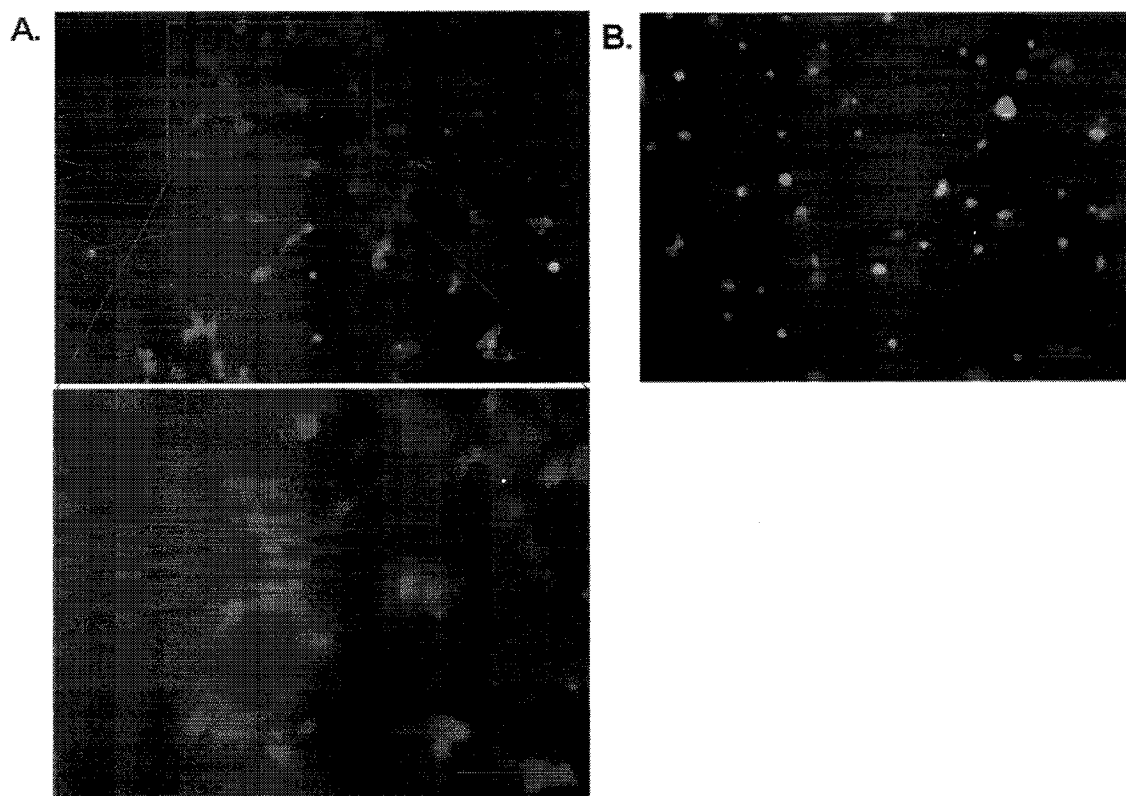


图 7

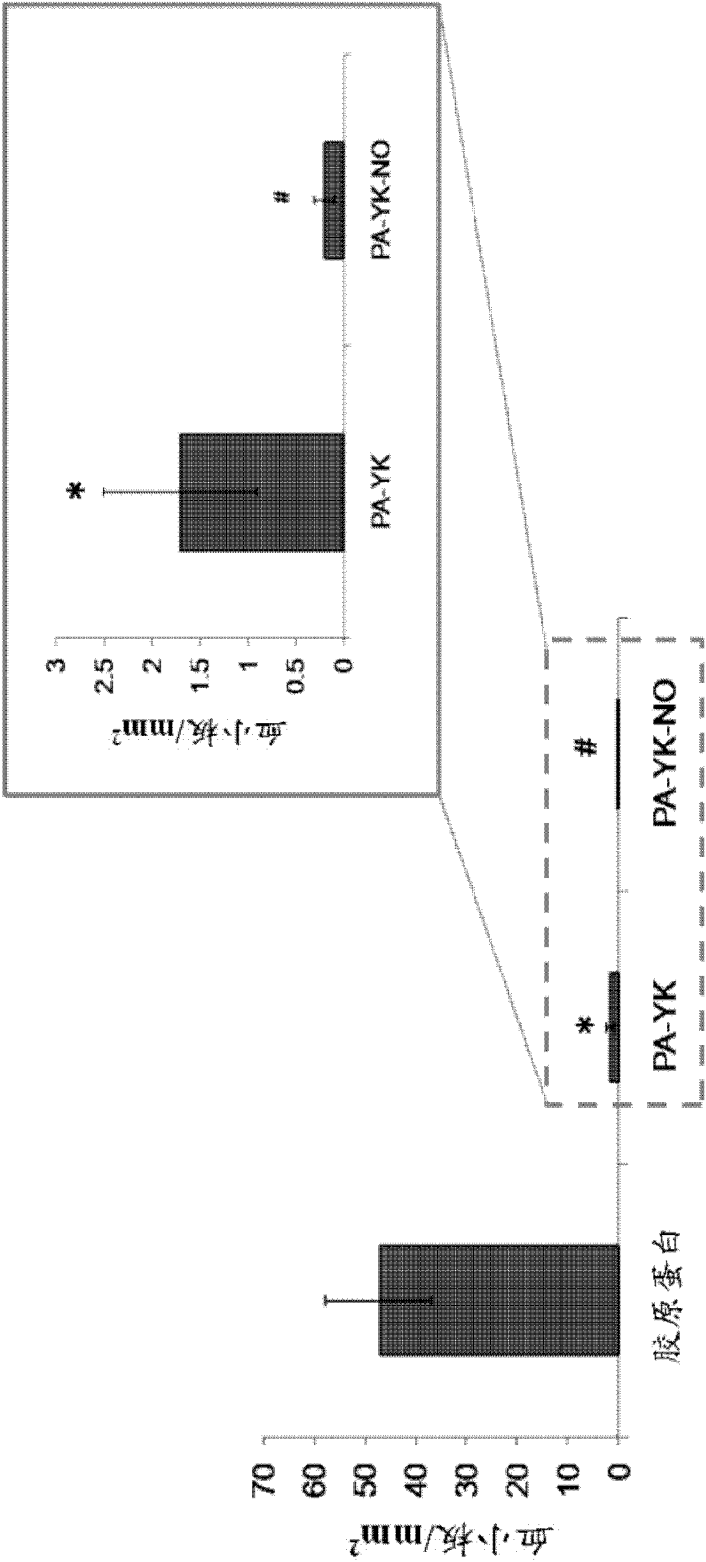


图 8

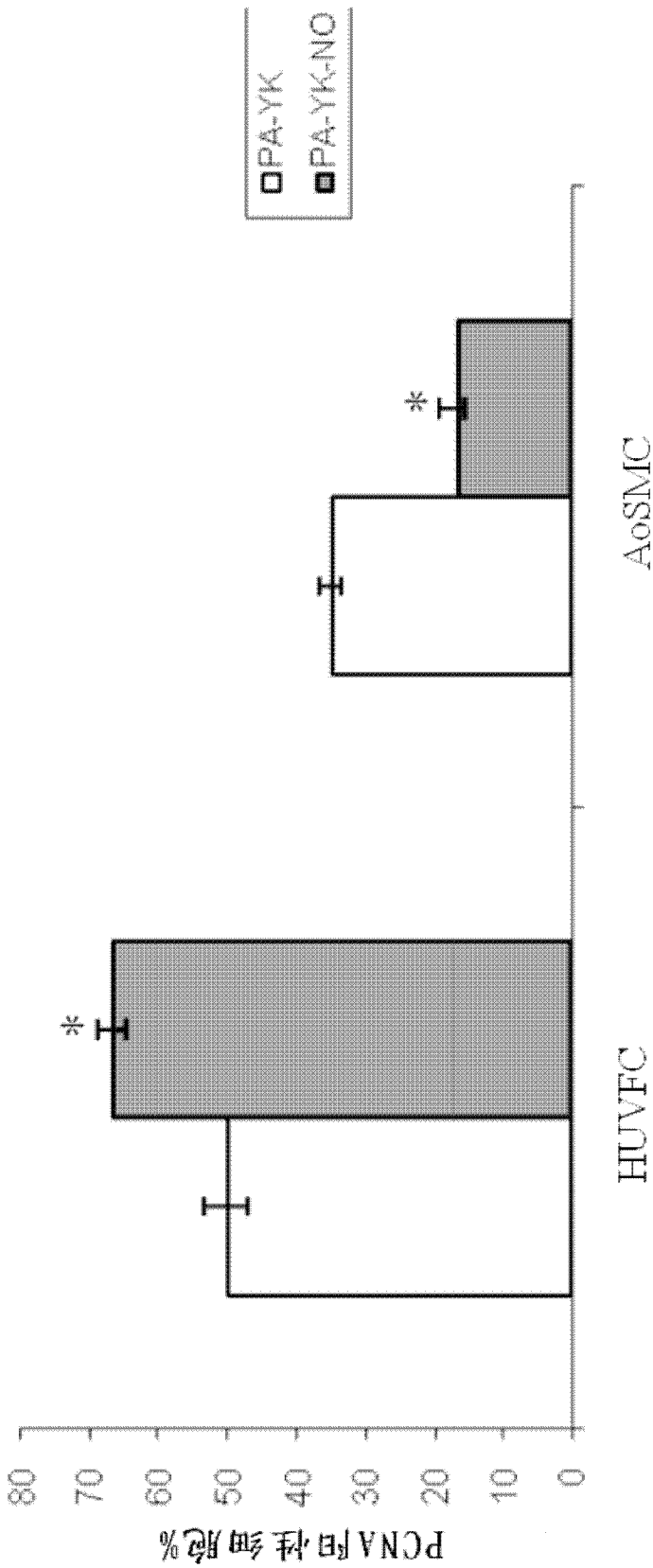


