



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112839687 A

(43) 申请公布日 2021.05.25

(21) 申请号 201980066972.1

(22) 申请日 2019.10.10

(30) 优先权数据

62/744,204 2018.10.11 US

62/854,647 2019.05.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.04.09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/055626 2019.10.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/077087 EN 2020.04.16

(71) 申请人 生命细胞公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 辉·许 黄励婷 埃里克·斯特克

(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 王玮玮 郑霞

(51) Int.Cl.

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

权利要求书2页 说明书14页 附图23页

(54) 发明名称

脱细胞的肌肉基质

(57) 摘要

本文公开了肌肉植入物和制造包含一种或更多种脱细胞的肌肉基质的肌肉植入物的方法。肌肉基质可以以适于注射或植入的颗粒形式提供。

1. 一种制备肌肉植入物的方法,所述方法包括:  
提供至少一种肌肉样品;  
将所述至少一种肌肉样品与含有蛋白酶的溶液接触;  
将所述至少一种肌肉样品脱细胞,以产生至少一种如用光学显微术测量的脱细胞的肌肉基质;  
以及  
加工所述肌肉基质以产生颗粒状基质,  
其中控制与含有蛋白酶的溶液的所述接触和所述脱细胞,以保留至少一些加工之前所述肌肉样品中通常存在的肌纤维。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述至少一种肌肉样品是至少两种或至少三种肌肉样品。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述至少一种肌肉样品通过使所述样品与脱细胞溶液接触而脱细胞,所述脱细胞溶液包含聚乙二醇、十二烷基硫酸钠、脱氧胆酸钠和聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单月桂酸酯中的至少一种。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中控制所述酶溶液的暴露持续时间和浓度产生保留了加工之前所述肌肉样品中通常存在的肌纤维的约20%-80%的至少一种脱细胞的肌肉基质。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,所述方法还包括将所述至少一种肌肉样品与DNA酶接触。
6. 根据权利要求1-5中任一项的方法,所述方法还包括将所述至少一种肌肉样品与 $\alpha$ -半乳糖苷酶接触。
7. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述至少一种肌肉样品来自缺乏基本上所有 $\alpha$ -半乳糖部分的动物。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中加工所述肌肉基质以产生颗粒状基质包括共混、切割、均质化或冷冻断裂所述肌肉植入物以形成颗粒状肌肉植入物。
9. 根据权利要求1-8中任一项所述的方法,所述方法还包括处理所述肌肉植入物以减少生物负荷。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中将所述肌肉植入物暴露于电子束辐射。
11. 根据权利要求1-10中的任一项所述的方法,其中所述蛋白酶包括胰蛋白酶、丝氨酸蛋白酶或菠萝蛋白酶中的至少一种。
12. 一种肌肉植入物,所述肌肉植入物根据权利要求1-11中任一项所述的方法制备。
13. 一种肌肉植入物,所述肌肉植入物包含至少一种脱细胞的肌肉基质,所述至少一种脱细胞的肌肉基质包含至少一些未加工的肌肉样品中通常存在的肌纤维,并且其中所述肌肉基质是颗粒状的。
14. 根据权利要求13所述的肌肉植入物,其中所述至少一种脱细胞的肌肉基质包含未加工的肌肉样品中通常存在的肌纤维的约20%-80%。
15. 根据权利要求13-14中任一项所述的肌肉植入物,其中所述脱细胞的肌肉基质缺乏基本上所有的 $\alpha$ -半乳糖部分。
16. 根据权利要求13-15中任一项所述的肌肉植入物,其中所述肌肉植入物是冻干的或

在水性溶液中。

17. 根据权利要求13-16中任一项所述的肌肉植入物,其中所述肌肉植入物基本上缺乏生物负荷。

18. 一种治疗方法,所述治疗方法包括向患者注射肌肉植入物,其中所述肌肉植入物包含颗粒状的脱细胞的肌肉基质,所述颗粒状的脱细胞的肌肉基质包含至少一些未加工的肌肉样品中通常存在的肌纤维。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述至少一种脱细胞的肌肉基质包含未加工的肌肉样品中通常存在的肌纤维的约20%-80%。

20. 根据权利要求18或19所述的方法,其中,所述肌肉植入物还包含与所述至少一种脱细胞的肌肉基质连接的至少一种脱细胞的真皮基质。

21. 根据权利要求18或19所述的方法,其中,所述肌肉植入物还包含与所述至少一种脱细胞的肌肉基质连接的至少一种网状物。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述至少一种网状物是合成的网状物、生物网状物、生物可降解的网状物和生物可吸收的网状物中的至少一种。

23. 根据权利要求18-19中任一项所述的方法,其中所述肌肉植入物呈颗粒形式。

24. 根据权利要求18-23中任一项所述的方法,其中所述肌肉植入物用于治疗骨骼肌缺损。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述骨骼肌缺损是腹部缺损。

26. 根据权利要求18-23中任一项所述的方法,其中所述肌肉植入物在大块肌肉组织的损失或去除之后使用。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述大块肌肉组织的损失是由于肌肉萎缩疾病。

28. 根据权利要求18-23中任一项所述的方法,其中所述肌肉植入物用于增强健康肌肉组织。

29. 根据权利要求18-23中任一项所述的方法,其中所述肌肉植入物用于加强弱化的肌肉组织。

## 脱细胞的肌肉基质

[0001] 本申请根据35U.S.C. §119, 要求于2019年5月30日提交的美国临时专利申请第62/854,647号和于2018年10月11日提交的美国临时专利申请第62/744,204号的权益。每项前述临时申请的全部内容通过引用并入本文。

[0002] 本公开内容总体上涉及制造脱细胞的肌肉基质和在腹壁和其他肌肉缺损的修复、再生和/或治疗中使用脱细胞的肌肉基质的方法。

[0003] 各种损伤、疾病和外科手术导致肌肉质量,特别是骨骼肌的损失。例如,手术去除软组织肉瘤和骨肉瘤可以导致大块肌肉的损失。其他手术和美容程序,诸如疝修复和肌肉增大,需要对肌肉含量进行长期管理。肌肉受损也可以由损伤引起,诸如由钝力创伤和枪伤引起。

[0004] 目前的肌肉再生程序集中于使用肌肉同种异体移植物(例如,从患者的供体部位或从尸体上收获臀大肌)或使用包含完全脱细胞的真皮和其他组织基质的异种移植物。然而,使用肌肉移植物可能导致过度的炎症(导致疤痕组织形成和潜在的排斥),并且如果肌肉移植物是从患者收获的,则出现供体部位处肌肉损失的问题。因此,仍然需要用于肌肉修复和再生的长期管理的改进的方法和组合物,包括功能性肌肉块的产生。此外,仍然需要增加肌肉质量的方法,例如,以改进功能特征或美学(例如,对于具有低肌肉质量的个体或那些希望增加力量或质量的个体)。

[0005] 概述

[0006] 因此,本文公开了包含脱细胞的肌肉基质的肌肉植入物,以及它们用于改进肌肉修复、治疗、增强、增大和/或再生的用途,所述脱细胞的肌肉基质保留至少一些加工之前肌肉组织中通常存在的肌纤维或其他肌肉结构蛋白。在各种实施方案中,提供了制备肌肉植入物的方法。该方法可以包括提供至少一种肌肉样品;将至少一种肌肉样品与酶接触;将至少一种肌肉样品脱细胞以产生至少一种脱细胞的肌肉基质;以及控制酶的暴露持续时间和/或浓度和脱细胞过程,以保留脱细胞前肌肉样品中通常存在的至少一些肌纤维。

[0007] 还提供了提供改进的强度的片状组织产品。片状产品可以包括脱细胞的肌肉基质和脱细胞的真皮基质。基质可以层放(layer)以允许形成复合物。使用这种基质的方法可以允许治疗需要产生功能性肌肉的复杂损伤。真皮基质可在肌肉再生期间为承重提供结构支撑,并可为新肌肉周围或附近的结缔组织的再生提供基底。

[0008] 在各种实施方案中,提供了肌肉植入物,其包含颗粒状或片状脱细胞的肌肉基质。基质可以包含至少一些加工之前肌肉组织中通常存在的肌纤维。可选地或另外地,肌肉可以被表征为保持一定百分比的肌球蛋白。此外,肌肉虽然保留了肌纤维和/或肌球蛋白,但可以被脱细胞,如通过组织学染色测量的。在一些实施方案中,脱细胞的肌肉基质含有加工之前肌肉组织中通常存在的肌纤维或肌球蛋白的不超过约20%-80%。在某些实施方案中,肌肉植入物是以颗粒形式。在某些实施方案中,肌肉植入物是冻干的或在水性溶液中提供。

[0009] 在各种实施方案中,提供了一种治疗方法,包括将上述肌肉植入物之一注射或植入患者。在一些实施方案中,与不存在植入物或存在包含完整肌肉或包含缺乏基本上所有肌纤维或肌球蛋白的脱细胞的肌肉的植入物时再生的速率和/或总量相比,肌肉植入物在

植入患者体内后促进了天然肌肉再生的速率和/或总量的增加。在某些实施方案中,肌肉植入物用于治疗骨骼肌缺损,诸如腹疝、腹部损伤、外科损伤、枪伤或钝力创伤。在一些实施方案中,肌肉植入物在大块肌肉的损失,例如由于肌肉萎缩疾病(muscle wasting disorder)或由于手术从患者体内移除天然肌肉组织(例如,由于肉瘤或骨肉瘤的治疗)后使用。在某些实施方案中,肌肉植入物用于增强植入部位的肌肉组织的外观和/或体积。肌肉植入物可以用颗粒状肌肉基质的一次或多于一次注射提供。

[0010] 肌肉植入物可用于提供功能性肌肉再生或增强,如通过收缩力测量的。

#### 附图说明

[0011] 图1是说明用于产生所公开的肌肉基质的示例性方法的流程图。

[0012] 图2A和图2B是新鲜猪肌肉和根据各种公开的实施方案制备的猪无细胞肌肉基质的组织学图像。

[0013] 图3是显示新鲜猪肌肉的肌球蛋白含量对比片状或颗粒形式的猪无细胞肌肉基质(pAMM)的肌球蛋白含量的条形图。

[0014] 图4A和图4B是产生和用猪无细胞真皮基质或猪无细胞真皮基质和猪无细胞肌肉基质的组合处理后6周的大鼠腹直肌缺损的三色染色切片。

[0015] 图5是具有未处理的腓肠肌缺损或用pAMM修复的腓肠肌缺损的大鼠的功能性肌肉恢复的图表,如通过奔跑距离测量的。

[0016] 图6是具有未处理的腓肠肌缺损或用pAMM修复的腓肠肌缺损的大鼠的功能性肌肉恢复的条形图,如通过收缩力测量的。

[0017] 图7A和图7B提供了缺损产生后三周时大鼠胫骨前肌(TA)肌肉缺损的三色染色图像。缺损保持不修复(A),或在缺损产生后立即用可注射的pAMM进行修复(B)。

[0018] 图8是说明使用可注射pAMM修复或不修复,缺损产生后三周时TA肌肉重量的条形图,并与对侧肌肉进行比较。

[0019] 图9A和图9B是缺损产生12周后灵长类腓肠肌缺损的三色染色图像。缺损保持不修复(A),或在缺损产生后立即用pAMM进行修复(B)。

[0020] 图10A和图10B提供了注射pAMM的大鼠TA肌肉在注射后一周或三周时的总体横截面图像。

[0021] 图11是植入后三周注射pAMM的大鼠TA肌肉的H&E切片,并显示新的肌肉形成。

[0022] 图12是注射或不注射pAMM的大鼠TA肌肉在处理后的三周的条形图,显示pAMM增强现有肌肉质量的能力。

[0023] 图13是在注射后9周在1、2或3次处理期间注射pAMM的大鼠TA肌肉的条形图。

[0024] 图14示出了如实施例8中所述,经注射的肌肉与其对应的对侧肌肉相比的重量增加百分比。

[0025] 图15提供了如实施例8所述,注射了各种pAMM制剂的肌肉在注射后3周时的三色染色图像。没有残留量的制剂1pAMM可检测到,而少量的制剂2pAMM和制剂3pAMM是可检测到的。

[0026] 图16提供了如实施例8所述,注射了各种pAMM制剂的肌肉在注射后6周时的三色染色图像。没有残留量的制剂1pAMM或制剂2pAMM可检测到,而少量的制剂3pAMM是可检测到的。

的。

[0027] 图17A-图17E提供了胰蛋白酶处理的猪肌肉组织的总体图像。

[0028] 图18是用不同浓度的胰蛋白酶处理的猪肌肉组织中剩余肌球蛋白的条形图。

[0029] 图19A-图19J提供了胰蛋白酶处理的、菠萝蛋白酶处理的和未处理的猪肌肉组织的总体图像。

[0030] 图20是用不同浓度的菠萝蛋白酶处理的猪肌肉组织中剩余肌球蛋白的条形图。

[0031] 某些示例性实施方案的描述

[0032] 现在将详细参考根据本公开内容的某些示例性实施方案,其中的某些实例在附图中示出。

[0033] 如本文使用的,“肌纤维”是参与肌肉收缩的杆状结构,并且包括蛋白质诸如肌球蛋白、肌钙蛋白、原肌球蛋白和辅肌动蛋白。长肌纤维链存在于细长的肌肉细胞(肌细胞)内部及它们之间。

[0034] 如本文使用的,“肌肉缺损”是适于通过植入的肌肉基质而被修复、改善、增强、再生、缓解和/或治疗的任何肌肉异常或损伤。肌肉缺损包括由疾病、创伤或手术干预导致的造成肌肉改变的任何异常或损伤。如本文使用的,“大块”肌肉组织的去除或损失是指可感知且可测量的体积,例如至少约 $0.5\text{cm}^3$ 的体积的肌肉组织的损失。

[0035] 如本文使用的,“脱细胞的组织”是通常发现生长在组织的细胞外基质中的大部分或全部细胞已经被去除的任何组织(例如,缺乏约80%、85%、90%、95%、99%、99.5%或100%(或其间的任何百分比)的天然细胞的组织)。细胞去除可以通过H&E切片的光学显微术来评估。

[0036] 如本文使用的,术语“天然细胞”和“天然组织”意指在植入肌肉植入物之前存在于受体组织/器官中的细胞和组织,或在植入后由宿主动物产生的细胞或组织。

[0037] 本文使用的章节标题仅用于组织目的,并且不被解释为限制所描述的主题。在本申请中引用的所有文件或文件的部分,包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍和论文,在此为了任何目的,明确地将其通过引用以整体并入。在通过引用并入的出版物和专利或专利申请与本说明书中包含的本发明相矛盾的程度,本说明书将优先于任何矛盾的材料。

[0038] 在本申请中,除非另外特别说明,否则单数的使用包括复数。在本申请中,除非另外说明,否则“或”的使用意指“和/或”。此外,术语“包括(including)”以及其他形式诸如“包括(includes)”和“包括(included)”的使用是非限制性的。本文描述的任何范围将被理解为包括端点和端点之间的所有值。

[0039] 本文公开了包含一种或更多种脱细胞的肌肉基质的肌肉植入物。肌肉基质可以包括适于注射的颗粒状基质。注射可用于治疗许多解剖部位,包括大肌肉(例如,四肢、腹部、颈部、躯干),或较小肌肉,包括括约肌、面部肌肉、舌头或手。基质可以可选地包括片,或具有脱细胞的肌肉和脱细胞的真皮的组合的片,或肌肉和其他材料诸如聚丙烯网状物。基质可以被植入并诱导功能性肌肉再生或增强。

[0040] 所公开的肌肉基质可以使用图1的流程图中所示的示例性过程的变化形式来产生。如所示的,该过程通常包括,获得肌肉(步骤110),将肌肉切割成期望的尺寸(步骤120),并且任选地执行溶解或破坏某些细胞(包括红细胞)的步骤(步骤130)。该方法还可以包括用酶诸如胰蛋白酶处理组织(步骤140),使组织脱细胞(步骤150),以及任选地进行另外的

步骤以去除或破坏组织的成分(步骤160)。接下来,组织可以被加工以形成颗粒(步骤170)。然后,组织可以被准备用于最终储存和在保护或储存溶液中的灭菌放置(步骤180),随后是最终灭菌(步骤190)。这些步骤的细节如下提供。

[0041] 步骤110包括接收或获得肌肉组织。组织可以包括从许多不同的动物或动物的解剖部位获得的骨骼肌。可选地,组织可以包括平滑肌或心肌。

[0042] 组织可以从人类或非人类哺乳动物获得。此外,肌肉可以包括任何合适的肌肉,但是通常将被选择来提供合适的体积以允许有效的加工。合适的肌肉可以包括,例如,动物腿、臂或躯干肌肉,包括,例如,腰部肌肉、直肌、背部肌肉、胫骨肌或类似的肌肉。

