

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103260606 A

(43) 申请公布日 2013. 08. 21

(21) 申请号 201180048630. 0

A61K 9/08 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 08. 24

A61K 47/38 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 31/498 (2006. 01)

61/376, 654 2010. 08. 24 US

A61K 38/43 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

A61K 35/12 (2006. 01)

2013. 04. 08

A61P 9/00 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/049026 2011. 08. 24

(87) PCT申请的公布数据

W02012/027514 EN 2012. 03. 01

(71) 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

申请人 万特雷斯公司

(72) 发明人 K·克里斯特曼 J·辛格林

J·德夸奇 亚当·金赛

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 高瑜 杨淑媛

(51) Int. Cl.

A61K 9/16 (2006. 01)

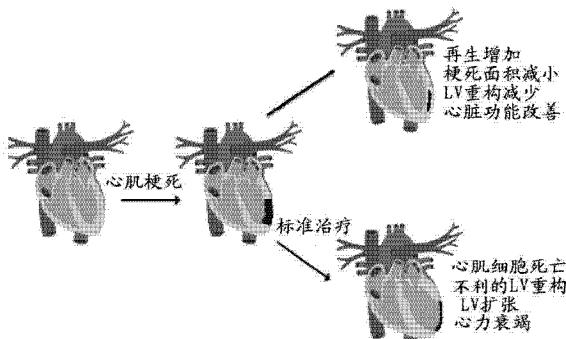
权利要求书2页 说明书19页 附图3页

(54) 发明名称

用于心脏治疗的组合物和方法

(57) 摘要

本文提供了用于心脏治疗的方法和组合物。此类组合物包含可用于支持组织修复的基于细胞外基质 (ECM) 的产物。所述组合物可用于多种用途。在一些情况下，可将它们引入受试者体内以保护和 / 或修复受损的心脏组织。



1. 一种组合物,其包含孔隙大小约为 30 至 40 微米的材料,其中所述材料可通过内径为 25G 或更小的导管注射。
2. 权利要求 1 的组合物,其中所述材料包含 :来源于心脏组织的脱细胞化的细胞外基质 ;和水。
3. 权利要求 2 的组合物,其中所述材料进一步包含盐水溶液。
4. 权利要求 2 的组合物,其中所述材料进一步包含至少一种消化酶。
5. 权利要求 4 的组合物,其中所述至少一种消化酶裂解所述基质,使得所述组合物在高于 20、25、30 或 35℃时胶凝。
6. 权利要求 4 的组合物,其中所述至少一种消化酶裂解所述基质,使得所述组合物在小于 30、20、10、5 或 1 分钟内胶凝。
7. 权利要求 4 的组合物,其中所述至少一种消化酶是胃蛋白酶。
8. 权利要求 2 的组合物,其中所述材料来源于心室组织。
9. 权利要求 2 的组合物,其中所述材料来源于左心室组织。
10. 权利要求 2 的组合物,其中所述材料进一步包含生长因子。
11. 权利要求 2 的组合物,其中所述材料进一步包含合成聚合物。
12. 权利要求 2 的组合物,其中所述材料进一步包含自然衍生的聚合物。
13. 权利要求 2 的组合物,其中所述材料进一步包含纤维素。
14. 权利要求 2 的组合物,其中所述材料包含纤维蛋白胶。
15. 权利要求 1 的组合物,其中所述组合物在递送到体内组织后的 30 分钟内呈凝胶形式。
16. 权利要求 1 的组合物,其中所述材料包含促进内源性心肌细胞和心脏细胞存活的因子。
17. 权利要求 1 的组合物,其中所述材料包含防止内源性心肌细胞和心脏细胞凋亡的因子。
18. 权利要求 1 的组合物,其中所述材料包含促进新血管形成的因子。
19. 权利要求 1 的组合物,其中所述材料包含促进细胞浸润的因子。
20. 权利要求 1 的组合物,其中所述材料包含改变免疫应答的因子。
21. 权利要求 1 的组合物,其中所述材料包含改变炎症应答的因子。
22. 一种组合物,其包含 :(a) 来源于心脏组织的脱细胞化的细胞外基质 ;(b) 生物相容性金属 ;和 (c) 水。
23. 权利要求 22 的组合物,其中所述金属是金属纤维。
24. 权利要求 22 的组合物,其中所述金属是金属颗粒。
25. 一种组合物,其包含 :(a) 来源于心脏组织的脱细胞化的细胞外基质 ;(b) 藻酸盐 ;和 (c) 水。
26. 一种组合物,其包含 :来源于心脏组织的脱细胞化的细胞外基质,其中所述基质包含分子量小于 300kDa、小于 200kDa、小于 100kDa、小于 50kDa 或小于 20kDa 的材料。
27. 一种组合物,其包含 :冻干的来源于心脏组织的脱细胞化的细胞外基质 ;和糖胺聚糖,其中所述组合物以至少 5、10 或 15 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 冻干基质的量包含糖胺聚糖。
28. 权利要求 27 的组合物,其中所述组合物以约 15 至 25 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 冻干基质的量包含糖

胺聚糖。

29. 一种组织培养装置,其包括:包含来源于心脏组织的脱细胞化的细胞外基质的组合物;和基底。

30. 权利要求 29 的装置,其中所述基底是组织培养板。

31. 权利要求 29 的装置,其中所述基质呈模具的形状。

32. 权利要求 29 的装置,其中将所述基质模塑成所述基底的形状。

33. 权利要求 29 的装置,其中所述基底是纤维素。

34. 权利要求 33 的装置,其中所述纤维素呈用于植入受试者体内的形状。

35. 权利要求 29 的装置,进一步包括组织培养基。

36. 一种制备组合物的方法,该方法包括:

a. 对心脏组织进行脱细胞化;

b. 冻干所述脱细胞化的心脏组织;

c. 消化所述冻干的组织;

d. 冻干所述消化的组织;

e. 将所述消化的组织在低于 25°C、低于 0°C、低于 -20°C 或低于 -70°C 的温度下储存长达 6 个月;和

f. 通过将冻干的消化组织与液体合并来制备组合物。

37. 一种修复心脏组织的方法,包括将包含来源于心脏组织的脱细胞化的细胞外基质的组合物注射到或植入受试者体内。

38. 权利要求 37 的方法,其中在心肌梗死后一个月之内注射或植入所述组合物。

39. 权利要求 37 的方法,其中在心肌梗死后两周之内注射或植入所述组合物。

40. 权利要求 37 的方法,其中所述组合物在注射或植入后的 3 个月内降解。

41. 权利要求 37 的方法,其中所述组合物在注射或植入后的 1 个月内降解。

42. 权利要求 37 的方法,其中所述组合物的注射或植入修复先天性缺陷。

43. 权利要求 37 的方法,其中所述组合物的注射或植入修复所述受试者所遭受的心脏组织损伤。

44. 权利要求 43 的方法,其中所述损伤是心肌梗死。

45. 权利要求 1 的组合物,其中在注射到或植入受试者后,所述组合物在 3 个月内降解。

46. 权利要求 1 的组合物,其中在注射到或植入受试者后,所述组合物在 1 个月内降解。

用于心脏治疗的组合物和方法

交叉引用

[0001] 本申请要求提交于 2010 年 8 月 24 日的美国临时申请号 61/376,654 的权益，该临时申请通过引用整体并入本文。

发明背景

[0002] 在美国，心血管疾病是死亡的主要原因。心血管疾病最常见的病因是当冠状动脉堵塞时发生的心肌梗死 (MI)。大约 37% 的 MI 患者将在一年内死于心力衰竭，且在幸存的患者中，2/3 的患者不能完全康复。MI 导致心肌细胞的死亡和细胞外基质 (ECM) 降解，而后是疤痕沉积。最终发生心力衰竭，并且心脏扩张，导致泵送效率降低。由于心脏中的心脏祖细胞非常少，因此心脏组织不能再生。目前对心力衰竭的治疗严重依赖于侵入性外科手术，而对受损心脏组织的修复来说作用不大。

[0003] 目前对于预防心肌梗死 (MI) 后心力衰竭的努力已集中于细胞移植以替换坏死的心肌细胞，防止不利的左心室 (LV) 重构，并再生或修复心脏组织。然而，在没有合适的基质的情况下，心肌细胞在体外的生长以及在体内的存活并不理想。心脏修复、心律不齐治疗以及细胞培养都需要凝胶或溶液形式的心脏细胞外基质。

发明内容

[0004] 一方面，一种组合物包含孔隙大小约为 30-40 微米的材料，其中所述材料可通过内径为 25G 或更小的导管注射。

[0005] 在一些情况下，该材料包含：来源于心脏组织的脱细胞化的细胞外基质；和水。在一些情况下，该材料进一步包含盐水溶液。

[0006] 在一些情况下，该组合物在递送至体内组织后的 30 分钟内呈凝胶形式。在一些情况下，该材料进一步包含至少一种消化酶。在一些情况下，所述至少一种消化酶裂解基质，使得组合物在高于 20、25、30 或 35°C 时胶凝。在一些情况下，所述至少一种消化酶裂解基质，使得组合物在少于 30、20、10、5 或 1 分钟内胶凝。在一些情况下，所述至少一种消化酶是胃蛋白酶。

[0007] 该材料可来源于心室组织，进一步地，该材料可来源于左心室组织。在一些情况下，该材料进一步包含生长因子、合成聚合物、自然衍生的聚合物或其组合。在一些情况下，该材料进一步包含纤维素。在一些情况下，该材料包含纤维蛋白胶。

[0008] 在一些情况下，该材料包含促进内源性心肌细胞和心脏细胞存活的因子、防止内源性心肌细胞和心脏细胞凋亡的因子、促进新血管形成的因子、促进细胞浸润的因子、改变免疫应答的因子、改变炎症应答的因子或其组合。

[0009] 另一方面，一种组合物包含：来源于心脏组织的脱细胞化的细胞外基质；生物相容性金属；和水。在一些情况下，该金属是金属纤维。在一些情况下，该金属是金属颗粒。

[0010] 再一方面，公开了一种组合物，其包含：来源于心脏组织的脱细胞化的细胞外基质；藻酸盐；和水。

[0011] 一方面,一种组合物包含:来源于心脏组织的脱细胞化的细胞外基质,其中所述基质包含分子量低于300kDa、低于200kDa、低于100kDa、低于50kDa或低于20kDa的材料。一方面,一种组合物包含:来源于心脏组织的脱细胞化的细胞外基质,其中所述基质包含分子量低于300kDa、低于200kDa、低于100kDa、低于50kDa或低于20kDa的非水性材料。一方面,一种组合物包含:来源于心脏组织的脱细胞化的细胞外基质,其中所述基质包含分子量处于上限为300kDa、200kDa、100kDa、50kDa或20kDa且下限为0.5kDa、1kDa、2kDa、5kDa、10kDa或20kDa的范围内的材料。

[0012] 另一方面,一种组合物包含:冻干的来源于心脏组织的脱细胞化的细胞外基质;和糖胺聚糖,其中所述组合物以至少5、10或15 μ g/mg冻干基质的量包含糖胺聚糖。在一些情况下,该组合物以约15至25 μ g/mg冻干基质的量包含糖胺聚糖。