图 9

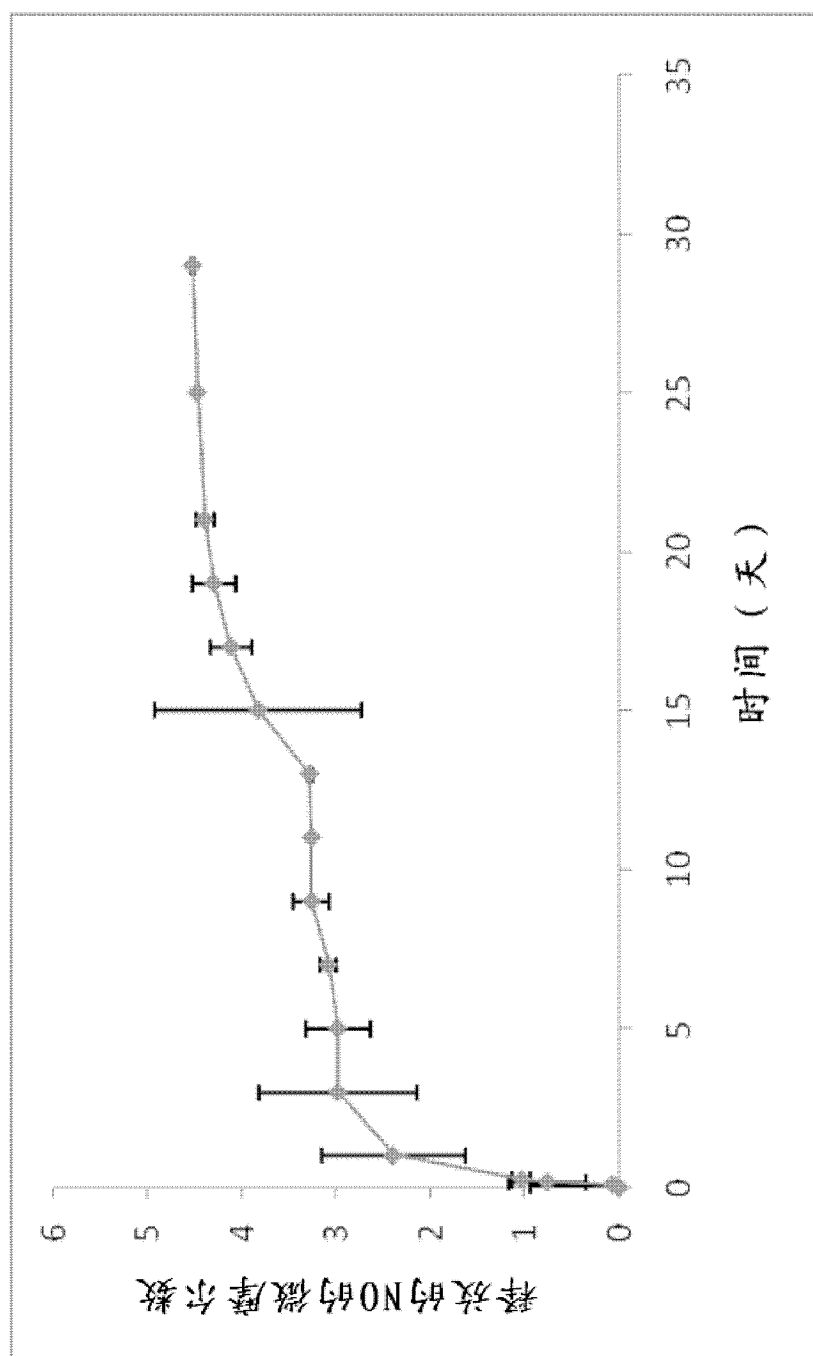


图 10

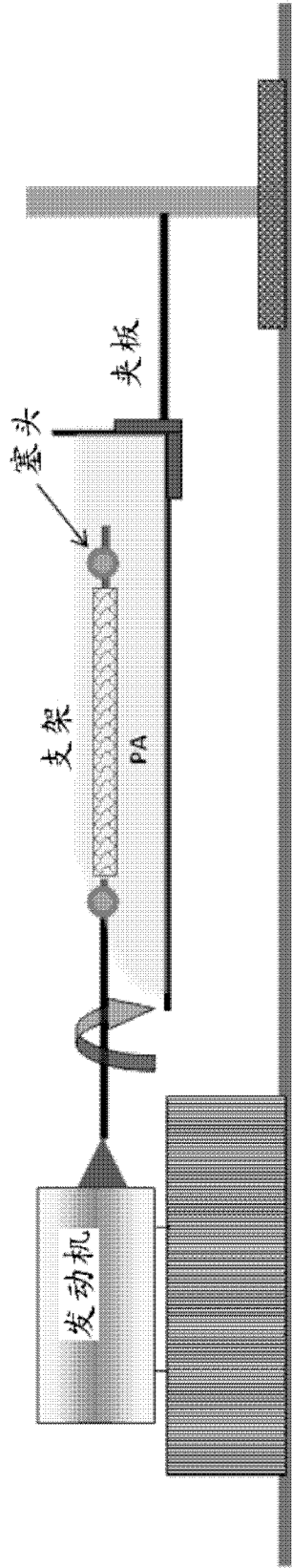


图 11

