



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112867499 A

(43) 申请公布日 2021.05.28

(21) 申请号 201980067713.0

(74) 专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713

(22) 申请日 2019.10.25

代理人 王思琪 王建秀

(30) 优先权数据

62/750,303 2018.10.25 US

(51) Int.Cl.

A61K 35/34 (2015.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 35/38 (2015.01)

2021.04.13

A61K 35/22 (2015.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61K 35/30 (2015.01)

PCT/US2019/058052 2019.10.25

A61P 9/10 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2020/086955 EN 2020.04.30

(71) 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 K·克里斯特曼 M·斯潘

G·格罗佛

权利要求书2页 说明书16页 附图8页

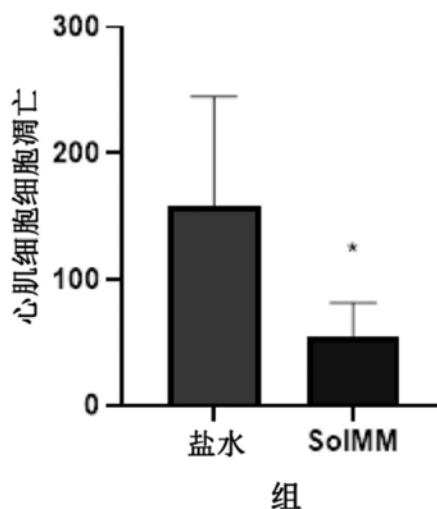
(54) 发明名称

可溶性细胞外基质组合物和用于血管内递送的方法

(57) 摘要

提供了组合物以及用于组合物制造和使用的方法,所述组合物包括用于血管内递送的可溶性细胞外基质级分,所述可溶性细胞外基质级分原位形成凝胶或覆盖层以用于治疗各种组织中的心肌梗死和缺血以及内皮损伤/功能障碍。

心肌细胞细胞凋亡



1. 一种制备可溶性细胞外基质 (ECM) 组合物的方法, 包括:
 - a. 用酸性蛋白酶消化脱细胞的ECM材料;
 - b. 将液体中的所述消化的ECM材料中和至pH值为7.0-8.0;
 - c. 处理所述液体ECM以产生可溶性和不溶性级分; 以及
 - d. 将所述可溶性级分中的至少一部分与所述不溶性级分分离, 以生产可溶性ECM组合物。
2. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 所述处理所述液体ECM以产生所述可溶性和不溶性级分是通过离心进行的。
3. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 所述处理所述液体ECM以产生所述可溶性和不溶性级分是通过渗析或过滤进行的。
4. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 所述分离是用250nm或更小的尺寸排阻过滤器进行的。
5. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 将所述可溶性ECM组合物进一步冻干以及再水合。
6. 一种可溶性ECM组合物, 包括从其中去除了固体ECM材料中的至少一部分的脱细胞的、消化的且中和的组织, 其中所述可溶性ECM组合物通过250nm的尺寸排阻过滤器。
7. 根据权利要求6所述的可溶性ECM组合物, 其中, 所述组合物被配制用于血管内输注。
8. 根据权利要求6所述的可溶性ECM组合物, 其中, 所述组合物在室温下为液体, 并且在输注或注射后在体内形成凝胶。
9. 根据权利要求6所述的可溶性ECM组合物, 其中, 所述组合物在室温下为液体, 并且在输注或注射后在体内形成给受损的血管加衬的覆盖层。
10. 根据权利要求6所述的可溶性ECM组合物, 其中, 所述组合物在室温下为液体, 并且在输注或注射后在体内填充内皮细胞之间的孔。
11. 根据权利要求6所述的可溶性ECM组合物, 其源自人、动物、胚胎或胎儿组织。
12. 根据权利要求6所述的可溶性ECM组合物, 其源自心脏、脑、膀胱、小肠或骨骼肌组织、肾、肝、肺和血管。
13. 治疗受试者以促进组织修复的方法, 包括向有此需要的受试者给药有效量的根据权利要求6所述的可溶性ECM组合物的输注。
14. 根据权利要求13所述的方法, 其中, 所述输注是通过导管、静脉内或血管内递送的。
15. 根据权利要求13所述的方法, 其中, 当在体内递送时, 所述可溶性ECM组合物在组织中形成凝胶。
16. 根据权利要求13所述的方法, 其中, 在给药之前将所述可溶性ECM组合物与戊二醛、甲醛、双-NHS分子或其他交联剂交联。
17. 根据权利要求13所述的方法, 其中, 在给药之前将所述可溶性ECM组合物与细胞、肽、蛋白质、DNA、药物、纳米颗粒、营养物、促进存活的添加剂、蛋白聚糖和/或糖胺聚糖组合。
18. 根据权利要求13所述的方法, 其中, 在给药之前将所述可溶性ECM组合物与合成聚合物或生物衍生的材料组合和/或交联。
19. 根据权利要求13所述的方法, 其中, 所述可溶性ECM组合物在所述受试者中引起内源性细胞内生长、血管生成和再生。

