



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105246520 B

(45)授权公告日 2017.11.21

(21)申请号 201380069978.7

(22)申请日 2013.12.10

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105246520 A

(43)申请公布日 2016.01.13

(30)优先权数据
2012905409 2012.12.10 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.07.09

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2013/001435 2013.12.10

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/089610 EN 2014.06.19

(73)专利权人 埃拉斯塔根私人有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士州

(72)发明人 安托尼·史蒂文·魏斯
苏珊娜·玛丽·米蒂厄

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 彭鲲鹏

(51)Int.Cl.
C07K 14/78(2006.01)
A61L 27/22(2006.01)
A61K 38/39(2006.01)

审查员 杨静

权利要求书2页 说明书29页 附图5页

(54)发明名称

可缩放的三维弹性构建体制造

(57)摘要

本发明涉及原弹性蛋白并且涉及使用弹性材料的组织修复和恢复。披露一种用于由原弹性蛋白产生一种弹性材料的方法,该方法包括加热原弹性蛋白的一种溶液以便由该溶液中的原弹性蛋白形成一种弹性材料。还披露根据该方法制备的弹性材料及其应用。

1. 用于形成弹性材料的方法,该方法包括:
 - 提供原弹性蛋白单体的溶液;
 - 将该溶液施加到表面上;
 - 将该表面上的该溶液加热至从60°C至200°C的温度以使这些原弹性蛋白单体能够彼此结合以便形成弹性材料,当该弹性材料与水溶液相接触时该材料不会解离成原弹性蛋白单体,从而形成该弹性材料。
2. 如权利要求1所述的方法,其中将该溶液加热至足以使这些原弹性蛋白单体能够彼此结合以便形成弹性材料的温度,当该弹性材料:
 - 暴露于生理条件时;
 - 与具有从6.5至8.0的pH的水溶液相接触时;
 - 与具有从30°C至45°C的温度的水溶液相接触时;和/或
 - 与具有75mM至300mM的盐浓度的水溶液相接触时,该材料不会解离成原弹性蛋白单体。
3. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中加热该表面以用于加热该溶液。
4. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中该弹性材料在该加热步骤完成时具有从大于0%至50% (w/w) 的该材料的溶剂含量。
5. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中该溶液是通过过程形成,该过程包括以下步骤:
 - 提供原弹性蛋白单体的溶液;
 - 增加该溶液中原弹性蛋白单体的浓度。
6. 如权利要求5所述的方法,其中通过使溶剂从该溶液中蒸发来增加原弹性蛋白单体的浓度。
7. 如权利要求6所述的方法,其中当该溶液被施加到该表面上时该溶剂从该溶液中蒸发。
8. 如权利要求7所述的方法,其中该溶剂在该溶液在该表面上被加热至使这些原弹性蛋白单体能够彼此结合以便形成弹性材料的温度时蒸发,从而实现这些原弹性蛋白单体的浓度,其中当该弹性材料与水溶液相接触时该材料不会解离成原弹性蛋白单体。
9. 如权利要求5所述的方法,其中通过使原弹性蛋白单体与溶剂分离来增加原弹性蛋白单体的浓度。
10. 如权利要求9所述的方法,其中通过这些原弹性蛋白单体的电纺丝来使这些原弹性蛋白单体与该溶剂分离。
11. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中在该溶液被施加到该表面上时该溶液具有从1%至40% (w/v) 的原弹性蛋白单体浓度。
12. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中该溶液包括凝聚的原弹性蛋白单体。
13. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中这些单体包含原弹性蛋白的亲水结构域和疏水结构域。
14. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中这些单体具有序列,该序列跨至少50个连续氨基酸与人原弹性蛋白的氨基酸序列具有至少90%序列一致性。

15. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中这些单体是具有人原弹性蛋白同种型的序列的重组原弹性蛋白单体。

16. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中该溶液是通过将该溶液喷涂到该表面上而被施加到该表面上的。

17. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中该表面是以铸模、模具或铸件的形式提供的,从而使通过该过程形成的该弹性材料能够被成形为预定形状。

18. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中该溶液是水溶液。

19. 用于形成弹性水凝胶的方法,该方法包括:

- 根据以上权利要求中任一项所述的方法形成弹性材料;
- 使该弹性材料与水溶液相接触。

可缩放的三维弹性构建体制造

发明领域

[0001] 本发明涉及由原弹性蛋白 (tropoelastin) 产生弹性材料, 并且尤其涉及材料形成优选的三维形状, 并且尤其 (但非排他性地) 涉及可以用于组织疗法和修复的材料。

[0002] 发明背景

[0003] 本说明书中对任何现有技术的提及不是并且不应当视为承认或以任何形式暗示这种现有技术形成在澳大利亚或任何其他管辖权的公知常识的部分或者可以合理地预期这项现有技术由本领域技术人员确认、理解和视为相关的。

[0004] 对于可以用于人组织修复的三维构建体存在相当大的、日益增长的需求。基于天然生物材料 (如弹性蛋白) 的构建体由于其显著特性 (包括弹性、自组装、长期稳定性和生物活性) 而已经成为各种组织工程化应用的主要候选物。

[0005] 原弹性蛋白是用于形成弹性蛋白和弹性纤维的基质材料。弹性蛋白是在原弹性蛋白交联时由原弹性蛋白形成的。

[0006] 原弹性蛋白是在大多数水溶液中可溶的, 并且确实是在生理盐和pH下可溶的。可以通过加热水溶液诱导原弹性蛋白从水溶液沉淀。该过程被称为凝聚, 其中原弹性蛋白单体通过一个原弹性蛋白单体的疏水区与另一个单体的相同区的接触彼此缔合。单体的这种缔合是可逆的, 并且凝聚的原弹性蛋白中的原弹性蛋白单体可以例如通过pH、盐或温度改变解离, 从而导致凝聚层的原弹性蛋白单体溶解到溶液中和凝聚层的消失。这意味着原弹性蛋白的凝聚层不足以强健来形成在生理条件下稳定的一种优选的三维弹性结构。

[0007] 原弹性蛋白单体的交联 (无论是以凝聚形式还是以另外的方式) 导致原弹性蛋白单体的一种共价键合, 该共价键合表面上表示不能通过pH、盐或温度调节解离的原弹性蛋白单体的一种缔合。一般来说, 交联的原弹性蛋白单体 (如在弹性蛋白和弹性纤维中所观察到的) 不能彼此解离, 除非这些单体水解, 如在用于纯化来自天然来源的弹性蛋白的现有技术过程中所描述。

[0008] 鉴于如在弹性蛋白或弹性纤维中的交联原弹性蛋白中所观察到的原弹性蛋白单体的通常不可逆的缔合, 原弹性蛋白的交联已被提出作为一种解决方案来使能形成优选的三维弹性结构。该技术的实例在宫本 (Miyamoto) 等人 (2009) WO 2008/033847和WO 2009/099570中披露, 其中使电纺丝材料交联成优选的稳定结构。一些交联技术需要一个加热步骤, 其中一种含有原弹性蛋白的组合物在一种优选的弹性结构的形成中加热。通常需要加热步骤来蒸发溶剂和/或提供用于交联反应的所需温度条件。

[0009] 涉及交联的过程的一个问题是这些交联剂在组织对交联剂的化学性质、或残留未反应的交联剂抑或交联材料的弹性功能的耐受性背景下不是生物相容的。另一个问题是难以由交联材料形成一种优选的结构, 因为在交联之后, 材料迅速凝固成一种类型的结构, 该结构然后不能符合一种优选的强健形状。因此对于这类过程可以用于通过喷射成型技术等形成结构的程度存在限制。

[0010] 最终, 由原弹性蛋白单体形成一种稳定的优选的三维结构所需的是使这些单体以这样一种方式彼此连接, 该方式为以便防止将导致该优选的结构或形状的损失的彼此解

离。形成一种稳定的弹性三维构建体的另一种方法是使用其他分子,这些分子表面上充当连接子以用于将一个原弹性蛋白单体与另一个连接。实例包括通常如WO 2009/099570中所论述的合成聚合物。另一种方法是用如WO 2012/080706、WO 2011/127478和WO 2007/029913中的可溶性弹性单体的溶液喷涂或涂覆一种水不溶性基质。在该后者方法中,不溶性基质(如WO 2007/029913中的一种纳米纤维网状物或如WO 2011/127478中的一种管)表面上将这些原弹性蛋白单体彼此连接,这样使得它们不会在水性条件下解离。这些方法的问题是,不可避免地是不溶性基质提供优选的三维形状而不是这些分子组分,这样影响结构的总体弹性概况并且限制建立三维结构的能力。

[0011] 存在对于形成弹性三维结构的新方法的需要。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明试图解决上述限制、需求或问题中的一个或多个或至少提供对这些上述限制、需求或问题中的一个或多个的一种改进,并且在一个实施例中提供一种用于形成一种弹性材料的方法,该方法包括:

[0014] -提供原弹性蛋白单体的一种溶液;

[0015] -将该溶液施加到一个表面上;

[0016] -将该表面上的溶液加热至足以使这些原弹性蛋白单体能够彼此结合以便形成一种弹性材料的一个温度,当该弹性材料与一种水溶液相接触时该材料不会解离成原弹性蛋白单体,

[0017] 从而形成该弹性材料。

[0018] 在另一个实施例中,提供一种用于形成一种弹性材料的方法,该方法包括:

[0019] -提供原弹性蛋白单体的一种溶液;

[0020] -将该溶液施加到一个表面上;

[0021] -将该表面上的溶液加热至由一个最小值和一个最大值限定的一个范围内的一个温度;

[0022] 其中该最小值是一个温度,在该温度以上原弹性蛋白单体彼此键合以便形成在一种水溶液中不会解离的一种材料;以及

[0023] 其中该最大值是一个温度,在该温度以上形成一种非弹性材料;从而形成一种弹性材料。

[0024] 在另一个实施例中,提供一种通过以上所述的一种方法形成的弹性材料。

[0025] 在另一个实施例中,提供一种用于形成一种弹性水凝胶的方法,该方法包括:

[0026] -根据以上所述的一种方法形成一种弹性材料;

[0027] -使该弹性材料与一种水溶液相接触。

[0028] 在另一个实施例中,提供一种通过以上所述的一种方法形成的弹性水凝胶。

[0029] 在另一个实施例中,提供一种包括以上所述的一种弹性材料或水凝胶的构建体、植入物或装置。

[0030] 在其他实施例中,提供以上所述的弹性材料、水凝胶、装置、植入物或构建体用于修复和/或恢复生物组织和用于在测定应用中使用该弹性材料的方法和用途。

[0031] 现在将参考所附实例以及绘图更充分地描述本发明。然而,应当理解的是,以下描述仅是说明性的并且不应被视为以任何方式作为对上述的本发明的一般性的限制。

[0032] 附图简要说明

[0033] 图1. 热处理的基于水的原弹性蛋白溶液A. 在加热至160℃之后B. 在PBS中润湿之后。

[0034] 图2. 热处理的基于HFP的原弹性蛋白溶液A. 在加热至160℃之后。B. 在PBS中润湿之后。

[0035] 图3. 热处理的基于70%乙醇的原弹性蛋白溶液A. 在加热至160℃之前。B. 在加热至160℃之后。C. 在PBS中的侧视图。D. 在PBS中润湿之后。

[0036] 图4. 用于涂覆管件的热处理的基于HFP的原弹性蛋白溶液A. 在加热至160℃之后。B. 在PBS中润湿之后。

[0037] 图5. 热处理的电纺丝原弹性蛋白的扫描电子显微镜图像。A. 在加热至160℃之后。B. 在PBS中润湿之后。

[0038] 图6. 在热处理的电纺丝原弹性蛋白上培养的成纤维细胞的扫描电子显微镜图像。

[0039] 图7. 示出热处理的电纺丝原弹性蛋白的持久性的VVG染色的皮肤活检的图像。

[0040] 图8. 由一种热处理的基于水的原弹性蛋白溶液制成的薄膜A) 在37℃下干燥16小时之后B) 在进一步加热至160℃持续4小时之后。

[0041] 图9. 由一种热处理的基于水的原弹性蛋白溶液制成的微图案化的薄膜。槽图案是500nm深和3.5μm宽。

[0042] 图10. 在0%-105%和105%-19%延伸率下的模量计算。

[0043] 实施方式的详细说明

[0044] 现在将详细地参照本发明的某些实施例。尽管将结合这些实施例描述本发明, 但将应理解, 不旨在将本发明局限于那些实施例。相反地, 本发明意欲涵盖所有替代方案、修改方案和等效方案, 它们均可包括在如由权利要求书所限定的本发明的范围之内。

[0045] 本领域技术人员将认识到与在此所述的那些相似或等同的许多方法和材料, 它们可以用于本发明的实践。本发明决不限于所描述的方法和材料。

[0046] 应当理解的是, 在本说明书中披露和限定的本发明可扩展至所提及的或者从文本和附图中显而易见的单个特征中的两个或更多个的所有替代性组合。所有这些不同组合构成本发明的各种替代性方面。

[0047] 在此提及的所有专利和公开都通过引用以其全部内容结合在此。

[0048] 本发明的工作首次证明具有所希望的特性如强度和弹性的一种生物相容性材料可以通过加热原弹性蛋白由一种简单过程合成。因此, 本发明提供制造生物相容性三维弹性材料的一种可靠的、可缩放的廉价途径。本发明适合于高通量生产并且使用蛋白质来产生适用于治疗性和体外测定应用的各种各样的生物材料(如片材、管和纤维)。通过本发明的过程产生的这些材料具有为天然弹性蛋白的标志的弹性和强度特性, 但不含通常在由使用交联剂形成的构建体中发现或与由使用交联剂形成的构建体相关的化学污染物和有毒副产物。

[0049] 本发明的这些材料的有利特性贯穿本说明书进行论述, 并且具体地在实例中展示, 这些实例显示本发明的这些材料可以通过加热原弹性蛋白的一种溶液以一种简单的方式制成, 并且所形成的这些材料具有生物相容性、强度、回弹性、细胞结合和细胞外基质相互作用的所需特性, 这些特性使它们能够用于组织工程化应用中以及体外测定的构建中。

[0050] 如上所述,基于生物材料的支架由于其生物相容性和机械特性已被用于组织工程化应用。然而,合成基于三维生物材料的构建体的现有技术方法是低效、缓慢且受限制的,并且替代方法——传统组织工程化技术绝大多数需要使用缓慢且昂贵的方法(这些方法可能花费数周来产生一个构建体),通常扩散受限几百微米厚度,并且定期承受需要法规遵从性的毒性组分或副产物问题的负担。

[0051] 因此在一个实施例中,提供一种用于形成一种弹性材料的方法,该方法包括:

[0052] -提供原弹性蛋白单体的一种水溶液;

[0053] -将该溶液施加到一个表面上;

[0054] -将该表面上的溶液加热至足以使这些原弹性蛋白单体能够彼此结合以便形成一种弹性材料的一个温度,当该弹性材料与一种水溶液相接触时该材料不会解离成原弹性蛋白单体,