[0043] 虽然所公开的肌肉基质组织可以源自与预期的受体动物相同的物种的一个或多个供体动物,但这不是必须的情况。因此,例如,脱细胞的肌肉组织可以从猪组织制备并植入人类患者中。可作为脱细胞肌肉组织的供体和/或受体的物种包括但不限于哺乳动物,诸如人类、非人灵长类(例如猴、狒狒或黑猩猩)、猪、牛、马、山羊、绵羊、狗、猫、兔、豚鼠、沙鼠、仓鼠、大鼠或小鼠。在一些实施方案中,可以使用来自多于一种供体动物的肌肉组织。

[0044] 在某些实施方案中,已经被遗传修饰以缺乏一个或多个抗原表位的动物可以被选择作为肌肉基质的组织来源。例如,已经被遗传工程化为缺乏末端 $\alpha$ -半乳糖部分的表达的动物(例如,猪)可以被选择作为组织来源。关于合适的动物和产生用于异种移植的转基因动物的方法的描述,参见于2014年8月12日授权的题为“Acellular Tissue Matrices Made from Alpha-1,3-Galactose Deficient Tissue”的美国专利第8,802,920号,该专利通过引用以其整体特此并入。可选地,可以处理组织以去除末端 $\alpha$ -半乳糖部分,例如通过用 $\alpha$ -半乳糖苷酶处理。

[0045] 获得肌肉后但在使用前,组织可以被储存以防止损伤或不期望的变化。例如,组织可以在低温冷冻并缓慢解冻以防止冻融循环损伤。例如,组织可在 $-60^{\circ}\text{C}$ 冷冻,并在需要时经6-12小时解冻。

[0046] 在获得肌肉之后,可以将肌肉切割成期望的尺寸,以便于进一步加工(步骤120)。例如,为了允许用各种溶液加工,肌肉可以被切割成具有期望的厚度或尺寸的块或片。合适的切割尺寸可以包括约0.5mm厚的条或片,但是可以使用更小或更大的块。

[0047] 在初始切割之后,可以加工组织样品以去除血液或血液成分,诸如红细胞(“RBC”) (步骤130)。例如,可以将组织样品暴露于细胞裂解溶液以去除细胞,诸如红细胞。可以使用各种血细胞去除或裂解溶液,包括诸如氯化铵、低渗盐水或高渗盐水、去污剂或其他已知的血液去除组合物的溶液。此外,该溶液可以用于许多孵育和/或洗涤步骤,包括例如1至10个洗涤步骤,或其间的任何合适的数目。可以冲洗组织以去除溶解的RBC物质。

[0048] 血液裂解后,组织样品可与包含酶的溶液接触,以分解肌肉纤维束(例如,通过裂解肌肉纤维中的肌球蛋白分子)和/或去除其他不需要的成分(步骤140)。例如,该酶可以包括一种或更多种蛋白酶,诸如丝氨酸蛋白酶,并且蛋白酶可以帮助细胞去除或破坏,去除变性或受损的胶原蛋白片段,或者去除某些抗原,诸如 $\alpha$ -半乳糖。

[0049] 在一些实施方案中,溶液可以包括酶,诸如胰蛋白酶或丝氨酸蛋白酶。合适的酶可以包括例如木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、无花果蛋白酶(ficin)或碱性蛋白酶(alcalase)。在一些实施方案中,上面列出的胰蛋白酶或其他酶可以通过在随后的脱细胞期间增加肌纤维分解和肌细胞去除的速率和/或程度来促进脱细胞过程。

[0050] 在一些实施方案中,肌肉样品可以暴露于从约 $10^{-10}\%$ - $0.5\%$ (例如,在约 $0.02\%$ 、 $0.03\%$ 、 $0.04\%$ 、 $0.05\%$ 、 $0.06\%$ 、 $0.07\%$ 、 $0.08\%$ 、 $0.09\%$ 、 $0.1\%$ 、 $0.15\%$ 、 $0.2\%$ 、 $0.25\%$ 、 $0.3\%$ 、 $0.35\%$ 、 $0.4\%$ 、 $0.45\%$ 或 $0.5\%$ )、或从 $10^{-8}\%$ - $10^{-4}\%$ 、或从 $10^{-7}\%$ - $10^{-5}\%$ 、或从 $10^{-4}\%$ - $10^{-2}\%$ 的范围中或其间的任何百分比的浓度的胰蛋白酶。上述浓度可以被认为适合具有使得 $10^{-6}$ 对应于大约120个-130个BAEE单位的酶的酶促活性的胰蛋白酶,并且BAEE单位使用 $\text{Na}\alpha$ -苯甲酰基-L-精氨酸乙酯(BAEE)作为底物对具有胰蛋白酶活性的技术参数的酶确定。该程序是基于以下反应的连续分光光度速率确定( $\Delta A_{253}$ ,光路=1cm):

[0051]  $\text{BAEE} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{胰蛋白酶}} \text{Na}\alpha\text{-苯甲酰基-L-精氨酸} + \text{乙醇}$ ,其中:

[0052] BAEE= $\text{Na}\alpha$ -苯甲酰基-L-精氨酸乙酯;并且

[0053] BAEE单位定义为使得以BAEE作为底物,在pH 7.6在 $25^\circ\text{C}$ ,在3.20ml的反应体积中,一个BAEE单位的胰蛋白酶活性将产生每分钟0.001的 $\Delta A_{253}$ 。

[0054] 可以使用许多合适的胰蛋白酶,但是可能合适的一种示例性胰蛋白酶包括牛胰腺胰蛋白酶、人类胰腺胰蛋白酶、猪胰腺胰蛋白酶、重组人类胰蛋白酶和重组猪胰蛋白酶。

[0055] 在一些实施方案中,肌肉样品可以暴露于从约5单位/升至200单位/升的范围中的浓度的菠萝蛋白酶。

[0056] 在某些实施方案中,肌肉样品可以暴露于胰蛋白酶或其他酶至少约15分钟或多达最多约24小时(例如,约15分钟、30分钟、45分钟、60分钟、75分钟、90分钟、105分钟、120分钟、4小时、8小时、12小时、24小时或任何中间的时间)。在某些实施方案中,肌肉样品可以暴露于酶至少约15分钟或多达最多约48小时(例如,约15分钟、30分钟、45分钟、60分钟、75分钟、90分钟、105分钟、120分钟、4小时、8小时、12小时、24小时、48小时或任何中间的时间)。在各种实施方案中,脱细胞可以在胰蛋白酶化(或其他酶处理)之前进行、在胰蛋白酶化之后进行、或在胰蛋白酶化之前和之后都进行。

[0057] 在酶处理后,可以加工组织样品以产生脱细胞的基质。如本文所讨论的,“脱细胞的”组织将被理解是指去除了基本上所有细胞的肌肉基质,如通过光学显微术确定的。然而,如本文所讨论的,肌肉基质可以保留收缩蛋白,包括肌球蛋白,已发现肌球蛋白在允许新肌肉组织生长方面很重要。尽管肌球蛋白和其他蛋白质可以被包含在细胞中,但是本文所指的“脱细胞的”或“无细胞的”肌肉基质将被理解为只要组织在苏木精和曙红光学显微术上视觉上没有细胞,则组织就是脱细胞的或无细胞的。

[0058] 组织样品可以暴露于脱细胞溶液,以便从肌肉组织中去除有活力的细胞和无活力的细胞,而不损伤肌肉组织内细胞外基质的生物和/或结构完整性。脱细胞溶液可以包含合适的缓冲液、盐、抗生素、一种或更多种去污剂(例如TRITON X-100<sup>TM</sup>或其他非离子型辛基酚乙氧基化表面活性剂、十二烷基硫酸钠(SDS)、脱氧胆酸钠或聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单月桂酸酯)、一种或更多种防止交联的剂、一种或更多种蛋白酶抑制剂和/或一种或更多种酶。在一些实施方案中,脱细胞溶液可以包含 $0.1\%$ 、 $0.2\%$ 、 $0.3\%$ 、 $0.4\%$ 、 $0.5\%$ 、 $1.0\%$ 、 $1.5\%$ 、 $2.0\%$ 、 $2.5\%$ 、 $3.0\%$ 、 $3.5\%$ 、 $4.0\%$ 、 $4.5\%$ 、 $5.0\%$ 或任何中间百分比的TRITON X-100<sup>TM</sup>,以及任选地 $10\text{mM}$ 、 $15\text{mM}$ 、 $20\text{mM}$ 、 $25\text{mM}$ 、 $30\text{mM}$ 、 $35\text{mM}$ 、 $40\text{mM}$ 、 $45\text{mM}$ 、 $50\text{mM}$ 或任何中间浓度的EDTA(乙二胺四乙酸)。在某些实施方案中,脱细胞溶液可以包含 $0.1\%$ 、 $0.2\%$ 、 $0.3\%$ 、 $0.4\%$ 、 $0.5\%$ 、 $1.0\%$ 、 $1.5\%$ 、 $2.0\%$ 、 $2.5\%$ 、 $3.0\%$ 、 $3.5\%$ 、 $4.0\%$ 、 $4.5\%$ 、 $5.0\%$ 或任何中间百分比的脱氧胆酸钠,以及任选地 $1\text{mM}$ 、 $2\text{mM}$ 、 $3\text{mM}$ 、 $4\text{mM}$ 、 $5\text{mM}$ 、 $6\text{mM}$ 、 $7\text{mM}$ 、 $8\text{mM}$ 、 $9\text{mM}$ 、 $10\text{mM}$ 、 $11\text{mM}$ 、 $12\text{mM}$ 、 $13\text{mM}$ 、 $14\text{mM}$ 、

15mM或20mM HEPES缓冲液(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸),所述HEPES缓冲液含有10mM、15mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM或任何中间浓度的EDTA。在一些实施方案中,肌肉组织可以在脱细胞溶液中在20摄氏度、21摄氏度、22摄氏度、23摄氏度、24摄氏度、25摄氏度、30摄氏度、31摄氏度、32摄氏度、33摄氏度、34摄氏度、35摄氏度、36摄氏度、37摄氏度、38摄氏度、39摄氏度、40摄氏度、41摄氏度或42摄氏度(或其间的任何温度)孵育,并且任选地,可以在10rpm、20rpm、30rpm、40rpm、50rpm、60rpm、70rpm、80rpm、90rpm、100rpm、110rpm、120rpm、130rpm、140rpm、或150rpm(或其间的任何rpm)施加温和振荡。孵育可以持续1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、15小时、20小时、24小时、36小时、48小时、60小时、72小时、84小时或96小时(或其间的任何时间段)。

[0059] 可以调节暴露于脱细胞溶液的时间长度和/或去污剂或其他脱细胞剂的浓度,以便控制脱细胞和肌纤维或肌球蛋白从肌肉组织去除的程度。在某些实施方案中,可以使用另外的去污剂以从肌肉组织去除细胞。例如,在一些实施方案中,脱氧胆酸钠、SDS和/或TRITON X-100<sup>TM</sup>可被用于脱细胞并且将不期望的组织成分与细胞外组织基质分离。

[0060] 在一些实施方案中,可以控制使组织样品脱细胞的程序,以保留至少一些加工之前组织样品中通常存在的肌纤维。例如,可以调节暴露的时间长度和/或脱细胞溶液和/或胰蛋白酶溶液的浓度,以便控制肌纤维去除的程度。在一些实施方案中,持续时间和/或浓度被选择为去除通常存在于胰蛋白酶化/其他酶处理和脱细胞之前的肌肉组织中的约20%-80%的肌纤维。在某些实施方案中,持续时间和/或浓度被选择为去除约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的肌纤维(或其间的任何百分比)。在一些实施方案中,通过将组织样品暴露于在 $10^{-10}\%$ -0.5%的范围内的浓度的胰蛋白酶15分钟至24小时或48小时和/或通过将其肌肉组织样品暴露于约0.1%-2.0%的脱细胞剂(例如TRITON X-100<sup>TM</sup>或其他非离子型辛基酚乙氧基化表面活性剂、十二烷基硫酸钠、脱氧胆酸钠或聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单月桂酸酯)0.1小时-72小时来去除约20%-80%的肌纤维。

[0061] 肌纤维的量可以以许多方式分析。如本文使用的,剩余的肌纤维可以使用光学显微术来评估。

[0062] 可选地,不同于保留肌纤维,本文所述的肌肉基质可以被处理以产生所需量的剩余肌球蛋白。肌球蛋白可能与肌纤维含量相关,但可以使用酶联免疫吸附测定(ELISA)直接测量。因此,根据各种实施方案,本文所述的肌肉基质可以被处理成具有在新鲜肌肉中发现的肌球蛋白的10%-50%之间、在新鲜肌肉中发现的肌球蛋白的20%-30%之间、或者具有特定的肌球蛋白浓度(例如,50-150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或75-150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。这种肌纤维或肌球蛋白含量可以通过将组织加工成基本上无细胞的(如通过光学显微术测量的)来获得。

[0063] 在其他实施方案中,使组织样品脱细胞同时保留至少一些加工之前组织样品中通常存在的肌纤维的程序可以通过调节组织质量与脱细胞溶液或酶溶液的体积的比率(例如,组织质量/含有胰蛋白酶或其他酶和/或脱细胞剂的溶液的体积)来控制。在一些实施方案中,组织与溶液体积的较低比率可以增加肌纤维去除过程的效率,从而导致保留较少的完整的肌纤维的脱细胞的基质。在其他实施方案中,组织与溶液体积的较高比率可以降低肌纤维去除过程的效率,从而导致保留更完整的肌纤维的脱细胞的基质。

[0064] 在各种实施方案中,脱细胞的肌肉组织内的细胞外支架可以包括胶原(特别是I型或III型胶原)、弹性蛋白、肌纤维和/或其他纤维、以及蛋白聚糖、多糖和/或生长因子(例

如, IGF、EGF、Ang 2、HGF、FGF和/或VEGF)。肌肉基质可以保留在脱细胞之前的肌肉中天然存在的一些或全部细胞外基质成分, 或者可以通过化学手段、酶促手段和/或遗传手段去除各种不期望的成分。一般而言, 肌肉细胞外基质提供了一种包含纤维、蛋白聚糖、多糖和生长因子的结构支架, 在植入患者中后, 天然细胞和脉管系统可以迁移到该结构支架中、在其中生长和增殖。细胞外基质的确切结构成分将取决于所选择的肌肉和/或筋膜的类型以及用于制备脱细胞的组织的过程。

[0065] 在某些实施方案中, 包括肌肉的组织样品可以被化学处理以稳定组织, 从而避免在细胞去除之前、期间或之后的生物化学和/或结构降解。在各种实施方案中, 稳定溶液可以阻止和防止渗透性、缺氧性、自溶性和/或蛋白水解性降解; 防止微生物污染; 和/或减少脱细胞过程中可能发生的机械损伤。稳定溶液可以包含合适的缓冲剂、一种或更多种抗氧化剂、一种或更多种膨胀剂 (oncotic agent)、一种或更多种抗生素、一种或更多种蛋白酶抑制剂和/或一种或更多种平滑肌松弛剂。在一些实施方案中, 稳定溶液可以包含一种或更多种自由基清除剂, 包括但不限于谷胱甘肽、n-乙酰半胱氨酸、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶或谷胱甘肽过氧化物酶。

[0066] 在某些实施方案中, 肌肉植入物可以包含一种或更多种另外的剂。在一些实施方案中, 另外的剂可以包括抗炎剂、止痛剂或任何其他期望的治疗剂或有益剂。在某些实施方案中, 另外的剂可以包括至少一种添加的生长因子或信号传导因子 (例如, 小细胞生长因子、血管生成因子、分化因子、细胞因子、激素和/或趋化因子)。这些另外的剂可以促进天然肌肉的迁移、增殖和/或血管形成。在一些实施方案中, 生长因子或信号传导因子由包含在表达载体中的核酸序列编码。如本文使用的, 术语“表达载体”是指能够被细胞摄取、包含编码期望的蛋白质的核酸序列、并且包含其他必需的核酸序列 (例如, 启动子、增强子、起始密码子和终止密码子等) 以确保细胞至少最小限度地表达期望的蛋白质的任何核酸构建体。

[0067] 脱细胞后, 可以执行另外的加工步骤 (步骤160)。在某些实施方案中, 基质可以用一种或更多种酶处理, 以去除不期望的抗原, 例如通常不被受体动物表达并因此可能导致免疫应答和/或排斥的抗原。例如, 在某些实施方案中, 肌肉组织可以用 $\alpha$ -半乳糖苷酶处理, 以去除 $\alpha$ -半乳糖 ( $\alpha$ -gal) 部分。在一些实施方案中, 为了酶促去除 $\alpha$ -gal表位, 在用盐水充分洗涤肌肉组织之后, 可以对该组织进行一种或更多种酶促处理以去除 $\alpha$ -gal抗原 (如果存在于样品中的话)。在某些实施方案中, 肌肉组织和/或筋膜组织可以用 $\alpha$ -半乳糖苷酶处理, 以基本上消除 $\alpha$ -gal表位。此外, 加工组织以减少或去除 $\alpha$ -1,3-半乳糖部分的某些示例性方法描述于Xu等人, “A Porcine-Derived Acellular Dermal Scaffold That Supports Soft Tissue Regeneration: Removal of Terminal Galactose- $\alpha$ -(1,3)-Galactose and Retention of Matrix Structure” Tissue Engineering Part A, Vol.15 (7), 1807-1819 (2009), 该文献通过引用以其整体特此并入。