20. 根据权利要求13所述的方法, 其中, 所述可溶性ECM组合物在所述受试者中促进细胞存活并减少炎症。

21. 一种用于治疗急性心肌梗死的方法, 包括向需要的受试者中注射或输注有效量的可溶性ECM组合物, 所述可溶性ECM组合物包括从其中去除了固体ECM材料中的至少一部分的脱细胞的、消化的且中和的组织。

22. 根据权利要求21所述的方法, 其中, 所述组合物是血管内递送的。

23. 根据权利要求21所述的方法, 其中, 所述组合物是用球囊输注导管递送的。

24. 根据权利要求21所述的方法, 其中, 所述组合物在递送之后在组织中转变为凝胶形式。

25. 根据权利要求21所述的方法, 其中, 所述组合物在室温下为液体, 并且在递送之后形成给梗死的血管加衬的覆盖层。

26. 根据权利要求21所述的方法, 其中, 所述组合物在室温下为液体, 并且在递送之后填充梗死的内皮细胞之间的孔。

27. 根据权利要求21所述的方法, 其中, 所述组合物在注射或输注后的一至14天内降解。

28. 根据权利要求21所述的方法, 其中, 所述组合物的注射或输注修复由所述受试者承受的对心肌的损害。

29. 根据权利要求21所述的方法, 其中, 所述组合物的注射或输注修复由所述受试者的缺血引起的损害。

30. 根据权利要求21所述的方法, 其中, 所述有效量是在所述受试者的注射或输注区域中增加血流量、增加活组织质量或诱导新血管形成的量。

31. 一种治疗内皮细胞损伤和/或功能障碍的方法, 包括向有此需要的受试者注射或输注有效量的可溶性ECM组合物, 所述可溶性ECM组合物包括从其中去除了固体ECM材料中的至少一部分的脱细胞的、消化的且中和的组织。

32. 根据权利要求31所述的方法, 其中, 所述有效量促进内皮细胞存活、增殖或血管活性和/或减少炎症、细胞凋亡、活性氧损伤或渗漏的脉管系统。

可溶性细胞外基质组合物和用于血管内递送的方法

[0001] 相关申请交叉引用

[0002] 本申请要求提交于2018年10月25日的美国临时申请第62/750,303号的优先权权益,将所述申请通过援引并入本文。

[0003] 政府赞助

[0004] 本发明是在美国国立卫生研究院 (NIH) 授予的第HL113468号资助的政府支持下完成的。政府具有本发明的某些权利。

技术领域

[0005] 本发明涉及可输注的可溶性细胞外基质组合物以及用于微创递送至组织/器官/细胞,包括缺血性或损伤的心脏、脑、骨骼肌、血管和内皮细胞的治疗。

背景技术

[0006] 细胞外基质治疗包括为组织再生提供支架的天然组织组分。当前的脱细胞的细胞外基质治疗仅限于贴剂或直接注射。没有细胞外基质治疗能够血管内/输注递送至感兴趣的组织。已生成了由脱细胞的且消化的组织制成的ECM水凝胶,但是它们不是完全可溶的或透明的胶体。它们是包含可溶性和非可溶性组分两者的半透明的悬浮液 (Freytes等人, 2008、Singelyn等人, 2009), 其防止材料从血流中通过渗漏的脉管系统 (其发生在缺血性组织, 例如急性心肌梗死、中风、癌症等中 (Nguyen等人, 2015、Dvorak等人, 1988、Yuan等人, 1995)) 进入组织, 给渗漏的脉管系统加衬或填充渗漏的脉管系统的孔。

[0007] 心肌梗死 (MI) 的特征在于随时间进展的心肌的缺血性坏死, 导致不良的左心室 (LV) 重构和最终的心力衰竭。当前的护理标准不能解决这种缺血性损害。微创组织工程治疗可以修复MI后的心脏。许多干细胞和生长因子治疗已进入临床试验; 然而, 这些治疗显示出较差的功效, 这可能是由于未包囊的治疗的保留不足引起的。