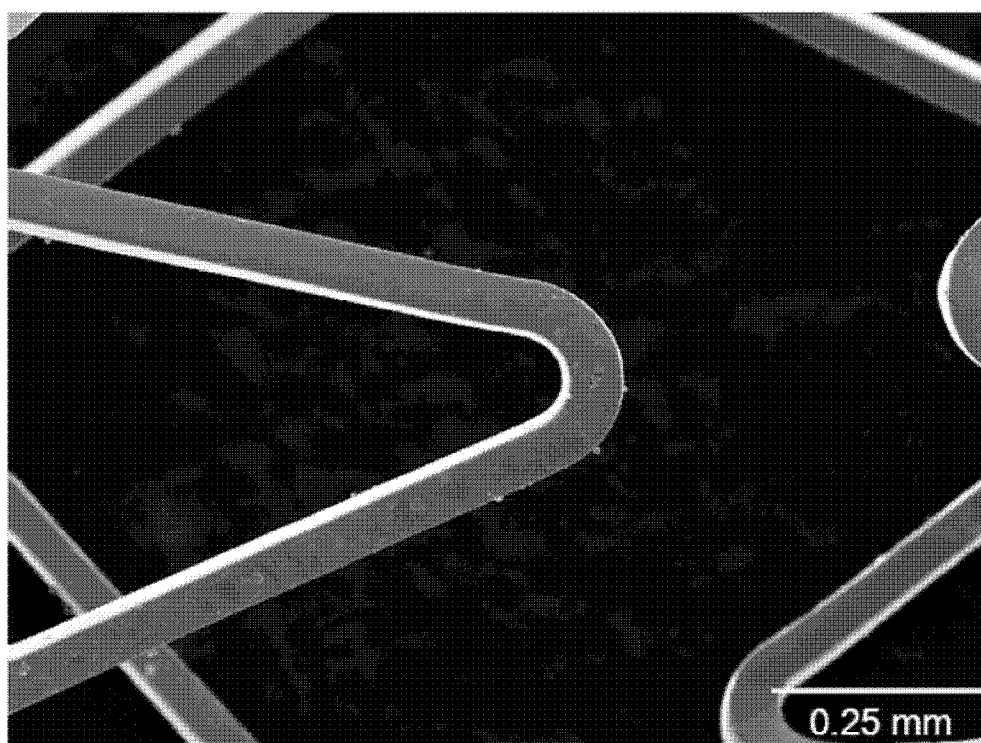


图 12

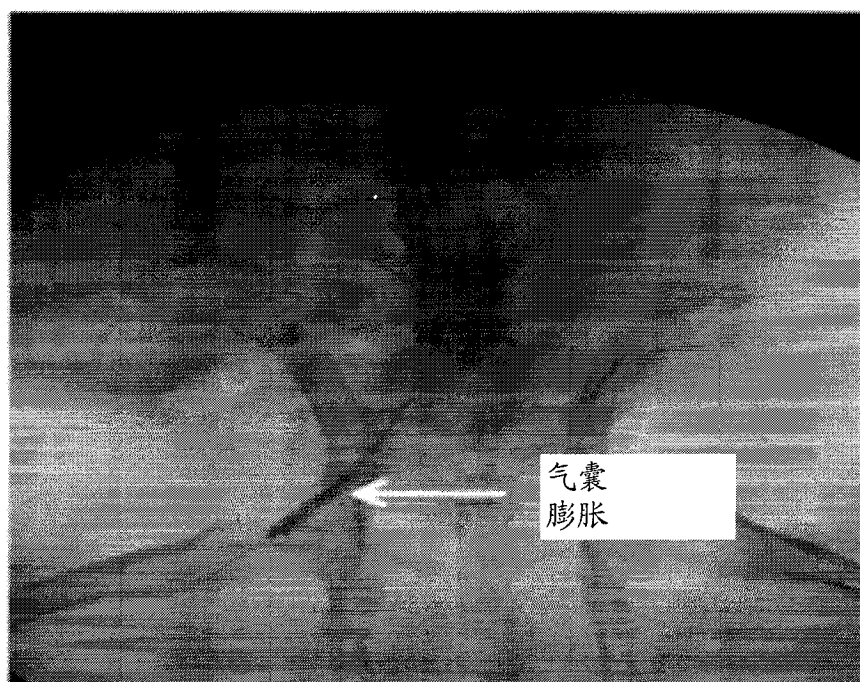


图 13A

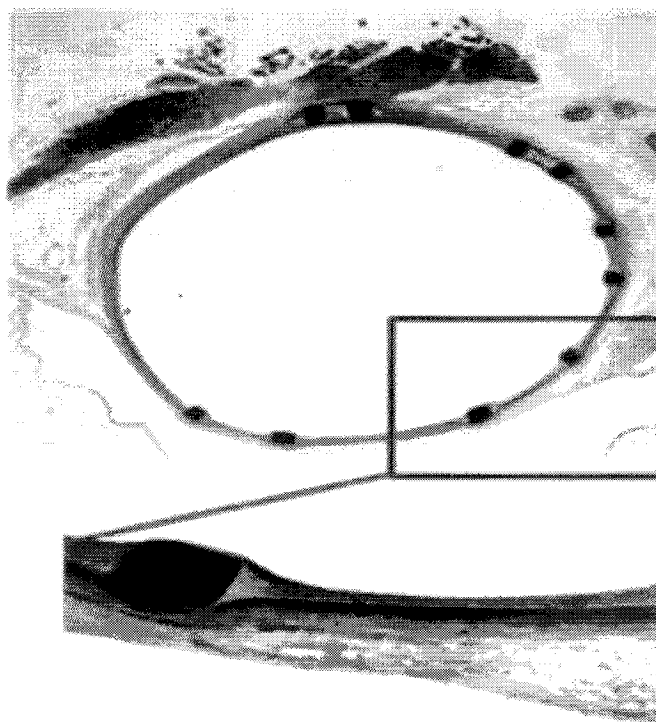