[0068] 在一些实施方案中, 在脱细胞后, 彻底清洗肌肉组织。任何生理学上相容的溶液可以用于洗涤。合适的洗涤溶液的实例包括蒸馏水、磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 或任何其他生物相容的盐水溶液。在一些实施方案中, 洗涤溶液可以包含消毒剂, 诸如弱酸。在某些实施方案中, 例如, 当使用异种材料或同种异体材料时, 脱细胞的肌肉组织用脱氧核糖核酸酶 (DNA酶) 溶液处理 (例如, 在室温过夜)。在一些实施方案中, 用DNA酶溶液处理组织样品。任选地, 可以向DNA酶溶液加入抗生素溶液 (例如庆大霉素)。可以使用任何合适的DNA酶缓冲液和/

或抗生素。

[0069] 在各种实施方案中,公开了包含颗粒状的脱细胞的肌肉基质的肌肉植入物。因此,在酶步骤和脱细胞步骤之后或之前,组织可以形成颗粒(步骤170)。例如,上述脱细胞的肌肉基质可以被切割、共混、冷冻断裂或以其他方式均质化以形成颗粒状基质,该颗粒状基质可以被冻干并干燥储存,或者悬浮在凝胶、水凝胶或其他水性溶液中储存。在一些实施方案中,颗粒状的脱细胞的肌肉基质可用作可流动和/或可注射的组合物,其可容易地被模制以填充植入部位,并用于修复肌肉缺损、增大弱化的肌肉组织或增强健康的肌肉组织。

[0070] 颗粒可以使用许多加工步骤形成。例如,用于产生颗粒的合适方法可以包括低温球磨、低温研磨、活检穿孔(biopsy punching)、绞肉机、手工切碎或干磨。可以选择用于颗粒形成的特定方法来产生所需的尺寸范围。例如,颗粒尺寸可以选择为允许使用标准尺寸的注射器或套管进行注射。合适的颗粒可以具有范围从约3 $\mu\text{m}$ 至约5,000 $\mu\text{m}$ 的尺寸。此外,颗粒可以被分选或过滤(例如,用筛子)以产生颗粒尺寸范围。优选的尺寸范围是100 $\mu\text{m}$ (低温球磨法)到800 $\mu\text{m}$ (低温研磨法)。颗粒尺寸可以基于各种因素或预期用途来选择。例如,美容注射可能优先需要较大的尺寸,诸如700-800 $\mu\text{m}$ ,而需要非常小的针头的适应症(例如,括约肌注射)可能需要较小的尺寸,诸如50-200 $\mu\text{m}$ 。

[0071] 在颗粒形成后或与片状组织一起形成后,组织可以被准备用于储存和灭菌。例如,如步骤180所示,组织可以被放置在储存或保护溶液中。合适的保护溶液可以包括水性溶液或含有冷冻保护剂、抗菌剂、辐射防护材料或稳定组织的物质的溶液。合适的储存溶液描述在例如于2014年5月27日授权并且题为“Acellular Tissue Matrix Preservation Solution”的美国专利8,735,054中。

[0072] 在置于溶液之后,组织可以被最终灭菌(步骤190)。灭菌可以使用化学灭菌或辐射(例如 $\gamma$ 射线、电子束或UV)进行。合适的灭菌过程在美国专利8,735,054中讨论,该专利在上文中被引用,并通过引用并入本文。

[0073] 使用方法

[0074] 在各种实施方案中,可将包含保留至少一些肌纤维的脱细胞的肌肉基质的肌肉植入物植入患者体内(例如,以填充大块肌肉损失的区域或美容增强肌肉组织)。在一些实施方案中,肌肉基质中剩余的肌纤维可在植入部位诱导炎症响应。在一些实施方案中,炎症响应足以启动和/或增强患者的肌肉修复机制,而不引起会导致疤痕组织形成增加和/或植入物排斥的过度的炎症。在一些实施方案中,炎症响应的诱导启动和/或增强患者的肌肉修复,例如,通过募集渗入肌肉基质的巨噬细胞和成肌细胞,并通过激活在由肌肉基质提供的支架内分化成肌肉的卫星细胞,从而将植入物重塑成肌肉组织。在各种实施方案中,先天肌肉修复机制的激活增加了植入部位的肌肉修复/再生的程度和/或动力学。相比之下,在植入物不存在的情况下,或者当使用包含正常肌纤维含量的植入物或缺乏任何肌纤维的脱细胞组织时的肌肉修复导致肌肉修复速率较慢和肌肉组织形成水平较低(并且伴随结缔组织和/或疤痕组织形成的增加)。

[0075] 在一些实施方案中,颗粒状肌肉植入物可用于填充肌肉组织中的空隙空间。例如,水性溶液中的颗粒状肌肉植入物可以流入植入部位,填充期望的空间和/或增加肌肉组织的体积。在一些实施方案中,颗粒状肌肉植入物可用于填充非颗粒状肌肉植入物周围的空间,以便更充分地填充植入部位。

[0076] 本文公开的肌肉植入物可用于需要修复、改变、再生和/或增强肌肉组织的任何外科手术。例如，肌肉植入物可用于腹壁缺损的修复（例如疝修复、枪伤或其他腹部创伤）。

[0077] 在一些实施方案中，肌肉植入物还可以在手术去除大块肌肉组织之后（例如，在手术干预以去除肉瘤或骨肉瘤之后）使用。在这些实施方案中，肌肉植入物可以通过诱导充足（但不是过度）的炎症水平来启动和/或提高肌肉修复的速率和总体积，所述炎症水平用于募集患者的肌肉修复途径（例如，巨噬细胞/成肌细胞募集和卫星细胞激活）。相比之下，在未接受肌肉植入物的患者和接受包含完整的肌肉或缺乏任何残留的肌纤维的脱细胞的组织的植入物的患者中，肌肉修复的速率和总体积降低。类似地，在从一种肌肉收获肌肉组织以移植到患者的另一个位置上的手术程序中，如以上描述的肌肉植入物可以被放置在收获部位以帮助提高收获部位在移植程序后的肌肉修复的速率和总程度。

[0078] 在一些实施方案中，肌肉植入物可用于增加天然肌肉体积。例如，肌肉植入物可以用作对于肌肉萎缩疾病的治疗的一部分，从而增加修复和再生的速率，和/或增加植入部位处的肌肉的总体积。在另一个实例中，植入物可用于通过促进在植入部位处的另外的肌肉体积的生长而在美容学上增强肌肉组织的外观。

[0079] 如以上所讨论的，肌肉基质可以片状或颗粒形式提供。当以片状形式提供时，基质可以与真皮基质（例如 ALLODERM® 或 STRATTICE）或生物的、合成的（例如聚丙烯）、生物可降解的或生物可吸收的网状物组合。当组合时，肌肉和真皮材料的片可以层放和附着，例如通过胶粘、缝合或其他方式连接。

[0080] 当植入时，片状材料可以单独或与真皮基质或生物的、合成的（例如聚丙烯）、生物可降解的或生物可吸收的网状物组合放置在肌肉缺损处。如果使用真皮基质，真皮基质将提供结构支持，并可为结缔组织的再生提供基底。例如，可以将肌肉/真皮材料放置在腹部缺损处，使肌肉邻接需要功能性肌肉的区域，并且可以将真皮材料放置在通常存在腹部筋膜层的地方。

[0081] 颗粒状肌肉基质可以以许多方式植入。例如，如上所述，颗粒可以被提供给肌肉缺损或增强或扩大天然肌肉。此外，颗粒可以作为单次注射或多于一次注射到肌肉部位来提供，或者可以进行多次注射。例如，可以在随后间隔不同时间间隔例如1周、2周、3周、4周或更长时间的治疗期间施用注射。此外，或者可选地，可以在单个治疗时间施用多于一次注射。

## 实施例

[0082] 以下实施例用于说明而决不限本公开内容。

[0083] 实施例1：肌肉植入物的制备和力学分析

[0084] 切下猪骨骼肌并冷冻保存，直到准备好使用。然后清洗组织，切成5mm厚的切片或片，并用氯化铵裂解缓冲液清洗以去除RBC。用胰蛋白酶处理肌肉样品。然后将样品放入含有去污剂的脱细胞溶液中，之后在HEPES溶液中洗涤。样品用DNA酶处理以去除组织中残留的任何DNA，并且然后用 $\alpha$ -半乳糖苷酶处理过夜以去除组织上的agal表位。将样品暴露于弱酸，清洗，并暴露于电子束辐射。

[0085] 通过控制对胰蛋白酶和脱细胞溶液的暴露来调整肌纤维去除的程度。

[0086] 然后对脱细胞的肌肉基质进行各种粉碎过程，以产生适于注射的颗粒状基质。使

用冷冻球磨、冷冻研磨、活检穿孔、绞肉机或干磨来进行粉碎。颗粒也可以通过手工切碎形成,例如用解剖刀。

[0087] 粉碎后,分析颗粒尺寸。简而言之,制备10mL的5%pAMM在去离子水中的固体溶液样品并按照制造商的说明用Horiba颗粒分析仪分析。每个样品进行三次运行,并确定平均值。表1提供了每种粉碎方法的颗粒尺寸信息。

[0088] 表1. 使用各种粉碎方法生成的可注射颗粒的尺寸范围。

[0089]

粉碎方法	最小颗粒尺寸(μm)	最大颗粒尺寸(μm)
低温球磨	4.472	1531.914
低温研磨	8.816	3458.727
活检穿孔	29.907	4537.433
绞肉机	5.867	4537.433
干磨	5.867	3961.533

[0090] 为了评估使用不同颗粒的注射容易程度,测量了注射力。简而言之,以100N的称重传感器和50N的压板建立Instron机械测试系统。将注射器装载到基板上,并测量以1mm/sec压缩注射器的柱塞25mm所产生的力。表2提供了注射力数据。

[0091] 表2. 将用各种方法产生的粉碎的pAMM浆料注射通过1mL注射器所需的最大力。

[0092]

粉碎方法	最大注射力(N)(平均值±标准偏差)	针号
低温球磨	9.43 ± 2	21G
低温研磨	43.5 ± 14	21G
活检穿孔(1.5 mm)	32.59 ± 6	21G
绞肉机	20.54	18G

[0093] 如所示的,低温球磨产物导致的注射力最低。

[0094] 加工后分析残留DNA含量,并且加工后组织的DNA减少到约20ng/mg。此外,对组织样品进行分析以确认其无细胞性。图2A和图2B显示了新鲜肌肉与加工的肌肉(活检穿孔样品)相比。如所示的,新鲜肌肉(样品A)保留细胞核(黑斑),而加工的肌肉(样品B)是无细胞的,如缺乏细胞核所指示的。

[0095] 此外,用ELISA分析了片状或颗粒形式pAMM的残留肌球蛋白含量,并与新鲜肌肉的进行了比较。如图3所示,片状和颗粒状肌肉基质的肌球蛋白含量相对相似,并且明显低于新鲜肌肉的。结果表明诱导肌肉形成所需的肌纤维的保留。

[0096] 实施例2:猪无细胞真皮基质(pADM)和(pAMM)对肌肉再生的影响。

[0097] 通过去除一块测量尺寸为15×5×5mm(长度×宽度×深度)的肌肉,在大鼠的腹直肌中产生了缺损。用猪无细胞真皮基质(pADM)(STRATTICE®)或pADM和片状pAMM的组合来修复缺损。

[0098] 图4A和图4B是产生并用猪无细胞真皮基质(图4A)或猪无细胞真皮基质和猪无细胞肌肉基质的组合(图4B)处理后6周的大鼠腹直肌缺损的三色染色切片。在仅用pADM修复的缺损中检测到最小的肌肉再生。然而,在缺损产生和修复后6周,在用pADM和pAMM的组合修复的缺损中检测到显著的肌肉再生。结缔组织被染成蓝色,并且肌肉纤维被染成红色。

[0099] pAMM支持大鼠中的肌肉再生。此外,只有肌肉基质能够支持肌肉再生。

[0100] 实施例3:大鼠模型中的肌肉功能恢复。

[0101] 为了确定pAMM支持的肌肉再生是否转化为功能改善,研究了连续奔跑轮(continuous running wheel)和收缩力。通过去除一块尺寸为大约 $10 \times 8 \times 4$ mm(长度 $\times$ 宽度 $\times$ 深度)且质量为20%的肌肉,在每只大鼠的一条腿的腓肠肌中产生缺损。这些缺损保持不修复,或用片状pAMM修复。每只动物另一条腿的腓肠肌未被触及,并作为对侧对照。

[0102] 将装有连接到计算机接口的电子计数器的奔跑轮放入动物的笼子中,以监控它们在缺损产生和修复后的自主活动和奔跑轮的使用。此外,通过对穿过腓肠肌的坐骨神经进行经皮电刺激,在受手术影响的肌肉和对侧肌肉中引起肌肉收缩。然后测量收缩的力量。

[0103] 图5是如通过奔跑距离测量的,具有保持未处理或用pAMM修复的腓肠肌缺损的大鼠的功能性肌肉恢复的图表。图6是通过将含有保持未修复或用pAMM修复的缺损的大鼠肌肉施加的收缩力与对侧大鼠肌肉施加的力进行比较的百分比来测量的功能性肌肉恢复的图表。具有用pAMM修复的缺损的大鼠(使用pAMM组)比保持未修复缺损的大鼠(无pAMM组)更早开始奔跑,并且跑得更多。此外,具有用pAMM修复的缺损的肌肉(使用pAMM组)比未修复缺损的肌肉施加更大的力。值得注意的是,其他研究提供了新肌肉神经支配的证据。

[0104] 实施例4:可注射基质对具有肌肉损伤的大鼠的体内效应

[0105] 使用大鼠模型研究了如上所述制备的可注射肌肉基质。颗粒状组织是用绞肉机方法制成的。通过去除一块尺寸为 $15 \times 4 \times 4$ mm(长度 $\times$ 宽度 $\times$ 深度)的肌肉,在每只大鼠的一条腿的胫骨肌(TA)肌肉中产生了缺损。这些缺损保持不修复,或用可注射的pAMM修复。每只大鼠另一条腿的TA肌肉未被触及,并作为对侧对照。处死动物后,切下两条腿的TA肌肉,并评价肌肉重量和用苏木精和伊红(H&E)及三色染色法评价组织学染色。

[0106] 图7A和图7B提供了缺损产生后三周时大鼠胫骨前肌(TA)肌肉缺损的三色染色图像。缺损保持不修复(A),或在缺损产生后立即用可注射的pAMM进行修复(B)。未修复的缺损被结缔、疤痕组织填充,几乎没有新的肌肉形成。用可注射pAMM修复的缺损显示出新肌肉形成的明显证据。

[0107] 图8是说明缺损产生并使用可注射pAMM修复或不修复后三周时TA肌肉重量并与对侧肌肉进行比较的条形图。当测量时,接受pAMM的TA肌肉的重量几乎与对侧肌肉一样重,而那些没有修复缺损的肌肉的重量明显小于对侧肌肉。因此,可注射pAMM支持大鼠缺损部位的肌肉再生。图表中描绘的百分比代表每组中TA肌肉重量与对侧TA肌肉重量相比的比率。

[0108] 实施例5:可注射基质在灵长类受损肌肉中的体内效应

[0109] 通过去除一块尺寸为大约 $42 \times 12 \times 7$ mm(长度 $\times$ 宽度 $\times$ 深度)且质量为20%的肌肉,在每只灵长类(非洲绿猴)的一条腿的腓肠肌中产生缺损。缺损保持不修复(阴性对照组),或者用片状或可注射pAMM(手工切碎制成)修复,或者用自体切碎的灵长类肌肉修复(阳性对照组)。

[0110] 图9A和图9B是缺损产生12周后灵长类腓肠肌缺损的三色染色图像。缺损保持不修复(A),或者在缺损产生后立即用pAMM进行修复(B)。研究结果表明,未经处理的缺损处发生很少的肌肉再生。缺损部位充满了结缔疤痕组织。相比之下,在用任一种形式的pAMM(片状或可注射)修复的缺损中,可以检测到多个新的肌束。在某些情况下,再生的程度类似于用自体切碎的灵长类肌肉修复的缺损中观察到的。pAMM可以支持灵长类的肌肉再生。