[0055] 从而形成该弹性材料。

[0056] 本发明的一个重要发现是,加热步骤使这些原弹性蛋白单体的缔合能够具有如此亲和力以使得当使聚集体与一种水溶液相接触时这些单体基本上不会解离。加热形成一种弹性聚集体,该聚集体是在它不会在生理条件下解离成单个单体方面来说不同于一种凝聚层并且在它不需要单体与有毒交联剂如戊二醛的交联或使用具有碱性pH的一种溶剂来维持自身处于一种固相或者来保留它所形成的形状的永久性的意义上不同于弹性纤维或其他材料的质量或材料。优点在于该过程或多或少将生物相容性单体永久地组装成可以用于组织应用而无毒性问题的一种永久性结构或形状。

[0057] 典型地将该溶液加热至足以使这些原弹性蛋白单体能够彼此结合以便形成一种弹性材料的一个温度,当该弹性材料暴露于生理条件、尤其是人生理条件时该材料不会解离成原弹性蛋白单体。具体地说,聚集体不会在温度和pH的生理条件下解离。有利地,聚集体不会在以下条件下解离:

[0058] • 温度(从约30°C至约45°C);

[0059] • 盐(约75mM至约300mM的浓度);

[0060] • pH(约6.5至约8.0)。

[0061] 因此,这种材料不仅适合用于在生理条件下使用,而且适合于其他应用如体外测定,其中它可能被暴露于其他更苛刻的条件。值得注意的是,这种材料是在无需进行这些原弹性蛋白单体的任何交联并且无需使用一个支架来将肽的组装体结合到其上的情况下实现的。

[0062] 通过本发明的过程形成的材料具有许多优点。首先,这些原弹性蛋白单体保持彼此结合,这样使得由聚集体形成的弹性材料的三维形状在一种水性环境中得以保留。其次,使得原弹性蛋白如此适用于组织工程化应用的起始材料的特性(例如,弹性、强度、回弹性和生物相容性)被保留在最终产物中。第三,虽然聚集体可以在一种水溶液中吸收水以便形成一种水凝胶,但是在这种情况下聚集体不会解离,从而维持弹性材料的三维结构。

[0063] 在一个实施例中,将该溶液加热至足以使这些原弹性蛋白单体能够彼此结合以便形成一种弹性材料的一个温度,当该弹性材料与具有从约6.5至约8.0的pH的一种水溶液相接触时,该材料不会解离成原弹性蛋白单体。如在此所有,限定一个长度范围的限制的措辞例如像“从1至5”意指从1至5的任何整数,即1、2、3、4和5。换言之,由明确提及的两个整数限

定的任何范围意指包括且披露限定所述限制的任何整数和包括在所述范围内的任何整数。例如,该溶液可以具有约6.6、约6.7、约6.8、约6.9、约7.0、约7.1、约7.2、约7.3、约7.4、约7.5、约7.6、约7.7、约7.8、约7.9、或约8.0的pH。

[0064] 在一个实施例中,将该溶液加热至足以使这些原弹性蛋白单体能够彼此结合以便形成一种弹性材料的一个温度,当该弹性材料与具有从约30°C至约45°C的温度的一种水溶液相接触时,该材料不会解离成原弹性蛋白单体。例如,该温度可以是约31°C、约32°C、约33°C、约34°C、约35°C、约36°C、约37°C、约38°C、约39°C、约40°C、约41°C、约42°C、约43°C、约44°C、或约45°C。

[0065] 在一个实施例中,将该溶液加热至足以使这些原弹性蛋白单体能够彼此结合以便形成一种弹性材料的一个温度,当该弹性材料与具有约75mM至约300mM的盐浓度的一种水溶液相接触时,该材料不会解离成原弹性蛋白单体。例如,盐浓度可以是约75mM、约80mM、约85mM、约90mM、约95mM、约100mM、约110mM、约120mM、约130mM、约140mM、约150mM、约160mM、约170mM、约180mM、约190mM、约200mM、约210mM、约220mM、约230mM、约240mM、约250mM、约260mM、约270mM、约280mM、约290mM、或约300mM。

[0066] 在一个实施例中,将该溶液加热至足以使这些原弹性蛋白单体能够彼此结合以便形成一种弹性材料的一个温度,当该弹性材料暴露于生理条件(例如约7.2与约7.5之间的pH、约36°C与约37°C之间的温度和约150mM的盐浓度)时,该材料不会解离成原弹性蛋白单体。

[0067] 根据该过程,加热该溶液以便形成本发明的弹性材料。如以上所论述,加热步骤的目的是形成一种含有缔合的原弹性蛋白单体的材料,更确切地说,使这些原弹性蛋白单体能够彼此结合以便形成一种弹性材料,当该弹性材料与一种水溶液相接触时该材料不会然后解离成原弹性蛋白单体。加热步骤将是在足以使浓缩物中的这些原弹性蛋白单体能够彼此结合以便形成包括原弹性蛋白单体的一种聚集体或材料的一个温度下进行。典型地,加热将是在约100°C或更高,例如从100°C至160°C的温度下进行的。例如,加热步骤的温度可以是110°C或更高、120°C或更高、130°C或更高、140°C或更高、150°C或更高、160°C或更高、170°C或更高、或180°C或更高。优选地,该温度是在约120°C与约180°C之间、约130°C与约170°C之间、或在约140°C与约160°C之间。最优选地,该温度是约160°C。

[0068] 在另一个实施例中,提供一种用于形成一种弹性材料的方法,该方法包括:

[0069] -提供原弹性蛋白单体的一种溶液;

[0070] -将该溶液施加到一个表面上;

[0071] -将该表面上的溶液加热至由一个最小值和一个最大值限定的一个范围内的一个温度;

[0072] 其中该最小值是一个温度,在该温度以上原弹性蛋白单体彼此键合以便形成在一种水溶液中不会解离的一种材料;以及

[0073] 其中该最大值是一个温度,在该温度以上形成一种非弹性材料。

[0074] 根据该实施例,在该最小值以下,不形成本发明的弹性材料。也就是说,所形成的材料是在水溶液中、特别是在生理条件下可解离的。因此,在该最小值以下,可能形成更像是一个凝聚层的某物。在该最大值以下,材料保留在此讨论的弹性特性。在该最大值以上,材料可能损失弹性特性。

[0075] 应进行溶液的加热的适合时间长度包括约10分钟或更长、约20分钟或更长、约30分钟或更长、约40分钟或更长、约50分钟或更长、约1小时或更长、约2小时或更长、约3小时或更长、约4小时或更长、或约5小时或更长。然而，本领域的技术人员将会理解，溶液应被加热至的温度以及溶液应被加热的时间将取决于各种因素变化，这些因素如：

[0076] • 所采用的加热方法的类型(例如，干式加热、闪速加热等)；

[0077] • 溶液中原弹性蛋白单体的浓度；

[0078] • 溶液的体积；

[0079] • 原弹性蛋白单体的组成；

[0080] • 聚集体或弹性材料中所希望的缔合程度；

[0081] • 在加热期间的相对湿度。

[0082] 在某些实施例中，加热从8至16个小时可以用于提供结晶度更高且仍保留弹性特性的一种物质。

[0083] 通常在加热期间的湿度可以是约20%至约80%、优选约35%、45%、55%、65%或75%的相对湿度。

[0084] 如在此所述，加热步骤可以导致形成发展一种色变的一种弹性材料。因此，在某些实施例中，可以通过测定材料是否已经发展一种色变来测试一种弹性材料的形成或检查加热步骤的完成。一种色变通常是从弹性蛋白的正常半透明外观到可能是黄色或褐色的一种颜色的变化。并非需要整个材料发展一种色变。通常可以通过水合减少弹性材料中的色变。

[0085] 本领域的技术人员还将意识到，通过利用不同的加热方法，可以获得具有不同内部结构的聚集体。例如，闪速加热将涉及使浓缩物经受一种强烈热源仅持续非常有限量的时间。因此，加热将发生持续足够量的时间以便使这些单体缔合来形成聚集体，但对于捕获在该聚集体中的所有溶剂来说将太快而不能从该聚集体中蒸发，从而形成具有一种液泡型结构的一种聚集体。此外，聚集体可以被再次加热，这样使得所捕获的溶剂蒸发，从而迫使液泡膨胀，并且导致一种多孔聚集体的形成。本领域的技术人员还将意识到，溶剂可能不存在于聚集体内部，而是可能存在于聚集体的外表面上(除了存在于聚集体内部的溶剂之外或作为存在于聚集体内部的溶剂的一种替代方案)。

[0086] 该过程的一个特别重要的优点是在某些实施例中，由该过程形成的材料可以是表面上不透气的，这起因于通过加热步骤保持的蛋白质分子的紧密对准。这样使材料能够被吹制成一种特定形状，与在玻璃吹制技术中发生的差不多。

[0087] 不管使用何种加热方法，本领域的技术人员将理解，通过加热溶液形成的聚集体因此可以包括到不同程度的水。例如，聚集体可以包括显著量的水(例如，多于约60%w/w水)，从而使其基本上是一种水凝胶。可替代地，水可以以仅约10%w/w的量存在于聚集体中。因为水含量影响弹性，所以聚集体(并且因此材料)的弹性可以通过改变聚集体的水含量而改变，聚集体的水含量进而可以通过改变各种因素如在加热之前浓缩物中存在的水的量以及加热时间、方法和温度来改变。

[0088] 在一个实施例中，弹性材料在加热步骤完成时具有从大于约0%至约50%(w/w)的材料的溶剂含量。例如，弹性材料可以具有约0.5%(w/w)、约1%(w/w)、约2%(w/w)、约3%(w/w)、约4%(w/w)、约5%(w/w)、约10%(w/w)、约15%(w/w)、约20%(w/w)、约25%(w/w)、约30%(w/w)、约35%(w/w)、约40%(w/w)、约45%(w/w)或约50%(w/w)的溶剂含量。在一个

实施例中,溶剂是水。

[0089] 溶液可以通过直接加热该溶液或通过加热该溶液被放置到其上的表面来进行加热。在后者实施例中,表面可以在溶液被施加到其上之前进行加热,或者在施加溶液时它可以是在室温下并且然后被加热至相关温度。因此,在一个实施例中,加热表面以用于加热溶液。

[0090] 也如上文所讨论,本发明的过程的一个主要优点是可以形成生物相容性材料,因为该过程不需要使用试剂如交联剂来实现聚合物形成。因此,在一个实施例中,本发明的过程排除使用交联剂。

[0091] 在另一个实施例中,该过程可以排除盐或其他凝聚剂的使用,以便有助于形成基于原弹性蛋白的聚合物。

[0092] 在另一个实施例中,该过程可以排除pH-调节剂的使用,这些pH-调节剂实现原弹性蛋白单体的不可逆聚集。具体地说,在一个实施例中,加热步骤是在不为碱性pH的pH下进行的,例如,pH通常可以小于8.5或8.0。

[0093] 如上所讨论,本发明的材料是通过加热在一个表面(例如像,在一种成形模具中)上的原弹性蛋白的一种溶液来形成的。不希望受任何理论或作用模式限制,本发明人认为在原弹性蛋白的一种浓缩溶液中,原弹性蛋白单体是紧密填充的。这种紧密填充有助于在加热溶液时这些单体之间的键合,从而产生当置于一种水性环境中时不会解离成分离的原弹性蛋白单体的一种弹性材料。

[0094] 形成原弹性蛋白单体的溶剂的溶液可以是一种水溶液或一种非水溶液。

[0095] 如在此所用,术语“水溶液”是指一种含水溶液。一种水溶液可以包含其他组分,如缓冲剂和药学上可接受的赋形剂,并且还可以包含其他有机、水混溶性溶剂,如甲醇、乙醇和六氟丙醇以及其组合。在水溶液包含其他溶剂的情况下,本领域的技术人员将会理解,水将是主要溶剂组分并且其他一种或多种溶剂将占溶剂组分的一小部分。使用一种水溶液是特别有利的,因为它意味着原弹性蛋白浓缩物、并且因此材料是由一种组合物形成的,该组合物不包含为非生物相容的或有毒的或者可以在体内降解以便形成毒性或不希望的副产物的任何组分。因此,优选地,水溶液不包含为有毒的或非生物相容的和/或当材料在使用中(例如,在体内或在一种测定中)时形成有毒的或非生物相容的物质的任何组分(溶剂、缓冲剂等)。

[0096] 如在此所用,术语“非水溶液”是指不包含水抑或包含水作为一种次要溶剂组分的一种溶液。非水溶剂的实例包括HFP,例如,如在此的实例中所例示。使用一种非水溶剂来形成一种非水溶液的一个优点是通常该溶剂可以具有比水更低的沸点。这将使溶剂能够在该过程期间根据需要蒸发,而无需大量添加热量。

[0097] 在一个实施例中,该溶液通过一个过程产生,该过程包括以下步骤:

[0098] -提供原弹性蛋白单体的一种溶液;

[0099] -增加该溶液中原弹性蛋白单体的浓度。

[0100] 最终产物可以被称为一种“浓缩物”。该浓缩物可以通过本领域的技术人员已知适合的任何方法来获得。据信,在浓缩物中,原弹性蛋白单体彼此紧密接触,这样使得在加热时这些单体将形成一种聚集体或质量,该聚集体可以符合在其上形成它的表面的形状,并且当被置于一种水性环境中时该聚集体不会解离或经历在加热期间形成的键联的显著破

坏。

[0101] 该浓缩物可以通过经由例如加热溶液或在溶液上吹空气或氮来使溶剂从溶液中蒸发来获得。因此,在一个实施例中,通过使溶剂从溶液中蒸发来增加原弹性蛋白单体的浓度。

[0102] 当溶液被施加到表面上时溶剂可以从溶液中蒸发。溶剂可以在溶液在表面上被加热至使这些原弹性蛋白单体能够彼此结合以便形成一种弹性材料(当该弹性材料与一种水溶液相接触时该材料不会解离成原弹性蛋白单体)的一个温度时蒸发,从而实现这些原弹性蛋白单体的浓度。

[0103] 在一个实施例中,通过使原弹性蛋白单体与溶剂分离来增加原弹性蛋白单体的浓度。可以通过这些原弹性蛋白单体的电纺丝来使这些原弹性蛋白单体与溶剂分离。“电纺丝”是一种工艺,其中通过使一种带电荷的溶液或熔体跨电势梯度流动通过一个孔来由一种溶液或熔体形成纤维。在一个实施例中,在溶液被施加到表面上时该溶液具有从约1%至约40% (w/v) 的原弹性蛋白单体浓度。例如,该溶液中原弹性蛋白单体的浓度可以是约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约12%、约14%、约16%、约18%、约20%、约22%、约24%、约26%、约28%、约30%、约32%、约34%、约36%、约38%、或约40% (w/v)。

[0104] “电纺丝材料”是作为电纺丝工艺的结果形成一种结构或结构组(如纤维、网状物或微滴)的任何分子或物质。一般来说,这种材料可以是天然的、合成的或这些的组合,但在本发明中,优选的是使用原弹性蛋白。

[0105] 可以使用电纺丝使基质材料沉积在织物模板上。这种平台技术被广泛用于组织工程化中来制造由纳米和微纤维状结构组成的支架(Li等人(2006)和Li等人(2005))。