[0013] 再一方面,公开了一种组织培养装置,其包含:含有来源于心脏组织的脱细胞化的细胞外基质的组合物;和基底。该基底可以是组织培养板。该基质可以呈模具(mold)的形状。在一些情况下,将基质模塑为基底的形状。示例性的形状可以是诸如支架或导管的生物医学产品的形状。其他形状可包括那些配置为在体内适合于心脏的形状。基底可以是纤维素。在一些情况下,纤维素呈用于植入受试者体内的形状。在一些情况下,该装置进一步包含组织培养基。在一些情况下,所述形状是组织培养形状,例如,但不限于,皿、小瓶、培养皿、板、孔和多孔板(multiwall plate)。

[0014] 一方面,本文描述了制备组合物的方法,该方法包括:对心脏组织进行脱细胞化;将脱细胞化的心脏组织冻干;消化所述冻干的组织;冻干所述消化的组织;将消化的组织在低于25°C、低于0°C、低于-20°C或低于-70°C的温度下储存长达6个月;以及通过将冻干的消化的组织与液体合并来制备组合物。

[0015] 另一方面,一种修复心脏组织的方法包括将包含来源于心脏组织的脱细胞化的细胞外基质的组合物注射到或植入受试者体内。在一些情况下,在心肌梗死后1个月内注射或植入所述组合物。在一些情况下,在心肌梗死后两周之内注射或植入所述组合物。在一些情况下,所述组合物在注射或植入后的3个月内降解。在一些情况下,所述组合物在注射或植入后的1个月内降解。在一些情况下,所述组合物的注射或植入修复先天性缺陷。在一些情况下,所述组合物的注射或植入修复所述受试者遭受的心脏组织损伤。该损伤可以是心肌梗死。

援引并入

[0016] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请均通过引用而以相同的程度整体并入本文,犹如特别地和单独地指出每个单独的出版物、专利或专利申请均通过引用而并入。

附图说明

[0017] 本发明的许多特征在随附的权利要求中具体阐述。通过参考以下对在其中利用到本发明的许多原理的说明性实施方式加以阐述的详细描述和附图,将会获得对本发明的特征和优点的更好的理解,在附图中:

[0018] 图1图示了递送本发明的组合物的示例性方法。

[0019] 图2图示了本文所述的方法和组合物的各种实施方式。

[0020] 图 3 展示了通过将本发明的组合物注射到大鼠心脏内而获得的数据。

[0021] 图 4 图示了如本文所述的组合物的制备方法的一些示例性步骤。

具体实施方式

[0022] 最近所研究的方法利用将健康细胞注射到左心室 (LV) 梗死壁, 以试图再生和修复心肌, 但是研究表明注入的细胞的存活较差。细胞 (包括成体干细胞和胚胎干细胞、诱导多能干细胞和分化细胞如心肌细胞) 一般在涂覆有一种或几种细胞外基质 (ECM) 蛋白质的表面或支架上培养。然而, 在体内, 这些细胞存在于高度复杂的细胞外环境中; 更加近似地模拟这种天然环境的 ECM 可能有利于所培养的细胞的存活以及在体外和体内的功能 / 成熟。

[0023] 目前正在研究将一些自然衍生的材料, 包括纤维蛋白、胶原蛋白、藻酸盐、基质胶 (matrigel) 和明胶, 注射到心肌内。这些材料中无一提供显著量的心脏细胞外基质的天然成分。对于心律不齐的治疗而言, 目前的非消融形式包括藻酸盐、纤维蛋白和细胞的注射。用于心肌细胞、干细胞以及其他心脏相关细胞的体外细胞培养的现有基质包括胶原蛋白、层粘连蛋白、SureCoat (Cellutron, 胶原蛋白和层粘连蛋白的混合物)、基质胶和明胶。

[0024] 需要开发针对晚期心力衰竭的新疗法。目前, 常见的疗法是心脏移植、左心室 (LV) 辅助装置和 / 或现有的药物治疗方案。这些治疗不能充分地防止心肌梗死 (MI) 后的不利的 LV 重构。针对心肌梗死和心力衰竭的治疗, 已经开发了细胞心肌成形术或细胞移植; 然而, 最近无细胞生物材料已在提供相似的功能益处而不产生与细胞递送相关的并发症方面展示出极大的前景。用于心脏治疗的生物材料产品是有限的, 因为极少数是特别针对心肌而制备的。目前正在研究的用于注入心肌内的材料包括但不限于纤维蛋白、胶原蛋白、藻酸盐、基质胶和明胶。

[0025] 在一些情况下, 如本文所述的组合物包含心脏 ECM 的基本上所有成分。在一些情况下, 该组合物以类似于体内所见的比例包含心脏 ECM 的基本上所有成分。ECM 蛋白质、糖蛋白和蛋白聚糖可包括但不限于:I、III、IV、V 和 VI 型胶原蛋白、弹性蛋白、纤维蛋白原、腔蛋白聚糖、串珠蛋白聚糖、纤蛋白和 / 或层粘连蛋白。在一些情况下, 如本文所述的组合物以类似于体内所见的比例包含心脏 ECM 的所有成分的 90%、80%、70%、60%、50% 或更多。在一些情况下, 使用了 ECM 模拟物。例如, 可通过组合天然存在的或人工产生的 ECM 的独立成分, 以使得独立成分的比例模拟在天然存在的 ECM 中发现的比例, 而生产人工 ECM。

[0026] ECM 包括间质基质和基膜材料。在一些情况下, 包含 ECM 的组合物由纤维状蛋白质和糖胺聚糖 (GAG) 的互锁网组成。GAG 是糖类聚合物, 且通常附着于细胞外基质蛋白质上以形成蛋白聚糖。可包含在本发明的组合物中的示例性 ECM 纤维包括但不限于, 串珠蛋白聚糖、聚集蛋白和所有类型的胶原蛋白, 所述胶原蛋白类型包括: 纤维状 (I、II、III、V、XI 型); 断续三股螺旋 (facit) (IX、XII、XIV 型); 短链 (VIII、X 型); 基膜 (IV 型); 以及其他 (VI、VII、XIII 型)。

[0027] 本文描述了用于注射到心脏组织内的包含心脏 ECM 的组合物。在本文所述的一些情况下, 提供了来源于天然心脏细胞外基质 (ECM) 的组合物的可注射凝胶形式。还可单独使用该凝胶以将细胞募集至受损组织中或作为药物递送载体。凝胶也可用于支持受损组织或改变机械性能。本发明的另一用途是作为非破坏性传导阻滞以治疗心律不齐。在一些情

况下,如本文所述的心脏或心 ECM 材料来源于心肌组织。在一些情况下,组合物来源于心室组织。在一些情况下,组合物来源于左心室组织。在一些情况下,组合物可来源于左心室和右心室组织。在一些情况下,组合物可来源于可无创获得的自体心包组织。在其他情况下,如本文所述的心脏或心 ECM 材料来源于心包组织。

[0028] 组合物可用于将细胞递送至心肌梗死后的梗死壁。

[0029] 在一些情况下,本发明的组合物模拟细胞外基质 (ECM),例如,可能已被梗死损伤的 ECM。该组合物可提供促进修复的、复杂的、心肌特异性的 ECM 信号 (cue)。本文的组合物被配置用于经由导管技术递送。

[0030] 天然心脏 ECM 可比传统的细胞涂层具有更多的成分,并因此当与胶原蛋白和层粘连蛋白相比时可展示更复杂的 ECM 成分的混合物。在一些情况下,在此制备为基质的组合物可模拟天然心脏 ECM。在此制备的组合物可提高心肌细胞的存活率或生长速率。在此制备的组合物可用于接种细胞培养物,如心肌细胞培养物。在一些情况下,接种至本发明组合物上的培养物开始搏动。在一些情况下,接种至本发明组合物上的细胞比培养在单独的胶原蛋白上的细胞持续搏动得更久。例如,接种至本发明组合物上的细胞可持续搏动长于 10、14、20、25、30、35、40、45、60、70、80、90 或 100 天。

[0031] 在一些情况下,生长在本发明组合物上的细胞具有增加的辅肌动蛋白、连接蛋白 43 或泛 - 钙黏着蛋白的量。生长在本发明组合物上的细胞与生长在胶原蛋白上的细胞相比可具有增强的生存能力。此外,与生长在胶原蛋白上的细胞对胶原蛋白的附着相比,生长在本发明组合物上的细胞可具有增强的对组合物的附着。

[0032] 在一些情况下,本文提供的组合物在脱细胞化后包含多种 ECM 蛋白质。ECM 蛋白质、糖蛋白和蛋白聚糖可包括但不限于:I、III、IV、V 和 VI 型胶原蛋白、弹性蛋白、纤维蛋白原、腔蛋白聚糖、串珠蛋白聚糖、纤蛋白或层粘连蛋白。因此,脱细胞化的心肌 ECM 可包含蛋白质和蛋白聚糖的复杂组合。

[0033] 在一些情况下,本发明的组合物以可注射的形式提供。可消化脱细胞化的基质粉末以溶解或其他方式将产物合并至液体中。在一些情况下,合并的产物包含糖胺聚糖 (GAG)。例如,组合物可具有至少 1、2、3、4、5、8、10、15、20、25、30、40、50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 冻干基质或更高的糖胺聚糖 (GAG) 含量。

[0034] 在一些情况下,本发明的组合物包含心肌特异性的 ECM 成分。在一种情况下,组合物是来源于天然心肌 ECM 的可注射水凝胶。在一些情况下,组合物基本上不包含任何细胞抗原。在一些情况下,组合物在受试者体内不产生免疫应答。在一些情况下,在免疫抑制治疗之前、与之同时或之后将组合物递送至受试者体内。在一些情况下,不使用免疫抑制治疗。

[0035] 在一些情况下,本文所述的组合物配置为以即用的 (off-the-shelf) 方式提供以用于治疗。在一个实例中,本发明的组合物呈干燥固体形式并可被储存在架子上或者室内或单元内,然后在治疗前用水、盐水或另一种液体溶液立即溶解。

[0036] 本文描述了包含心肌特异性材料的组合物,该组合物可经由导管递送以在 MI 后环境中促进修复。该组合物包含心室 ECM 蛋白质、肽和多糖的复杂混合物。在许多情况下,组合物在室温下是液体并且在注入心肌后形成多孔纤维状支架。当组合物在体内递送至心肌梗死部位时,其促进细胞流入并保持 LV 的几何形状和心脏功能。

[0037] 在一些情况下,如本文所述的组合物可帮助再生或修复有缺陷的或缺如的心肌并恢复心脏功能。在此,可注射的细胞外基质组合物可来源于哺乳动物或合成来源。组合物可进一步包含细胞。本发明的细胞外基质组合物可进一步包含附加成分,例如但不限于:细胞、肽、多肽或蛋白质、诸如多核苷酸或寡核苷酸的核酸、DNA、RNA、表达生物活性分子的DNA的载体、聚合物或其他材料、交联剂以及其他添加剂如营养物或药物分子。一种或几种附加成分可包含于该组合物中。在一些情况下,附加成分是药物。在一些情况下,药物作为细胞外基质组合物的一部分或作为ECM的注射溶液的成分来递送;在一些情况下,在递送本文所述的组合物的同时、之前或之后递送药物。药物的实例包括但不限于:血压或高血压药物(例如,ACE抑制剂、 α 激动剂、 α 阻滞剂、血管紧张素II受体阻滞剂、利尿剂或肾素阻滞剂);抗心律不齐药(例如,钠通道阻滞剂、 β 阻滞剂、钾通道阻滞剂、钙通道阻滞剂);降胆固醇药(例如,他汀类药物、考来烯胺(chloestyramine));血液稀释剂或抗凝剂(例如,阿司匹林、抑肽酶、氯吡格雷、依诺肝素、肝素、华法林、达比加群酯(dabigatran etexilate));控制心率的药物(例如,洋地黄制剂);和/或血管舒张剂(例如,硝酸甘油)。