[0008] 已示出了细胞外基质 (ECM) 水凝胶在心脏组织工程领域的巨大的希望; 特别是在MI模型中, 源自脱细胞的猪心肌的组织特异性水凝胶 (称为心肌基质 (MM)) 示出心肌的增加、梗死区域的新生血管形成以及改善的区域和总体心脏功能 [2-4]。此外, 通过对从用MM注射的大鼠心脏的梗死的区域分离的RNA进行全转录组分析来研究修复的机制, 表明与心脏修复相关的上调的通路 (例如, 新生血管形成和心脏发育) 以及与不良的LV重构相关的下调的通路 (例如, 肥大、细胞凋亡和纤维化 [6])。在MI后患者的I期试验中在MI后60天至3年内使用经心内膜注射对这种材料进行了估计 (美国临床试验数据库 (ClinicalTrials.gov) 标识符: NCT02305602)。然而, 心肌细胞死亡和不良的LV重构是MI之后在数分钟至数天内开始的过程 [26, 27]。MM的当前递送仅限于经心内膜导管注射, 因为它不适用于冠状动脉内输注, 因为它包含的亚微米颗粒太大而不能通过渗漏的冠状动脉脉管系统进入梗死。此外, 经心内膜注射是在MI后的第一周内具有心室破裂和心律失常的一些安全问题的专门的医学技术 [7, 8]。这阻止了在急性MI后的关键治疗窗内递送MM。

[0009] 冠状动脉内输注是经心内膜注射的替代的方法。冠状动脉内递送在急性MI中是可

行的,因为它可以伴随通常在患者入院之后不久进行的球囊血管成形术。这样的技术是介入心脏病学标准技术,且不需要专门的训练。冠状动脉内输注利用急性MI后的渗漏的脉管系统允许生物材料通过冠状动脉脉管系统并进入梗死的区域[5]。冠状动脉内递送生物材料的可行性已在猪MI模型中用褐藻胶水凝胶示出[9],并已进展到II期临床试验(美国临床试验数据库标识符:NCT01226563)。然而,这种材料并未示出心脏功能的显著改善,可能是由于褐藻胶的受限的生物活性引起的[10]。

发明内容

[0010] 在实施方式中,本发明提供了一种制备可溶性细胞外基质(ECM)组合物的方法,所述方法包括用酸性蛋白酶,诸如胃蛋白酶酶促消化ECM材料;将液体中的所述消化的ECM材料中和至pH值为7.0-8.0;处理所述液体ECM以产生可溶性和不溶性级分;以及将所述可溶性级分中的至少一部分与所述不溶性级分分离,以生产可溶性ECM组合物。

[0011] 在实施方式中,本发明提供了:处理所述液体ECM以产生可溶性和不溶性级分是通过离心来实现的。在实施方式中,本发明提供了:将所述可溶性ECM组合物渗析和/或过滤以去除不溶性材料。在实施方式中,本发明提供了:将所述可溶性ECM组合物进一步冻干以供储存以及再水合以供使用。

[0012] 在实施方式中,所述可溶性ECM组合物与所述液体ECM中的ECM固体基本上分离。在实施方式中,所述可溶性ECM组合物比所述消化的未分离的ECM材料更透明。在实施方式中,所述可溶性ECM组合物包括透明的ECM胶体,其可以通过0.25 μ m的过滤器。

[0013] 在实施方式中,本发明提供了治疗有此需要的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者给药有效量的所述可溶性ECM组合物,以促进组织修复或细胞募集。在实施方式中,所述输注是通过导管、静脉内或血管内进行的。在实施方式中,本发明提供了:当在体内递送时,所述可溶性级分然后将在组织中形成凝胶。在实施方式中,所述可溶性级分将覆盖血管衬里。在实施方式中,所述可溶性级分将填充孔、窗孔、内皮破坏、敞开的细胞间连接或泄漏的或受损的脉管系统的间隙。

[0014] 在实施方式中,本发明提供了:将ECM的所述可溶性级分与戊二醛、甲醛、双-NHS分子或其他交联剂进一步交联。在实施方式中,本发明提供了:将ECM的所述可溶性级分与合成聚合物或生物衍生的材料组合和/或交联。在实施方式中,本发明提供了:将ECM的所述可溶性级分与细胞、肽、蛋白质、DNA、药物、纳米颗粒、抗生素、生长因子、营养物、促进存活的添加剂、蛋白聚糖和/或糖胺聚糖组合。