[0106] 电纺丝的过程涉及将一种含有聚合物或单体的流体(例如,一种聚合物或单体溶液、聚合物或单体悬浮液或聚合物或单体熔体)放置在配备有一个小孔口(如一个针或移液管尖端)和一个计量泵的一种储器中。一个高压电源的一个电极被放置成与该流体或孔口电接触,而另一个电极被放置成与一个目标(典型的一个集电器屏或一个旋转心轴)电接触。在电纺丝期间,通过将高电压施加至溶液或孔口(例如,约3至约15kV)来使流体带电荷并且然后通过计量泵迫使流体通过小孔口,从而提供一种稳定流动。虽然在孔口处的流体由于表面张力通常将具有一种半球形状,但施加高电压引起在孔口处的否则为半球形的流体伸长以便形成被称为泰勒锥(Taylor cone)的一种锥形形状。在足够高的电压施加至流体和/或孔口的情况下,带电荷的流体的静电排斥力克服表面张力并且流体的带电荷的射流从泰勒锥的尖端喷射出且朝向目标加速,其典型地被偏压在-2至-10kV之间。具有施加的偏压(例如,1至10kV)的一个聚焦环可以任选地用于引导流体的带电荷的射流的轨迹。在流体的带电荷的射流朝向偏压的目标行进时,它经历一种复杂的抖动和弯曲运动。如果流体是一种单体或聚合物溶液或悬浮液,则溶剂典型地在中途(mid-flight)期间蒸发,从而在偏压的目标上留下一一种聚合物或单体纤维。如果流体是一种聚合物或单体熔体,则熔融单体/聚合物在中途冷却并固化并且作为一种单体/聚合物纤维被收集在偏压的目标上。当聚合物/单体纤维积聚在偏压的目标上时,一种多孔网在该偏压的目标上形成。

[0107] 电纺丝基质的特性可以通过改变电纺丝条件来进行定制。例如,当模板相对接近于孔口时,所得到的电纺丝网倾向于含有不均匀地厚纤维,这样使得纤维的一些区域具有

一种“珠状”外观。然而，当模板进一步移动远离孔口时，该网的纤维倾向于在厚度上更均匀。此外，模板可以相对于孔口移动。在某些实施例中，模板以一种规则的和周期性的方式来回移动，这样使得该网的纤维基本上彼此平行。当是这种情况时，所得到的网可以相较于垂直于纤维的方向在平行于纤维的方向上具有更高的应变抗性。在其他实施例中，偏压的目标相对于孔口以一种二维或三维图案移动，以便产生包括具有相似或不同丝束定向、厚度等的一个或多个图案化层的一种网。在其他实施例中，模板相对于孔口随机移动，这样使得该网的平面中的应变抗性是各向同性的。电纺丝基质的特性还可以通过改变施加到电纺丝系统上的电压的幅值来改变。在一个非限制性实例中，电纺丝设备包括偏压至20kV的一个孔口。在另一个非限制性实例中，电纺丝设备包括偏压至-7kV的一个模板。在又一个非限制性实例中，电纺丝设备包括偏压至3kV的一个聚焦环。

[0108] 在一个实施例中，在溶液被施加到表面上时该溶液中原弹性蛋白的浓度是在约10与约350mg/mL之间。例如，原弹性蛋白的浓度是约15mg/mL、约20mg/mL、约25mg/mL、约30mg/mL、约35mg/mL、40mg/mL、约45mg/mL、约50mg/mL、约55mg/mL、约60mg/mL、约65mg/mL、约70mg/mL、约75mg/mL、约80mg/mL、约85mg/mL、约90mg/mL、约95mg/mL、约100mg/mL、约110mg/mL、约120mg/mL、约130mg/mL、约140mg/mL、约150mg/mL、约160mg/mL、约170mg/mL、约180mg/mL、约190mg/mL、约200mg/mL、约210mg/mL、约220mg/mL、约230mg/mL、约240mg/mL、约250mg/mL、约260mg/mL、约270mg/mL、约280mg/mL、约290mg/mL、约300mg/mL、约310mg/mL、约320mg/mL、或约340mg/mL。

[0109] 在一个实施例中，溶液中原弹性蛋白的浓度可以取决于溶剂的类型和在其下将原弹性蛋白添加至它的溶剂的温度。

[0110] 被施加到表面上的原弹性蛋白的溶液或浓缩物可以具有一系列粘度。它可以包括沉淀的非交联原弹性蛋白，如一个凝聚层。

[0111] 在某一实施例中，施加到表面上的溶液还可以包括凝聚的原弹性蛋白单体。

[0112] 在一个实施例中，提供一种用于形成一种弹性材料的方法，该方法包括：

[0113] -提供原弹性蛋白单体的一种溶液；

[0114] -增加该溶液中原弹性蛋白单体的浓度以便形成原弹性蛋白的一种浓缩物；

[0115] -将该浓缩物施加到一个表面上；

[0116] -将该表面上的浓缩物加热至足以使该浓缩物中的原弹性蛋白单体能够彼此结合以便形成一种弹性材料的一个温度，当该弹性材料与一种水溶液相接触时该材料不会解离成原弹性蛋白单体，

[0117] 从而形成该弹性材料。在一个实施例中，将浓缩物加热至由一个最小值和一个最大值限定的一个范围内的一个温度；

[0118] 其中该最小值是一个温度，在该温度以上原弹性蛋白单体彼此键合以便形成在一种水溶液中不会解离的一种材料；以及

[0119] 其中该最大值是一个温度，在该温度以上形成一种非弹性材料；

[0120] 从而形成一种弹性材料。该方法可以涉及以下步骤：加热表面上的浓缩物以便实现该浓缩物的从约1%至20%水(w/w)、优选地约15%水(w/w)的水损失。

[0121] 原弹性蛋白是由弹性蛋白(ELN)基因组序列(或基因)编码的一种单体蛋白。原弹性蛋白单体在大小上是大约60-70kDa。在原弹性蛋白中存在约36个小结构域并且每个重约

2kDa。在外显子内,存在富含非极性氨基酸如甘氨酸、缬氨酸、脯氨酸、异亮氨酸和亮氨酸的交替疏水结构域(这些结构域通常在三至六个肽的重复序列如GVGVVP、GGVP和GVGVAP中发生)和富含赖氨酸和丙氨酸的亲水结构域。亲水结构域通常由被两个或三个丙氨酸残基分开的赖氨酸的序列区段如AAAKAAKAA组成。另外,原弹性蛋白以含有其仅两个半胱氨酸残基的一个亲水羧基末端序列结束。原弹性蛋白在组装期间不会经历解离并且形成微原纤维是通过被称为凝聚的一个自缔合过程实现的。

[0122] 在生理温度下原弹性蛋白由于疏水结构域之间的相互作用而聚集。该过程是可逆的并且是热力学控制的。凝聚层通过经由赖氨酰基氧化酶交联来稳定化。然后凝聚层变得不溶并且该过程是不可逆的。它然后冷凝以便形成锁链素抑或异锁链素中的两个残基或四个残基的交联结构。

[0123] 在某些实施例中,在本发明中使用的原弹性蛋白单体包括亲水结构域和疏水区域二者。亲水结构域有助于弹性功能(通过例如结合水)。它们还有助于更多种类的生物功能,包括结合细胞和结合细胞外基质。疏水结构域被认为对于提供为本发明的材料的一种特征的弹性来说是重要的。

[0124] 可以存在于一个原弹性蛋白单体中的氨基酸序列的一些实例是如下:

[0125] GGVPGAIPGGVPGGVFYP

[0126] GVGLPGVYP

[0127] GVPLGYP

[0128] PYTTGKLPYGYGP

[0129] GGVAGAAGKAGYP

[0130] TYGVGAGGFP

[0131] KPLKP

[0132] ADAAAAAYKAAKA

[0133] GAGVKPGKV

[0134] GAGVKPGKV

[0135] TGAGVKPKA

[0136] QIKAPKL

[0137] VAPGVG

[0138] VPGVG

[0139] AAAAAAAKAAAK

[0140] AAAAAAAAAAKAACYGAAAGLV

[0141] EAAAKAAAKAACYGAR

[0142] EAQAAAAAKAACYGVT

[0143] AAAAAKAAAKAAQFGLV

[0144] GGVAAAAKSAKVAAKQLRAAAGLGAGI

[0145] GALAAAKAACYGAAV

[0146] AAAAAAAKAAAKAA

[0147] AAAAKAACYGAA

[0148] CLGKACGRKRK。

[0149] 在某些实施例中,用于在本发明中使用的原弹性蛋白包括上述序列中的任何一个或由上述序列中的任何一个组成。

[0150] 在一个实施例中,用于在本发明中使用的原弹性蛋白包括以下所示的一个序列或由以下所示的一个序列组成:

[0151] VXPGVG

[0152] 其中X是任何氨基酸残基或无残基

[0153] ZXPGZG

[0154] 其中Z是一个脂肪族残基

[0155] VXP (I/L/V) V (I/L/V)

[0156] 其中 (I/L/V) 是异亮氨酸、亮氨酸或缬氨酸。

[0157] 在一个实施例中,原弹性蛋白单体包含原弹性蛋白的亲水结构域和疏水结构域。

[0158] 其他适合的原弹性蛋白序列是本领域中已知的并且包括CAA33627 (智人)、P15502 (智人)、AAA42271 (褐家鼠)、AAA42272 (褐家鼠)、AAA42268 (褐家鼠)、AAA42269 (褐家鼠)、AAA80155 (小家鼠)、AAA49082 (原鸡)、P04985 (黄牛)、ABF82224 (斑马鱼 (*Danio rerio*))、ABF82222 (热带爪蟾 (*Xenopus tropicalis*)) 和P11547 (绵羊 (*Ovis aries*))。在一个优选的实施例中,用于在本发明中使用的原弹性蛋白单体来源于人原弹性蛋白。在一个实施例中,它们具有对应于GenBank条目AAC98394的氨基酸残基27-724的序列。如在此所述,本发明还包括原弹性蛋白的变体,例如物种变体或多态性变体。

[0159] 用于在本发明中使用的原弹性蛋白单体可以从重组来源获得。它们还可以从天然来源提取或合成(例如通过固相合成技术)。原弹性蛋白单体还是可商购的。

[0160] 存在原弹性蛋白的多个同种型,并且因此组成原弹性蛋白多肽的氨基酸的确切数量将变化。术语“多肽”或“多肽链”是指氨基酸的一种聚合物,通常通过酰胺键连接在一起。氨基酸的一种功能上活性的聚合物通常被称为一种“蛋白质”。本发明还包括原弹性蛋白的变体,例如物种变体或多态性变体。本发明旨在涵盖原弹性蛋白的表现出相同活性(即生物相容性和弹性)的所有功能上活性的变体。这还包括原弹性蛋白的apo-和holo-形式、翻译后修饰的形式、以及糖基化的或去糖基化的衍生物。这类功能上活性的片段和变体包括,例如具有保守氨基酸取代的那些。

[0161] 在一个实施例中,这些单体是具有一种人原弹性蛋白同种型的序列的重组原弹性蛋白单体。

[0162] 关于原弹性蛋白的片段或变体的术语“功能上活性的”意指能够形成一种弹性材料的片段或变体(如一种类似物、衍生物或突变体),如下文所进一步讨论。这类变体包括天然发生的变体以及非天然发生的变体。考虑到了这些氨基酸中的一个或多个的添加、缺失、取代以及衍生,只要这些修饰不会导致该片段或变体的功能活性损失。通过缩短氨基酸序列,例如,使用一种肽链外切酶或者通过合成更短长度的氨基酸序列,可以容易地确定功能上活性的片段,并且然后如通过在以下实例中说明的方法,对弹性材料形成能力进行测试。

[0163] 在无天然变体发生的情况下,可以将该片段称作一种肽模拟物,肽模拟物也在本发明的范围内。例如,合成的氨基酸以及它们的类似物可以取代如在以下进一步描述的提供构建体形成活性的这些天然氨基酸中的一个或多个。

[0164] “肽模拟物”是一种合成的化学化合物,其基本上具有用于在本发明中使用的原弹

性蛋白的相同结构和/或功能特征。肽模拟物总体上包含至少一个非天然合成的残基。肽模拟化合物的非天然组分可以是根据以下中的一个或多个:a)不同于天然酰胺键(“肽键”)键联的残基键联基团;b)代替天然发生的氨基酸残基的非天然残基;或c)诱导二级结构拟态,即诱导或稳定一种二级结构例如 β 转角、 γ 转角、聚脯氨酸转角、 β 折叠、 α 螺旋构象等的残基。

[0165] 肽模拟物可以使用在科学和专利文献(例如,吉尔曼(Gilman)等人、奥贝迪(a1-Obeidi)等人(1998)、赫鲁比(Hruby)等人(1997)和奥斯特加德(Ostergaard)和霍尔姆(Holm)(1997))中描述的各种程序和方法来合成。

[0166] 优选地,功能上活性的片段是约100个氨基酸的长度。一般来说,用于在本发明中使用的最短片段将是约10个氨基酸的长度。因此,该片段可以是在约10与约100个氨基酸之间的长度。更短片段是有利的,其中例如试图通过合成技术来制备这些片段,因为通过例如固相合成来制备长片段可能是难以实现的。通常在体外合成片段,其中希望获得非常纯的产物。更长片段的优点是,片段的疏水/亲水性质可以更容易地进行微调,其弹性性质也可如此。优选地,功能上活性的片段或变体与如以上所述的一种多肽具有至少大约60%一致性,更优选地至少大约65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%或85%一致性,甚至更优选地90%一致性,甚至更优选地至少大约95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性。该功能上活性的片段或变体可以对应于来自原弹性蛋白的氨基酸的连续序列,或者与来自原弹性蛋白的氨基酸的连续序列具有一致性,然而,还考虑到,一个功能上活性的片段对应于空间上聚集在原弹性蛋白的三维结构中的氨基酸的序列,或者与空间上聚集在原弹性蛋白的三维结构中的氨基酸的序列具有一致性。

[0167] 这类功能上活性的片段和变体包括,例如具有保守氨基酸取代的那些。本领域的那些技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括实现对进行比较的序列的全长的最大比对所需要的任何算法(下述非限制性实例)。当比对氨基酸序列时,一个给定氨基酸序列A与(to,with或against)一个给定氨基酸序列B的氨基酸序列一致性百分比(可以可替代地被表述为一个给定氨基酸序列A具有或包括与(to,with或against)一个给定氨基酸序列B的某一百分比的氨基酸序列一致性)可以被计算为:氨基酸序列一致性百分比 = $(X/Y) \times 100$,其中,X是通过A与B的序列比对程序的或算法的比对,被计分为一致匹配的氨基酸残基的数目,并且Y是B中的氨基酸残基的总数目。如果氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度,则A与B的氨基酸序列一致性百分比将不等于B与A的氨基酸序列一致性百分比。

[0168] 在计算一致性百分比中,计数确切的匹配。两个序列之间的一致性百分比的确定可以使用一种数学算法来完成。用于比较两个序列的数学算法的一个非限制性实例是卡林(Karlin)和阿尔丘尔(Altschul)(1990)的算法,如在卡林和阿尔丘尔(1993)中进行修改。这种算法被结合到阿尔丘尔等人(1990)的BLASTN和BLASTX程序中。为了获得用于比较目的的空位比对,可以使用如阿尔丘尔等人(1997)中所说明的空位BLAST(在BLAST2.0中)。可替代地,PSI-Blast可以用于进行一种迭代搜索,该搜索检测分子之间的远缘关系。参见阿尔丘尔等人(1997)上文。在一个优选实施例中,利用BLAST、有空位的BLAST以及PSI-Blast程序,使用对应程序的默认参数(例如,BLASTX和BLASTN)。还可以通过检查,手动进行比对。用于序列比较的数学算法的另一个非限制性实例是ClustalW算法(希金斯(Higgins)等人