[0038] 一方面,如本文所述的组合物包含:来源于心脏组织的脱细胞化的细胞外基质;和水。在一些情况下,组合物进一步包含盐水溶液。本发明的组合物可包含来源于心脏组织的脱细胞化的ECM和脱细胞化的ECM可混溶于其中的液体溶液。

[0039] 本文所述的组合物可包含体内的许多因子或信号,包括但不限于:促进新血管形成的因子,如VEGF和bFGF;促进细胞浸润的因子,如SDF;改变免疫应答的因子;改变炎症应答的因子,如IL-10;促进内源性心肌细胞和心脏细胞存活的因子;和防止内源性心肌细胞和心脏细胞凋亡的因子。

[0040] 在一些情况下,描述了递送方法,其中可将组合物放置在与有缺陷的或缺如的心肌接触处,从而导致心肌组织再生以及心肌的收缩性、传导性或功能的恢复。在一些情况下,本发明的组合物可募集内源性细胞并可协调新募集的或添加的细胞的功能,还允许组合物中的细胞迁移和增殖。如本文所述,在一些情况下,组合物可帮助修复心肌组织。在一些情况下,这种修复涉及心脏组织和/或心脏组织的特有特征如条纹、T管或闰盘的恢复。

[0041] 已经制备了包含天然细胞外基质支架的组合物,以供在哺乳动物组织移植手术中使用。ECM基质的实例包括但不限于:小肠粘膜下层(SIS),如在美国专利号5,275,826中描述的支架;膀胱粘膜下层(UBS),如在美国专利号5,554,389中描述的支架;胃粘膜下层(SS),如在美国专利号6,099,567中描述的支架;以及肝粘膜下层(LS)或肝基膜(LBM),如在美国专利号6,379,710中描述的支架。此外,来自哺乳动物来源的胶原蛋白可从含有组织的基质获取并用于形成基质组合物。细胞外基质还可由细胞培养物来合成。已经发表了为了再生整个心脏目的的心脏脱细胞化(Ott等人,Nature Medicine,2008)。也已经描述了猪膀胱基质的可注射凝胶形式(Freytes等人,Biomaterials,2008)。

[0042] 本文公开了包含直接来源于天然心脏组织的脱细胞化心脏细胞外基质的生物相容性材料,并且通过将包含脱细胞化心脏细胞外基质的生物相容性材料注射到或植入受试者体内而用于治疗受试者(优选地人类)体内有缺陷的、患病的、损伤的或缺血的组织或器官。在一些情况下,将材料递送至非人类动物受试者。

[0043] 图1图示了递送本文的组合物的示例性方法。图1提供了从心肌梗死到引入本文

所述的组合物的事件流程，导致了如下的结果：再生增加，梗死面积减小，LV 重构减少以及心脏功能改善。

[0044] 图 2 是图示本文提供的方法和组合物的几个实施方式的流程图。在一些情况下，从动物获取组织，201。该组织可以是心脏组织，例如心肌组织，但也可以是其他类型的组织。本文描述了组织的各处理步骤，202。例如，可对组织进行脱细胞化、冻干、消化和溶解在期望的液体中，或备选地通过本文所述的步骤的任意组合进行处理。结果形成了基于 ECM 的基质产物；在一些实施方式中，基于 ECM 的基质产物是可注射的。在各种实施方式中，基于 ECM 的基质产物模拟受试者体内受损组织的 ECM，例如心肌梗死患者的心肌 ECM。

[0045] 在一些实施方式中，可将基于 ECM 的基质产物模塑为特定形状，然后将其移植到或引入受试者体内。可将基于 ECM 的基质产物模塑为期望形状（例如，可能适合于移植到或引入受试者体内的期望区域（例如，心肌）的导管、支架、移植物、补片等的形状）的支持性基质。可将细胞（例如，种子细胞）任选地接种到模塑的基于 ECM 的基质产物上或在其上培养，204。可通过本文所述的方法制备补片、移植物或凝胶产物或相似的移植构件，205。可将该移植构件移植或引入受试者体内的受损区域，206。在一些实施方式中，移植（或引入）促进该区域中的细胞生长或存活或者以其他方式使细胞聚集于受损区域；细胞或组织生长常常直接发生在基于 ECM 的基质上。

[0046] 一些实施方式涉及模拟 ECM（例如心肌 ECM）的基于 ECM 的基质产物（202）以及修复受损组织或利用其防止组织中的损伤的方法。在许多情况下，将基于 ECM 的基质产物注射到、植入或以其他方式引入受损组织，例如损伤的心肌、心肌梗死，207。在一些情况下，在注射之前或之后允许形成凝胶。在一些实施方式中，在将溶液输入受试者之后发生凝胶形成，208。凝胶形成可取决于温度变化，例如，向体温的转变或向约 37℃ 的温度的转变。之后细胞诸如内源性细胞可聚集于基于 ECM 的基质产物，211。任选地，将细胞以注射或其他方式引入基于 ECM 的基质产物的注射部位或移植部位之上或其附近，209。在各种实施方式中，基于 ECM 的基质产物模拟受损组织的 ECM，并因此促进细胞生长、分化或向受损区域的归巢，210。结果，在一些情况下，细胞聚集于受损区域，211（细胞生长通常直接发生在基于 ECM 的基质产物上）。在各种实施方式中，在经过细胞足以聚集于受损区域的时间后，基于 ECM 的基质产物降解，212。

[0047] 本公开内容还提供了使组织培养物在组织培养孔上生长的组合物和方法，213。使用本文所述的方法和组合物产生的基于 ECM 的基质产物可用于涂覆组织培养孔。许多类型的细胞可在所述已涂覆的培养孔上培养。例如，心肌细胞可在用基于 ECM 的基质产物涂覆的孔上培养，215。在一些实施方式中，将多潜能干细胞 (pluripotent stem cells)、多能干细胞 (multipotent stem cells) 或心肌细胞前体细胞在涂覆的孔上培养，214。然后基于 ECM 的基质产物可促进或允许培养的细胞分化为特定组织的细胞，例如可使用来源于心肌组织的基于 ECM 的基质产物来产生涂层，并且涂层可以促进细胞分化为心肌细胞，216。

[0048] 在其他实施方式中，可使用由人工创建的 ECM 产生的基于 ECM 的基质产物。在此类情况下，此类基于 ECM 的基质产物可用于涂覆组织培养孔，213，从而得以注入受损的心肌（或其他类型的受损组织），207，或模塑为期望形状的支持性基质，203。

[0049] 心肌梗死后，目前的标准疗法如药物和医疗装置（或缺乏疗法）通常是无效的，并最终导致心肌细胞死亡、不利的 LV 重构、LV 扩张和心力衰竭。本文描述了递送可注射的组

合物的方法。在一些情况下,将本发明的组合物递送至 LV 可导致再生增加、梗死面积减小、LV 重构减少或心脏功能改善。心脏基质的溶液形式、凝胶形式和吸附形式提供了类似于体内所见比例的天然 ECM 的许多成分。

[0050] 在一些情况下,脱细胞化的心脏细胞外基质来源于选自人类心脏、猪心脏、牛心脏或任何其他哺乳动物或动物心脏(包括但不限于,山羊心脏、小鼠心脏、大鼠心脏、兔心脏和鸡心脏)的天然心脏组织。在一些情况下,脱细胞化的心脏细胞外基质来源于天然组织,该天然组织来自于源自于如本文所述组织的胚胎或胎儿来源,而没有额外的限制。

[0051] 在又一实施方式中,包含脱细胞化的心脏细胞外基质的生物相容性材料呈可注射凝胶或溶液的形式,且可通过将细胞移植或递送至心肌梗死后的梗死壁或将细胞募集至受损的心脏组织内而用于心脏修复。在其他情况下,包含脱细胞化的心脏 ECM 的生物相容性材料例如是补片、乳剂、粘性液体、凝胶、片段、颗粒、微珠或纳米珠。

[0052] 在本文公开的另一方面,组合物包含孔隙大小约为 30-40 微米的材料,其中所述材料是与心脏组织生物相容的,且其中所述材料可通过内径为 25G 或更小的导管注射。在一些情况下,所述材料包含来源于心脏组织的脱细胞化的细胞外基质。在一些情况下,该组合物包含孔隙大小小于 50 微米的材料。

[0053] 在一些情况下,本发明的组合物促进所植入的细胞的成熟。例如,植入受损心肌中的未成熟细胞可与本文所述的基质组合物的递送一起植入或在其后不久植入,其中所述基质组合物促进所植入的细胞的成熟。在一些情况下,组合物促进所植入的细胞的分化。例如,诱导性多能干(iPS)细胞可与基质组合物的递送一起植入或在基质组合物的递送后不久植入;且基质组合物起到促进 iPS 细胞分化的作用。在一些情况下,体内因子还可作用于 iPS 细胞以独立地或与基质组合物一起促进分化。在另一实例中,胚胎干(ES)细胞或成体干细胞与基质组合物的递送一起植入或在其后植入;且 ES 细胞或成体干细胞随后分化成更成熟的细胞类型。在一些情况下,体内因子也可作用于 ES 细胞或成体干细胞以独立地或与基质组合物一起促进分化。

[0054] 在又一实例中,组合物可促进所植入的细胞的转分化。例如,可将非心脏细胞与组合物一起递送至受试者体内,该组合物可促进细胞转分化为心脏表型。在一些实例中,本发明的组合物促进体内细胞的成熟和/或促进体内细胞的分化。在另一实例中,本发明的组合物促进体外培养的细胞的成熟和/或促进体外培养的细胞的分化。

[0055] 在一些情况下,本发明的组合物可进一步包含与如本文所述的基质材料中的多糖相结合的生长因子。

[0056] 在一些情况下,公开了用于移植前在研究实验室中或在临床环境中培养心肌细胞或其他心脏相关细胞以及用于心脏修复的生物相容性材料(例如,不引起受试者体内免疫应答的材料)。还提供了制备和利用脱细胞化的心脏细胞外基质涂覆组织培养板或孔的表面的方法。该生物相容性材料还适合于植入患者体内。

[0057] 本文进一步提供了生产包含本发明的脱细胞化心脏细胞外基质的生物相容性材料的方法。此方法包括以下步骤:(a)从受试者获得含有细胞外基质和非细胞外基质成分的心脏组织样品;以及(b)处理心脏组织样品以去除非细胞外基质成分,从而获得脱细胞化的心脏细胞外基质。在某些实施方式中,从诸如非灵长类动物(例如,牛、猪、马、猫、狗、大鼠等)或灵长类动物(例如,猴和人)的哺乳动物或从禽源(例如,鸡、鸭等)分离心脏