图 13B

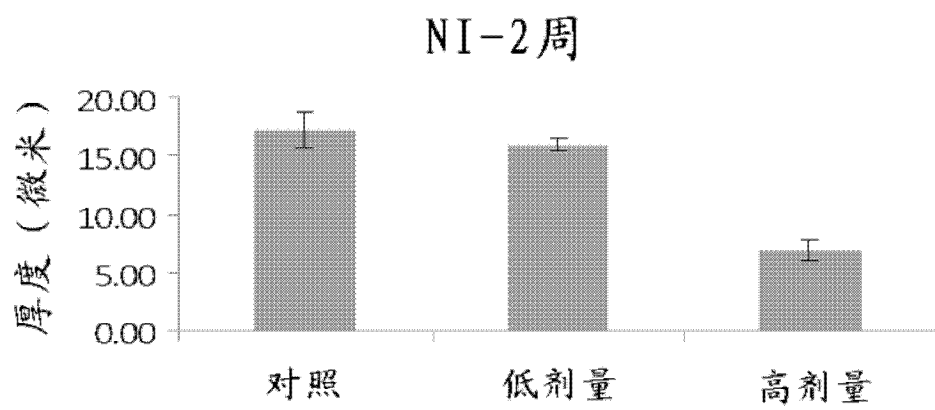


图 14

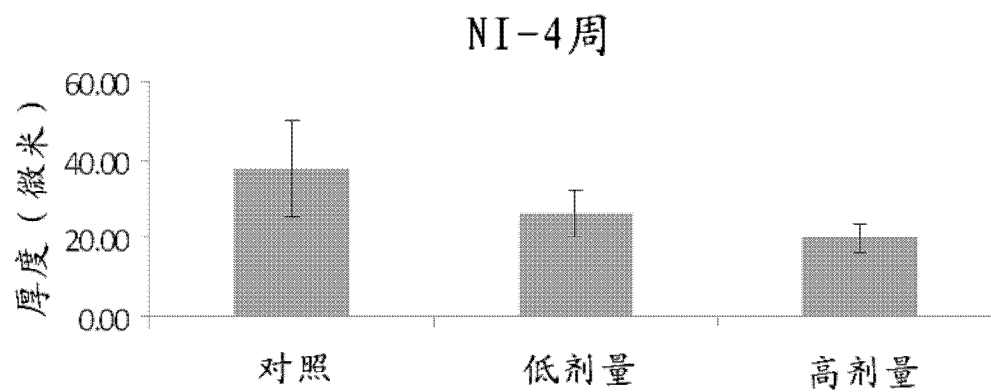


图 15