[0015] 在实施方式中,本发明提供了:将ECM的所述可溶性级分与上述组分组合使用以用于内源性细胞内生长、血管生成和再生。在实施方式中,本发明提供了:将ECM的所述可溶性级分与上述组分组合使用作为改变组织的机械特性的基质。在实施方式中,本发明提供了:将ECM的所述可溶性级分单独地或与上述组分组合地与细胞一起递送以用于再生或修复受损的组织。

[0016] 在实施方式中,本发明提供了:在调节浓度和/或无菌过滤之后,可以将ECM的所述可溶性级分冻干并冷冻储存(例如-20C、-80C)至少3个月。然后可以在注射或输注之前将所述可溶性ECM组合物或级分重新悬浮和/或无菌过滤。

[0017] 在实施方式中,本发明提供了:在调节浓度和/或无菌过滤之后,可以将ECM的所述

可溶性级分冻干并在冷冻机(例如4C)中储存至少3个月。然后可以在注射或输注之前将所述可溶性ECM级分重新悬浮和/或无菌过滤。

[0018] 在实施方式中,本发明提供了:在调节浓度和/或无菌过滤之后,可以将ECM的所述可溶性级分冻干并在室温下储存至少3个月。然后可以在注射或输注之前将所述可溶性ECM级分重新悬浮和/或无菌过滤。

[0019] 在实施方式中,本发明提供了:将液体细胞外基质(预凝胶溶液)中的所述可溶性级分中的至少一部分与不溶性级分分离的方法可以通过高速离心、渗析、过滤或调节pH或盐度来进行。在实施方式中,可溶性级分的分离是通过从所述ECM材料中去除至少一部分固体来进行。在实施方式中,可溶性级分的分离是用具有的大小限制小于 $1\mu\text{m}$ 、 $0.5\mu\text{m}$ 、 $0.25\mu\text{m}$ 、 $0.22\mu\text{m}$ 或 $0.2\mu\text{m}$ 的过滤器进行的。在实施方式中,本发明提供了可溶性ECM组合物,所述可溶性ECM组合物源自脱细胞的组织并且在体内胶凝作用之前被处理以分离出可溶性级分。在实施方式中,本发明提供了:制备所述可溶性ECM的组合物以用于血管内输注。

[0020] 在实施方式中,本发明提供了:所述可溶性细胞外基质的组合物源自人、动物、胚胎和/或胎儿组织来源。在实施方式中,本发明提供了:所述可溶性细胞外基质的组合物源自心脏、脑、膀胱、小肠、骨骼肌、肾、肝、肺、血管以及其他组织/器官组织来源。

[0021] 在实施方式中,本发明提供了治疗急性心肌梗死的方法,所述方法包括向有需要的具有心肌梗死的受试者注射或输注有效量的包括源自肌肉组织的可溶性脱细胞的细胞外基质的组合物。

[0022] 在实施方式中,本发明提供了:所述可溶性ECM组合物是通过输注血管内递送的。在实施方式中,本发明提供了:所述可溶性ECM组合物是通过用球囊输注导管的冠状动脉内输注来递送的。在实施方式中,本发明提供了:所述可溶性ECM组合物在递送之后在组织中转变为凝胶形式。在实施方式中,本发明提供了:所述可溶性ECM组合物在递送之后转变为在损伤的血管的内皮上形成覆盖层。在实施方式中,本发明提供了:所述可溶性ECM组合物在注射或输注后一至14天内降解。

[0023] 在实施方式中,本发明提供了:所述组合物的注射或输注修复了由所述受试者承受的对心肌的损害,诸如心肌梗死。在实施方式中,本发明提供了:所述组合物的注射或输注用于治疗由所述受试者的疾病、创伤、中风和/或缺血引起的肌肉或神经损害。在实施方式中,本发明提供了:所述有效量是在所述受试者的注射或输注区域中增加血流量、增加活组织质量或诱导新血管形成的量。在实施方式中,本发明提供了:所述有效量是在受试者的注射或输注区域中促进细胞存活、减少炎症并修复受损的脉管系统的量。

附图说明

[0024] 图1A-1F示出了可溶性心肌基质的生成。图1A示出了分离的左心室心肌被切成碎片。图1B示出了在1%十二烷基硫酸钠中连续搅拌之后被脱细胞。图1C示出了冻干并研磨成细粉。图1D示出了部分消化的心肌基质。(E)离心之后分级的心肌基质,(1)上清液中的So1MM级分以及(2)不溶性团块。(F)皮下注射后的So1MM水凝胶。图像(A-D)取自[3]。