[0111] 实施例6:可注射基质在具有非损伤肌肉的大鼠中支持新肌肉形成的体内作用

[0112] 将如实施例1中所述制备的低温球磨的可注射猪无细胞肌肉基质 (pAMM) 注射到每只大鼠右腿的正常胫骨肌 (TA) 中 (不存在缺损或未产生缺损)。左腿的TA肌肉没有接受任何pAMM, 并作为每只动物的对侧对照。在第1周、第2周和第3周处死动物。从注射侧和对侧腿部切除TA肌肉, 并评价总体观察、肌肉重量和使用苏木精和伊红 (H&E) 和三色染色法评价组织学染色。

[0113] 图10A和图10B提供了注射pAMM的大鼠TA肌肉在注射后一周或三周时的总体横截面图像。植入的pAMM在1周的时间点容易看到, 但在整个研究期间减少。在3周的时间点, 肉眼没有检测到pAMM, 但组织学上可以检测到残余量。

[0114] 此外, 对三色染色和H&E染色的植入物的评价显示, 在所有检查的时间点都有新肌纤维的证据。图11描绘了注射pAMM的TA肌肉在植入后3周时的H&E染色的横截面图像。在第三周, 可以检测到与天然肌肉中的肌纤维尺寸相似的大束新肌纤维, 尤其是在残留pAMM周围的区域。许多新的肌纤维束包含中心定位的细胞核, 这是新形成和成熟中的束的典型特征。

[0115] 在第三周, 接受pAMM的TA肌肉比对侧肌肉重。图12是注射或不注射pAMM的大鼠TA肌肉在处理三周的条形图, 显示pAMM增强现有肌肉质量的能力。由于没有可检测到的疤痕组织 (总体上或组织学上), 并且只有残留的pAMM可检测到, 额外的重量只能归因于新的肌肉。可注射的pAMM支持大鼠非损伤肌肉中的肌肉形成 (再生)。

[0116] 实施例7:重复处理的研究

[0117] 进行了一项另外的研究, 以确定用pAMM重复处理是否增加新肌肉形成的量。

[0118] 将大鼠分成三组。在所有组中, 将pAMM (猪无细胞肌肉基质) 注射到大鼠右腿的正常TA肌肉中。左腿的TA肌肉没有接受任何注射, 并作为对侧对照。三组中的每组的动物在不同时间点接受不同次数的处理, 如下所示:

[0119] 第1组-动物在T=0时接受pAMM注射

[0120] 第2组-动物在T=0和T=3周时接受pAMM注射

[0121] 第3组-动物在T=0、T=3周和T=6周时接受pAMM注射

[0122] 每次处理时向动物注射 $131 \pm 15$ mg (平均值 $\pm$ 标准偏差) 的pAMM。在T=0的第一次处理后9周处死所有动物。

[0123] 9周后, 接受1次处理的肌肉比其对侧肌肉重平均197mg。然而, 接受3次处理的肌肉比其对侧肌肉重平均292mg (图13)。

[0124] 如图13所示, 注射侧和对侧TA肌肉之间的平均重量差异随着处理次数的增加而增加, 图13是描绘第一次处理后9周时注射侧和对侧TA肌肉之间的重量差异的条形图。

[0125] 实施例8:颗粒尺寸对体积保留的影响

[0126] 人们认识到, 较大的基质颗粒可能不容易注射 (即, 将需要较大的针头或较高的注射力)。然而, 颗粒尺寸对基质体积保留的影响并不完全清楚。因此, 使用不同的颗粒尺寸进行了注射。

[0127] 因此, 本研究的目的是确定pAMM颗粒尺寸是否影响 (1) pAMM在体内保留的动力学或 (2) 新肌肉形成的程度。

[0128] 将大鼠分成四组。在所有组中, 将pAMM (猪无细胞肌肉基质) 注射到大鼠右腿的正

常TA肌肉中。左腿的TA肌肉没有接受任何注射,并作为对侧对照。每组动物接受不同的材料,如下所示:

[0129] 第1组-动物接受低温研磨的pADM

[0130] 第2组-动物接受低温球磨的pAMM-~100um颗粒尺寸(制剂1)

[0131] 第3组-动物接受低温研磨的pAMM-~600um颗粒尺寸(制剂2)

[0132] 第4组-动物接受活检穿孔的pAMM-~1.5mm颗粒尺寸(制剂3)

[0133] 每只动物注射大约150mg的材料。对于每组,注射后3周处死一半动物,并且注射后6周处死一半动物。

[0134] 图14是描绘经注射的肌肉相对于它们相应的未处理对侧肌肉的重量增加百分比的条形图。注射制剂1的肌肉在第3周和第6周分别比其对侧肌肉重22%和10%。(图中报告的制剂1在第3周的13%差异是本研究的值与同样使用制剂1材料的另一项研究的3周时间点的值的平均值)。注射制剂2的肌肉在第3周和第6周分别比其对侧肌肉重21%和17%。注射制剂3的肌肉在第3周和第6周分别比其对侧肌肉重20%和11%。

[0135] 注射制剂1的肌肉的三色染色图像显示,注射后3周没有可检测到的残留pAMM,而注射制剂2和3的肌肉的三色染色图像显示,注射后3周有少量但可检测到的量的残留pAMM(图15)。注射后6周,制剂1或制剂2均未检测到残留的pAMM。注射后6周仍可检测到微量的制剂3(图16)。

[0136] pAMM的体内保留与颗粒尺寸成反比,大颗粒比小颗粒保留时间长。然而,在注射后3周和6周,制剂2pAMM注射导致注射侧和对侧肌肉之间的最大重量差异。

[0137] 实施例9:胰蛋白酶浓度对肌纤维保留的影响

[0138] 人们认识到,改变应用于骨骼肌的胰蛋白酶的浓度将影响骨骼肌的加工,特别是肌纤维的保留。因此,使用了不同浓度的胰蛋白酶,并研究了加工样品的均匀性,无论是在每块内还是与其他块相比。在所有加工步骤结束时,通过目视检查确定组织的均匀性。

[0139] 将猪肌肉组织切成5cm×10cm×5mm尺寸。然后将组织样品冷冻、切割、用保护溶液处理、用胰蛋白酶处理、脱细胞、用PBS洗涤,并储存在冰箱中。一旦切割后,在室温处理组织样品。对照组织不用胰蛋白酶处理,而是在PBS中放置一段另外的时间。

[0140] 图17A描绘了用浓度为 $10^{-4}$ 重量/体积的胰蛋白酶处理的组织样品。图17B描绘了用浓度为 $10^{-5}$ 重量/体积的胰蛋白酶处理的组织样品。图17C描绘了用浓度为 $10^{-6}$ 重量/体积的胰蛋白酶处理的组织样品。图17D描绘了用浓度为 $10^{-7}$ 重量/体积的胰蛋白酶处理的组织样品。图17E描绘了用浓度为 $10^{-8}$ 重量/体积的胰蛋白酶处理的组织样品。

[0141] 研究的结果通过加工结束时对脱细胞组织的目视检查和差示扫描量热法测量来确定。在这项研究中,就能够控制猪组织内肌纤维的保留而言,所探索的胰蛋白酶浓度范围表现为是合适的。最终的组织外观在每块中是一致的,并且块与块之间是一致的。在高浓度(从 $10^{-4}$ 开始),组织形成网状特征。在浓度为 $10^{-7}$ 和 $10^{-8}$ 的范围内,加工过的肌肉组织表现为能够在实验过程结束时保留其大部分肌纤维。

[0142] 实施例10:胰蛋白酶浓度和处理时间对肌球蛋白保留的影响

[0143] 在不同的胰蛋白酶浓度持续不同的时间量重复实施例9中描述的研究。图18描绘了胰蛋白酶处理后测量的肌球蛋白浓度。

[0144] 以 $10^{-6}$ 重量/体积的浓度进行胰蛋白酶处理6-8小时,产生的组织中保留的肌球蛋白

白浓度为新鲜未加工肌肉组织的40%-60%。用 $10^{-4}$ 重量/体积浓度的胰蛋白酶处理6-8小时的组织保留了与用相同胰蛋白酶浓度过夜处理的组织相比更多,但比用 $10^{-6}$ 重量/体积浓度处理6-8小时的组织少的肌球蛋白。这些结果表明,肌球蛋白浓度是时间和酶浓度依赖性的。

[0145] 实施例11:胰蛋白酶和菠萝蛋白酶对肌纤维保留的影响

[0146] 用 $10^{-2}$ 或 $10^{-4}$ 重量/体积的胰蛋白酶浓度如实施例9所述地处理8mm和5mm的猪肌肉组织样品。一些样品用浓度为10单位/升(U/L)的菠萝蛋白酶处理。胰蛋白酶处理的样品在4°C的温度或室温处理。将一些经胰蛋白酶处理的样品沿横截面切割,并且其他样品沿纵截面切割。

[0147] 图19A描绘了未用胰蛋白酶或菠萝蛋白酶处理的对照组织。图19B描绘了在室温用 $10^{-4}$ 重量/体积的胰蛋白酶浓度处理的8mm厚的猪肌肉组织。图19C描绘了在室温用 $10^{-4}$ 重量/体积的胰蛋白酶浓度处理的5mm厚的猪肌肉组织。图19D描绘了在室温用 $10^{-2}$ 重量/体积的胰蛋白酶浓度处理的猪肌肉组织的横截面。图19E描绘了在室温用 $10^{-2}$ 重量/体积的胰蛋白酶浓度处理的猪肌肉组织的纵截面。图19F描绘了在4°C的温度用 $10^{-2}$ 重量/体积的胰蛋白酶浓度处理的猪肌肉组织的横截面。图19G描绘了在4°C的温度用 $10^{-2}$ 重量/体积的胰蛋白酶浓度处理的猪肌肉组织的纵截面。图19H描绘了在室温用10U/L菠萝蛋白酶处理的5mm厚的猪肌肉组织。图19I描绘了在室温用10U/L菠萝蛋白酶处理的8mm厚的猪肌肉组织。图19J描绘了在室温用100U/L菠萝蛋白酶处理的猪肌肉组织。

[0148] 在加工结束时,通过目测检查评价猪组织样品。不使用胰蛋白酶加工的对照组织在加工过程中显示出非常少的肌纤维损失。对照组织看起来致密,并且颜色不透明。用 $10^{-2}$ 胰蛋白酶浓度处理的组织显示出明显的肌纤维损失,留下网状组织网络。无论组织是在横截面还是纵向加工,都是如此,并且在4°C或室温都是如此。当使用 $10^{-4}$ 胰蛋白酶浓度时,8mm厚的肌肉组织显示出比5mm厚的肌肉组织大得多的肌纤维保留。另一方面,10U/L的菠萝蛋白酶溶液表现为对去除肌纤维的作用要小得多。如图20所示,用100U/L菠萝蛋白酶处理的组织在处理6小时后保留了88%的肌纤维,并且在处理23小时后保留了32%的肌纤维。