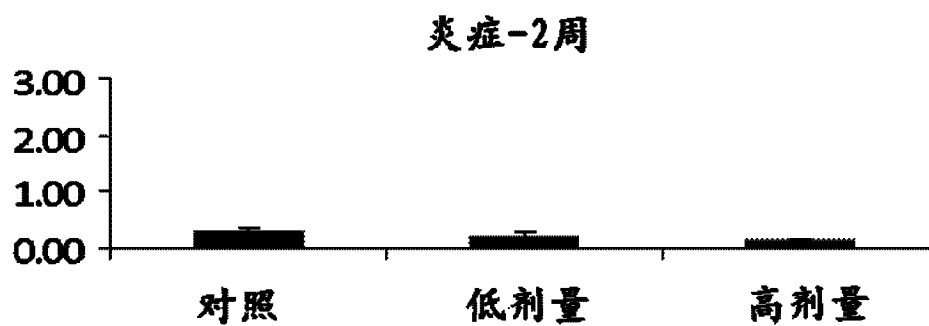


图 16

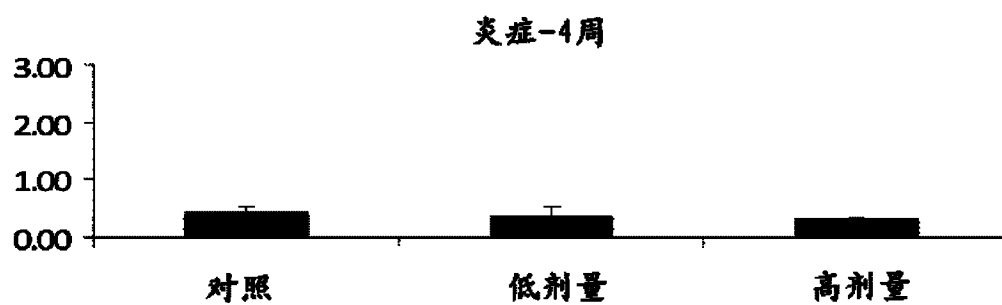


图 17

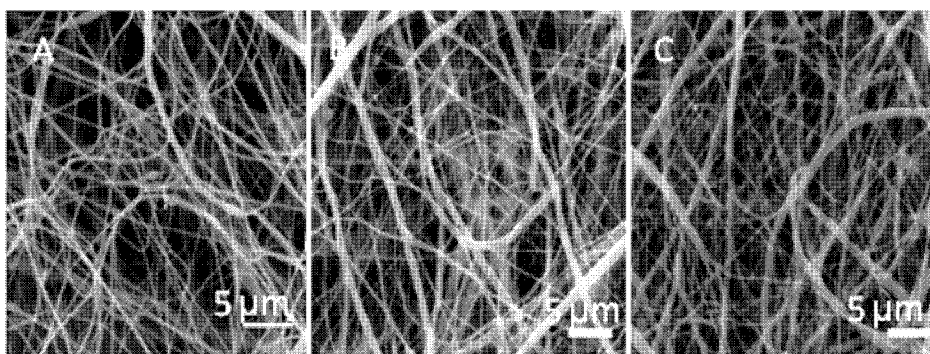