[0025] 图2示出了比较了梯状物(ladder)(全范围RPN800E,泳道1)、胶原(泳道2)、心肌基质(泳道3)和可溶性心肌基质(泳道4)的蛋白质分布的PAGE。

[0026] 图3示出了在缺血-再灌注大鼠模型中,在冠状动脉内注射 $200\mu\text{L}$ 的 10mg/mL So1MM

后12小时的So1MM (红色灰度) 的分布和保留。(左) 用苏木精和伊红染色的梗死的心脏的短轴视图, 梗死横跨心脏的下半部, 比例尺: 3mm; (右) 梗死的心肌上的插图, 其显示了在整个梗死的心肌上的So1MM微尺度凝胶, 比例尺: 200 μ m。

[0027] 图4示出了在猪缺血-再灌注模型中, 在冠状动脉内输注1小时后的So1MM (红色灰度) 的分布和保留。(左) 梗死的猪心脏的短轴总体组织学。以蓝色灰度概括梗死。(右) 梗死的心肌在整个梗死的心肌中均显示So1MM微凝胶。

[0028] 图5示出了在缺血-再灌注模型中, 在冠状动脉内输注So1MM后的输注后24小时和5周, 不良的左心室重构缓解 (保存的EDV和ESV)。EDV-舒张末期容积, ESV-收缩末期容积, EF-射血分数, So1MM (蓝色灰度正方形), 盐水 (红色灰度圆圈)。N=10-11/组。

[0029] 图6示出了在输注和缺血-再灌注后5周的So1MM输注的大鼠中梗死的小动脉密度增加。通过共同染色 α -平滑肌肌动蛋白和同工凝集素 (isolectin) 识别小动脉, 并在ImageJ中手动追踪。N=10-11/组。

[0030] 图7示出了在输注和缺血-再灌注后3天, 在So1MM输注的大鼠中, 梗死的边界区心肌细胞细胞凋亡减少。用以下对组织染色: 用 α -辅肌动蛋白染色心肌细胞, 用切割的胱天蛋白酶3染色细胞凋亡。在ImageJ中对凋亡的心肌细胞进行手动计数。N=5-6/组。

[0031] 图8示出了在输注和缺血-再灌注后1天, 在So1MM输注的大鼠中的相对基因表达变化。使用从LV游离壁分离的RNA, 通过RT-qPCR测量基因表达。第1天的基因表达表明血管生成和活性氧代谢途径增加。N=5-6/组。

[0032] 图9示出了在输注和缺血再灌注后3天, 在So1MM输注的大鼠中的相对基因表达变化。使用从LV游离壁分离的RNA, 通过RT-qPCR测量基因表达。第3天的基因表达表明细胞凋亡/坏死和纤维化途径减少。在血管生成途径中已表明LRG1, 而LRG1下调牵涉纤维化。N=5-6/组。

[0033] 图10示出了在缺血再灌注大鼠模型中输注可溶性基质后, 可溶性基质 (红色灰度) 和内皮细胞的同工凝集素 (绿色灰度) 的共聚焦成像。图组 (panel) 是来自z堆栈的顺序图像。可溶性基质覆盖小的 (大约5 μ m直径) 毛细管的内部, 但是可溶性基质并未完全阻塞腔。

[0034] 图11示出了在缺血-再灌注大鼠模型中输注可溶性基质后, 可溶性基质 (红色灰度) 和内皮细胞的同工凝集素 (绿色灰度) 的共聚焦成像。可溶性基质与内皮细胞重叠, 并且不阻塞血管腔。

[0035] 图12示出了在输注和缺血-再灌注后24小时, 在可溶性基质输注的心脏中的可溶性基质保留。从左到右, 用1) 盐水、2) 与Vivo Tag 750缀合的10mg/ml可溶性基质、3) 与Vivo Tag750缀合的10mg/ml三赖氨酸、4) 与Vivo Tag 750缀合的10mg/ml可溶性基质输注心脏。三赖氨酸用作小肽对照, 并且示出了最小心脏保留。

[0036] 图13示出了可溶性基质水凝胶的扫描电子显微镜图像。左侧图像比例尺: 20 μ m, 右侧图像比例尺: 5 μ m。

[0037] 图14示出了1:50稀释度 (分别为1.0mg/ml和0.6mg/ml) 的可溶性基质 (So1MM) 和完全基质 (MM) 的动态光散射数据, 示出了直径小于100nm的可溶性基质颗粒, 而完全基质具有更大的颗粒。