组织样品。使用一种或多种物理、化学和 / 或生物技术来完成心脏组织样品的脱细胞化程序。

[0058] 对于人类治疗,心脏细胞外基质材料具有许多潜在来源:人类心脏(包括自体的、同种异体的或尸体的)、猪心脏、牛心脏、山羊心脏、小鼠心脏、大鼠心脏、兔心脏、鸡心脏以及其他动物来源。在一些情况下,ECM 源自于多只动物(例如,多头猪)或多个动物物种(例如,猪和不同的物种,如兔)。与全心脏移植不同,一个供体心脏可用于治疗许多人。非人类动物将是心脏细胞外基质的来源,而无需人类供体。作为研究试剂,可使用非人类动物来源(猪心脏、牛心脏、山羊心脏、小鼠心脏、大鼠心脏、兔心脏、鸡心脏等)。首先对心脏进行脱细胞化,仅留下细胞外基质和 / 或细胞外蛋白质和 / 或多糖。

[0059] 在一个实施方式中,将心脏细胞外基质冻干、碾碎并用低 pH 的胃蛋白酶或其他基质降解酶如基质金属蛋白酶进行消化。在一些情况下,组合物进一步包含胃蛋白酶。在一些情况下,组合物进一步包含消化酶,例如,胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、木瓜蛋白酶或其组合。在一些情况下,组合物进一步包含如本文所述的多种消化酶。可基于被一种或多种消化酶切割的肽键为此处的组合物选择一种或多种消化酶。

[0060] 在一些情况下,组合物被配置为在体温(例如,37°C 或更高)下胶凝。在一些情况下,组合物被配置为在高于 20、25、30 或 35°C 下胶凝。在一些情况下,制备如本文所述的组合物的方法包括基于组合物胶凝的期望温度来选择酶。在一些情况下,制备如本文所述的组合物的方法包括基于组合物在体内递送时期望的胶凝时间来选择酶。在一些情况下,组合物在递送至体内组织后的 30 分钟、20 分钟、10 分钟、5 分钟、1 分钟或更短的时间内呈凝胶形式。在一些情况下,利用本文所述的方法对一个心脏进行脱细胞化。在一些情况下,利用本文所述的方法对两个或更多个心脏进行脱细胞化。在一些情况下,从多只动物(例如,多头猪)或多个动物物种(例如,猪和不同的物种,如兔)获得心脏组织。在一个方面,本文提供了制备组合物的方法,该方法包括:对心脏组织进行脱细胞化;冻干脱细胞化的心脏组织;在第一液体中用酶消化所述冻干的组织;冻干所述消化的组织;以及通过将冻干的消化组织与第二液体合并来制备组合物。在一些情况下,并入液体的过程中包括溶解。在一些情况下,该方法包括多个但不是全部所述步骤。例如,该方法可包括对心脏组织进行脱细胞化,在第一液体中用酶消化组织,以及将消化的组织与第二液体合并。在一些情况下,该方法不包括对心脏组织进行脱细胞化。在一些情况下,该方法不包括将消化的组织与第二液体合并。

[0061] 在一些情况下,通过使用十二烷基硫酸钠(SDS)溶液进行脱细胞化。在一些情况下,酶是消化酶,例如,胃蛋白酶。在一些情况下,第一液体是磷酸盐缓冲盐水(PBS)、盐水或其他缓冲溶液。在一些情况下,第二液体是水,例如,无菌水和 / 或去离子水,或者第二液体可以是盐水。

[0062] 另一方面,组合物包含:冻干的来源于心脏组织的脱细胞化的细胞外基质。冻干的基质可在水中混溶,从而形成溶液。在一些情况下,溶液在低于 25、20、15、10、5 或 0°C 的温度下是液体溶液。在一些情况下,溶液在高于 20、30、35 或 37°C 的温度下是凝胶。在一些情况下,当水与组合物混合并且组合物在体内递送时溶液是液体。

[0063] 在一种情况下,当从病理上评估时,本发明的组合物显示细胞核、DNA、RNA 缺失。在另一种情况下,本发明的组合物包含分子量条带低于约 20kDa 的心脏细胞外材料的部分。

在一些情况下，本发明的组合物具有至少为 5、10 或 15 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 冻干组合物的糖胺聚糖含量。在另一种情况下，本发明的组合物具有约 15 至 25 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 冻干组合物的糖胺聚糖含量。

[0064] 在一些情况下，本发明的方法进一步包括将组合物冻干，并在低于 25°C、低于 0°C、低于 -20°C 或低于 -70°C 的温度下储存该组合物长达 6 个月。

[0065] 可将本文所述的组合物直接注射至受试者体内，其因此用作材料治疗。例如，可中和含有心脏细胞外基质的溶液并使用 PBS/ 盐水或其他缓冲液使其达到合适的浓度。之后可通过小直径针将含有心脏细胞外基质的溶液注射至心肌内。在体温下，这种溶液随后可形成凝胶。细胞或药物 / 蛋白质还可在凝胶内或与凝胶一起递送。例如，未分化的细胞可在凝胶内或与凝胶一起递送，并且此类细胞随后可在体内分化。在其他实例中，部分分化的或终末分化的细胞在凝胶内或与凝胶一起递送。

[0066] 本文提供的组合物，尤其是凝胶试剂，可用于组织培养应用。可中和含有心脏细胞外基质的溶液并使用 PBS/ 盐水使其达到合适的浓度。之后可将此溶液放置于组织培养板 / 孔中。一旦放置在 37°C 或高于室温的培养箱中，溶液就会形成可用于细胞培养的凝胶。

[0067] 在本发明的另一方面，提供了一种组合物，该组合物包含：来源于心脏组织的脱细胞化的细胞外基质，其中所述组合物呈模具的形状。在一个实例中，该组合物是体外试剂。

[0068] 在一个方面，组织培养装置包含：含有来源于心脏组织的脱细胞化细胞外基质的组合物。在一些情况下，装置是组织培养板。在一些情况下，装置的基质呈模具的形状。在一些情况下，装置进一步包含组织培养基。

[0069] 在一些情况下，本发明的方法进一步包括使组合物胶凝成为预定的形状或模具。例如，组合物可在组织培养皿或板内胶凝，或者组合物可胶凝以适配模具的特定形状。示例性的形状可以是诸如支架或导管的生物医学产品的形状。其他形状可包括那些配置为在体内适合于心脏的形状。基底可以是纤维素。在一些情况下，纤维素为用于植入受试者体内的形状。在一些情况下，装置进一步包含组织培养基。在一些情况下，形状是组织培养形状，例如但不限于皿、小瓶、培养皿、板、孔以及多孔板。

[0070] 在另一种情况下，使组合物胶凝至一个形状或产品上以产生用该组合物涂覆的装置。在另一种情况下，使组合物胶凝至一个形状或模具内而后冻干。在另一种情况下，可将该冻干的形状植入体内或用作体外支架，或可以在使用之前将其再水合。

[0071] 在一种情况下，用于受试者心脏修复的治疗方法包括部分地或完整地注射或植入本发明的生物相容性材料。本发明还提供了用于治疗受试者的心律不齐或其他有缺陷的、患病的、损伤的或缺血的组织或器官的治疗方法，该方法包括注射或植入本发明的生物相容性材料。

[0072] 本发明的组合物可包含来源于心脏组织的脱细胞化的 ECM 和另一种成分或多种成分。在一些情况下，整个组合物中的 ECM 的量高于组合物的 90% 或 95%（重量）。在一些实施方式中，整个组合物中的 ECM 高于组合物的 1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70% 或 80%（重量）。

[0073] 在此，制备了脱细胞化的细胞外基质，使得用于心肌组织再生的许多生物活性得以保留。本发明的组合物的示例性生物活性包括但不限于：细胞粘附、细胞迁移、细胞分化、细胞成熟、细胞组织化、细胞增殖、细胞死亡（凋亡）的控制或引发，血管生成的刺激，蛋白水解活性，酶活性，细胞运动性，蛋白质和细胞调节，转录事件的激活，针对翻译事件的准

备,对一些生物活性的抑制(例如对凝固、干细胞吸引、趋化性的抑制),以及MMP或其他酶活性。

[0074] 本发明的组合物包含基本上脱细胞化的基质。在一些情况下,脱细胞化的基质不包含天然细胞。在一些情况下,脱细胞化的基质包含低于1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%(重量)的细胞成分。

[0075] 在一些情况下,本发明的组合物可包含分级分离的来源于心脏组织的脱细胞化细胞外基质。例如,本发明的组合物包含分子量低于300kDa、低于200kDa、低于100kDa、低于50kDa或低于20kDa的基质材料。对于另一实例,本发明的组合物包含分子量低于300kDa、低于200kDa、低于100kDa、低于50kDa或低于20kDa的非水性基质材料。对于又一实例,本发明的组合物包含分子量处于上限为300kDa、200kDa、100kDa、50kDa或20kDa且下限为0.5kDa、1kDa、2kDa、5kDa、10kDa或20kDa的范围内的基质材料。

[0076] 在一些情况下,本发明的组合物进一步包含交联剂,如戊二醛、甲醛、转谷氨酰胺酶或双胺反应性分子。

[0077] 在一些情况下,本发明的组合物进一步包含肽、蛋白质、核酸、多核苷酸、寡核苷酸、DNA、RNA、促存活添加剂、蛋白聚糖或糖胺聚糖。在一些情况下,组合物还包含免疫抑制剂。在其他情况下,组合物不包含免疫抑制剂。

[0078] 如本文所述,组合物可包含脱细胞化的ECM和不同组织脱细胞化ECM或者合成的或天然存在的聚合物。本发明的组合物的示例性聚合物包括但不限于:聚对苯二甲酸乙二醇酯纤维(涤纶)、聚四氟乙烯(PTFE)、戊二醛交联的心包膜、聚乳酸(PLA)、聚二醇(PGA)、透明质酸、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯(polyethylene)、镍钛诺以及来自动物和非动物来源的胶原蛋白(如植物胶原蛋白或合成胶原蛋白)。在一些情况下,组合物的聚合物是生物相容的和可生物降解的和/或可生物吸收的。示例性的可生物降解的或可生物吸收的聚合物包括但不限于:聚乳酸、聚乙交酯、聚己内酯、聚二氧六环及它们的无规共聚物和嵌段共聚物。可生物降解的和/或可生物吸收的聚合物可含有选自乙交酯、丙交酯、二氧环己酮、己内酯、三亚甲基碳酸酯、乙二醇和赖氨酸的单体。材料可以是含有这些单体的无规共聚物、嵌段共聚物或单体、均聚物、共聚物和/或杂聚物的混合物。可生物降解的和/或可生物吸收的聚合物可包含可生物吸收的和可生物降解的直链脂肪族聚酯如聚乙交酯(PGA)及其无规共聚物(乙交酯-丙交酯)共聚物(PGA-co-PLA)。合适的生物相容性聚合物的其他实例是包括甲基丙烯酸乙酯在内的聚羟基烷基甲基丙烯酸酯和诸如聚乙烯吡咯烷酮和聚丙烯酰胺的水凝胶。其他合适的可生物吸收的材料为生物聚合物,其包括胶原蛋白、明胶、藻酸、壳多糖、壳聚糖、纤维蛋白、透明质酸、葡聚糖、聚氨基酸、聚赖氨酸以及这些材料的共聚物。根据本发明考虑使用上述实例的任意组合、共聚物、聚合物或其混合物。可通过已知方法制备此类可生物吸收的材料。