图 20

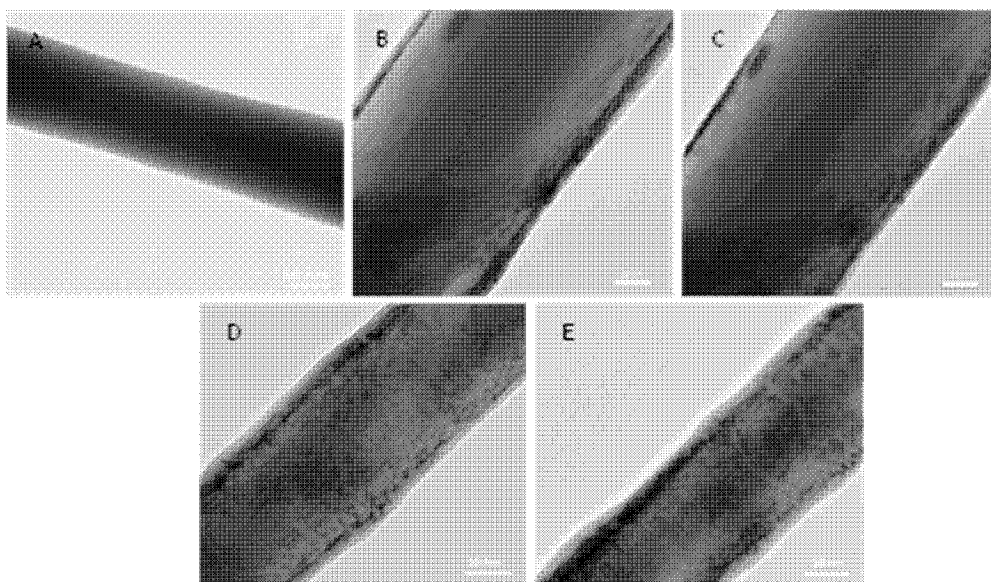


图 21

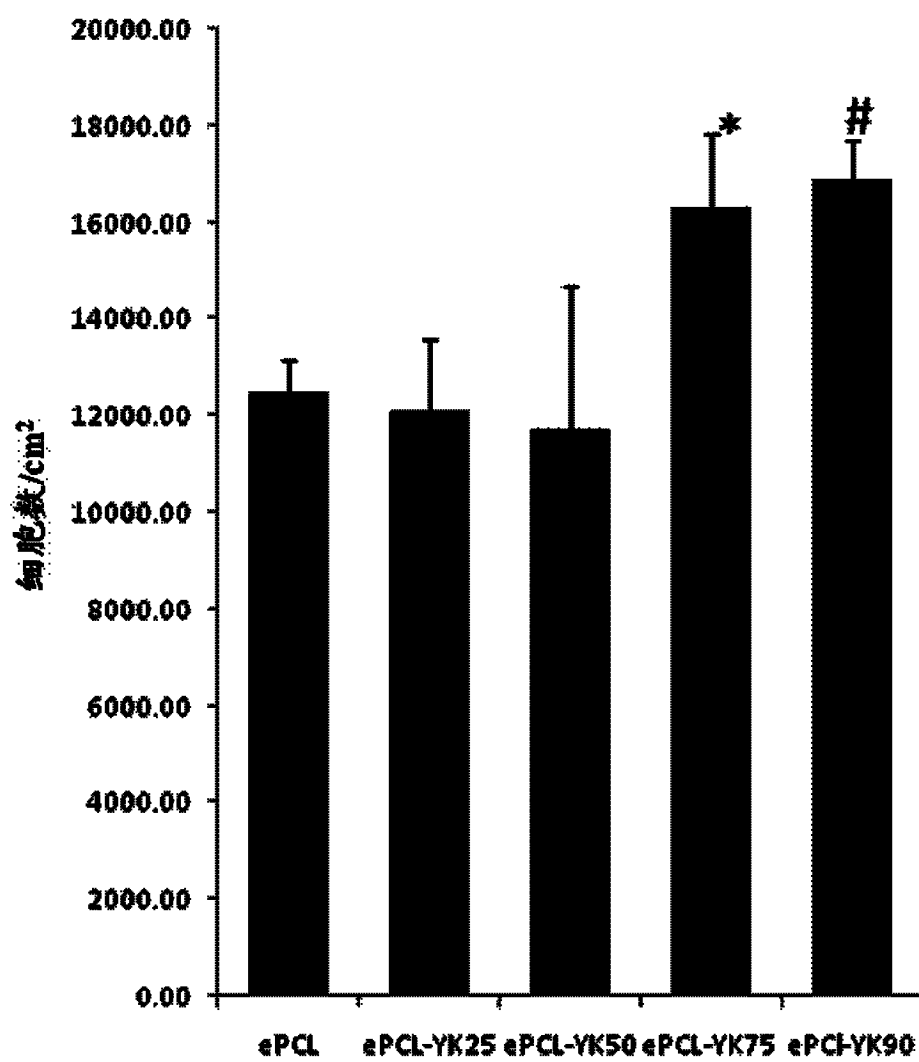


图 22