(1994))。ClustalW比较了序列并且比对了该氨基酸或DNA序列的整体,并且因此可以提供有关整个氨基酸序列的序列保守性的数据。ClustalW算法用于几个可商购的DNA/氨基酸分析软件包,如Vector NTI Program Suite的ALIGNX模块(英杰公司(Invitrogen Corporation),卡尔斯巴德(Carlsbad),加利福尼亚(CA))。在用ClustalW对多个氨基酸序列进行比对之后,可以评定氨基酸一致性百分比。适用于ClustalW比对的程序的一个非限制性实例是GENEDOC™或JalView(<http://www.jalview.org/>)。GENEDOC™允许评定多个蛋白质之间的氨基酸(或DNA)相似性和一致性。用于序列比较的一种数学算法的另一个非限制性实例是梅耶斯(Myers)和米勒(Miller)的算法(CABIOS 1988;4:11-17)。这种算法被结合到ALIGN程序(版本2.0)中,该程序是GCG威斯康星遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package)(版本10)(可购自阿塞勒德公司(Accelrys, Inc.),斯克兰顿路9685号(9685 Scranton Rd.),圣地亚哥(San Diego),加利福尼亚州,美国)的一部分。在一个优选实施例中,当评定一致性百分比时,利用用于比较氨基酸序列的ALIGN程序,使用PAM 120权重残基表、12的空位长度罚分以及4的空位罚分。

[0169] 术语“保守氨基酸取代”是指一个氨基酸被另一个相同类别的氨基酸取代,这些类别是如下:

[0170] 非极性:Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe、Trp

[0171] 不带电荷的极性:Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、Gln

[0172] 酸性:Asp、Glu

[0173] 碱性:Lys、Arg、His。

[0174] 其他保守氨基酸取代还可以如以下进行:

[0175] 芳香族:Phe、Tyr、His

[0176] 质子供体:Asn、Gln、Lys、Arg、His、Trp

[0177] 质子受体:Glu、Asp、Thr、Ser、Tyr、Asn、Gln。

[0178] 在一个实施例中,这些单体具有一个序列,该序列跨至少50个连续氨基酸与人原弹性蛋白的氨基酸序列具有至少90%序列一致性。

[0179] 在一个实施例中,这些单体具有一个序列,该序列跨由VPGVG组成的一个连续氨基酸序列与人原弹性蛋白的序列具有至少80%序列一致性。

[0180] 一种类型的原弹性蛋白单体可以用于本发明中,或者可以使用不同原弹性蛋白单体的组合。例如,原弹性蛋白单体的组合可以包括1、2、3、4、5、6、7、9、10或更多种不同类型的原弹性蛋白单体。在另一个实施例中,可以使用至少2种、至少3种、至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种、至少10种或更多种不同的原弹性蛋白单体。在另一个实施例中,可以使用1种或多种、2种或更多种、3种或更多种、4种或更多种、5种或更多种、6种或更多种、7种或更多种、8种或更多种、9种或更多种或10种或更多种不同类型的原弹性蛋白单体。

[0181] 此外,在其他实施例中,原弹性蛋白单体是任何数量或组合的人和/或非人(例如灵长类动物、牛、马、绵羊、山羊、猪、狗、猫或啮齿动物)原弹性蛋白单体。

[0182] 此外,应理解,改变存在于组合中的这些原弹性蛋白单体各自的比例和/或特性可以产生具有所希望的弹性、拉伸强度和可成形性的基于原弹性蛋白的水凝胶,并且因此可以通过将原弹性蛋白的各种多晶型物结合到聚合物支架中来改变并且可能地控制原弹性

蛋白聚合物的强度、弹性、交联潜力和其他物理和生物化学行为。

[0183] 此外,可以改变存在于组合中的原弹性蛋白单体各自的比例和/或特性以便匹配存在于所修复、替换或者再生的组织中的原弹性蛋白单体。

[0184] 在一个实施例中,通过将溶液喷涂到表面上来将该溶液施加到该表面上。

[0185] 如在此所用,术语“表面”是指可以用于制备具有互补形状的基于原弹性蛋白的聚合物构建体的任何物体或装置。例如,表面可以是一个平整表面,这样使得聚集体在其上形成一种平面薄膜;或者可以是一种模具。模具通常被理解为包括一个挖空部分的物体或装置。该部分可以填充有原弹性蛋白单体的溶液,这样使得当加热浓缩物时,该浓缩物硬化或凝固在模具内部,从而采用该模具的形状。模具可以具有本领域的技术人员所希望的任何形状。例如,模具可以被成形为使得自其形成的构建体处于待修复和/或替换的一种特定生物组织(例如,软骨、血管组织或骨)的形状,或者可以包括可以用于测定应用的一种图案(通道、槽等的图案,如下文进一步所讨论)。因此,在一个实施例中,以一种铸模具、模具或铸件的形式提供表面,从而使通过该过程形成的弹性材料能够成形为一种预定形状。

[0186] 在一个实施例中,一种弹性材料可以形成一个“表面”,原弹性蛋白单体的溶液可以根据上述过程被施加到该表面上。例如,一个第一施加可以导致在一个非蛋白质表面上形成一种弹性材料。可以对在该非蛋白质表面上形成的该弹性材料进行一个第二施加,从而导致在源自该第一施加的弹性材料上形成一种弹性材料。该过程可以重复多次,从而使能够例如通过逐滴施加原弹性蛋白单体的溶液构建结构。

[0187] 本发明还涉及一种通过一个过程形成的弹性材料,该过程包括:

[0188] -提供原弹性蛋白单体的一种溶液;

[0189] -将该溶液施加到一个表面上;以及

[0190] -将该表面上的溶液加热至足以使该溶液中的这些原弹性蛋白单体能够彼此结合以便形成原弹性蛋白单体的一种聚集体的一个温度。

[0191] 本发明还涉及一种构建体,该构建体包括通过原弹性蛋白单体的热辅助的缔合形成的一种弹性材料。

[0192] 弹性材料可以是用于修复、增添或替换受试者(例如,用于兽医或医学(人)应用)的一种天然组织(的至少一部分)的一种三维聚合物结构。此外,弹性材料可以被结合到一种三维构建体中或形成该三维构建体的一部分。例如,聚集体可以作为一个层被结合到用于软骨修复的一种构建体中,或者可以被结合到一个支架中。

[0193] 本领域的技术人员将会理解,在加热步骤之前溶液中的原弹性蛋白单体之间的接触程度也可以影响材料的特性。例如,在加热之前溶液越浓(就存在于浓缩物中的原弹性蛋白的量而言),越多的原弹性蛋白单体将相互作用以便形成聚集体,并且所得到的材料的弹性越低。因此,在某些实施例中,溶液中的原弹性蛋白单体的浓度可能与聚合度直接相关。其他因素也可以促成材料的特性,并且这些因素包括例如,所使用的原弹性蛋白单体的类型、进行加热步骤的温度和进行加热的时间段,如上文所讨论。

[0194] 如上所述,在此所述的材料可以是多孔的,即这些材料可以具有孔隙率,即该材料的一部分体积可以由开放空间(例如孔或其他开口)组成。因此,孔隙率度量一种材料中的空隙空间,并且是空隙的体积对总体积的一个分数,作为0%与100%之间(或者0与1之间)的一个百分比(参见,例如,库尔森等人,(1978))。基质孔隙率的测定是本领域技术人员熟

知的,例如,使用标准化技术,如水银孔隙度测定法和气体吸附(如氮吸附)。一般来说,材料的孔隙率可以在从0.5至0.99、从约0.75至约0.99或从约0.8至约0.95的范围内。优选地,材料的孔隙率是至少0.75,更优选地至少0.8,并且最优选地至少0.9。

[0195] 多孔材料可以具有任何孔径。如在此所用,术语“孔径”是指孔的横截面的直径或有效直径。术语“孔径”还可以指基于多个孔的测量值,这些孔的横截面的平均直径或平均有效直径。不是圆形的一个横截面的有效直径等于具有与该非圆形横截面的横截面积相同的横截面积的一个圆形横截面的直径。这些孔可以填充有一种流体如水或空气。在一些实施例中,该材料的这些孔可以具有从约50nm至约1000 μm 、从约250nm至约500 μm 、从约500nm至约250 μm 、从约1 μm 至约200 μm 、从约10 μm 至约150 μm 、从约15 μm 至约125 μm 、从约20 μm 至约100 μm 或从约40 μm 至约65 μm 范围内的孔径分布。在一些实施例中,该材料可以具有约12 μm 、约25 μm 、约45 μm 、约50 μm 或约65 μm 的孔径。在一些实施例中,该材料可以具有 $11.7 \pm 3.3\mu\text{m}$ 、 $23.4 \pm 5.8\mu\text{m}$ 或 $51 \pm 9\mu\text{m}$ 的孔径。

[0196] 本领域的技术人员将会理解,孔可以表现出大约所指示的“大小”的大小分布。除非另有说明,如在此所用的术语“大小”是指孔的大小分布的模式,即,在大小分布中出现最频繁的值。

[0197] 这些孔可以是基本上圆形的横截面或开口。“基本上圆形的”所意指的是孔横截面的最长垂直轴与最短垂直轴的长度之比小于或等于约1.5。基本上圆形不要求线性对称。在一些实施例中,孔横截面的最长轴与最短轴之间的长度之比小于或等于约1.5、小于或等于约1.45、小于或等于约1.4、小于或等于约1.35、小于或等于约1.30、小于或等于约1.25、小于或等于约1.20、小于或等于约1.15、小于或等于约1.1。

[0198] 有利地,本发明的材料是有弹性的。一种“有弹性的”材料是在施加到其上的一个力(如压缩或延伸)已经撤回之后返回至一种特定形状或构象的一种材料。它还被称为具有相对较低滞后的弹性可压缩的和可延伸的、机械耐久的或柔韧的材料。这种材料可以被称为可伸展的、可拉伸的、有回弹力的或能够弹回。例如,该材料可以具有从约20%至约400%的可延展性。

[0199] 在一些实施例中,该材料可以具有约1kPa至约 10^3 kPa范围内的弹性模量。如在此所用,术语“弹性模量”是指当向一个物体或物质施加一个力时该物质或物体的弹性变形(即,非永久地)的倾向。一般来说,一个物体的弹性模量被定义为在弹性变形区域中其应力-应变曲线的斜率。指定如何测量应力和应变(包括方向)允许定义许多类型的弹性模量。杨氏模量(E)描述拉伸弹性,或者当沿着一个轴线施加反作用力时一个物体沿该轴线变形的倾向;它被定义为拉伸应力与拉伸应变的比率。它通常简单地被称为弹性模量。还将理解,通过该过程形成的弹性材料弹性地响应于压缩。在一些实施例中,该材料可以具有在从约1kPa至约1000kPa范围内的弹性模量。在一些实施例中,该材料可以具有约10kPa、约100kPa或约200kPa的弹性模量。

[0200] 对于根据本发明的一种给定材料更高的杨氏模量可以通过以下中的任一项来实现:

- [0201] • 加热持续一个更长的时间段,例如8至16小时
- [0202] • 在溶解原弹性蛋白之前添加丝状纤维(silk)并且加热
- [0203] • 添加连接器

[0204] 这些调整产生一种具有高达10兆帕杨氏模量的材料。

[0205] 本发明的材料可以被添加到水中以便形成一种水凝胶。因此,本发明涉及一种包括一种弹性材料的水凝胶,其中该弹性材料通过一个过程形成,该过程包括:

[0206] -提供原弹性蛋白单体的一种溶液;

[0207] -将该溶液施加到一个表面上;以及

[0208] -将该表面上的溶液加热至足以使该浓缩物中的这些原弹性蛋白单体能够彼此结合以便形成原弹性蛋白单体的一种聚集体的一个温度,

[0209] 从而形成该弹性材料。

[0210] 水凝胶通常被理解为聚合物链的网(为亲水性的),其中水是分散介质。水凝胶是高吸收性的——它们可以包含超过99.9%水——并且由于其显著水含量而具有非常类似于天然组织的一种柔韧性。

[0211] 因此,包括本发明的一种弹性材料或聚集体的水凝胶将典型地含有大量的水。然而,聚集体被添加或浸没至其中以便形成水凝胶的水的量将取决于多种因素,如在水凝胶中所希望的弹性度。也就是说,添加至聚集体的水的量可以是恰好足以赋予弹性的一个量。可替代地,可以添加大量的水以便使所得到的水凝胶是高度弹性的。本领域的技术人员将会理解,所使用的水的量还将取决于聚集体本身的弹性(即如果聚集体已经是相当有弹性的,则将需要添加比在聚集体弹性更低的情况下更少量的水)。

[0212] 本领域的技术人员将会理解,在此涉及本发明的材料的另外组分(例如细胞、药物活性成分等)以及本发明的材料的形式(例如作为组织工程化构建和测定)的论述也适用于包含本发明的弹性材料的构建体和水凝胶。

[0213] 在此描述的材料可以用于组织工程化应用。在一些实施例中,组织工程化目的在于替换、修复和/或再生组织和/或器官功能或者产生用于移植的人工组织和器官。一般来说,在组织工程化中使用的支架模拟天然细胞外基质(ECM)并且提供对细胞粘附、迁移和增殖的支持。理想地,它们允许分化的功能、新组织生成以及它的三维组织。支架的所希望的特征包括物理参数如机械强度和降解性,而生物特性包括生物相容性和提供一种生物相关微环境的能力。生物可降解材料在一些应用(如组织再生)中是有利的,因为在组织生长之后,所得到的结构完全或几乎完全由生物组分制成。

[0214] 在一些实施例中,在此描述的这些材料可以用于许多组织工程化应用,包括血管组织、心脏组织、膀胱、皮肤、肺、韧带、腱、内分泌腺、肝、肾组织、淋巴结、胰腺、骨、软骨和其他组织的生长和/或替换。在一些实施例中,这些材料可以用于向细胞传递信号、充当细胞生长和功能的支撑结构并且提供间隙填充。

[0215] 弹性材料的示例性所希望的形状包括但不限于片材、管和任何其他三维形状。以片材的形状形成的弹性材料可以用于制备植入物、构建体和移植物以便提供用于皮肤组织的修复、替换和/或再生疗法,用于齿根覆盖手术、膜组织等的膜。以管的形状形成的弹性材料可以用于制备植入物、构建体和移植物以便提供用于动脉、静脉、输尿管、尿道、神经、长骨等的修复、替换和/或再生疗法。以任何其他三维物体的形状形成的弹性材料可以用于制备植入物、构建体和移植物以便提供用于器官移植、骨重塑或修补、牙植入物或用于肌肉、腱、韧带和软骨移植物的修复、替换和/或再生疗法。

[0216] 在一个实施例中,弹性材料可以以一种形状形成,从而使其能够用作一种预制补

片,该补片然后可以被缝合或以其他方式粘附到一个表面上。实例包括心脏补片、皮肤补片或适用于角膜的补片。

[0217] 以片材的形状形成、铸造或者模制形成的生物相容性弹性材料可以是一种平片,或者具有紧密地匹配所修复、替换或再生的受损的、损伤的或患病的组织或器官的轮廓的曲率的一种片材。这些片材可以具有任何几何形状,包括但不限于正方形、矩形、梯形、三角形、圆形、椭圆形等。