[0079] 在一些情况下,本发明的组合物包含自然衍生的聚合物和ECM。在此使用的自然衍生的聚合物的实例包括但不限于:藻酸盐、纤维蛋白胶和多糖如透明质酸。

[0080] 在一种情况下,本发明的组合物包含来源于心脏组织的脱细胞化的细胞外基质,且进一步包含生物相容性金属。生物相容性金属的实例包括但不限于钛。在一个实例中,本发明的组合物包含生物相容性金属的小直径纤维或小直径颗粒。组合物中的金属可以为材料结构提供支持。此外,当脱细胞化的ECM在体内降解时,可留下组合物的金属部分以便

为周围组织提供支持结构。

[0081] 在一些情况下，本发明的组合物进一步包含纤维素。可利用纤维素以使材料在体内和体外形成期望的形状。例如，当用作组织培养试剂时，本文所述的组合物可包含纤维素，并且可设置成特定形状。在本发明的另一方面，提供了一种装置，其中纤维素提供了基底，本文所述的组合物在该基底上沉积。该装置然后可以特定形状进行递送，以进行组织修复。

[0082] 可商购的 ECM 制品也可并入本文所述的方法、装置和组合物中。在一个实施方式中，ECM 来源于小肠粘膜下层或 SIS。可商购的制品包括但不限于 Surgisis™、Surgisis-ES™、Stratasis™ 和 Stratasis-ES™(Cook Urological Inc. ;Indianapolis, Ind.) 以及 GraftPatch™(Organogenesis Inc. ;Canton Mass.)。在另一实施方式中，ECM 来源于真皮。可商购的制品包括但不限于 Pelvicol™(作为 Permacol™ 在欧洲出售 ;Bard, Covington, Ga.)、Repliform™(Microvasive ;Boston, Mass.) 和 Alloderm™(LifeCell ;Branchburg, N. J.)。

[0083] 本文描述了制备包含来源于组织的脱细胞化 ECM 的可注射组合物的方法。还描述了相关的组合物、装置和使用方法。当加温至室温以上（包括接近约 37°C 的生理温度）时，组合物的粘度可增加。根据一个非限制性实施方式，ECM 衍生的组合物在室温和低于 35°C 的其他温度下为可注射溶液。在另一非限制性实施方式中，凝胶在 37°C 的体温或接近体温时可注射，但是随着温度升高，其更快地胶凝。在一些情况下，在 37°C 的生理温度下在小于 5 分钟的时间内形成凝胶。在一些情况下，在 37°C 的生理温度下在小于 10 分钟的时间内形成凝胶。在一些情况下，在 37°C 的生理温度下在小于 15 分钟的时间内形成凝胶。在一些情况下，在 37°C 的生理温度下在小于 30 分钟的时间内形成凝胶。在一些情况下，在 37°C 的生理温度下在小于 45 分钟的时间内形成凝胶。在一些情况下，在 37°C 的生理温度下在小于 1 小时的时间内形成凝胶。在一些情况下，在小于 5 分钟的时间内在体内形成凝胶。在一些情况下，在小于 10 分钟的时间内在体内形成凝胶。在一些情况下，在小于 15 分钟的时间内在体内形成凝胶。在一些情况下，在小于 30 分钟的时间内在体内形成凝胶。在一些情况下，在小于 45 分钟的时间内在体内形成凝胶。在一些情况下，在小于 1 小时的时间内在体内形成凝胶。

[0084] 在一个实施方式中，首先对心脏进行脱细胞化，仅留下细胞外基质。然后将基质冻干、磨成或压成细粉，并用胃蛋白酶或其他酶溶解。酶的实例包括但不限于：基质金属蛋白酶、胶原酶和胰蛋白酶。

[0085] 在一个方面，递送用于心脏修复的材料的方法包括：提供包含来源于心脏组织的脱细胞化细胞外基质的冻干组合物；对冻干的基质进行灭菌；用液体溶液溶解冻干的基质，从而形成材料；以及将材料递送到心脏组织。在一些情况下，利用环氧乙烷或通过辐射对基质进行灭菌。在一些情况下，液体溶液是水、盐水或缓冲溶液。在一些情况下，递送是经皮递送，例如，通过经心内膜或经冠状动脉的导管递送组合物。在一些情况下，递送组合物的步骤发生在心肌梗死后约 1 到 30 天。在一些情况下，递送组合物的步骤发生在心肌梗死后至少 1 个月或至少一年。递送组合物的步骤发生在心肌梗死后约 1 到 24 小时。在一些情况下，组合物被递送至心肌梗死处、心肌梗死处的边缘区或离心肌梗死处 2cm 或更小的范围内。例如，递送组合物的步骤可改变心室重构。

[0086] 在凝胶治疗的一个实例中，随后中和溶液并使用 PBS 或盐水使其达到合适浓度。在一个实施方式中，随后可通过针将溶液注入心肌（例如，经由导管，穿过肋骨，或在开胸手术期间）。针号可以是但不限于 22g、23g、24g、25g、26g、27g、28g、29g、30g 或更小。在一个实施方式中，用于注射凝胶的针号为 27g。递送还可通过球囊输注导管或其他非针导管进行。在体温下，溶液之后可形成凝胶。

[0087] 在本发明的又一方面，用于修复心脏组织的方法包括将包含来源于心脏组织的脱细胞化细胞外基质的组合物注射到或植入受试者体内。在一些情况下，在心肌梗死后一个月之内注射或植入组合物，或者在心肌梗死后两周之内注射或植入组合物。在一些情况下，在心肌梗死后 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、1 周、10 天、20 天、45 天、2 个月、3 个月、4 个月、6 个月或 1 年之内注射或植入组合物。在一些情况下，组合物在注射或植入后的 3 个月内或 1 个月内降解。在一些情况下，组合物在注射或植入后的 6 周、2 个月、4 个月、6 个月或 1 年内降解。在一些情况下，所述组合物的注射或植入修复先天性缺陷。

[0088] 在其他情况下，所述组合物的注射或植入防止或修复所述受试者所遭受的心脏组织损伤。该损伤可以是心肌梗死。在一些情况下，所述修复包括，在所述心肌梗死后的 3 个月，与具有心脏组织损伤而没有接受所述组合物的注射或植入的受试者相比，心室容积变化至少低 20%。在一些情况下，所述修复包括，在所述心肌梗死后的 3 个月，与具有心脏组织损伤而没有接受所述组合物的注射或植入的受试者相比，心室容积变化至少低 5%、10%、15%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 或 90%。所述损伤可以是心肌梗死。在一些情况下，所述修复包括，在所述心肌梗死后的 3 个月，与具有心脏组织损伤而没有接受所述组合物的注射或植入的受试者相比，心室容积变化至少低 5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 或 90%。在一些情况下，所述修复包括，在所述心肌梗死后的 3 个月，与具有心脏组织损伤而没有接受所述组合物的注射或植入的受试者相比，射血分数增加 20%。（射血分数是对心脏功能的衡量，其测量来自心室的输出效率）。在一些情况下，所述修复包括，在所述心肌梗死后的 3 个月，与具有心脏组织损伤而没有接受所述组合物的注射或植入的受试者相比，射血分数增加大于 20%、30%、50%、75%、100% 或 200%。

[0089] 在又一实施方式中，凝胶可单独地或与用于内源性细胞长入、血管生成和再生的上述组分组合地注入梗死区、边缘区或心肌。在又一实施方式中，凝胶也可单独地或与上述组分组合地用作基质，以改变心脏的机械性能和 / 或预防不利的左心室重构。在又一实施方式中，凝胶可单独地或与上述组分组合地与细胞一起递送以用于心肌再生。在又一实施方式中，凝胶可单独地或与上述组分组合地用于产生传导阻滞以治疗心律不齐。

[0090] 在一种示例性方法中，可使用经心内膜递送来注射组合物。在这个实例中，可利用 NOGA 引导的 Myostar Catheter 产生心内膜的三维机电功能图。使用该三维图，可在递送部位或心肌梗死部位处或在接近递送部位或心肌梗死部位处进行组合物的经心内膜注射。

[0091] 在本文所述的另一示例性方法中，可使用与骨髓细胞的冠状动脉内注射相似的经冠状动脉递送来注射本发明的组合物。在这个实例中，可在梗阻部位处扩张穿导丝 (over-the-wire) 血管成形术球囊，并且可经由导腔注入组合物。

[0092] 对于可溶性试剂，在包括但不限于 0.5M、0.1M 或 0.01M 乙酸或 0.1M HCl 的低 pH 溶液中使溶液达到期望浓度，然后将其置于组织培养板 / 孔、盖玻片或其他表面 /3D 基底内

以供组织培养。在置于 37°C 的培养箱内 1 小时之后, 或在室温或 4°C 下过夜之后, 可将溶液除去。在用 PBS 冲洗板 / 孔之后, 可将细胞在吸附的基质上培养。溶液可在注射 / 植入之前、期间或之后与肽、蛋白质、核酸、多核苷酸、寡核苷酸、DNA、RNA、药物、营养物、促存活添加剂、蛋白聚糖和 / 或糖胺聚糖组合。

[0093] 本发明的试剂提供了细胞在体外在心脏细胞外基质的凝胶和吸附形式上的附着和存活。本发明已显示, 与标准平板涂层相比, 心脏细胞外基质的可溶性试剂形式诱导新生心肌细胞的更快的扩散、更快的成熟和改善的存活。

[0094] 在一些情况下, 本发明提供的组合物可包含基质并包含细胞。该细胞可以是任何种类的细胞。在一些情况下, 该细胞是多种心脏细胞或心血管细胞, 包括但不限于: 来源于自体或同种异体来源的干细胞、祖细胞、心肌细胞、血管细胞和成纤维细胞。

[0095] 可通过在 ECM 中培养细胞而制备包含 ECM 和细胞的本发明组合物。此外, 在将诸如生长因子的蛋白质添加到细胞外基质中时, 可将蛋白质添加到组合物中, 或者可将蛋白质分子与基质中的分子共价或非共价连接。蛋白质与基质分子的共价连接可通过本领域已知的标准共价蛋白质连接程序来完成。蛋白质可与一种或多种基质分子共价连接。

[0096] 在一个实施方式中, 当递送包含细胞的组合物时, 细胞可来自用于治疗心肌的细胞源, 包括自体的、非自体的、HLA 匹配的、同种异体的、异种的或自生的来源。因此, 人胚胎干细胞 (hESC)、新生心肌细胞、肌成纤维细胞、间充质细胞、自体移植的扩增的心肌细胞和脂肪细胞可通过本发明的组合物来递送。在一些情况下, 本发明的细胞可离体培养, 并且在培养皿环境中直接分化成心肌细胞或分化成可变成心肌细胞的骨髓细胞。之后可将培养的细胞与组合物一起或与支架和其他组分接触而移植到哺乳动物体内。成肌细胞是适合于移植到心肌内的另一细胞类型, 然而, 它们在体内并不总是发育成心肌细胞。成体干细胞是又一细胞种类, 其可能是本发明的组合物的一部分。成体干细胞被认为通过在新部位生成其他干细胞 (例如适合心肌的干细胞) 而工作, 或者它们在体内直接分化成心肌细胞。它们在引入诸如心脏的器官后也可分化成其他谱系。在另一种情况下, 间充质干细胞与活化细胞因子一起施用。已表明间充质细胞亚群在体外暴露于细胞因子时朝肌源性细胞系分化。