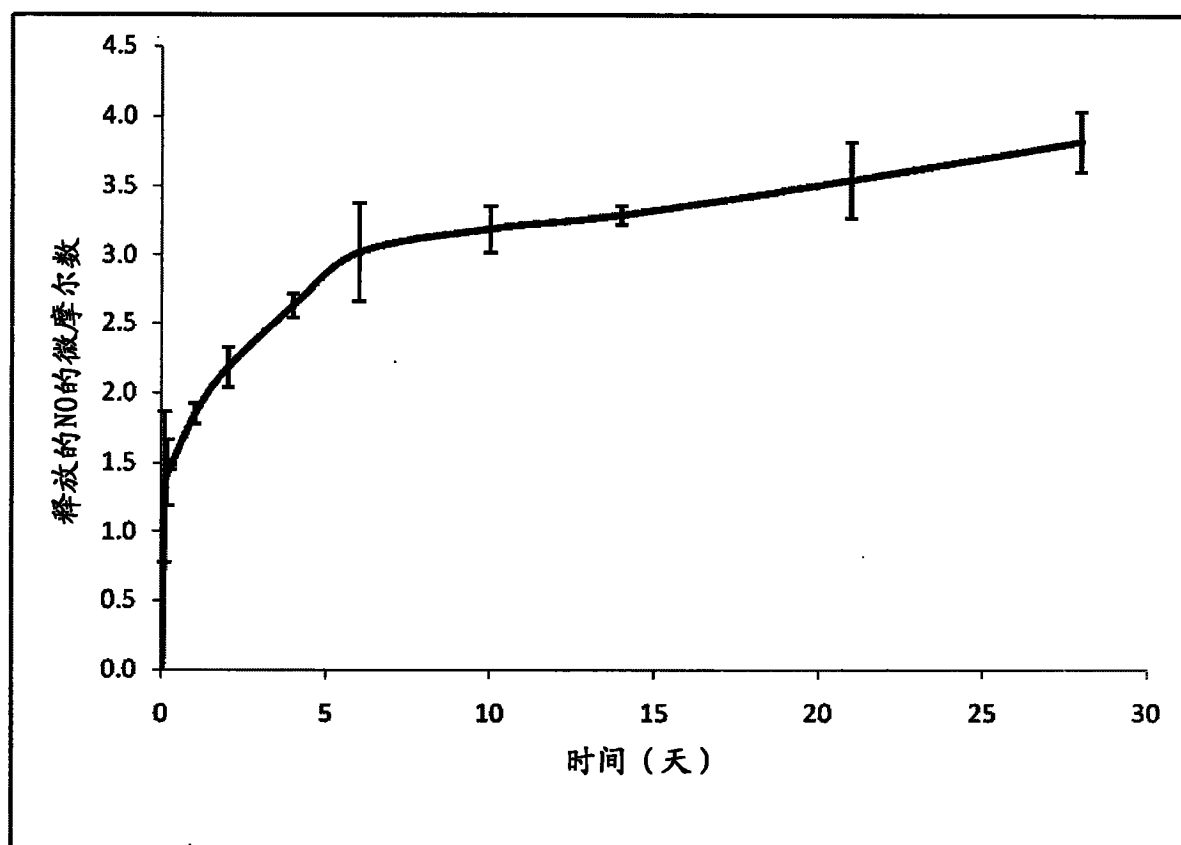


图 23

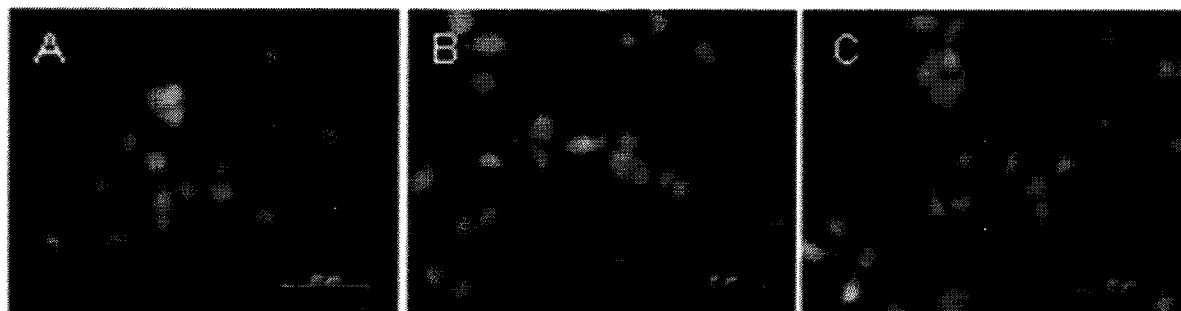


图 24

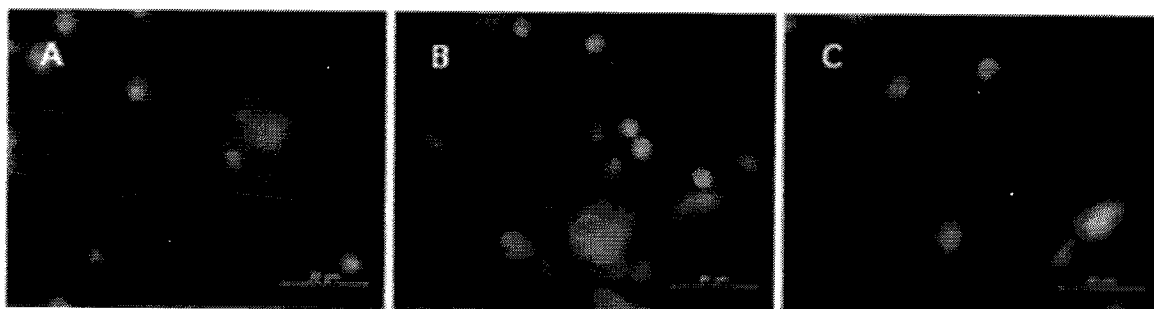