[0149] 以上实施例意图说明并且绝不限本公开内容。通过考虑本文公开说明书以及装置和方法的实践,所公开的装置和方法的其他实施方案对本领域技术人员将是明显的。

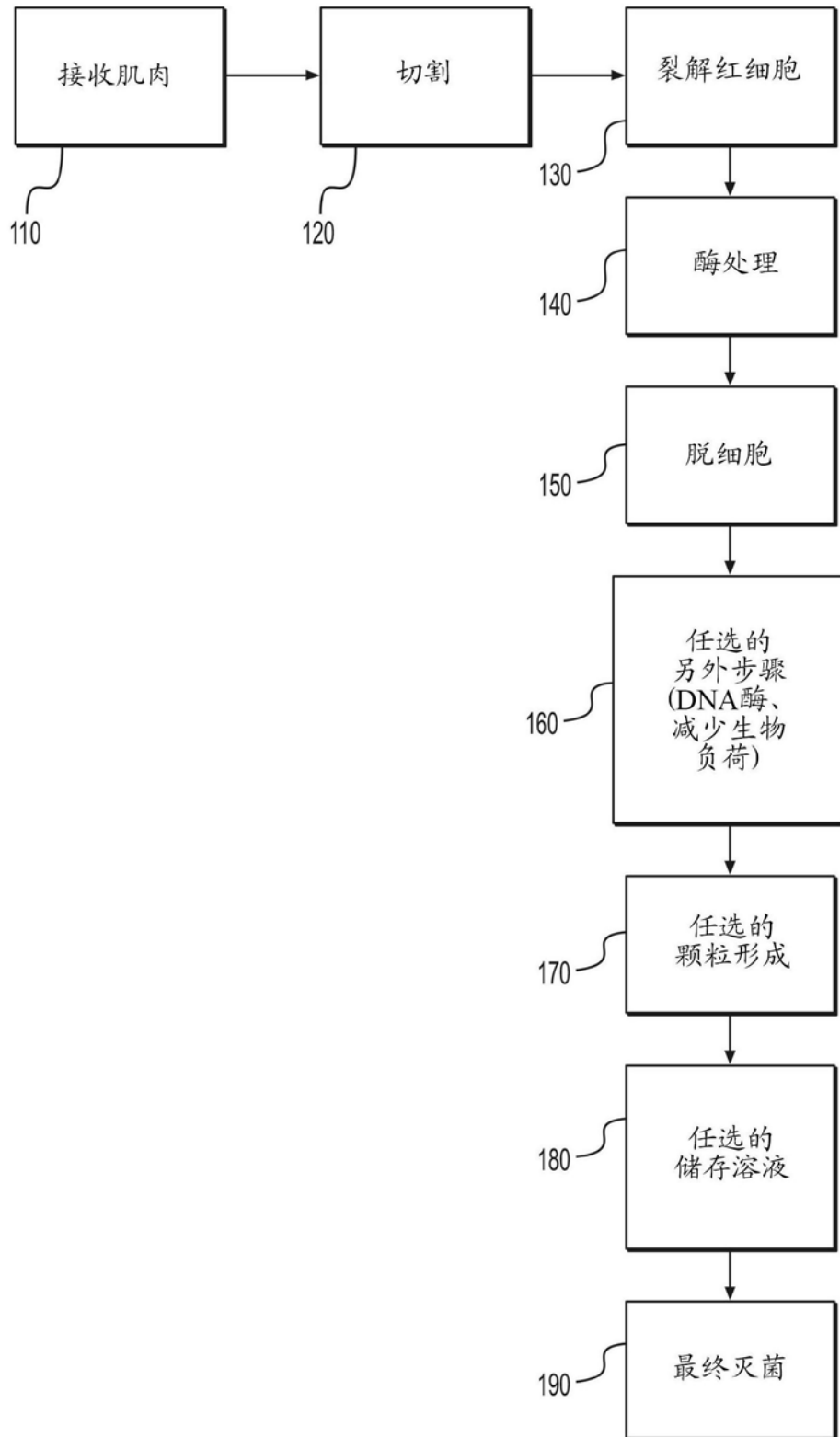


图1

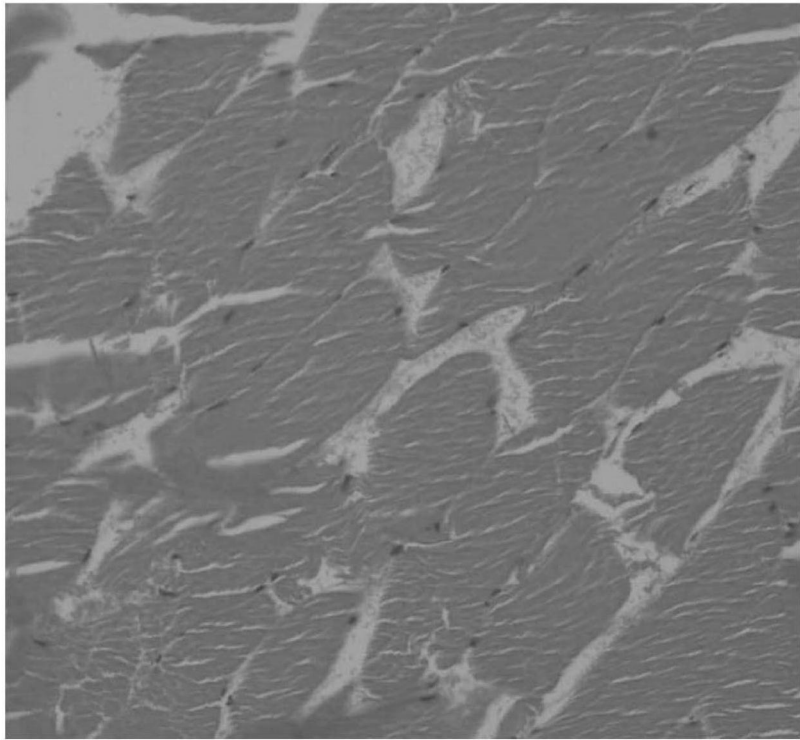


图2A

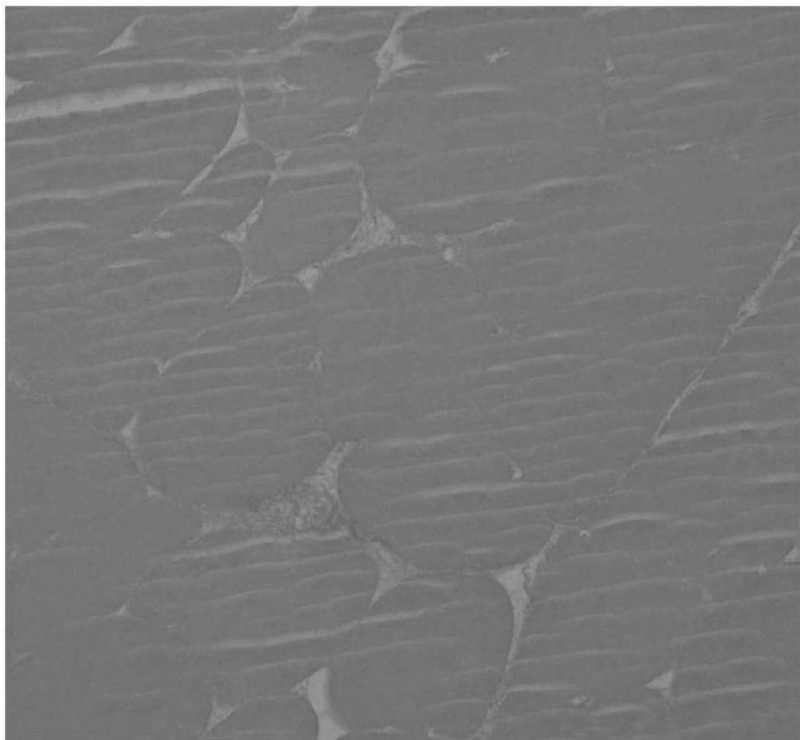


图2B

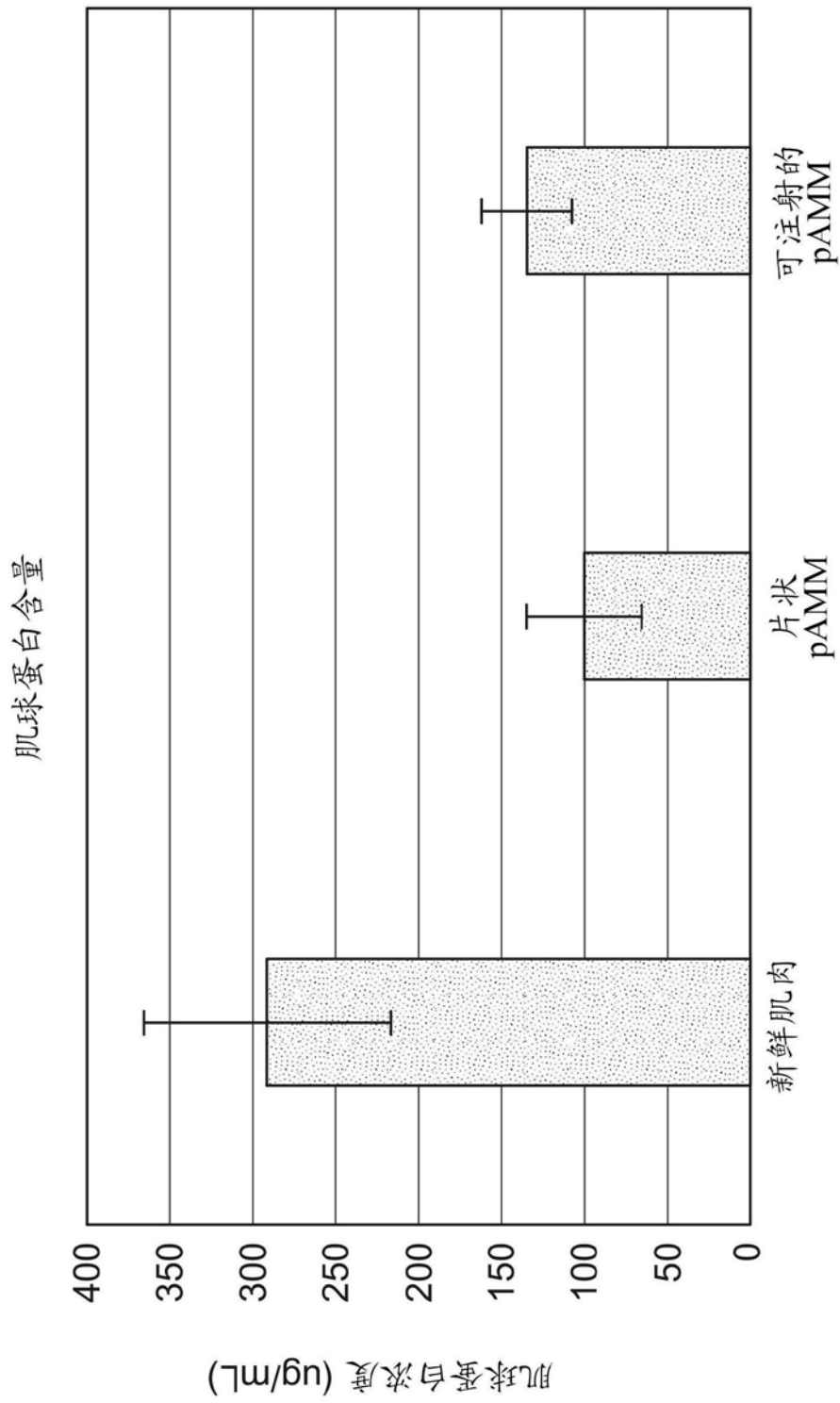
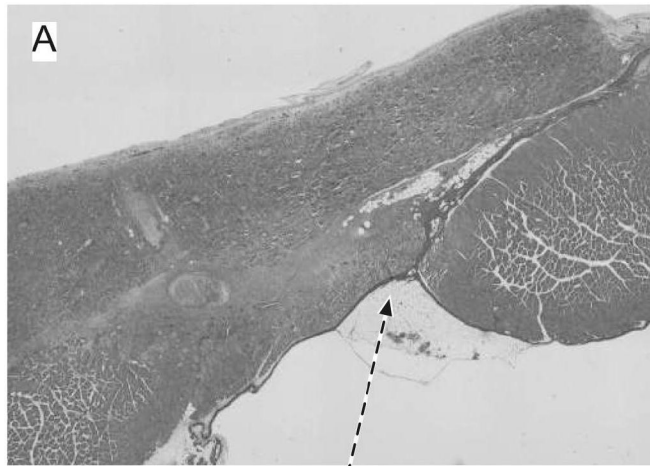
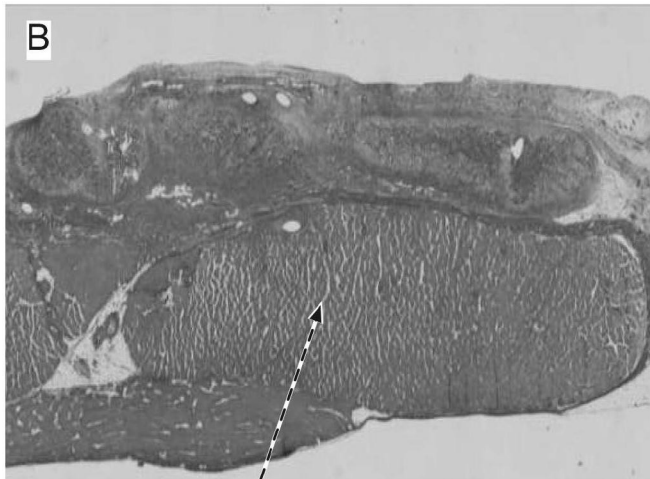