[0097] 以下列表包括可用作本发明组合物的细胞组分的一些细胞: 人胚胎干细胞、胎儿心肌细胞、肌成纤维细胞、间充质干细胞、自体移植的扩增的心肌细胞、脂肪细胞、全能细胞、多能细胞、诱导性多能细胞、血液干细胞、成肌细胞、成体干细胞、骨髓细胞、间充质细胞、胚胎干细胞、实质细胞、上皮细胞、内皮细胞、间皮细胞、成纤维细胞、肌成纤维细胞、成骨细胞、软骨细胞、外源性细胞、内源性细胞、干细胞、造血干细胞、多能干细胞、骨髓衍生的祖细胞、祖细胞、心肌细胞、骨骼细胞、胎儿细胞、胚胎细胞、未分化细胞、多能祖细胞、单能祖细胞、单核细胞、心肌细胞、心脏成肌细胞、骨骼成肌细胞、巨噬细胞、毛细血管内皮细胞、异种细胞、同种异体细胞、成体干细胞、出生后干细胞和由转分化生成的心肌细胞。如本文所述, 分化细胞可用作本发明提供的组合物的细胞组分。分化细胞的实例包括心肌细胞、心脏成肌细胞和本文描述的或本领域已知的其他心脏细胞。此类细胞可通过从动物或人的器官 (例如, 心脏) 分离细胞而获得。此类细胞还可通过使 ES 细胞、iPS 细胞、成体干细胞或其他祖细胞 (例如, 心肌细胞的祖细胞) 分化而获得。分化方法是本领域已知的。此类细胞还可通过不同细胞类型的细胞 (例如, 骨髓细胞) 整体转分化而获得。

[0098] 人胚胎干细胞衍生的心肌细胞可在包含心脏基质的本发明的组合物上生长。在一

些情况下,在本发明组合物的存在下生长的 hESC 衍生的心肌细胞提供更类似于体内的形态学。在一些情况下,在本发明组合物的存在下生长的 hESC 衍生的心肌细胞提供增加的成熟标志物。

[0099] 本发明还涉及包含脱细胞化的心脏细胞外基质的药物递送系统,其用于将细胞、药物、分子或蛋白质递送到受试者体内以治疗有缺陷的、患病的、损伤的或缺血的组织或器官。在一个实施方式中,包含单独的或与其他组分组合的脱细胞化心脏细胞外基质的生物相容性材料作为非破坏性传导阻滞用于治疗心律不齐。生物相容性材料还可用于移植细胞,或者被单独地注射以募集天然细胞或充当药物递送载体。本发明的药物递送系统进一步包含细胞、药物、蛋白质或选自但不限于以下各项的其他生物材料:促红细胞生成素、干细胞因子 (SCF)、血管内皮生长因子 (VEGF)、转化生长因子 (TGF)、成纤维细胞生长因子 (FGF)、表皮生长因子 (EGF)、软骨生长因子 (CGF)、神经生长因子 (NGF)、角质细胞生长因子 (KGF)、骨骼生长因子 (SGF)、成骨细胞衍生的生长因子 (BDGF)、肝细胞生长因子 (HGF)、胰岛素样生长因子 (IGF)、细胞因子生长因子 (CGF)、干细胞因子 (SCF)、血小板衍生的生长因子 (PDGF)、内皮细胞生长添加剂 (EGGS)、集落刺激因子 (CSF)、生长分化因子 (GDF)、整合素调节因子 (IMF)、钙调蛋白 (CaM)、胸苷激酶 (TK)、肿瘤坏死因子 (TNF)、生长激素 (GH)、骨形态发生蛋白 (BMP)、基质金属蛋白酶 (MMP)、组织抑制剂基质金属蛋白酶 (TIMP)、干扰素、白细胞介素、细胞因子、整合素、胶原蛋白、弹性蛋白、肌原纤蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白、糖胺聚糖、血连蛋白、血小板反应蛋白、硫酸乙酰肝素、皮肤素、硫酸软骨素 (CS)、透明质酸 (HA)、玻连蛋白、蛋白聚糖、转铁蛋白、腱生蛋白、生腱蛋白和淋巴因子。

[0100] 组织培养板可用本发明的细胞外基质的凝胶形式或本发明的细胞外基质的吸附形式涂覆,以培养心肌细胞或与心脏修复相关的其他细胞类型。这可用作这些细胞生长的研究试剂,或者用作在移植之前培养细胞的临床试剂。可将细胞外基质试剂应用于其他组织基质和细胞。

[0101] 对于凝胶试剂,可使溶液的 pH 达到约 6 至约 9 的 pH。在一些情况下,使 pH 达到约 7.4 的生理 pH。然后使用 PBS/ 盐水或其他缓冲液使凝胶达到合适的浓度,然后将其置于组织培养板和 / 或孔中。一旦放置于 37°C 的培养箱中,溶液可形成凝胶,该凝胶可用于供细胞培养使用的任何 2D 或 3D 培养基底。在一个实施方式中,凝胶可与戊二醛、甲醛、双 NHS 分子或其他交联剂交联,或者与细胞、肽、蛋白质、DNA、药物、营养物、促存活添加剂、蛋白聚糖和 / 或糖胺聚糖组合,或者与合成聚合物组合和 / 或交联,以供进一步使用。

[0102] 本发明还提供了在吸附基质上培养细胞的方法,包括以下步骤:(a) 提供在包括但不限于 0.5M 或 0.01M 乙酸或 0.1M HC1 的低 pH 溶液中包含本发明生物相容性材料从而达到期望浓度的溶液,(b) 将所述溶液置于组织培养板或孔中,(c) 温育所述组织培养板或孔,例如在 37°C 下温育 1 小时,或在室温或 4°C 下温育过夜,(d) 除去所述溶液,(e) 用 PBS 冲洗所述组织培养板或孔,和 (f) 在吸附基质上培养细胞。可在包含本发明的心脏细胞外基质的吸附基质上培养的细胞是心肌细胞或与心脏修复相关的其他细胞类型。

[0103] 在一些情况下,组合物包含交联剂,所述交联剂包括但不限于:常用胶原蛋白交联剂、HA 交联剂或降解及机械性质改变的其他蛋白质交联剂。

[0104] 在一种情况下,制备本发明组合物的方法包括电纺丝法。在一些情况下,本发明的方法配置用于控制纳米纤维的尺寸、形状或厚度。

[0105] 在一些情况下，本发明的组合物可包含微珠。微珠可以是组合物的一部分或者通过组合物来递送。示例性微珠可以是任何种类的材料，例如天然的或合成的。在一些情况下，微珠可具有改变的降解性质或者包含例如 MMP 抑制剂、生长因子或小分子。

[0106] 在一些情况下，组合物可包含在递送组合物处可充当粘合剂或锚的生物基团。

[0107] 在一种情况下，本发明的组合物可以是例如用于创伤修复的生物粘合剂。在一些情况下，本发明的组合物可配置为细胞粘附剂。例如，本发明的组合物可以是涂覆在医疗装置或与包含或不含细胞的生物物质混合。例如，本发明的组合物可以是用于合成聚合物血管移植物的涂层。在一些情况下，该组合物是抗细菌剂或者可包含抗细菌剂。

[0108] 本发明的方法可包括递送作为创伤修复装置的组合物。例如，在心脏消融后，可递送组合物以改善愈合。

[0109] 在一种情况下，本发明的组合物包含用如本文所述的 ECM 组合物涂覆的藻酸盐珠。

[0110] 在一些情况下，该组合物是可注射的。可注射的组合物可以是，但不限于粉末、液体、颗粒、片段、凝胶或乳剂。可注射的组合物可注射到心脏内，或者在许多情况下注射到左心室、右心室、左心房、右心房或心脏瓣膜内。本发明的组合物可募集例如但不限于内皮细胞、平滑肌细胞、心脏祖细胞、肌成纤维细胞、干细胞和心肌细胞。

[0111] 制备本发明组合物的方法可包括对来自任何年龄的动物或人的组织进行脱细胞化。

[0112] 本发明的方法包括递送包含 ECM 的组合物。示例性方法包括但不限于：在手术期间直接注射；穿过胸壁直接注射；通过导管穿过心内膜递送到心肌内；通过冠状血管递送；和通过输注球囊导管递送。

[0113] 在一些情况下，本发明的组合物是涂料。涂料可用于研究和临床上的组织培养应用。涂料可用于涂覆例如但不限于合成的或其他生物支架 / 材料或植入物。在一些情况下，对涂层进行纹理化或图案化。在一些情况下，制备涂层的方法包括吸附或化学连接。可使用组合物的溶液形式形成薄凝胶或吸附涂层。

[0114] 通过以下实施例进一步说明本公开内容，所述实施例不应以任何方式解释为对其范围加以限制。对熟练技术人员而言显而易见的是，各种修改和变化是可能的且预期在本发明的范围内。

实施例 1

[0115] 本研究的目的是检验凝胶作为体内细胞粘附、生长、成熟和递送的生长平台的用途。结果证明由天然心脏细胞外基质组织组成的凝胶可通过促进细胞存活而有助于心脏组织再生。

[0116] 对雌性 Sprague Dawley 大鼠施以安乐死并对它们的心脏进行脱细胞化。然后将脱细胞化的心脏冻干、再水合、粉碎并再次冻干以形成干粉。用水使冻结的心脏再水合，然后将其浸入液氮中。一旦冻结，就在球状及杯状装置内以 70psi 整体压碎心脏 10 秒。然后将粉末化的心脏微粒冻干。一旦变干，就将冻干的心脏组织与 1% 胃蛋白酶混合，并与 0.01M HCl 合并至 10mg/mL 的浓度。在室温下搅拌溶液 48 小时，以使细胞外基质组织溶解。48 小时后，将 HCl 溶液等分到在冰上的 Eppendorf 管内，并用 0.1N NaOH 中和至 pH7.4。

[0117] 通过上述方法，天然大鼠心脏 ECM 凝胶已形成。如根据增加的材料粘性性质所确

认的,2.5–8mg/mL 凝胶在 15 分钟内发生成功胶凝。对于较高密度的凝胶,观察到硬度增加。用 1×PBS 将 pH 经过调整的溶液稀释至一定浓度,将其以每孔 50 μL 接种至 96 孔板上,然后转移至 37°C 和 5% CO₂ 的培养箱中。凝胶形成后,将 100 μL 分离的 2d 新生心肌细胞以每孔 60,000 个细胞吸取至凝胶之上。几天后,检测细胞对凝胶的粘附。

[0118] 将心肌细胞以 1×10^4 接种在心脏 ECM 凝胶上表明细胞成功地粘附于 ECM 并存活。细胞在 ECM 上培养长达 4 天。

[0119] 通过 30G 针将 100ml 心脏 ECM 溶液 (7mg/mL) 注入麻醉的大鼠的 LV 游离壁中。总之,研究表明,当达到生理 pH 和温度时,天然心脏细胞外基质可被分离、溶解和自组装成凝胶。

实施例 2

[0120] 在此,已研究了细胞涂层针对已脱细胞化和溶解的成体心室的天然心脏细胞外基质的用途。优点是天然心脏 ECM 可比传统的细胞涂层具有更多组分,并且比用其他细胞类型进行预处理更容易加以利用。