图 25

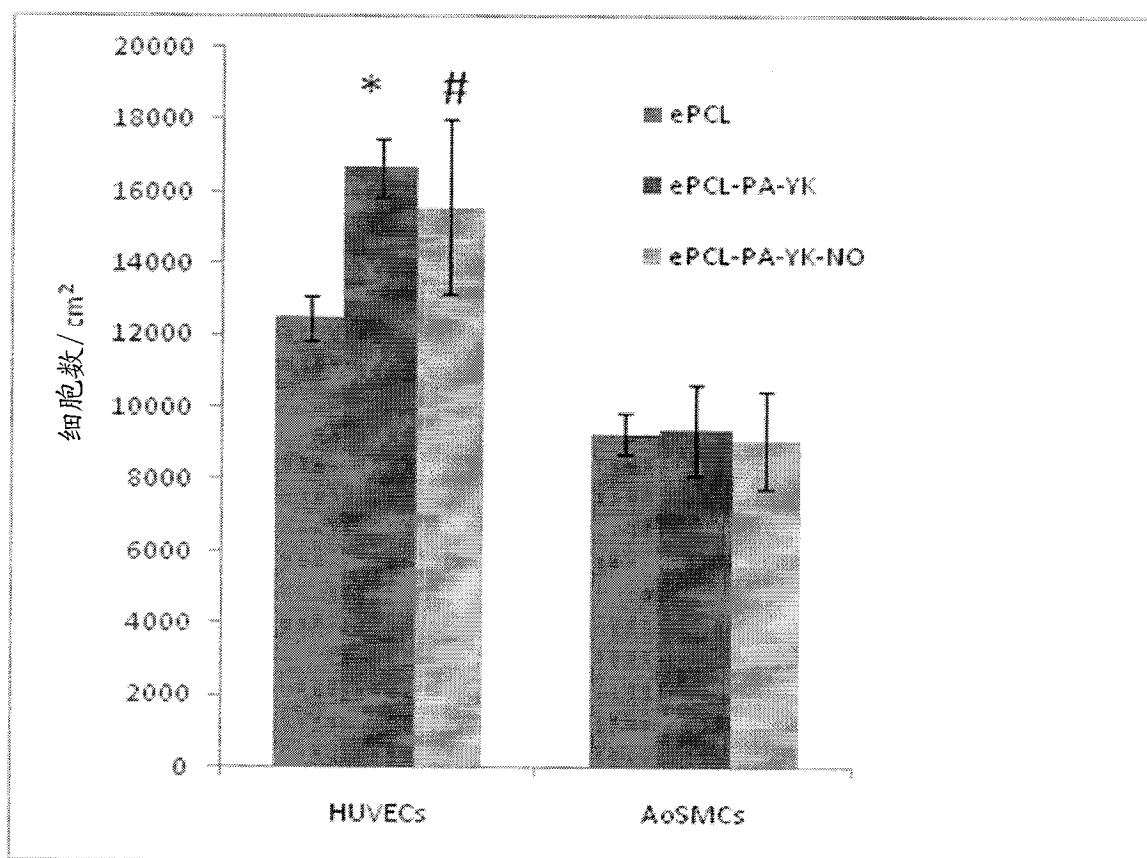


图 26

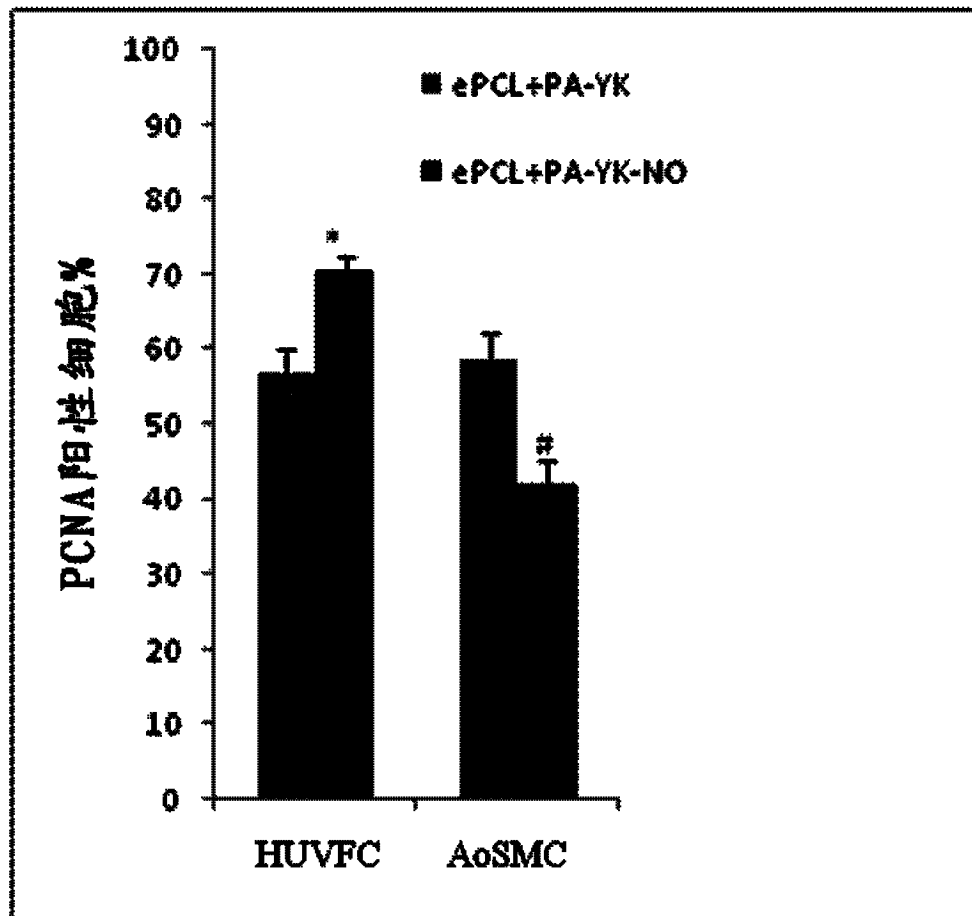


图 27