图3



空隙/结缔组织

图4A



新肌肉

图4B

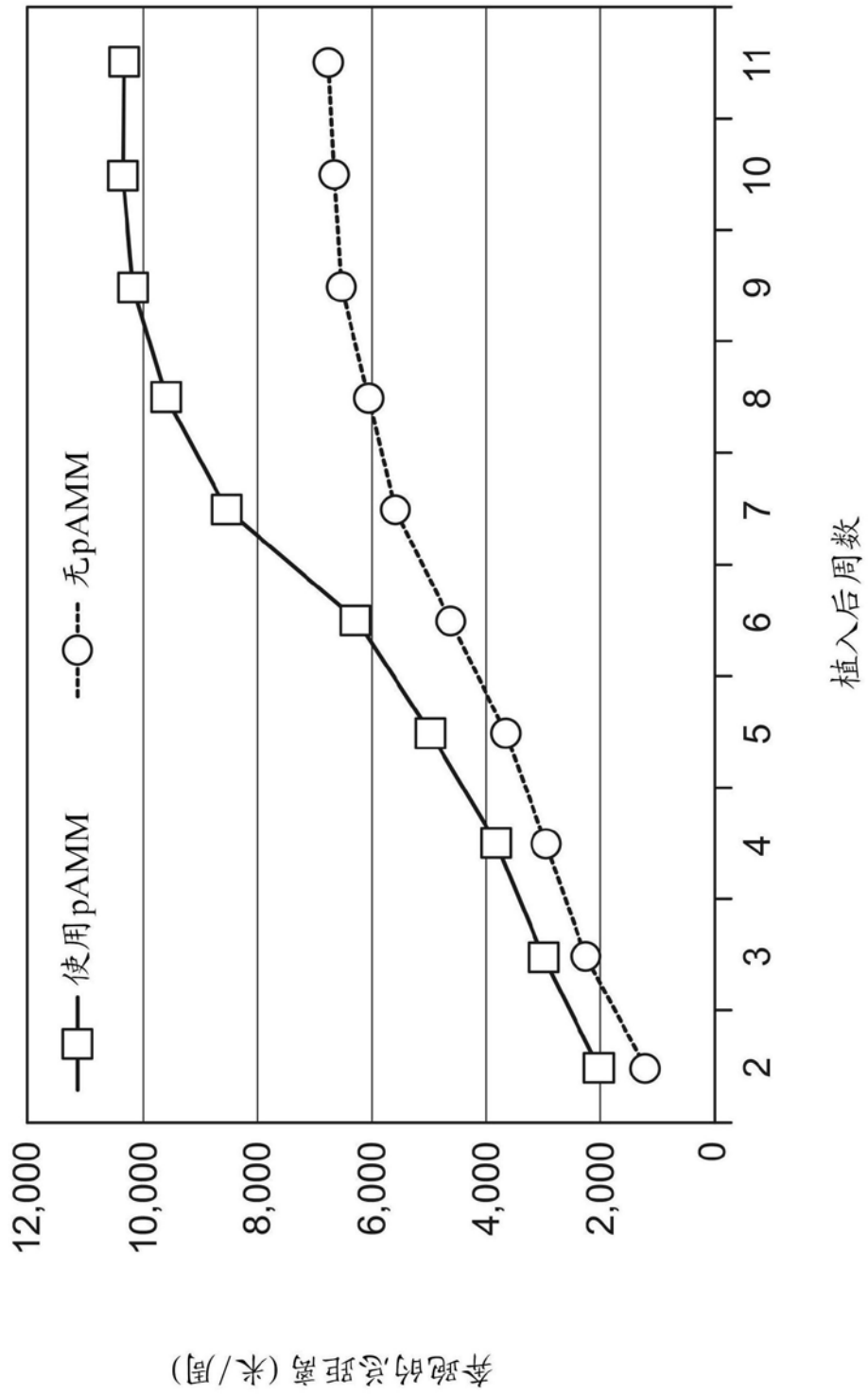


图5

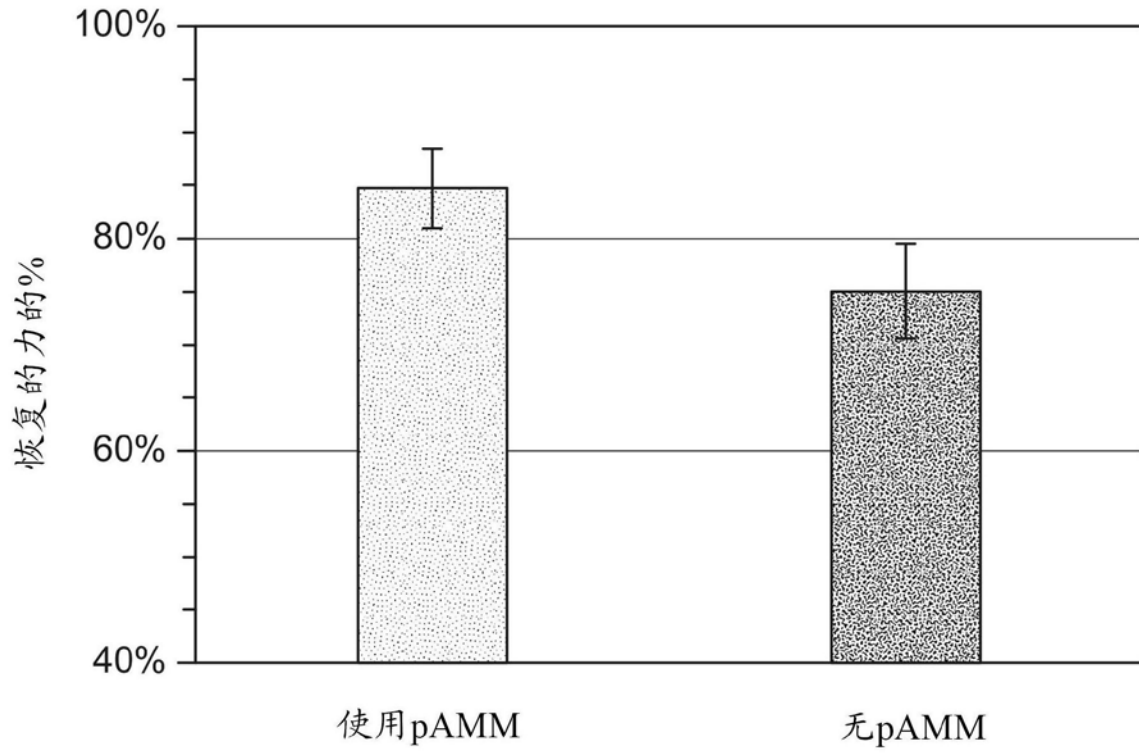


图6

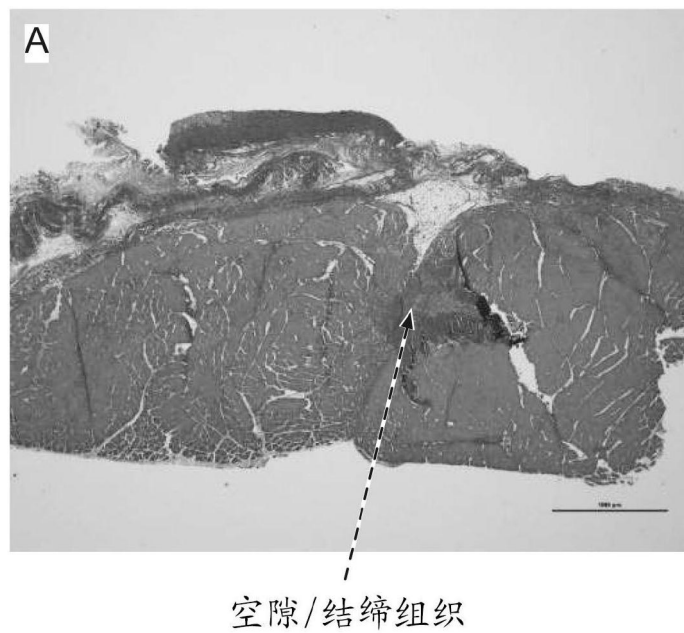


图7A

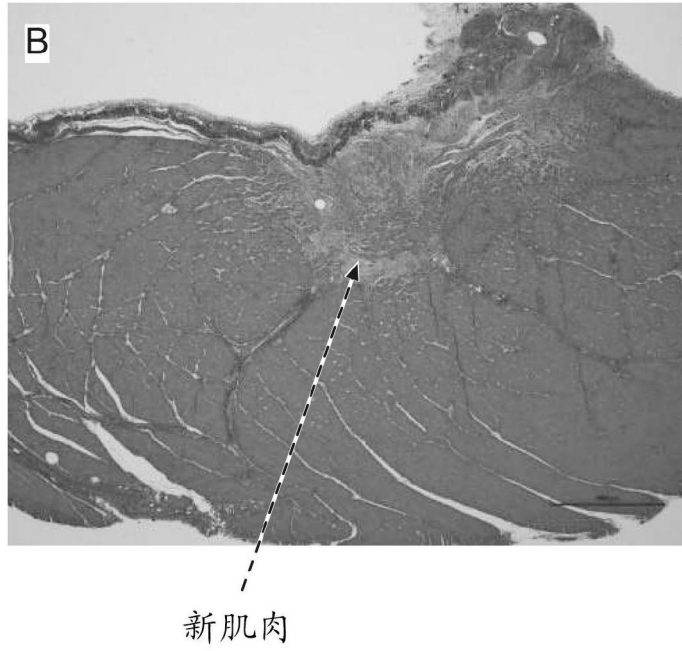


图7B

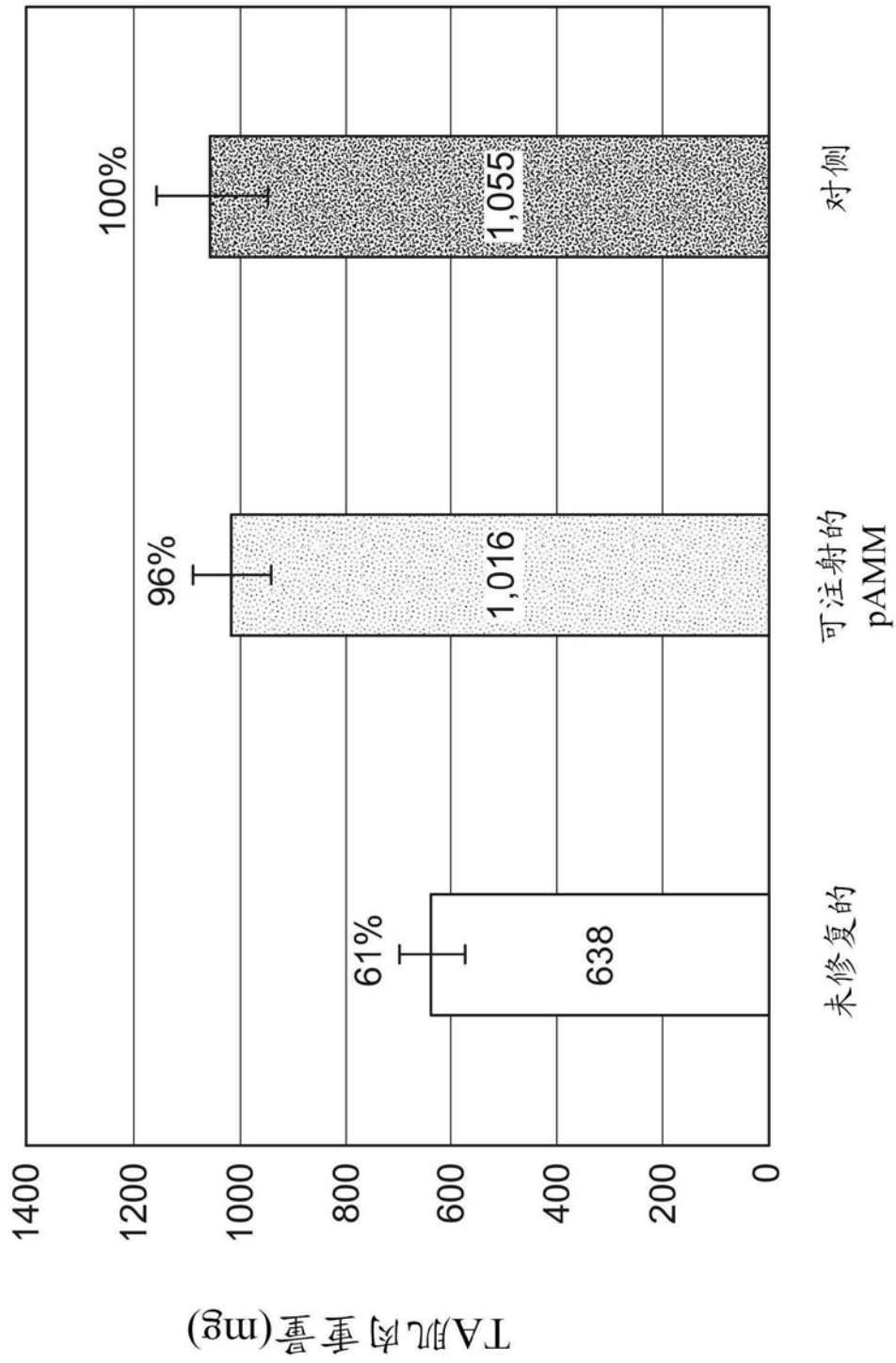
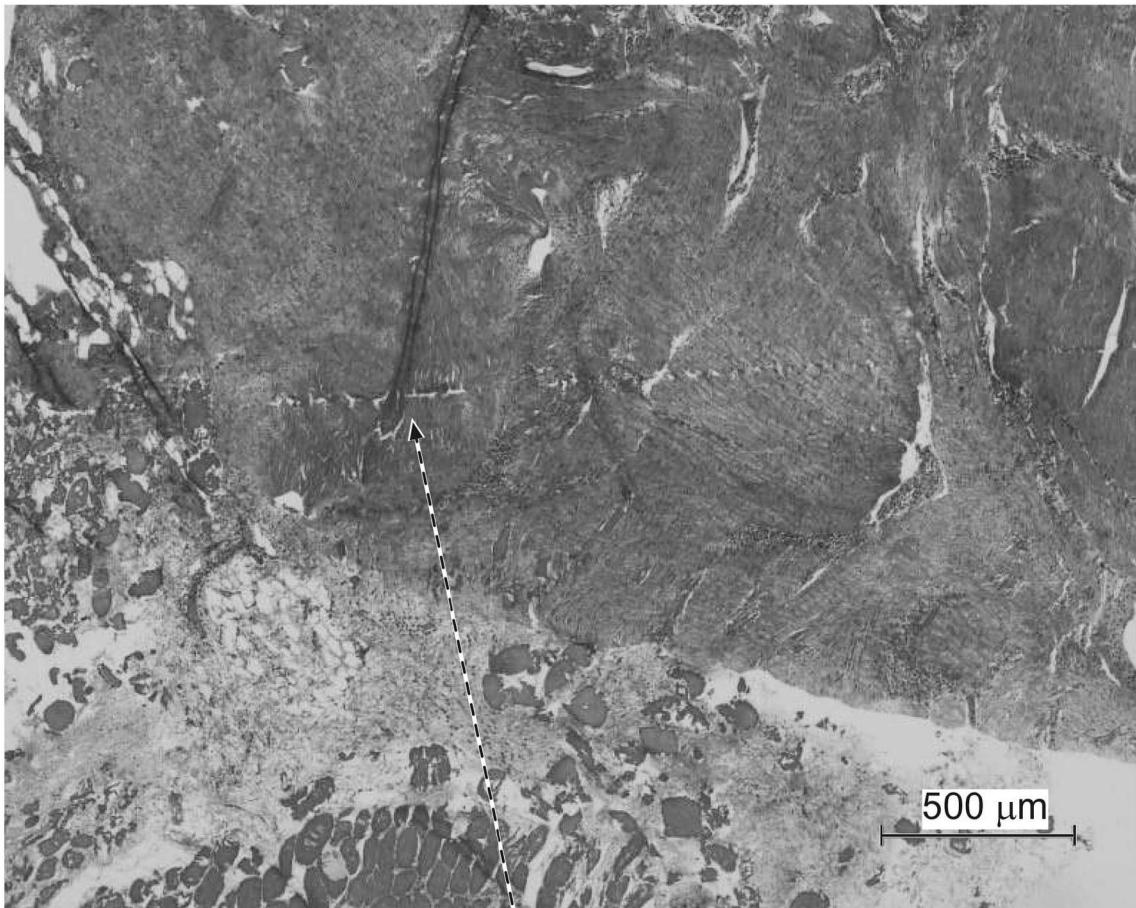
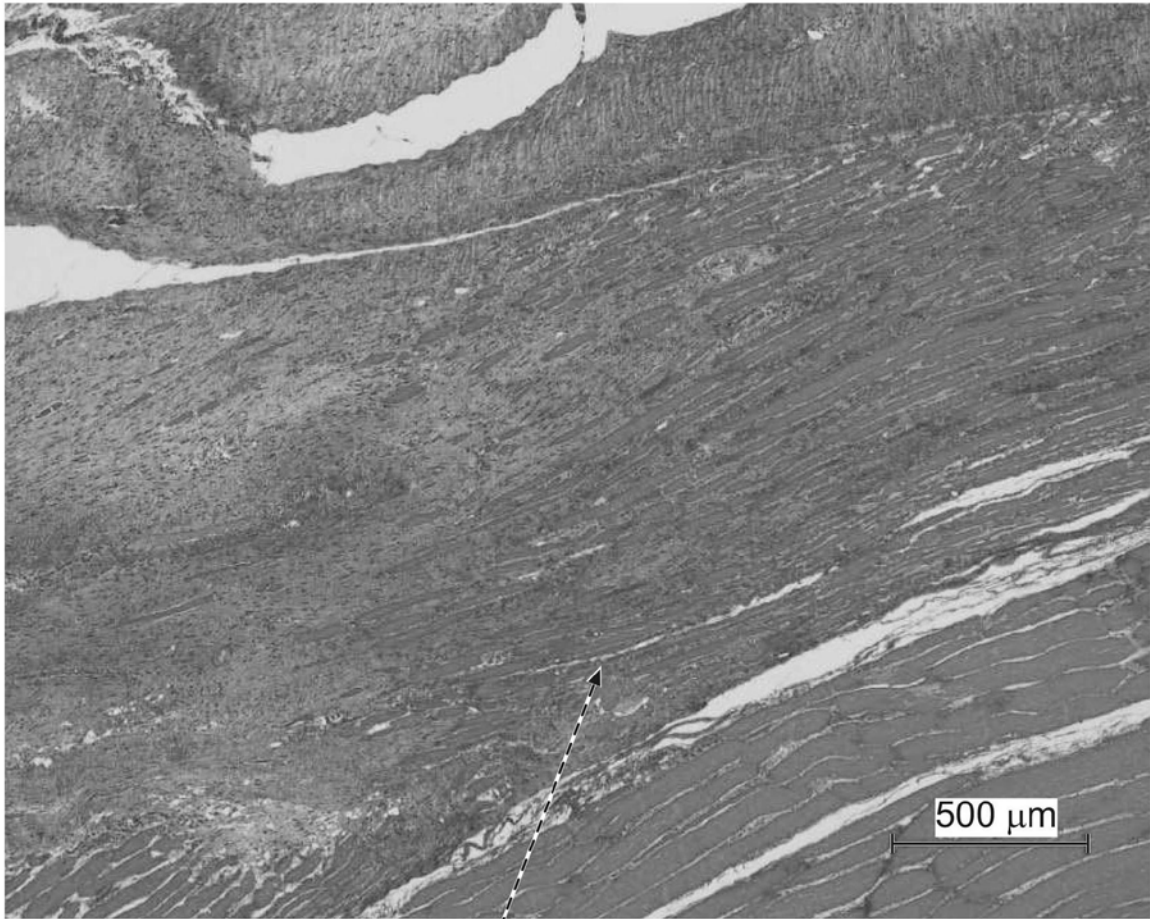