[0121] 从 Sprague-Dawley 大鼠中取出心脏,并对其进行脱细胞化。脱细胞化的心脏在液氮中冷冻后,进行冻干、再水合和粉碎。然后在 0.1M HCl 中用胃蛋白酶消化 ECM。消化 48 小时后,加入 0.01M 乙酸以稀释至 1mg/ml 的最终浓度。

[0122] 天然心脏 ECM 的胃蛋白酶消化物在使用二硫苏糖醇 (DTT) 的还原性条件下在垂直凝胶电泳中进行电泳,并与层粘连蛋白 (BD Biosciences) 和小牛皮肤胶原蛋白 (Sigma) 相比较。使用 Imperial 蛋白质染色剂 (Pierce) 对凝胶进行染色。当与胶原蛋白和层粘连蛋白比较时,天然心脏 ECM 可展示出更为复杂的 ECM 组分的混合物。

[0123] 使用分离试剂盒 (Cellutron, Highland Park, NJ) 从 1 至 2 日龄的 Sprague-Dawley 大鼠的心室收获心肌细胞。含弃最初的上清液,而获取 (strain) 随后 20 分钟的消化物,并将其悬浮在补充有 17% M199、10% 马血清、5% 胎牛血清和 1% 青霉素 / 链霉素的 DMEM 中。分离后,将上清液预先接种到聚苯乙烯组织培养皿上,从而通过成纤维细胞的选择性粘附来提高心肌细胞的纯度。

[0124] 在 37°C 下,1mg/ml 天然心脏 ECM 或胶原蛋白 I (Sigma, St. Louis, MO) 吸附于 48 孔组织培养板上 1 小时。以 200,000/cm² 的密度接种分离的新生心肌细胞,并在 24 小时后将培养基改变为低血清维持培养基 (DMEM, 18.5% M199、5% HS、1% FBS 和 1% 青霉素 / 链霉素)。细胞培养物维持在 37°C 和 5% 二氧化碳下,每日监测,并且每 2–3 天添加新鲜培养基。在第 2 天、第 4 天和第 7 天固定培养物,并针对 α - 辅肌动蛋白、连接蛋白 43、泛 - 钙黏着蛋白、肌动蛋白和细胞核进行染色。第 2 天,心肌细胞开始在培养中自发地搏动。第 8 天,在胶原蛋白上培养的细胞开始脱离培养板。在天然心脏 ECM 上培养的一组细胞持续搏动直到第 45 天。在胶原蛋白上培养的所有细胞在第 14 天停止搏动。

[0125] 这项研究表明,与其他标准细胞培养涂层相比,天然心脏 ECM 包含更复杂的组分。附着于作为涂层以培养细胞的天然心脏 ECM 上的新生大鼠心肌细胞自发地开始搏动。在天然心脏 ECM 上培养的心肌细胞展示随着时间推移而增加的辅肌动蛋白、连接蛋白 43 和泛 - 钙黏着蛋白染色。另外,与在胶原蛋白上相比,新生心肌细胞在天然心脏 ECM 上的生存能力和附着增强。

实施例 3

[0126] 使用 25 分钟缺血再灌注模型经由左前降支动脉阻塞在大鼠中诱发心肌梗死。在心肌梗死后一周,由 MRI 图像计算基线函数。猪心肌 ECM 以小块形式在 1% SDS 中脱细胞化数天,随后用 DI 漂洗过夜、冻干并磨成粉末。在 0.1M HCl 中用胃蛋白酶进行消化以产生材料的可溶形式。

[0127] 在注射前用 1M NaOH 将溶解的 ECM 调至 pH7.4, 并用 PBS 稀释至 6mg/mL。在 MI 手术后, 将动物随机分成两组, 并在梗死手术后两周通过 30G 针将 ECM 或盐水注入雌性 Sprague Dawley 大鼠的 LV 游离壁内。

[0128] 注射手术后 4 周 (MI 后 6 周), 使用 MRI 再次评估心脏功能。

[0129] 在第 6 周, 注射了 ECM 的动物显示出得到保持的功能 (如基于射血分数所评估的), 而注射了盐水的动物未保持心脏功能。在注射了 ECM 的动物中, 舒张末期容积和收缩末期容积也得到保持。

实施例 4

[0130] 目前, 干细胞和其他细胞类型正处于临床试验中, 这些细胞通过 27G 导管递送至心肌壁内以治疗心力衰竭。使用 SDS 去污剂对猪心室组织进行脱细胞化, 并对其进行处理以形成基质的可溶形式, 中和至生理 pH 并稀释至 6mg/mL 以供注射。

[0131] 两头约克夏猪接受簧圈 (coil) 诱发的心肌梗死, 并且在梗死后 2 个月注射单独的心肌基质或心肌基质与细胞。

[0132] 用荧光染料 1,1' - 二 (十八烷基)-3,3,3',3' - 四甲基吲哚碳菁碘化物 (DiI) (一种用于组织学鉴定的细胞质染料) 预先标记来源于胎儿心脏的外植体。使用在啮齿动物模型中显示提高 hESC 存活率的促存活混合物。

[0133] 通过 NOGA 标测 (mapping) 指导, 经导管以每 30 秒 0.2mL 的临床相关速率注射单独的基质或基质与细胞。各 0.1mL 的 5 份注射剂由基质单独组成或由基质与细胞一起组成, 注射到梗死的边缘区内。

[0134] 基质本身以及基质与细胞一起能够成功注入猪心脏内, 该过程是微创的且不会堵塞狭窄的导管。

实施例 5

[0135] 对猪心室心肌进行脱细胞化, 并通过对新鲜冷冻的脱细胞化组织切片进行苏木精和伊红 (H&E) 染色以确认细胞去除。在这个脱细胞化程序之后, 将 ECM 冻干, 然后磨成细颗粒。使用允许鉴定蛋白质和蛋白聚糖的液相色谱质谱法 (LC-MS/MS) 来表征心肌 ECM 粉末。LC-MS/MS 显示出多种 ECM 蛋白质, 指示脱细胞化后残留的蛋白质含量。所鉴定的 ECM 蛋白质、糖蛋白和蛋白聚糖包括:I、III、IV、V 和 VI 型胶原蛋白、弹性蛋白、纤维蛋白原、腔蛋白聚糖、串珠蛋白聚糖、纤蛋白和层粘连蛋白。对脱细胞化的心肌 ECM 内的这些组分进行的鉴定指示残留的蛋白质和蛋白聚糖的复杂组合。

[0136] 为了生成组合物的可注射形式, 通过酶消化溶解脱细胞化的基质粉末。使基质在持续搅拌下消化 48 小时。确定溶解的产物的糖胺聚糖 (GAG) 含量为 $23.2 \pm 4.63 \mu\text{g}/\text{mg}$ 基质。

实施例 6

[0137] 通过添加 NaOH 和 10X PBS 使液体组合物达到生理 pH, 并用 1X PBS 将其稀释至其最终浓度。此时, 产物可立即使用, 或者可冻干、冷冻保存, 并且在使用之前用无菌水再水

合。

[0138] 组合物在经心内膜体内注射到遍布间隔壁和 LV 游离壁的 25 个注射部位（每个部位 0.2mL）后自组装成水凝胶。对 LV 游离壁和间隔壁内的基质进行的检测确认了向心肌内的成功递送以及基质在体内的胶凝。在卫星器官中未观察到材料。

实施例 7

[0139] 在本实施例中使用根据实施例 5 和 6 制备的组合物（在本实施例中被称为“组合物”）。梗死后两周，将组合物（n = 6）或盐水（n = 6）注入雌性 Sprague Dawley 大鼠的 LV 游离壁。使用磁共振成像（MRI）评价 MI 后一周的心脏功能和 LV 几何结构作为治疗前基线，并评价 MI 后六周的心脏功能和 LV 几何结构。如表 1 中所示，在注射了组合物的动物中，注射后四周的 LV 容积和射血分数在统计学上仍等于基线测量值，而在盐水对照动物中这两个指标都恶化。在已注射的动物中，注射后四周的 LV 容积和射血分数在统计学上仍等于基线测量值，而在盐水对照动物中这两个指标都恶化（图 3）。图 3 展示了盐水（a, b）和组合物（c, d）的注射前和注射后情况（与基线相比，*P < 0.05；§ P = 0.054）。射血分数和容积的百分比变化也存在改善趋势。

表 1. MRI 数据

	MI 后一周 (注射前 1 周)	注射后 4 周
射血分数		
盐水	58 ± 6 %	55 ± 11 %*
组合物	62 ± 5 %	62 ± 9 %
舒张末期容积 (mm³)		
盐水	325 ± 49	451 ± 90 *
组合物	331 ± 66	414 ± 45
收缩末期容积 (mm³)		
盐水	137 ± 32	205 ± 61 *
组合物	126 ± 34	157 ± 37

实施例 8

[0140] 对猪心室心肌进行脱细胞化（图 4A），并通过对新鲜冷冻的脱细胞化组织切片的苏木精和伊红（H&E）染色、利用 Hoechst33342 的染色以及通过 DNEasy 试剂盒确认细胞去除。在这个脱细胞化程序之后，将 ECM 冻干，然后磨成细颗粒（图 4B）。使用允许鉴定蛋白质和蛋白聚糖的液相色谱质谱法（LC-MS/MS）来表征心肌 ECM 粉末。LC-MS/MS 显示出多种 ECM 蛋白质，指示脱细胞化后残留的蛋白质含量。所鉴定的 ECM 蛋白质、糖蛋白和蛋白聚糖包括但不限于：I、III、IV、V 和 VI 型胶原蛋白、弹性蛋白、纤维蛋白原、腔蛋白聚糖、串珠蛋白聚糖、纤蛋白和层粘连蛋白。对这些组分的鉴定指示残留的蛋白质和蛋白聚糖的复杂组合。

[0141] 为了生成可注射形式，通过酶消化将脱细胞化的基质粉末加工成液体。使基质在持续搅拌下消化 48 小时，从而产生液体。通过溶液中可见颗粒的缺乏（图 4C）以及凝胶电泳中低分子量物质的存在来确认完全消化。在一些情况下，本发明的组合物不存在细胞核 /

DNA, 具有低于 20kDa 的分子量带, 具有 15–25 μg/mg 基质的 GAG 含量, 并且在 48 小时的消化后不存在可见颗粒。通过添加 NaOH 和 10X PBS 使液体达到生理 pH, 并用 1X PBS 将其稀释至其最终浓度 (6mg/mL, 已针对合适的胶凝特性进行优化)。此时, 产物可立即使用, 或者可冻干、冷冻保存, 并且在使用之前用无菌水再水合。为了在体外诱导胶凝, 使溶液达到 37°C, 从而形成在规模和结构上与天然 ECM 相似的多孔纤维状支架 (图 4D)。或者还可将材料注入体内, 在体内其自组装成水凝胶。虽然本文已示出和描述了本发明的优选实施方式, 但本领域技术人员将明白这些实施方式仅通过举例的方式提供。

[0142] 在不背离本发明的情况下, 本领域技术人员现在将会想到许多变更、变化和替换。应当理解, 本文所述的本发明实施方式的各种替代方案可用于实践本发明。以下权利要求旨在限定本发明的范围, 从而涵盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等效方案。