[0218] 这些片材的示例性面积包括约 1mm^2 至约 1m^2 、约 1mm^2 至约 50cm^2 、约 1mm^2 至约 25cm^2 、约 1mm^2 至约 10cm^2 、约 1mm^2 至约 1cm^2 、约 1cm^2 至约 1m^2 、约 1cm^2 至约 500cm^2 、 1cm^2 至约 250cm^2 、 1cm^2 至约 200cm^2 、 1cm^2 至约 150cm^2 、至约 100cm^2 、约 1cm^2 至约 50cm^2 、约 1cm^2 至约 25cm^2 、约 1cm^2 至约 10cm^2 、约 1cm^2 至约 5cm^2 、约 1cm^2 至约 2.5cm^2 、约 10mm^2 至约 10cm^2 、约 0.1cm^2 至约 10cm^2 、约 0.1cm^2 至约 1cm^2 或其任何中间范围的面积。例如,一种示例性片材的 1cm^2 至 100cm^2 的面积的范围包括约 1cm^2 、约 5cm^2 、约 10cm^2 、约 20cm^2 、约 30cm^2 、约 40cm^2 、约 50cm^2 、约 60cm^2 、约 70cm^2 、约 80cm^2 、约 90cm^2 、以及约 100cm^2 的大约面积。

[0219] 以片材的形状形成、铸造或模制的一种弹性材料的示例性厚度程度包括约 0.1mm 至约 10mm 、约 0.25mm 至约 7.5mm 、约 0.5mm 至约 5mm 、约 0.75mm 至约 2.5mm 、约 1mm 至约 2mm 的一个范围或其任何中间范围。

[0220] 在另一个实施例中,厚度可以是约 0.1mm 、约 0.25mm 、约 0.5mm 、约 0.75mm 、约 1mm 、约 2mm 、约 3mm 、约 4mm 、约 5mm 、约 7.5mm 或约 10mm 或更厚。

[0221] 以管的形状形成、铸造或模制的一种弹性材料可以具有任何所希望的长度、直径和厚度,这样使得支架的大小适合用于修复、替换和/或再生损伤的、受损的或患病的组织或器官。管的示例性长度包括约 0.5cm 、约 1cm 、约 2.5cm 、约 5cm 、约 10cm 、约 25cm 、约 50cm 、约 100cm 、约 150cm 、约 200cm 、约 250cm 、约 300cm 、约 350cm 、约 400cm 、约 450cm 、约 500cm 或更长。管的示例性直径包括约 0mm (例如,一种实心纤维)、 0.5mm 、约 1mm 、约 1.5mm 、约 2mm 、约 2.5mm 、约 3mm 、约 3.5mm 、约 4mm 、约 4.5mm 、约 5mm 、约 5.5mm 、约 6mm 、约 6.5mm 、约 7mm 、约 7.5mm 、约 8mm 、约 8.5mm 、约 9mm 、约 9.5mm 、约 10mm 、约 11mm 、约 12mm 或更多 mm 的直径。在一个优选的实施例中,本发明的管具有约 1mm 至约 10mm 的直径。

[0222] 以其他三维物体的形状形成、铸造或模制的一种弹性材料可以具有任何所希望的体积和/或形状,这样使得支架的大小适合用于修复、替换和/或再生损伤的、受损的或患病的组织或器官。

[0223] 这些三维形状支架的示例性体积为约 100mm^3 至约 5m^3 、约 100mm^3 至约 1000cm^3 、约 1cm^3 至约 1000cm^3 、约 1cm^3 至约 100cm^3 、约 1cm^3 至约 10cm^3 、约 10cm^3 至约 1000m^3 、约 10cm^3 至约 100cm^3 、约 500cm^3 至约 1000cm^3 、约 100mm^3 至约 5cm^3 、约 100mm^3 至约 2.5cm^3 、约 1cm^3 至约 5cm^3 、约 1cm^3 至约 2.5cm^3 、约 750cm^3 至约 1250cm^3 、约 850cm^3 至约 1150cm^3 、约 950cm^3 至约 1050cm^3 、约 900cm^3 至约 1000cm^3 或其任何中间范围。例如,一种示例性三维形状的 1cm^3 至 10cm^3 的体积范围包括约 1cm^3 、约 2cm^3 、约 3cm^3 、约 4cm^3 、约 5cm^3 、约 6cm^3 、约 7cm^3 、约 8cm^3 、约 9cm^3 、以及约 10cm^3 的大约体积。在一个实施例中,支架可以具有从约 1 至约 100 微升的体积。

[0224] 在一些实施例中,弹性材料是呈一种薄膜的形式。该薄膜的厚度可以在从纳米至毫米的范围内。例如,薄膜厚度可以在从约 1nm 至约 1000mm 的范围内。在一些实施例中,薄膜厚度可以是约 1nm 至 1000nm 、从约 $1\mu\text{m}$ 至约 $1000\mu\text{m}$ 、从约 1mm 至约 1000mm 。在一些实施例中,

薄膜厚度可以是约500nm至约750 μm 、从约750nm至约500 μm 、从约1000nm至约250 μm 、从约10 μm 至约100 μm 、从约25 μm 至约75 μm 。在一些实施例中，薄膜厚度在从约10nm至约1mm的范围内。在一些实施例中，薄膜厚度可以是约50 μm 。

[0225] 在一些实施例中，弹性材料是一种泡沫。泡沫可以由本领域中已知的方法制成，包括例如，冷冻-干燥和气体发泡，其中水是溶剂或者氮或其他气体分别是发泡剂。

[0226] 在一些实施例中，这些材料可以用于构建能够具有精确定义的释放曲线的复杂递送装置。这可以通过组合药物或药物递送装置(即纳米颗粒或微颗粒)与在此所述的材料并且使用这些来构建更复杂的药物输送系统来实现。仅为了给出一个实例，在此描述的这些材料可以另外包括待递送的一种治疗剂(例如小分子、核酸、蛋白质、脂质和/或碳水化合物药物)。这类材料可以适用于将一种药物递送至已经被靶向用于组织再生的一个部位。例如，出于再生新骨的目的被给予至受试者的包括骨诱导细胞的一种材料可以另外包括一种或多种骨形态发生蛋白(BMP)，这些骨形态发生蛋白在其释放时可以帮助进一步刺激新骨的生长。

[0227] 在此所述的弹性材料可以与另一种材料例如一种生物材料组合以便形成一种复合材料。如在此所用的术语“生物材料”通常是指生物相容的天然存在的材料。示例性生物材料包括但不限于，生物聚合物、海绵、丝状纤维、脱细胞组织和明胶。如在此所用的术语“生物聚合物”是指一种天然存在的聚合物抑或与一种生物系统相容或模拟天然存在的聚合物的一种合成聚合物。示例性生物聚合物包括但不限于，寡糖、多糖如糖胺聚糖、肽、蛋白质、寡核苷酸、核酸、聚酮化合物、类肽、水凝胶、聚(二醇)如聚(乙二醇)、胶原、丝状纤维和聚乳酸酯。

[0228] 在一个实施例中，弹性材料可以与一盐或与聚乙烯吡咯烷酮组合。

[0229] 本发明的弹性材料还可以包括其他组分，如药学上可接受的赋形剂和生物活性剂(例如药物、维生素和矿物质)，以便帮助修复和/或再生目标组织和/或提供一种实现生物活性化合物的靶向递送的方法。这类组分可以在加热之前添加到原弹性蛋白溶液中(这样使得它们在弹性材料形成时被结合到弹性材料中)，或者它们可以在弹性材料已经形成之后被放置到该弹性材料中。此外，这些组分可以存在于用于由弹性材料形成一种水凝胶的水溶液中。本领域的技术人员将会理解，在待添加的组分在形成弹性材料所需的条件下不稳定的情况下，应当在已经形成该弹性材料之后添加这些组分。

[0230] 本领域的技术人员已知的在疾病的诊断、治疗或预防中具有益处的任何生物活性剂被考虑作为本发明背景下的治疗剂。治疗剂包括激素、生长因子、酶、DNA、质粒DNA、RNA、siRNA、病毒、蛋白质、脂质、促炎分子、抗体、抗生素、抗炎剂、反义核苷酸和转化核酸或其组合。任何这些治疗剂可以在这种组合是生物相容的程度上进行组合。

[0231] 适合的生长因子和细胞因子包括但不限于干细胞因子(SCF)、粒细胞-集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞刺激因子(GM-CSF)、基质细胞源性因子-1、青灰因子(steel factor)、VEGF、TGF β 、血小板源性生长因子(PDGF)、血管生成素(Ang)、表皮生长因子(EGF)、bFGF、HNF、NGF、骨形态发生蛋白(BMP)、成纤维细胞生长因子(FGF)、肝细胞生长因子、胰岛素样生长因子(IGF-1)、白介素(IL)-3、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-7、IL-8、IL-11和IL-13、集落-刺激因子、血小板生成素、促红细胞生成素、fit3-配体和肿瘤坏死因子 α (TNF α)。其他实例描述于戴克(Dijke)等人(1989)；马尔德(Mulder)等人(1998)；齐格勒(Ziegler)等人

(1997)。适合的激素包括但不限于,抗苗勒氏管激素(antimullerian hormone)(或苗勒氏管抑制因子或激素)、脂联素、促肾上腺皮质激素(adrenocorticotropic hormone)(或促肾上腺皮质激素(corticotropin))、血管紧张素原和血管紧张素、抗利尿激素(或加压素、精氨酸加压素)、心房钠尿肽(或心房肽)、降钙素、缩胆囊素、促肾上腺皮质激素释放激素、促红细胞生成素、促卵泡激素、胃泌素、胃饥饿素、胰高血糖素、促性腺激素释放激素、生长激素释放激素、人绒毛膜促性腺激素、人胎盘催乳素、生长激素、胰岛素样生长因子1、胰岛素样生长因子(或生长调节素)、瘦素、促黄体激素、促黑素细胞激素MSH、阿立新、催产素、甲状旁腺激素、催乳激素、松弛素、分泌素、促生长素抑制素、血小板生成素、促甲状腺激素(或促甲状腺素)、以及促甲状腺激素释放激素。

[0232] 示例性药理学活性化合物(例如,治疗剂)包括但不限于,在哈里森(Harrison)等人、医师案头参考(Physicians Desk Reference)、治疗学的药理学基础(1990)、美国药典(United States Pharmacopeia)、古德曼(Goodman)和吉尔曼(Oilman)的治疗学的药理学基础的现行版本;以及默克索引(Merck Index)的现行版本中找到的那些。

[0233] 在另一个实施例中,弹性材料(或由其形成的水凝胶)包括多潜能或多能干细胞(下文进一步讨论)的群体和一旦该弹性材料或水凝胶已经被植入患者中就促进细胞群体沿着一种特定发育途径分化的激素、生长因子、细胞因子、形态发生素(例如视黄酸等)、细胞外基质材料(例如,纤连蛋白、层粘连蛋白、胶原等)或其他材料(例如,DNA、病毒、其他细胞类型等)。可替代地或此外,这些细胞可以在用该弹性材料或水凝胶细胞培养期间在体外分化。

[0234] 生物活性剂可以通过一个连接子共价连接至弹性材料。取决于应用,连接子可以是一种可裂解的连接子或不可裂解的连接子。如在此所用,一个“可裂解的连接子”是指能够在各种条件下裂解的连接子。适合于裂解的条件可以包括但不限于,pH、UV照射、酶活性、温度、水解、消除和取代反应、氧化还原反应以及键联的热力学特性。在许多情况下,共轭或者偶联相互作用的预期性质或所希望的生物作用将决定连接子基团的选择。

[0235] 药学上可接受的赋形剂包括任何和所有溶剂、分散介质、稀释剂或其他液体媒介物、分散或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等,如适合于所希望的具体剂型。真纳罗(Gennaro)(2006)披露了用于配制药用组合物的各种赋形剂和用于其制备的已知技术。除非任何常规的赋形剂与一种物质或其衍生物不相容,如通过产生任何所不希望的生物作用或另外以有害的方式与该水凝胶的任何其他一种或多种组分相互作用,否则它的用途将预期在本发明的范围内。

[0236] 用于药用组合物的制造中的药学上可接受的赋形剂包括但不限于,惰性稀释剂、分散和/或造粒剂、表面活性剂和/或乳化剂、崩解剂、粘合剂、防腐剂、缓冲剂、润滑剂和/或油。这类赋形剂可以任选地被包括于含有原弹性蛋白的溶液中。根据配方设计师的判断,赋形剂如着色剂、包覆剂、甜味剂、调味剂和芳香剂可以存在于溶液中。配制和/或制造药剂的总论可以例如在真纳罗(2006)中找到。

[0237] 存在于材料中的原弹性蛋白和生物活性剂的量将必要地取决于具体药物和待治疗的病状。本领域的技术人员将知道用于治疗该病状的适当药剂和量。

[0238] 治疗有效量的本发明的材料可以在诊断具有一种疾病、病症和/或病状之前、同时和/或之后递送至患者和/或生物体。在一些实施例中,治疗有效量的本发明的材料在一种

疾病、病症和/或病状的症状发作之前、同时和/或之后递送至患者和/或生物体。

[0239] 如在此所用,术语“治疗有效量”是指足以治疗、减轻、改善、缓解该疾病、病症和/或病状的一种或多种症状或特征,延迟该疾病、病症和/或病状的一种或多种症状或特征的发作,抑制该疾病、病症和/或病状的一种或多种症状或特征的进展,降低该疾病、病症和/或病状的一种或多种症状或特征的严重程度和/或降低该疾病、病症和/或病状的一种或多种症状或特征的发病率的本发明的材料的量。

[0240] 如上所述,本发明的材料可以用于组织工程化应用。在一些实施例中,组织工程化目的在于替换、修复和/或再生组织和/或器官功能或者产生用于移植的人工组织和器官。一般来说,在组织工程化中使用的支架(例如水凝胶支架)模拟天然ECM并且提供对细胞粘附、迁移和增殖的支持。理想地,它们允许分化的功能、新组织生成以及它的三维组织。弹性支架的所希望的特征包括物理参数如机械强度和降解性,而生物特性包括生物相容性和提供一种生物相关微环境的能力。生物可降解材料是有利的,因为在组织生长之后,所得到的结构完全或几乎完全由生物组分制成。

[0241] 在一些实施例中,待用于药物递送的材料可以以产生增强的停留时间、持续药物递送和/或靶向药物递送的方式进行改变。可以改变和/或优化材料特性如渗透性(例如,缓释应用)、环境响应性质(例如,脉冲释放应用)、表面官能度(例如,用于隐形释放的PEG涂层)和生物可降解性(例如,生物可再吸收应用)以及表面生物识别位点(例如,靶向释放和生物粘附应用)以用于受控药物递送应用。例如,通过控制原弹性蛋白链长、原弹性蛋白组成和/或原弹性蛋白浓度,有可能控制材料的密度。对密度的控制尤其提供对所得材料的缓释特性的控制。