图8



结缔组织

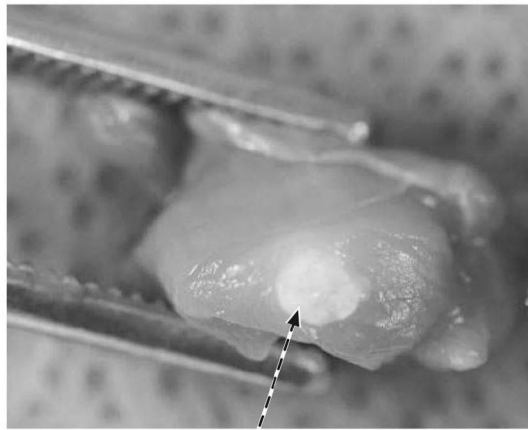
图9A



新肌肉

图9B

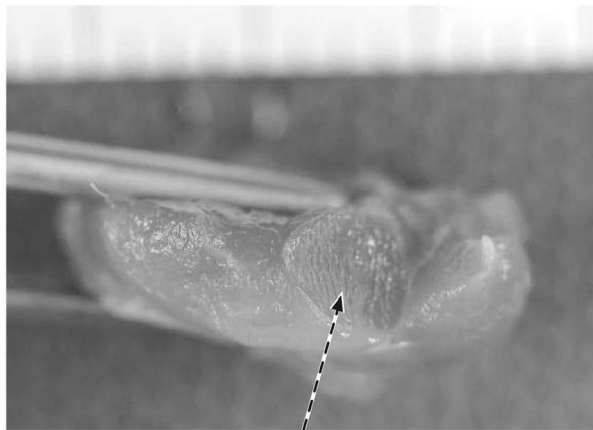
第1周



pAMM

图10A

第3周



新肌肉

图10B

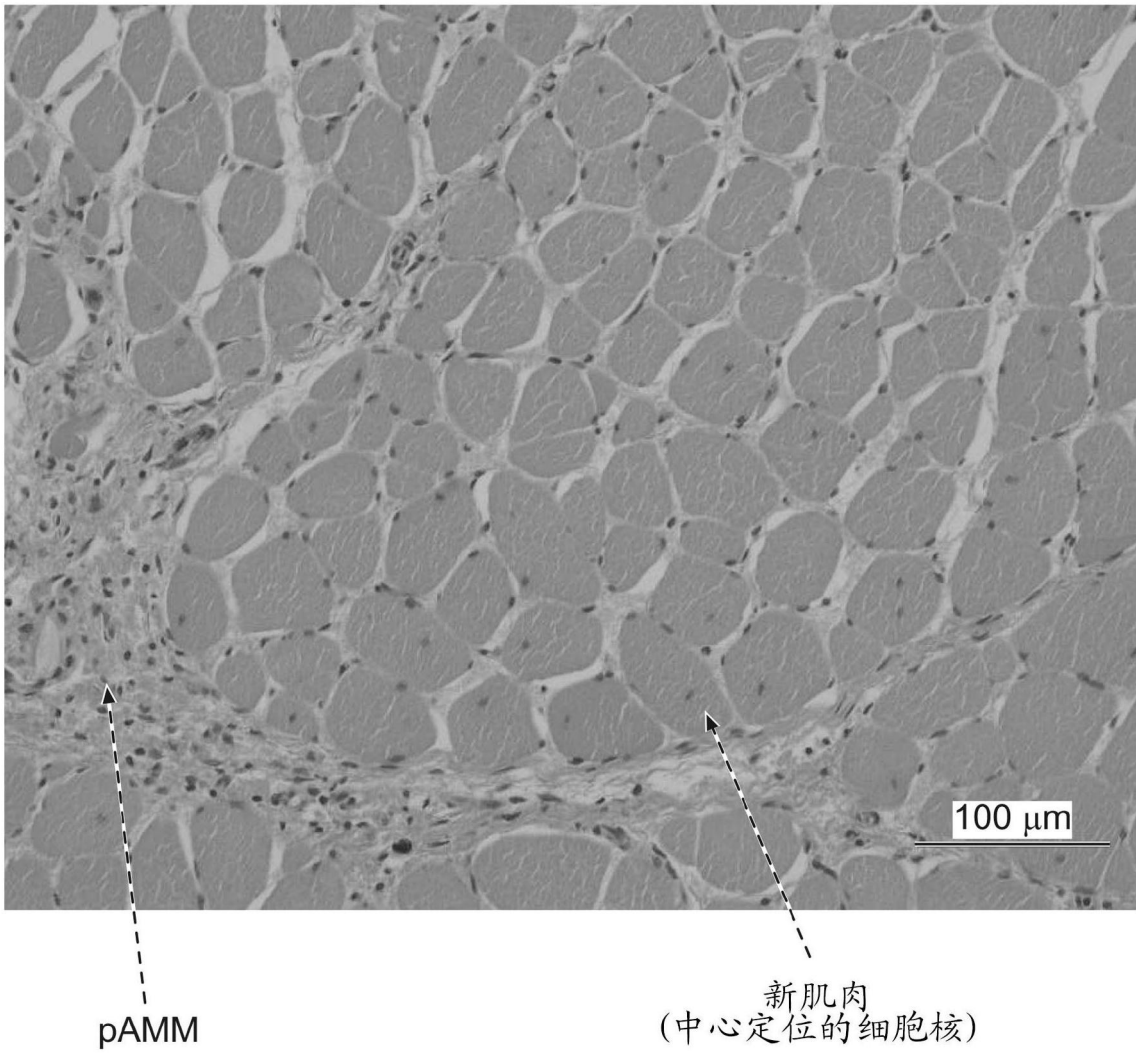


图11

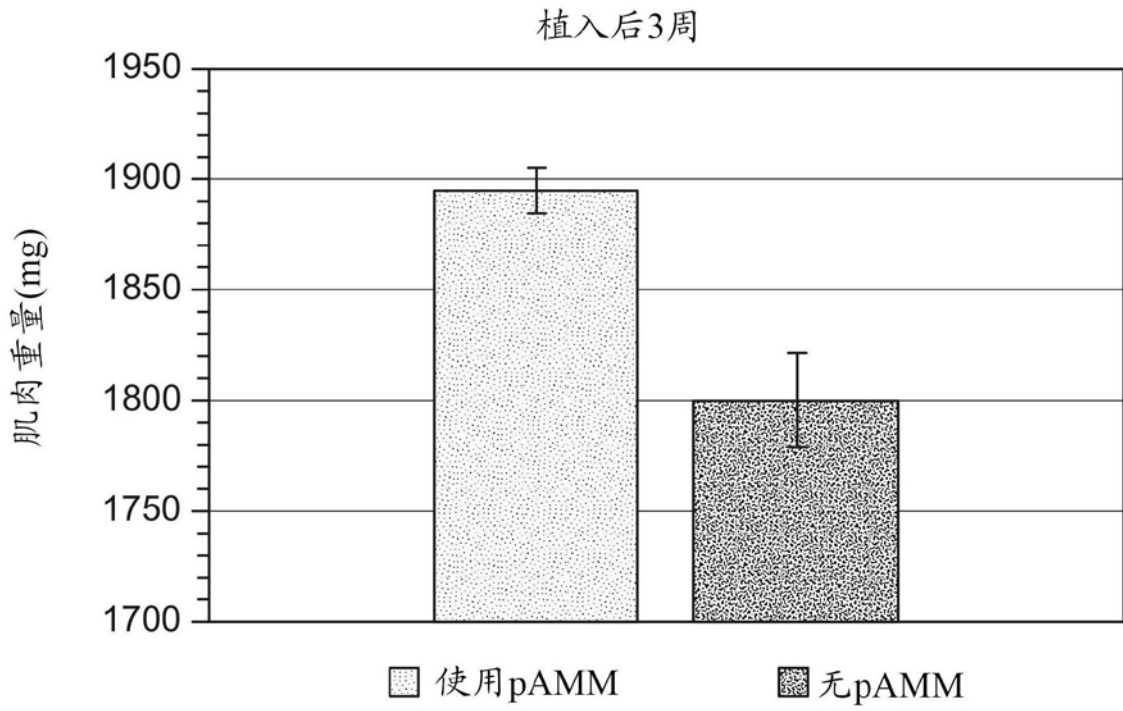


图12

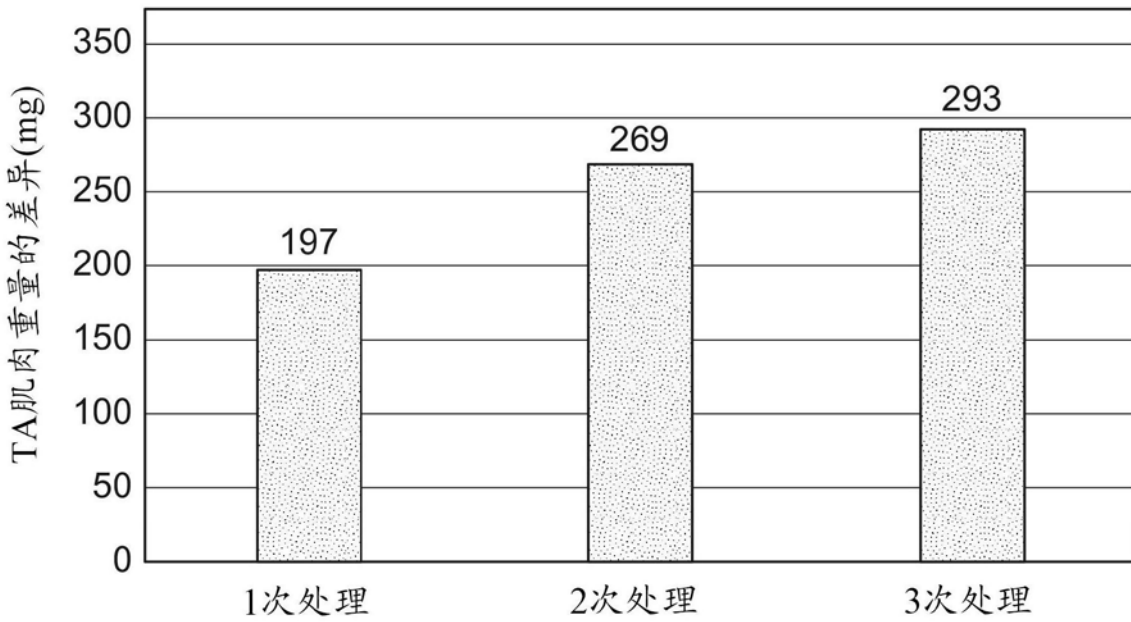


图13

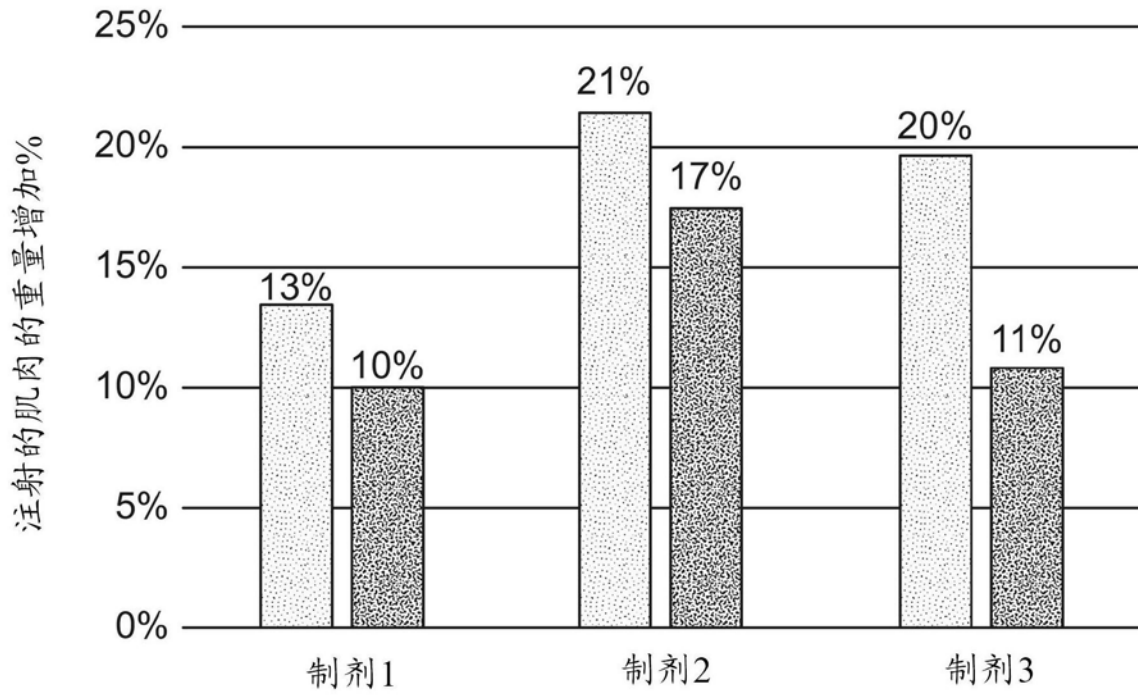


图14

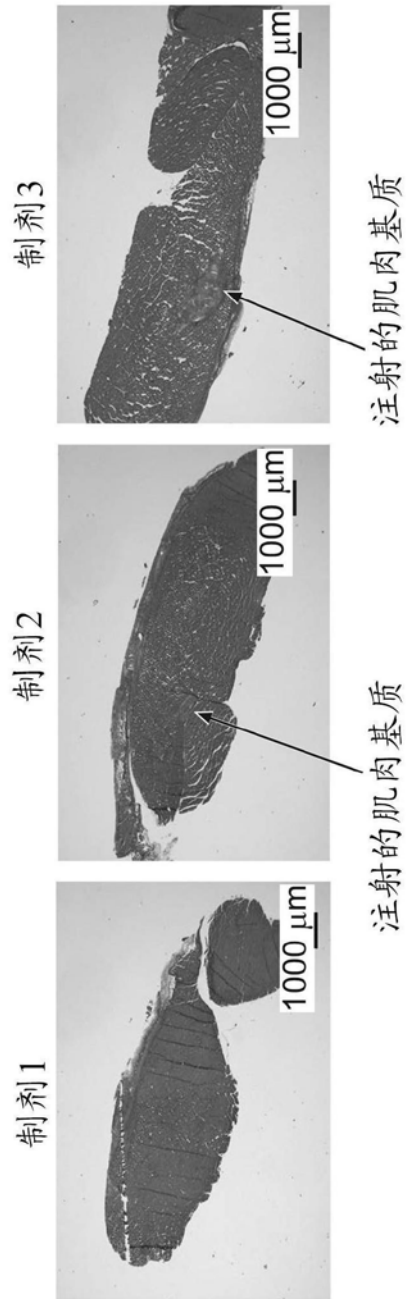


图15

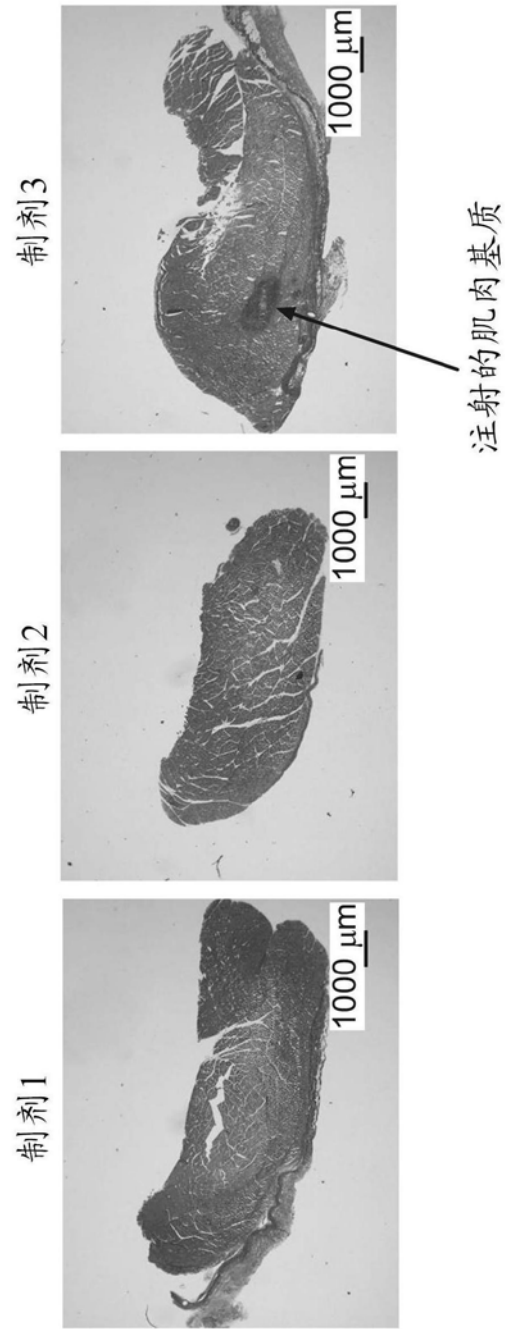


图16

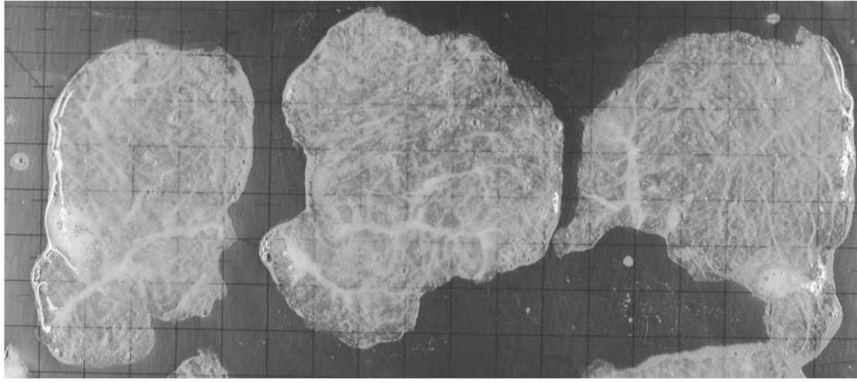


图17A

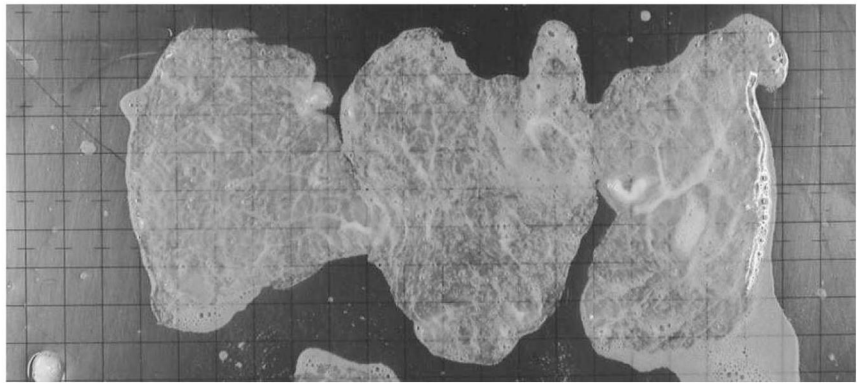


图17B

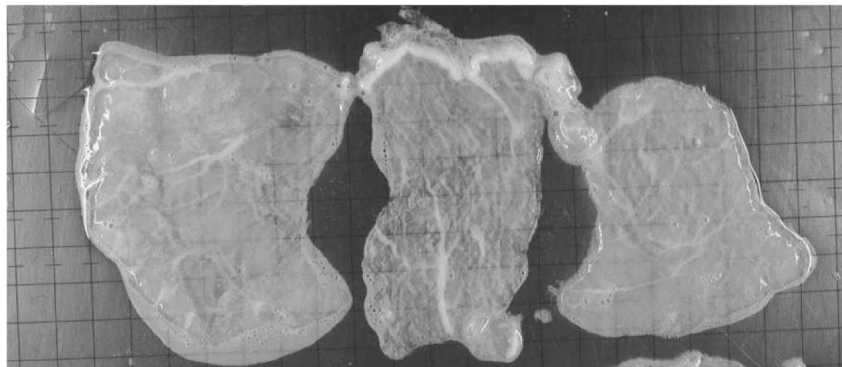


图17C

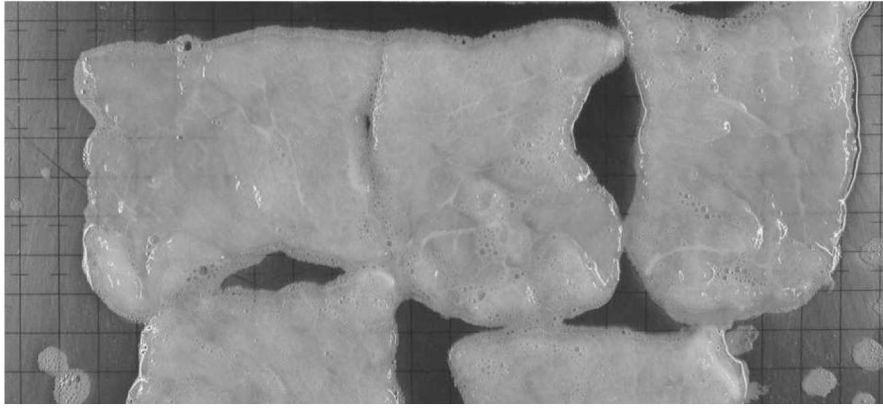