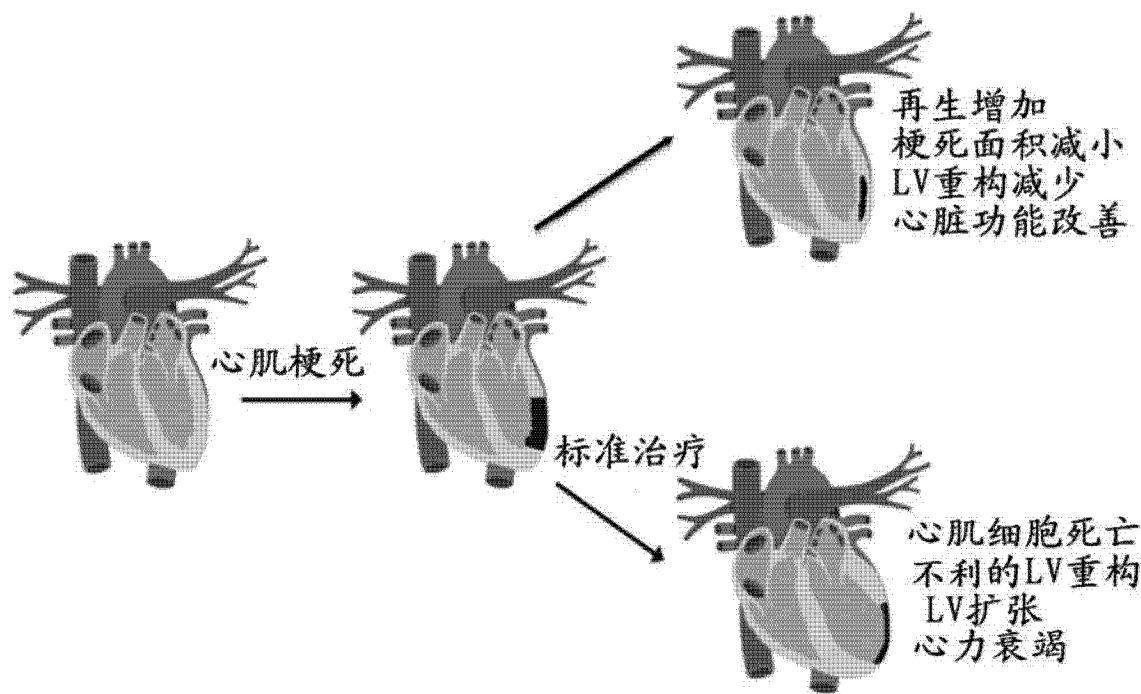


图 1

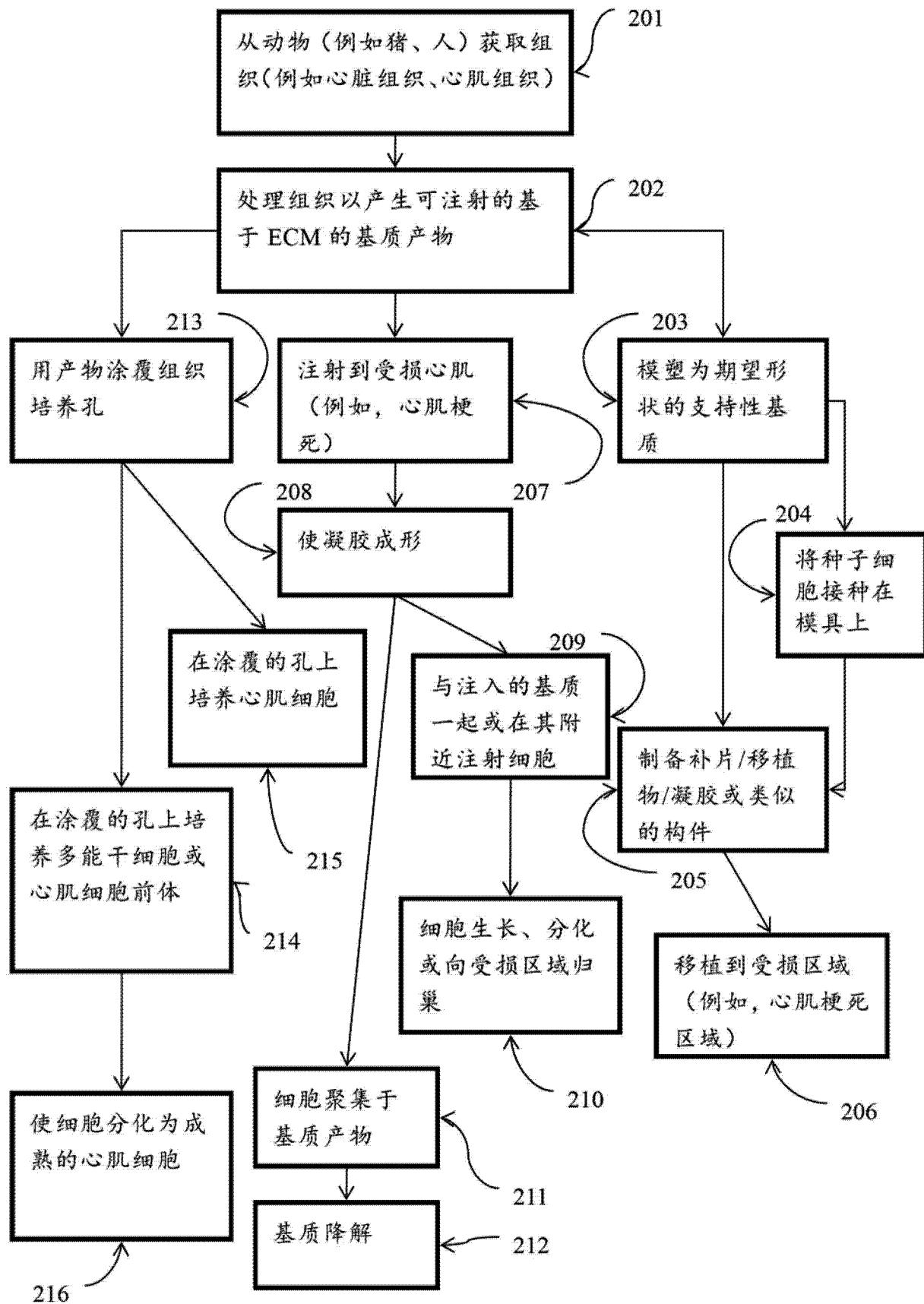


图 2

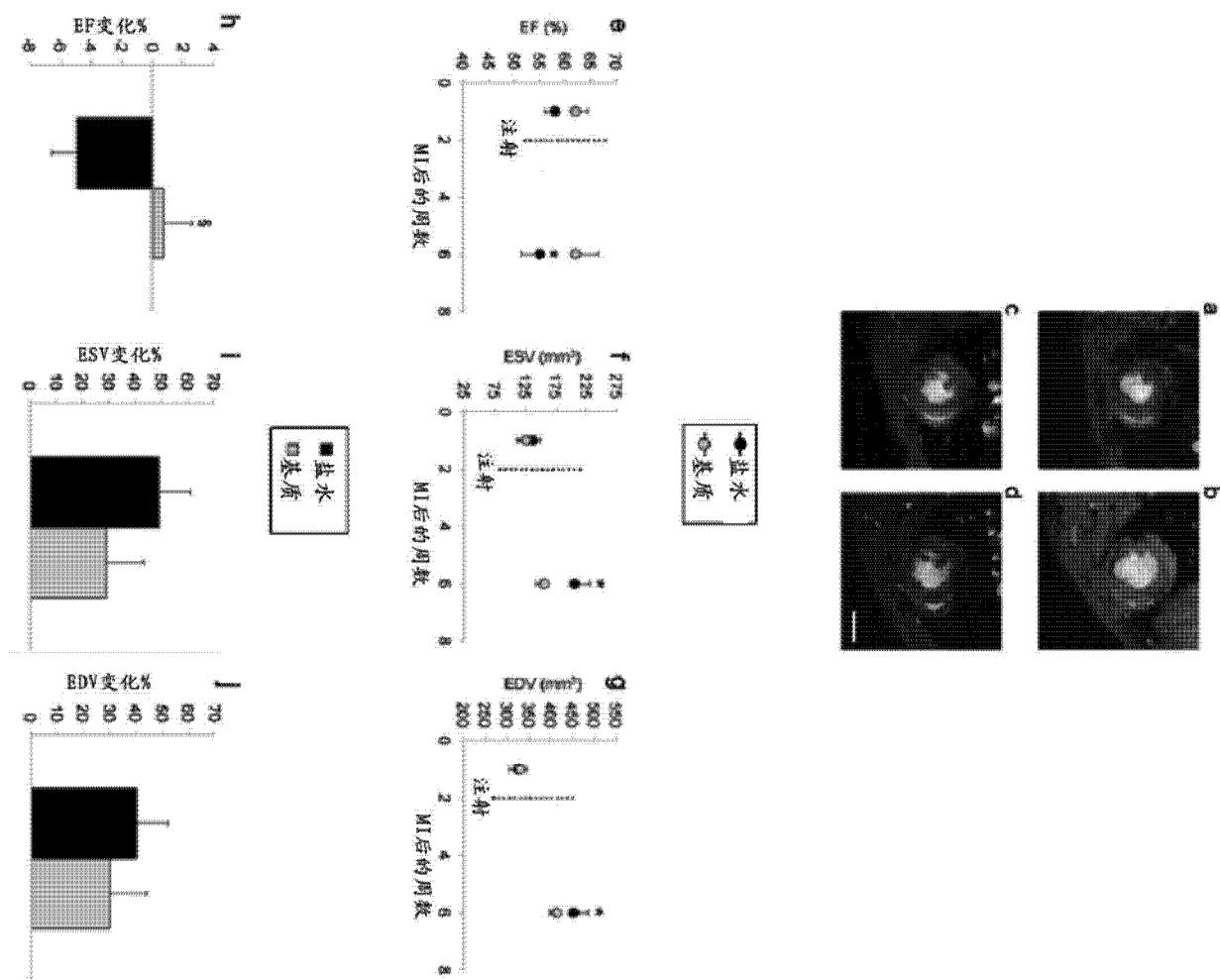


图 3

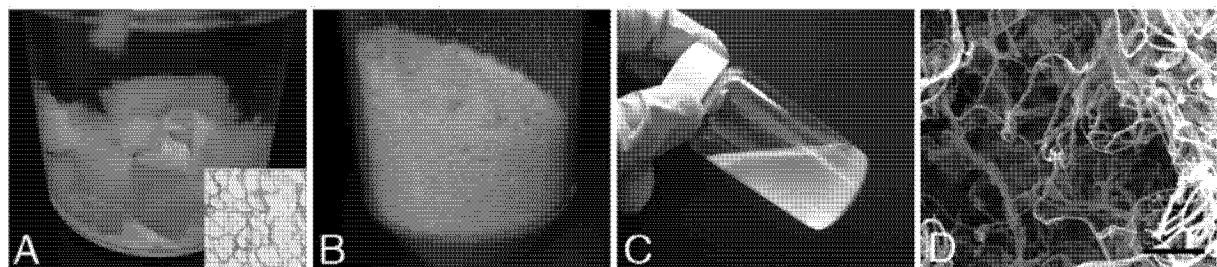


图 4