[0242] 在一些实施例中,酶可以被封装在这些材料内以便产生响应于生物分析物的药物递送系统。

[0243] 在此描述的弹性材料可以另外包括一种或多种添加剂。添加剂可以是拆分(生物可降解的)聚合物、甘露醇、淀粉糖、肌醇、山梨糖醇、葡萄糖、乳糖、蔗糖、氯化钠、氯化钙、氨基酸、氯化镁、柠檬酸、乙酸、羟基-丁二酸、磷酸、葡糖醛酸、葡糖酸、聚山梨糖醇、乙酸钠、柠檬酸钠、磷酸钠、硬脂酸锌、硬脂酸铝、硬脂酸镁、碳酸钠、碳酸氢钠、氢氧化钠、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇、羧甲基纤维素、甲基纤维素、淀粉、微颗粒、纳米颗粒、抑肽酶、因子XIII或其混合物。不希望受理论限制,该材料中的一种或多种添加剂可以改变(例如降低或提高)该材料的降解速率。

[0244] 在一些实施例中,在此描述的材料可以用于体外组织培养应用。在某些实施例中,所描述的材料可以用于开发适用于药物发现和生物学研究的测定(例如,组装明确限定的材料的阵列以用于高通量药物筛选)。例如,在功能性细胞(例如,肝细胞)存在下饲养细胞(例如,内皮细胞或成纤维细胞)的存在可以用于增加功能性细胞类型的维持。因此,有可能产生能够随后用于药物发现和/或诊断测定的模拟功能器官的天然结构的三维结构。

[0245] 本领域的技术人员将会理解,在待结合到弹性材料中的细胞在形成该弹性材料所需的条件下不稳定的情况下,应当在已经形成该弹性材料之后添加这些细胞。例如,这些细胞可以存在于用于由弹性材料形成一种水凝胶的水溶液中。

[0246] 在一些实施例中,在此描述的材料可以用于能够测试一种测试物质的毒性的毒性测定(例如,利用其中已经封装肝细胞的材料)。

[0247] 在一些实施例中,在此描述的材料可以用于制造和涂覆各种结构,如微流体通道。在该方法中,这些微通道的壁可以由构建体组装体制成,而不是由更常使用的材料如聚苯乙烯、玻璃和PDMS制成。由构建体组装体制成的微流体通道可以适用于许多目的,例如,在希望微流体通道的壁吸引并结合细胞的应用中。

[0248] 在一些实施例中,在此描述的材料可以用于诊断应用。仅为了给出一个实例,含细胞的材料可以用于产生可以用于测试一种或多种特定微生物的存在的测定中的组织样材料和/或材料组装体。例如,如果已知一种微生物(例如细菌、病毒、真菌等)特异性地结合一种特定组织,则可以制造将测试样品中该微生物的存在的组织样材料。

[0249] 在此描述的材料可以被图案化(例如一种微图案化的弹性材料)。可以使用例如一种方法来制备微图案化的材料,该方法包括使一种原弹性蛋白溶液与一个模具的一个表面相接触,该模具在其至少一个表面上包括待布置在弹性材料的至少一个表面上并且与该至少一个表面成整体的一种预定微图案的一种三维反向构型;并且在与该模具的微图案化的表面相接触时加热该溶液,从而提供一种微图案的弹性材料。这种方式制备的弹性材料在该材料的至少一个表面上包括一种预定和设计的微图案,该图案可有效促进细胞排列、组织修复、生长或再生,或者可有效提供一种蛋白质或一种治疗剂的递送。可以使用具有适当图案或大小的模具来控制微图案几何形状。此外,微图案可以通过已知技术针对表面形态进行特征化,这些技术如场发射扫描电子和原子力显微术。

[0250] 在一些实施例中,微图案是呈槽或通道的形式。槽大小(宽度)可以在从约500nm至约500 μ m的范围内。在一些实施例中,槽大小可以在从约1 μ m至约250 μ m、从约10 μ m至约100 μ m或从约20 μ m至约75 μ m的范围内。在一些实施例中,槽大小是约50 μ m或约20 μ m。

[0251] 这些槽之间的间距也可以针对所希望的用途进行优化。例如,这些槽之间的间距可以在从约500nm至约500 μ m的范围内。在一些实施例中,这些槽之间的距离可以在从约1 μ m至约250 μ m、从约10 μ m至约100 μ m或从约20 μ m至约75 μ m的范围内。在一些实施例中,这些槽之间的距离是约50 μ m或约20 μ m。

[0252] 槽厚度深度可以在从约250nm至约500 μ m的范围内。在一些实施例中,槽厚度可以在从约500nm至约250 μ m或从约750nm至约1000nm的范围内。

[0253] 如上所述,在此描述的弹性材料可以用于组织工程化和修复。如在此所用,术语“修复”是指任何矫正、增强、复原、补救、弥补、使健全、更新、修补(mending)、修补(patching)或恢复功能的类似方式。因此,术语“修复”也可以意指用于矫正、增强、复原、补救、弥补、使健全、更新、修补(mend)、修补(patch)或以其他方式恢复功能。

[0254] 本领域的技术人员将会理解,由本发明的弹性材料形成的水凝胶也可以用于组织工程化和修复中。因此,在这些背景下提及本发明的弹性材料时,应当理解,在适当的情况下可以除了这些弹性材料本身之外或作为这些弹性材料本身的一种替代来利用从这些材料形成的水凝胶。本领域的技术人员来还将理解,水凝胶可以简单地通过弹性材料与生理条件的接触、凭借弹性材料从周围环境中吸收水来由该弹性材料形成。

[0255] “治疗”、“预防”或“改善”意指延迟或预防与一种疾病或病症相关的一种病状的发生,逆转、减轻、改善、抑制、减缓或停止与一种疾病或病症相关的一种病状的进展、加剧、恶化或严重程度的发展。

[0256] 本发明的弹性材料可以使用对治疗有效的任何给药量以及任何给药途经来给予。

所要求的精确量将因受试者而异,这取决于受试者的种类、年龄和总体情况、感染的严重程度、具体的水凝胶、它的给药模式、它的活性模式等。

[0257] 在另一个实施例中,在此描述的弹性材料在再生医学中用于骨病应用,包括但不限于颅面、牙和牙周应用。在一个实施例中,包括一种弹性材料(或由一种弹性材料形成的水凝胶)的一种构建体或装置被提供用于在口腔和颅面组织的重建和再生中使用。

[0258] 在具体实施例中,该弹性材料(或由该弹性材料形成的水凝胶)包括一种或多种原弹性蛋白单体和人胶原。所得到的材料和水凝胶针对所希望的表面形貌、孔隙率、强度和弹性进行工程化。在一些实施例中,弹性材料或水凝胶不包含不同于原弹性蛋白的蛋白质或多肽。

[0259] 在一个实施例中,弹性材料是以一种片材的形式铸造的,并且可以用作各种临床应用例如引导组织再生(GTR)或齿根覆盖手术中的一种再生膜。在一个实施例中,弹性材料被铸造为一种片材并且接种牙周韧带细胞(PDL),从而形成适合用于在一种齿根覆盖手术中使用的一种植入物或移植物。一旦植入物已经形成,外科医生使用本领域中的技术人员已知的方法在齿根覆盖手术中移植该植入物。

[0260] 在另一个实施例中,弹性材料以一种三维形状铸造以用作一种骨填充材料。实际上可以实现任何形状,因为预加热的溶液是处于一种可成形的形式。一旦被放置到一个模具或所希望的区域中,可以通过加热来使溶液“硬化”。此外,该材料可以支持用于引导骨再生(GBR)的牙周医学中的独特临床应用并且消除对于一种骨填充物和包括骨移植物的一种膜的需要。

[0261] 在一个具体实施例中,弹性材料(或由该材料形成的水凝胶)或包括该弹性材料或由该材料形成的水凝胶的一种植入物被模制成一种所希望的形状,并且包括一个或多个细胞群体。

[0262] 一般来说,待根据本发明使用的细胞是任何类型的细胞。当被结合在本发明的弹性材料(或由这些弹性材料形成的水凝胶)中时这些细胞应该是有活力的。在一些实施例中,适合的细胞包括但不限于,哺乳动物细胞(例如人细胞、灵长类动物细胞、哺乳动物细胞、啮齿动物细胞等)、禽类细胞、鱼类细胞、昆虫细胞、植物细胞、真菌细胞、细菌细胞和杂交细胞。在一些实施例中,示例性细胞包括干细胞、全能细胞、多能细胞和/或胚胎干细胞。在一些实施例中,示例性细胞包括但不限于,原代细胞和/或来自任何组织的细胞系。可以根据本发明使用例如,心肌细胞、肌细胞、肝细胞、角化细胞、黑色素细胞、神经元、星形胶质细胞、胚胎干细胞、成体干细胞、造血干细胞,造血细胞(例如单核细胞、嗜中性粒细胞、巨噬细胞等)、成釉细胞、成纤维细胞、软骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、神经元、精子细胞、卵细胞、肝细胞、肺上皮细胞、消化道上皮细胞,肠、肝上皮细胞、皮肤上皮细胞等和/或其杂合体。

[0263] 示例性哺乳动物细胞包括但不限于:人脐静脉内皮细胞(HUVEC)、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HeLa细胞、马丁-达比(Madin-Darby)犬肾(MDCK)细胞、幼仓鼠肾(BHK细胞)、NS0细胞、MCF-7细胞、MDA-MB-438细胞、U87细胞、A172细胞、HL60细胞、A549细胞、SP10细胞、DOX细胞、DG44细胞、HEK293细胞、SHSY5Y、Jurkat细胞、BCP-1细胞、COS细胞、Vero细胞、GH3细胞、9L细胞、3T3细胞、MC3T3细胞、C3H-10T1/2细胞、NIH-3T3细胞、以及C6/36细胞。

[0264] 在某一实施例中,一个或多个细胞群包括骨髓干细胞、间充质干细胞或前成骨细

胞以便促进组织或骨再生。另外,该材料/水凝胶/植入物的成骨潜力可以用作一种单一疗法或与当前可获得商业骨填充物产品或原代自体骨收获物组合使用。本领域的技术人员将认识到,可以使用以上技术修复、替换或再生任何类型的骨。

[0265] 在一些实施例中,改变细胞被包括在弹性材料(或由其形成的水凝胶)中的条件以便使细胞存活力最大化。在一些实施例中,可能需要进调节和/或改变周围环境的条件(例如pH、离子强度、营养利用度、温度、氧利用度、摩尔渗透压浓度等)以便使细胞存活力最大化。

[0266] 细胞存活力可以通过监测许多细胞存活力指标中的一种来进行测量。在一些实施例中,细胞存活力指标包括但不限于,细胞内酯酶活性、质膜完整性、代谢活性、基因表达和蛋白质表达。仅为了给出一个实例,当细胞被暴露于一种荧光酯酶底物(例如钙黄绿素AM)时,活细胞由于使该酯酶底物水解成一种绿色荧光产物的细胞内酯酶活性而发出绿色荧光。为了给出另一个实例,当细胞被暴露于一种荧光核酸染料(例如乙锭同二聚体-1)时,死细胞发出红色荧光,因为它们的质膜受损并且因此对于高亲和力核酸染料是可渗透的。

[0267] 一般来说,材料(或由其形成的水凝胶)中的细胞百分比是允许形成根据本发明的弹性材料和/或水凝胶的一个百分比。在一些实施例中,适合的细胞百分比的范围在约0.1%w/w与约80%w/w之间、约1.0%w/w与约50%w/w之间、约1.0%w/w与约40%w/w之间、约1.0%w/w与约30%w/w之间、约1.0%w/w与约20%w/w之间、约1.0%w/w与约10%w/w之间、约5.0%w/w与约20%w/w之间或约5.0%w/w与约10%w/w之间。在一些实施例中,一种溶液中适合用于形成根据本发明的弹性材料的细胞百分比是大约5%w/w。在一些实施例中,一种水溶液中适合用于形成根据本发明的水凝胶的细胞浓度的范围是约 1×10^5 个细胞/mL与 1×10^8 个细胞/mL之间或约 1×10^6 个细胞/mL与 1×10^7 个细胞/mL之间。在一些实施例中,一种单一弹性材料或由其形成的水凝胶包括相同的细胞和/或细胞类型的一个群体。在一些实施例中,一种单一弹性材料或由其形成的水凝胶包括不相同的细胞和/或细胞类型的一个群体。在一些实施例中,一种单一弹性材料或由其形成的水凝胶可以包括至少两种不同类型的细胞。在一些实施例中,一种单一弹性材料或由其形成的水凝胶可以包括3、4、5、10或更多种类型的细胞。

[0268] 多种细胞培养基中的任何一种(包括能够支持一种或多种细胞类型或细胞系的生长的复合培养基和/或无血清的培养基)可以用于生长和/或维持细胞。典型地,一种细胞培养基包含一种缓冲剂、盐类、能量来源、多种氨基酸(例如,天然的氨基酸、非天然的氨基酸等)、多种维生素和/或多种痕量元素。细胞培养基可以任选地包含多种其他成分,包括但不限于,碳源(例如,天然糖、非天然糖等)、辅因子、脂质、糖类、核苷、动物源性组分、水解产物、激素、生长因子、表面活性剂、指示剂、矿物质、特定酶的活化剂、特定酶的活化剂抑制剂、酶、有机物和/或小分子代谢物。适合用于根据本发明使用的细胞培养基是从多个来源(例如ATCC(马纳萨斯(Manassas), 维吉尼亚州(Va))可商购的。在某些实施例中,使用以下培养基中的一种或多种来生长细胞:RPMI-1640培养基、杜尔贝科氏改良的伊格尔氏培养基、伊格尔最低必需培养基、F-12K培养基、伊思考夫氏改良的杜尔贝科氏培养基。

[0269] 如上所论述,本发明的一个显著优点是开发通过组合2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种本身具有独特特性的单独原弹性蛋白同种型产生的具有独特特性的材料(以及相应的水凝胶),这些特性是例如拉伸强度、弹性和柔性/硬度。这类独特的材料(以及相应的水凝胶)

可以被定制用于在体内它们的独特特性为最有利的位罝处使用。例如,最强韧的纤维可以用于修复肌肉,弹性最强的纤维可以用于构建膀胱和其他柔性器官(例如血管和心脏组织),并且最硬的纤维可以用于软骨修复中。

[0270] 本发明还涉及一种修复和/或恢复生物组织的方法,该方法包括向有需要的受试者给予治疗有效量的本发明的弹性材料。

[0271] 本发明还涉及治疗有效量的本发明的一种弹性材料用于修复和/或恢复生物组织的用途。

[0272] 在一个实施例中,当用于修复和/或恢复生物组织的一种方法中时,本发明提供一种本发明的弹性材料。

[0273] 本发明还涉及治疗有效量的本发明的一种弹性材料用于修复和/或恢复生物组织的用途。本发明还包括这种材料用于制造用以修复和/或恢复生物组织的药剂的用途。

[0274] 如上所述,应当理解,在这些实施例中,由本发明的弹性材料形成的一种水凝胶可以用作该弹性材料的一种替代,条件是然后对它进行适当地处理(通过例如暴露于水)以便形成一种水凝胶。

[0275] 本发明还涉及一种修复和/或恢复生物组织的方法,该方法包括以下步骤:

[0276] -鉴别具有组织损伤的受试者;以及

[0277] -向该受试者给予治疗有效量的本发明的弹性材料,

[0278] -向该受试者给予治疗有效量的由本发明的弹性材料形成的一种水凝胶,或

[0279] -向该受试者给予用于形成治疗有效量的水凝胶的量的本发明的弹性材料,然后处理本发明的弹性材料以便形成该水凝胶。

[0280] 本发明还涉及一种加速生物组织的修复和/或恢复的方法,该方法包括向有需要的受试者给予:

[0281] -治疗有效量的本发明的弹性材料,

[0282] -治疗有效量的由本发明的弹性材料形成的一种水凝胶,或

[0283] -用于形成治疗有效量的水凝胶的量的本发明的弹性材料,然后处理该弹性材料以便形成该水凝胶。

[0284] 本发明的弹性材料和由其形成的水凝胶典型地以剂量单位形式配制以便易于给药和剂量均匀性。然而,应当理解,本发明的材料和/或水凝胶的总每日剂量将由主治医师在合理医学判断的范围内决定。

[0285] 对于任何具体受试者或生物体的具体治疗有效剂量水平将取决于多种因素,包括所治疗的病症和病症的严重程度;所采用的具体活性成分的活性;所采用的具体聚合物和/或细胞;受试者的年龄、体重、总体健康状况、性别和饮食;给药时间、给药途径和所采用的具体活性成分的排泄速率;治疗的持续时间;与所采用的具体活性成分组合或同时使用的药物;以及医学领域中众所周知的类似因素。

[0286] 本发明的材料(和由其形成的水凝胶)可以通过任何途径给予。在一些实施例中,本发明的材料通过各种途径给予,包括直接给予至一个受影响的部位。例如,材料(和/或由其形成的水凝胶)可以在需要组织再生的部位附近局部给予。

[0287] 在某些实施例中,可以给予本发明的弹性材料(和/或由其形成的水凝胶)以使得所包括的待递送的细胞和/或治疗剂在以下范围内的浓度下释放:从约0.001mg/kg至约

100mg/kg、从约0.01mg/kg至约50mg/kg、从约0.1mg/kg至约40mg/kg、从约0.5mg/kg至约30mg/kg、从约0.01mg/kg至约10mg/kg、从约0.1mg/kg至约10mg/kg、或从约1mg/kg至约25mg/kg的受试者体重/天,一天一次或多次,以便获得所希望的治疗作用。所希望的剂量可以例如通过以下方式递送:一天三次、一天两次、一天一次、两天一次、三天一次、一周一次、两周一次、三周一次或四周一次。在某些实施例中,所希望的剂量可以使用多次给药(例如二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四或更多次给药)来递送。

[0288] 在一些实施例中,本发明涵盖包含本发明的弹性材料(和/或由其形成的水凝胶)的“治疗性混合物”。在一些实施例中,这些材料包括一种单一细胞类型以及任选地一种治疗剂。在一些实施例中,材料包括多种不同的细胞类型以及任选地一种治疗剂。

[0289] 应当理解,根据本发明的含细胞的弹性材料(和由其形成的水凝胶)可以用于组合疗法中。在一种组合方案中采用具体的疗法(治疗剂或程序)组合将考虑所希望的治疗剂和/或程序的相容性以及待实现的所希望的治疗作用。应当理解,所采用的疗法可以实现出于相同目的的一种所希望的作用(例如,包含待用于促进组织生长的某一细胞类型的水凝胶可以与用于刺激同一组织的生长的另一种治疗剂同时给予),或者它们可以实现不同的作用(例如,控制任何不利作用,如炎症、感染等)。

[0290] 本发明提供包括本发明的一种或多种材料的多种试剂盒。例如,本发明提供一种包括一种弹性材料和使用说明书的试剂盒。一种试剂盒可以包括多种不同的弹性材料。一种试剂盒可以任选地包括原弹性蛋白单体、原弹性蛋白单体的一种浓缩溶液、相关的原弹性蛋白单体、生物活性化合物等。一种试剂盒可以包括处于任何组合的多种另外组分或试剂中的任何一种。所有不同组合未明确地阐述,但每种组合包括在本发明的范围内。根据本发明提供的一些示例性试剂盒在以下段落中进行描述。

[0291] 根据本发明的某些实施例,一种试剂盒可以包括,例如,(i)原弹性蛋白单体的一种溶液;(ii)一种模具;和(iii)用于加热和由该溶液形成一种弹性材料的说明书。

[0292] 一种试剂盒还可以包括,例如,(i)原弹性蛋白单体的浓缩物;(ii)一种模具;和(iii)用于由该浓缩物形成一种弹性材料的说明书。

[0293] 试剂盒可以进一步包括从商业和使用者立场上出发所希望的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针、以及注射器。

[0294] 试剂盒典型地包括用于使用本发明的材料的说明书。说明书可以例如包括用于产生弹性材料、将材料给予至有需要的受试者、产生材料组装体等的方案和/或描述用于产生弹性材料、将材料给予至有需要的受试者、产生材料组装体等的条件。试剂盒通常将包括一个或多个器皿或容器,这样使得单独组分和试剂中的一些或者全部可以被分开容纳。试剂盒还可以包括一种用于将单独容器封闭在相对紧密的限制中用于商业销售的装置,例如一种塑料盒,说明书、包装材料如泡沫聚苯乙烯等可以被封闭在该塑料盒中。

[0295] 该试剂盒或“制造物品”可以包括一个容器以及在该容器上或与该容器相关联的一个标签或包装插入物。适合的容器包括例如瓶、小瓶、泡罩包装等。这些容器可以由多种材料(如玻璃或塑料)形成。标签或包装插入物指示构建体或组合物用于治疗选择的病状。在一个实施例中,标签或包装插入物包括使用说明书并且指示治疗性组合物可以用于修复或再生组织。

[0296] 实例

[0297] 实例1-使用水作为原弹性蛋白的溶剂

[0298] 在4℃下将100mg原弹性蛋白溶解于333μl水中。使用一个1ml 31规格注射器来将一滴原弹性蛋白溶液放置到一个载玻片上。在160℃下放置持续1分钟。添加另一滴原弹性蛋白；静置1分钟，之后添加另一滴。重复大约10次。在160℃下静置4小时。材料变成玻璃状和暗褐色(A)。放置在PBS中-缓慢润湿，未溶解并且变得非常有弹性(B)。

[0299] 实例2-使用HFP作为原弹性蛋白的溶剂

[0300] 在室温下将100mg原弹性蛋白溶解于500μL 1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇(HFP)中过夜。使用一个1mL 31规格注射器来将数滴原弹性蛋白溶液放置到位于设置在70℃下的一个加热块顶部上的一个载玻片上。在160℃下放置4小时。材料似乎在烘箱中起泡并且变成玻璃状和棕色(A)。放置于PBS中-缓慢润湿，变软且有弹性，似乎在材料内捕获有气泡(B)。

[0301] 实例3-使用70%EtOH作为原弹性蛋白的溶剂

[0302] 将100mg原弹性蛋白溶解于650μl 70%EtOH(154mg/mL)中。使用一个1ml 31规格注射器来将数滴原弹性蛋白溶液放置到位于设置在85℃下的一个加热块顶部上的一个载玻片上。通过在各滴之间等待约1分钟能够构造滴在滴之上的3D结构。在160℃烘箱下放置4小时。材料似乎在烘箱中起泡并且变成玻璃状和暗棕色。

[0303] 实例4-涂覆一种无生命物体

[0304] 于HFP中的20%w/v原弹性蛋白用于通过重复浸渍到该溶液中来涂覆一段Tygon管件。将涂覆的管在160℃下放置4小时。原弹性蛋白溶液变硬且玻璃样并且不能从管件上除去。用PBS润湿。材料变软且有弹性，它可以从管件上剥落并且不会溶解。

[0305] 实例5-电纺丝

[0306] 电纺丝于HFP中的20% (w/v) 原弹性蛋白，1mL/小时，从注射器尖端至集电器约17cm，20kV (+) /接地，0.1ml溶液，集电器配向的线2cm×4cm长。在160℃下放置24小时。用PBS润湿不会溶解；变成凝胶样，维持形状。通过SEM检查。

[0307] 实例6-热处理的电纺丝原弹性蛋白上的体外人真皮成纤维细胞生长。

[0308] 如上所述对于HFP中的20% (w/v) 原弹性蛋白进行电纺丝。将人新生儿真皮成纤维细胞(NHF8909; 5×10^5 个细胞/孔) 接种到固定到6孔板内的塑料盖玻片上的热处理的电纺丝配向的纤维上。在37℃下在5%CO₂中于DMEM+10%FBS+Pen/Strep中培养48小时之后，制备样品以用于SEM分析。将样品用于0.1M二甲胍酸钠/0.1M蔗糖中的2%戊二醛固定，用1%锇后固定，在增加浓度的乙醇中脱水、安装并且镀金。热处理的电纺丝原弹性蛋白支持细胞附着、铺展和增殖。

[0309] 实例7-在小鼠中皮下植入热处理的电纺丝原弹性蛋白。

[0310] 使用于HFP中的20%原弹性蛋白制备非配向的电纺丝原弹性蛋白构建体。将样品在20kV下以17cm的距离、1mL/小时速率纺丝到一个圆形集电器(非配向的)上。每个构建体使用0.2ml溶液。在160℃下放置22小时。

[0311] 每只小鼠植入一个热处理的非配向的电纺丝原弹性蛋白构建体和一个Integra对照物。两只小鼠用于在1周、3周和6周的每个时间点。用在每只小鼠的背部上进行并且剖开以便产生皮下小袋的两个10mm切口进行皮下植入。将无一个外部硅酮层的电纺丝支架或Integra支架(Integra LifeSciences公司)插入到每个小袋中。然后用6-0缝合丝线闭合伤口并且使用IV3000伤口敷料(施乐辉公司(Smith&Nephew))覆盖5天。卡洛芬(5mg/kg)在麻

醉时给予并且然后在手术后次日给予以用于止痛。在手术之后,在头两天将每只小鼠单独地关在笼内并且之后每笼两只小鼠,自由获取水和食物。收集皮肤活检以用于在植入后第1、3和6周进行组织学分析。将移植的支架和周围皮肤用伟郝夫范吉森(Verhoeff-VanGieson) (VVG) 染色,从而证明植入物的弹性性质。

[0312] 在植入后热处理的电纺丝原弹性蛋白在小鼠中持续最少6周。

[0313] 实例8-热处理的基于水的原弹性蛋白薄膜

[0314] 在4℃下将100mg原弹性蛋白溶解于1ml水中。将溶液吸移到一个8孔玻璃室载玻片的孔中。浓缩溶液并且通过在37℃下放置16小时干燥。将样品进一步加热至160℃持续4小时。在37℃下加热之后,支架是半透明的和淡褐色的。在160℃加热之后,样品仍然是半透明的,但颜色更深。

[0315] 实例9-微图案化的热处理的原弹性蛋白薄膜

[0316] 在4℃下将70mg原弹性蛋白溶解于1ml水中。将溶液吸移到包括3.5μm宽和500nm深的脊的一个PDMS(聚二甲基硅氧烷)模子上。浓缩溶液并且通过在37℃下放置16小时干燥。将样品进一步加热至160℃持续4小时。使用具有20倍和40倍物镜的一个光学显微镜获得图象。

[0317] 参考文献

[0318] al-Obeidi,F.et al.Peptide and peptidomimetic libraries:molecular diversity and drug design.Mol Biotechnol 9(3),205-223(1998).

[0319] Altschul,S.F.et al.Basic local alignment search tool.J Mol Biol 215(3),403-410(1990).

[0320] Altschul,S.F.et al.Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs.Nucleic Acids Res 25(17),3389-3402(1997).

[0321] Anderson,et al.Nanoliter-scale synthesis of arrayed biomaterials and application to human embryonic stem cells.Nature Biotechnology 22,863-866(2004).

[0322] Anderson,et al.Biomaterial microarrays:rapid,microscale screening of polymer-cell interaction.Biomaterials 26.4892-4897(2005).

[0323] Coulson J.M.et.al.,Chemical Engineering,1978,volume 2,3rd Edition,Pergamon Press,126.

[0324] Dijke et al.Growth factors for wound healing Bio/Technology 7,793-798(1989).

[0325] Falsey,et al.Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays.Bioconjugate Chemistry 12,346-353(2001).

[0326] Gennaro,A.R.,Remington:The Science and Practice of Pharmacy,21st ed.(2006),Lippincott Williams&Wilkins.

[0327] Gilman et al.(eds)Organic Syntheses Collective Volumes,John Wiley& Sons,Inc.,NY.

[0328] Harrison,T.R.et al.(eds)Harrison's Principles of Internal Medicine,

13th Edition, McGraw-Hill N.Y., NY.

[0329] Higgins, D.G. et al. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22 (22), 4673-4680 (1994).

[0330] Hruby, V.J. et al. Synthesis of oligopeptide and peptidomimetic libraries. *Curr Opin Chem Biol* 1 (1), 114-119 (1997).

[0331] Karlin, S. & Altschul, S.F. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (6), 2264-2268 (1990).

[0332] Karlin, S. & Altschul, S.F. Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (12), 5873-5877 (1993).

[0333] Miyamoto, K. et al. Creation of cross-linked electrospun isotypic-elastin fibers controlled cell-differentiation with new cross-linker, *Int J Biol Macromolecules* 45, 33-41 (2009).

[0334] Li, M. et al. Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials* 26 (30), 5999-6008 (2005).

[0335] Li, M. et al. Electrospinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications. *Biomaterials* 27 (13), 2705-2715 (2006).

[0336] Liu, et al. Nanostructured materials designed for cell binding and transduction. *Biomacromolecules* 2 (2), 362-368 (2001).

[0337] Mulder GD, Haberer PA, Jeter KF (eds). *Clinicians' Pocket Guide to Chronic Wound Repair*. 4th ed. Springhouse, PA: Springhouse Corporation; 1998: 85.

[0338] Orner, et al. Arrays for the combinatorial exploration of cell adhesion. *Journal of the American Chemical Society* 126, 10808-10809 (2004).

[0339] Ostergaard, S. & Holm, A. Peptomers: a versatile approach for the preparation of diverse combinatorial peptidomimetic bead libraries. *Mol Divers* 3 (1), 17-27 (1997).

[0340] *Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th Edition, Goodman and Gilman, 1990.

[0341] *Physicians Desk Reference*, 50th Edition, 1997, Oradell New Jersey, Medical Economics Co.

[0342] Tauriari, G. et al. Polymer microarrays for cellular adhesion. *Chem Comm* 2118-2120 (2006).

[0343] *United States Pharmacopeia, The National Formulary, USP XII NF XVII*, 1990.

[0344] Ziegler T.R., Pierce, G.F., and Herndon, D.N., 1997, *International Symposium on Growth Factors and Wound Healing: Basic Science & Potential Clinical Applications* (Boston, 1995, Serono Symposia USA), Publisher: Springer

Verlag.