图17D

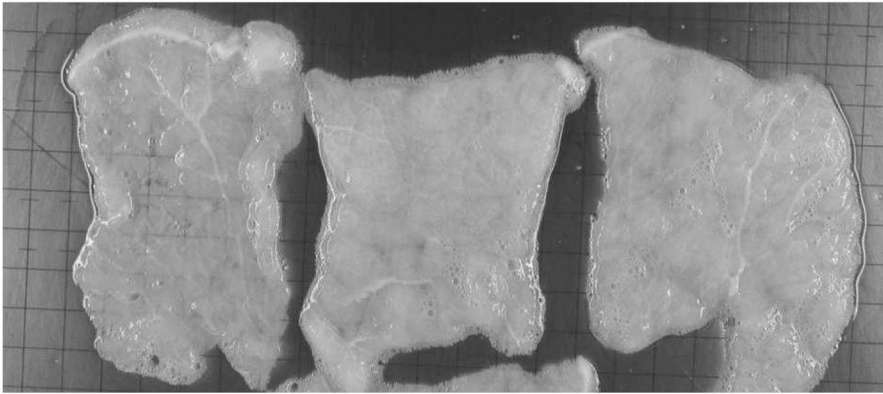


图17E

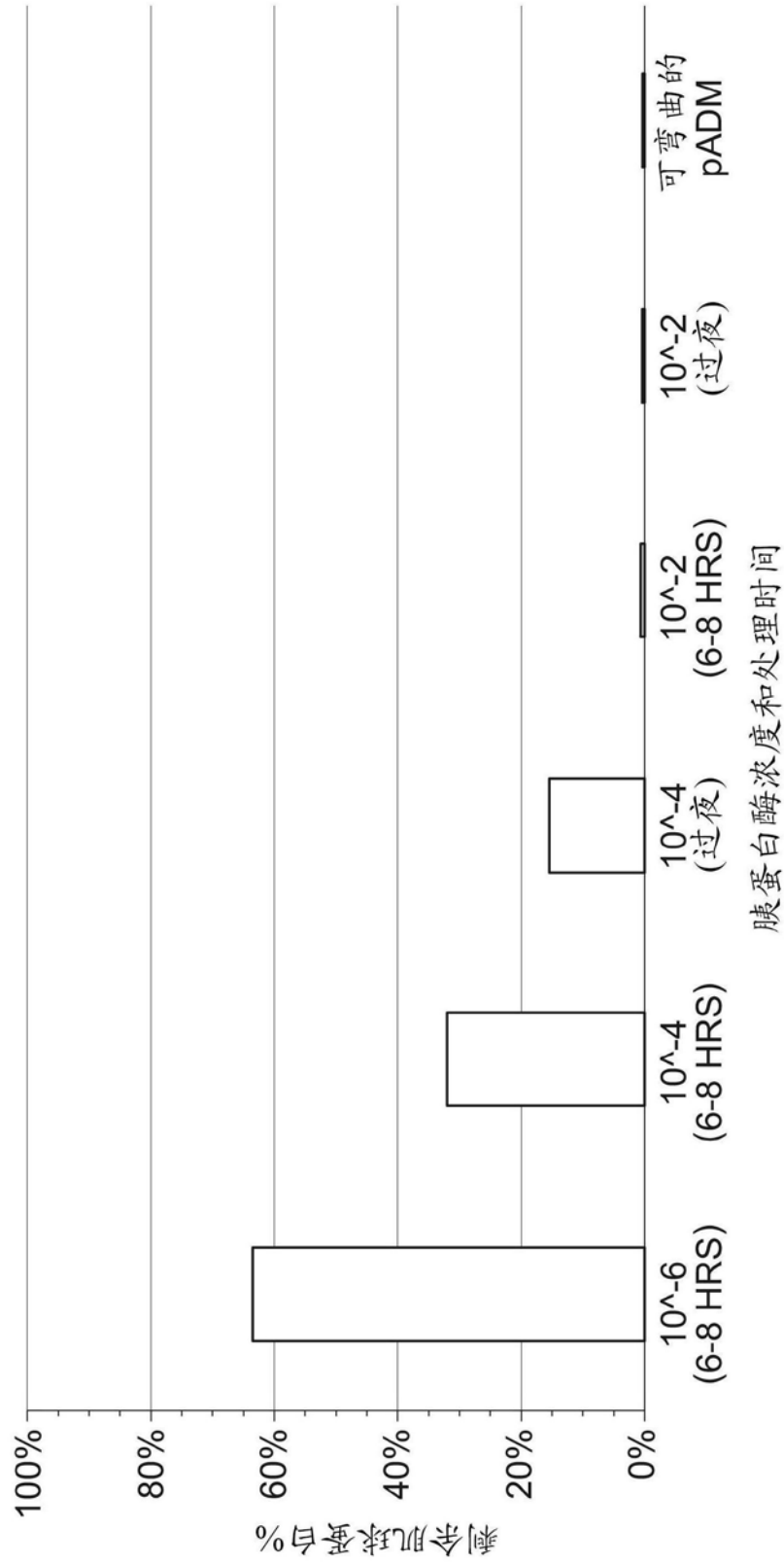


图18

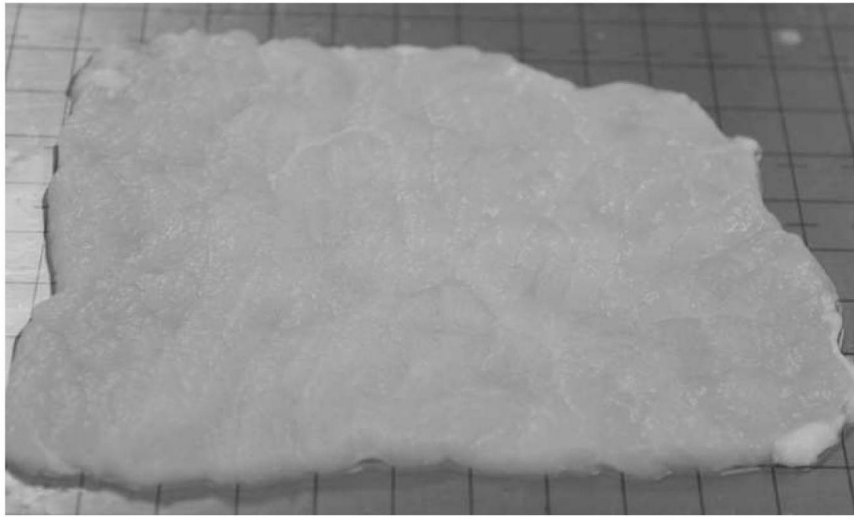


图19A

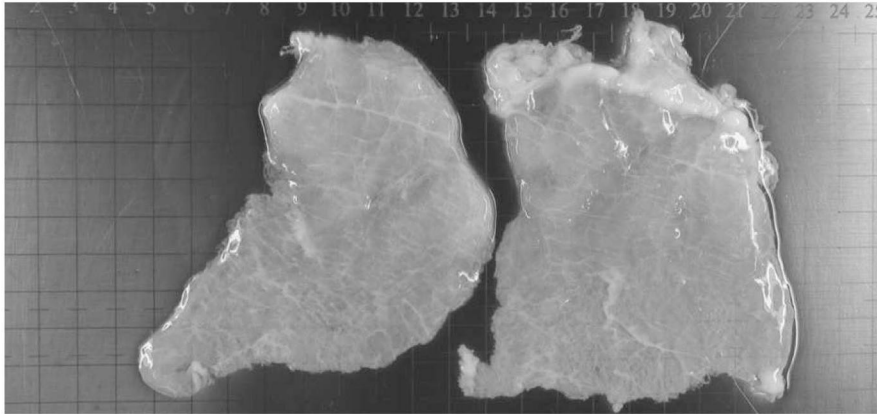


图19B

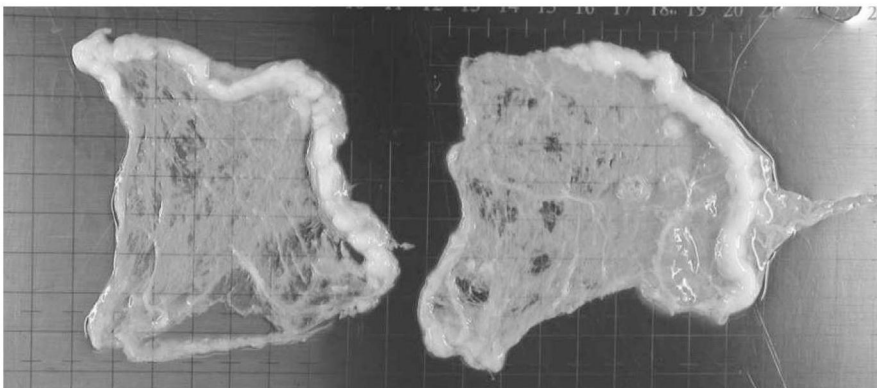


图19C

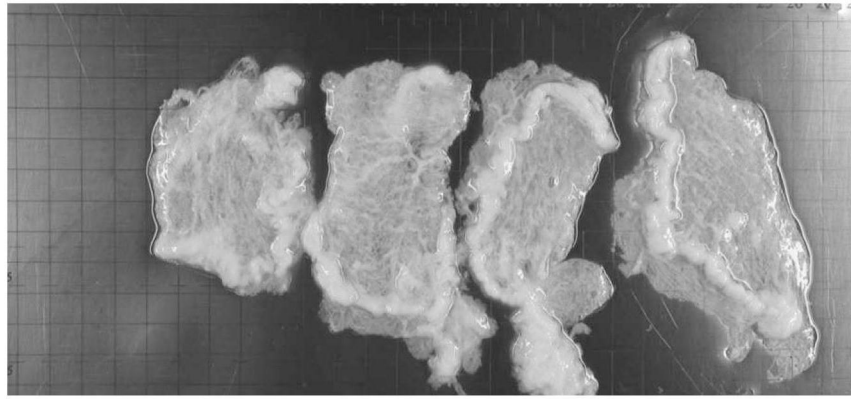


图19D

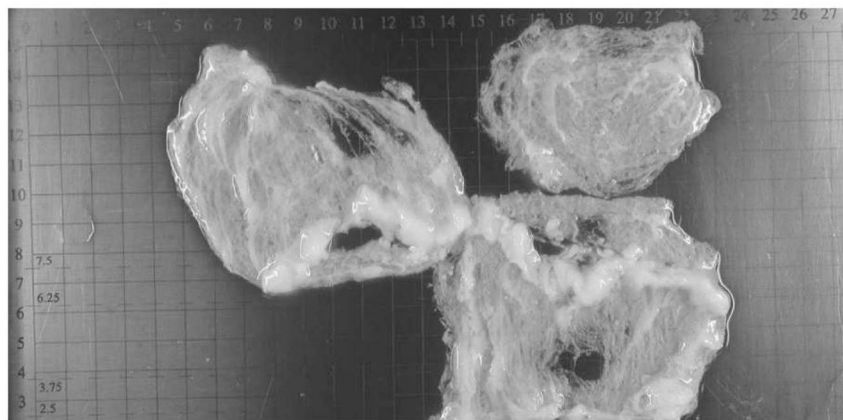


图19E

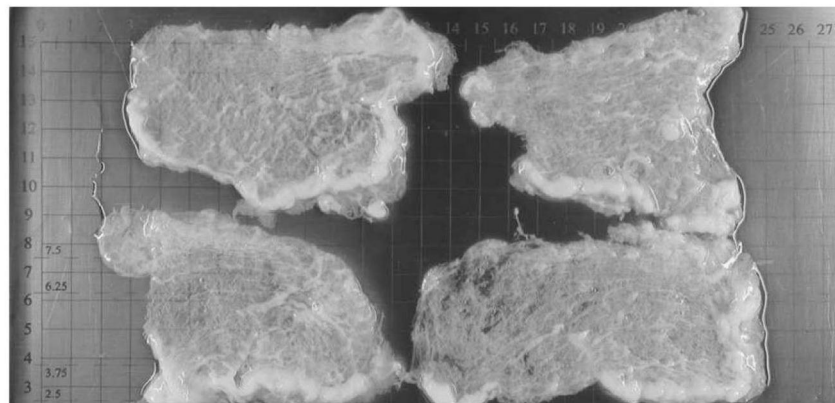


图19F



图19G

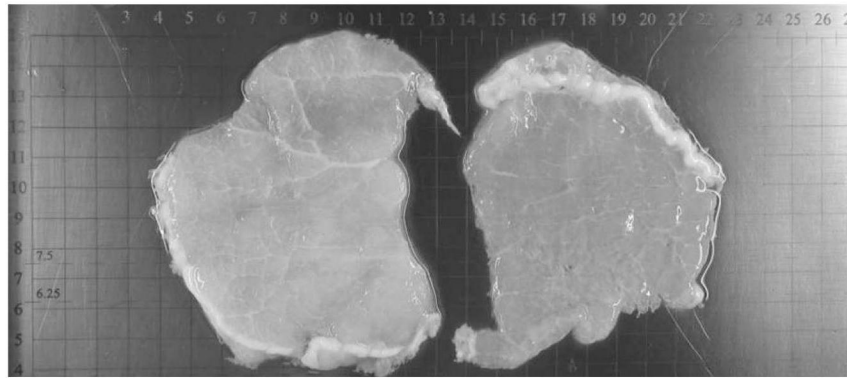


图19H

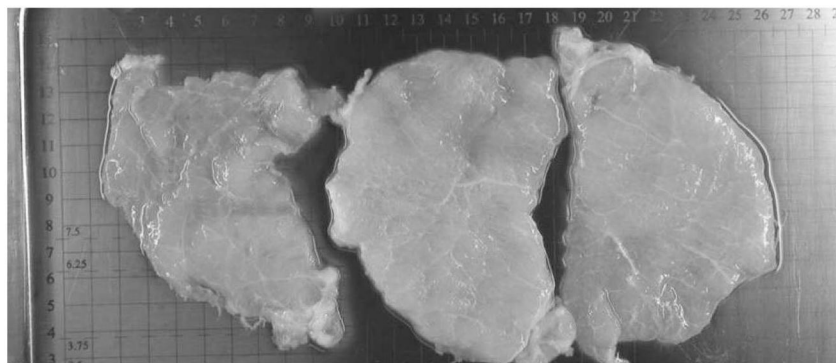


图19I

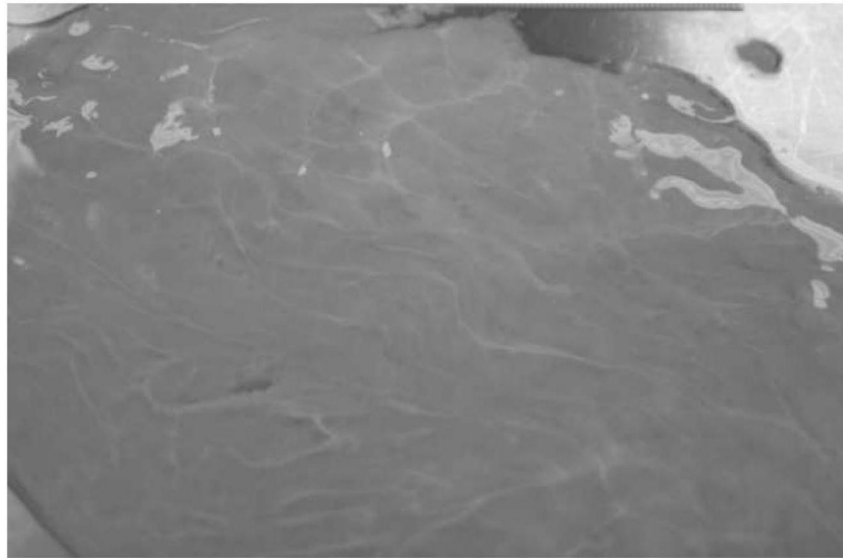


图19J

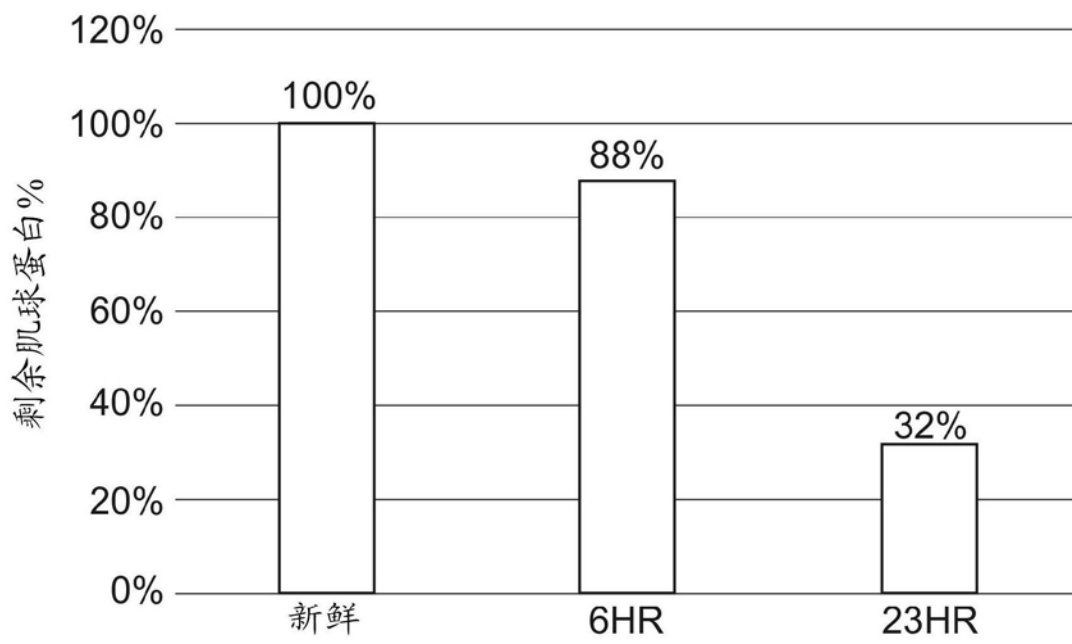


图20