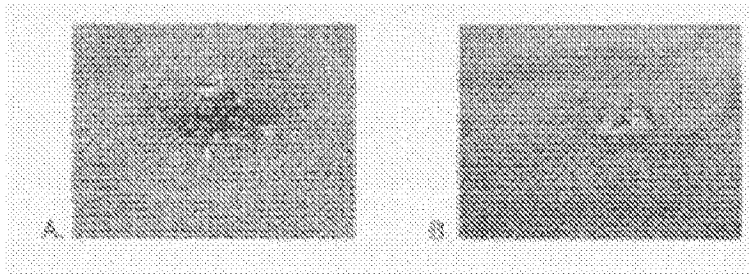


图1

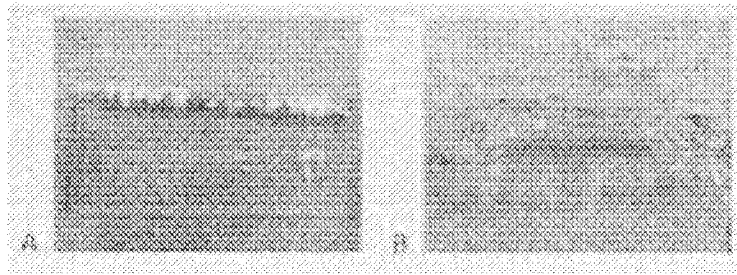


图2

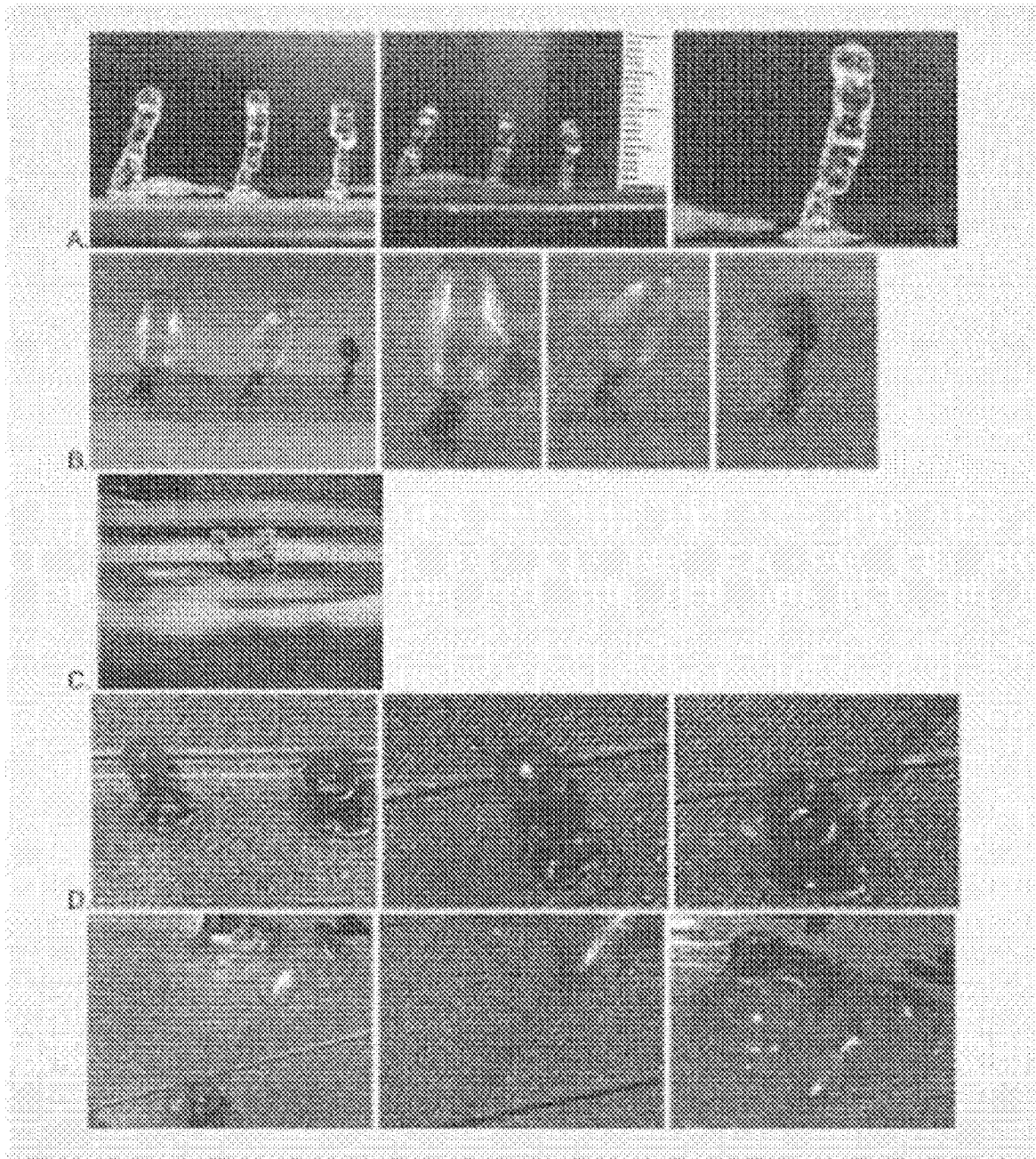


图3

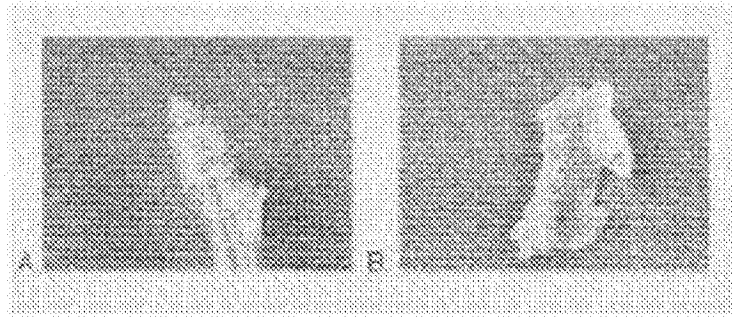


图4

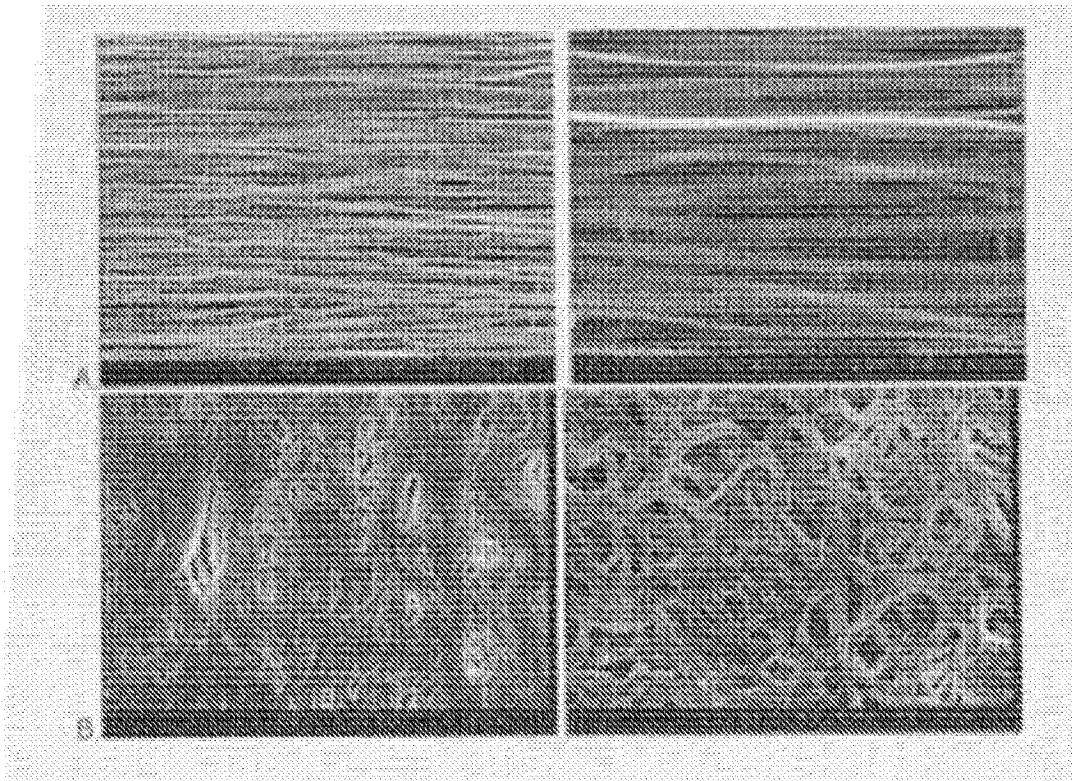


图5

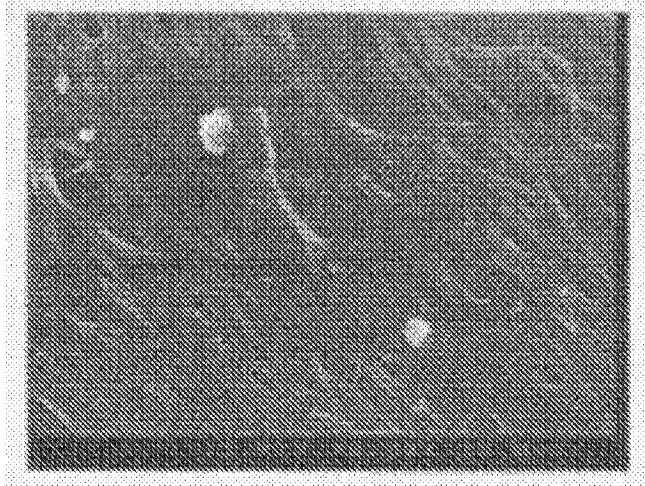


图6

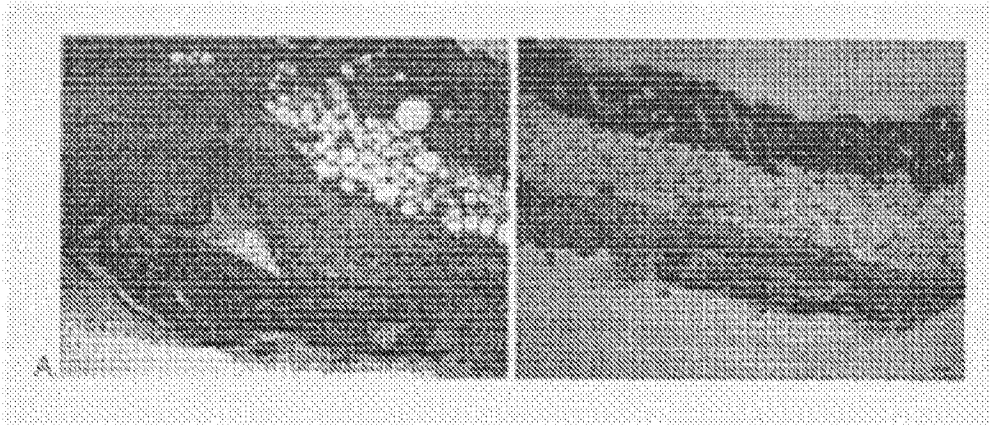


图7

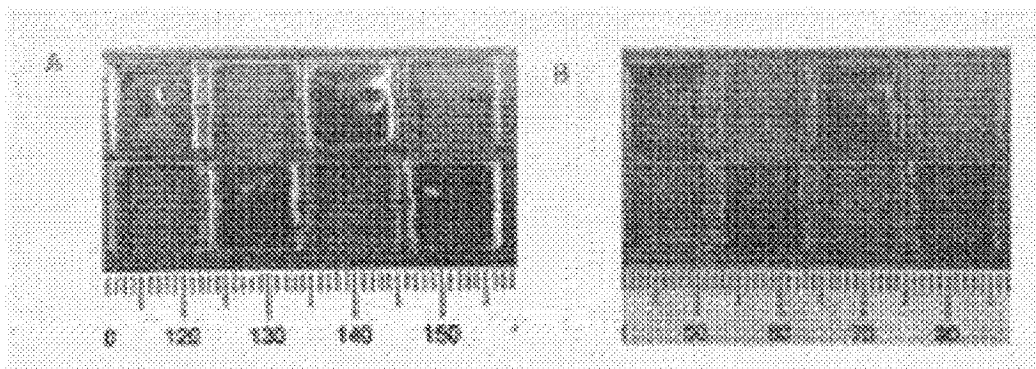


图8

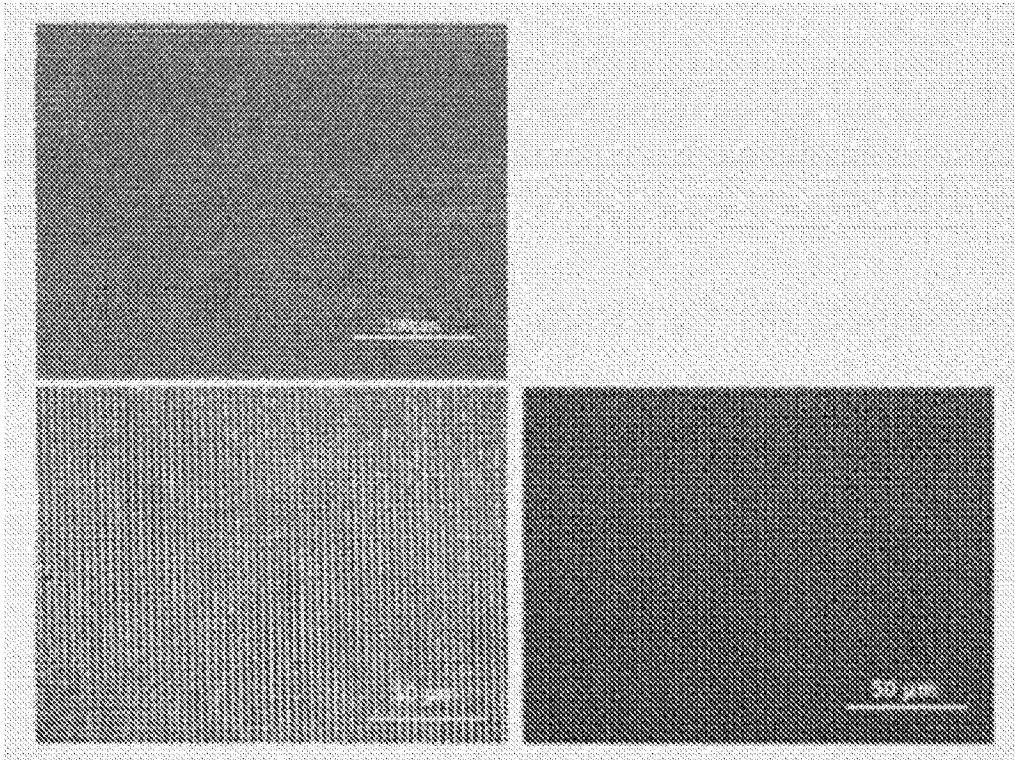


图9

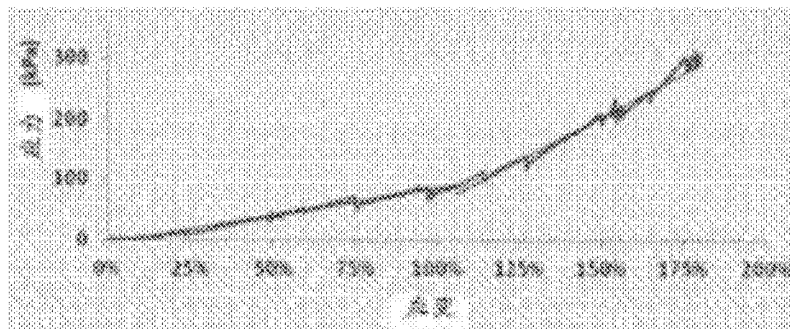


图10