[0038] 图15示出了可溶性基质 (So1MM) 在1:10和1:100稀释度 (分别为1.0mg/ml和0.1mg/ml) 下的动态光散射数据, 示出了直径小于100nm的颗粒。

[0039] 图16示出了盐水、可溶性基质 (SolMM) 和完全基质 (MM) 的吸光度 (左) 和透射率 (右)。

[0040] 图17示出了可溶性基质 (SolMM) 和完全基质 (MM) 的相对吸光度 (左) 和透射率 (右)。

具体实施方式

[0041] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请均通过援引并入本文,其程度如同每个单独的出版物、专利或专利申请被具体地且单独地指出通过援引并入一样。

[0042] 除非另有定义,否则本文中所有的技术和科学术语以及任何首字母缩略词均具有与本发明领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。尽管与本文所述的那些类似或等同的任何方法和材料都可以用于本发明的实践中,但是本文描述了示例性方法、装置和材料。

[0043] 除非另外指明,否则本发明的实践将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,这些都在本领域的技术范围内。这样的技术在以下文献中充分解释:分子克隆(Molecular Cloning):实验室手册(A Laboratory Manual),第2版(Sambrook等人,1989);寡核苷酸合成(Oligonucleotide Synthesis)(M.J.Gait编辑,1984);动物细胞培养(Animal Cell Culture)(R.I.Freshney编著,1987);酶学方法(Methods in Enzymology)(学术出版社有限公司);分子生物学实验指南(Current Protocols in Molecular Biology)(F.M.Ausubel等人编著,1987,并且定期更新);PCR:聚合酶链反应(PCR:The Polymerase Chain Reaction)(Mullis等人编著,1994);Remington,药学科学与实践(The Science and Practice of Pharmacy),第20版,(利平科特,威廉姆斯&威尔金斯2003)以及Remington,药学科学与实践,第22版,(费城理工大学医药出版社和药学院(Philadelphia College of Pharmacy at University of the Sciences)2012)。

[0044] 在实施方式中,本发明提供了制备细胞外基质(ECM)中的一种或多种生物活性可溶性级分以用于治疗性递送的方法,所述方法包括:

[0045] a. 用酸性蛋白酶,诸如胃蛋白酶部分或完全消化从组织中制备的脱细胞的ECM;

[0046] b. 将所述消化的ECM材料中和至pH为7.0-8.0;

[0047] c. 处理所述液体ECM(预凝胶溶液)以产生可溶性和不溶性级分;以及

[0048] d. 将所述不溶性级分中的至少一部分与可溶性级分分离,以生产可溶性ECM组合物。

[0049] 在实施方式中,本发明提供了:将可溶性ECM组合物进一步冻干、渗析和/或过滤。在实施方式中,本发明提供了:冻干后将所述可溶性ECM组合物再水合。

[0050] 在实施方式中,本发明提供了治疗有此需要的受试者的方法,该方法包括向所述受试者给药有效量的可溶性ECM组合物的血管内输注,以促进器官、组织或细胞修复或细胞募集。在实施方式中,所述输注是通过导管、静脉内或血管内进行的。在实施方式中,本发明提供了:当在体内递送时,所述可溶性ECM组合物将随后在组织的微脉管系统中中和/或周围形成凝胶。

[0051] 在实施方式中,本发明提供了治疗急性心肌梗死的方法,该方法包括向有需要的

具有心肌梗死的受试者注射或输注有效量的包括源自肌肉组织的可溶性脱细胞的细胞外基质的组合物。

[0052] 在实施方式中,本发明提供了:所述组合物是血管内递送的。在实施方式中,本发明提供了:所述组合物是用球囊输注导管递送的。在实施方式中,本发明提供了:所述组合物在递送之后在组织中转变为凝胶形式。在实施方式中,本发明提供了:所述组合物在注射或输注后一至14天内降解。在实施方式中,本发明提供了:所述组合物的注射或输注修复了由所述受试者承受的对心肌的损害。在实施方式中,本发明提供了:所述组合物的注射或输注修复了由所述受试者的创伤或缺血引起的非心脏组织的损害。

[0053] 在实施方式中,本发明提供了:所述有效量是在所述受试者的注射或输注区域中增加血流量、增加活组织质量或诱导新血管形成的量。

[0054] 对于人治疗,细胞外基质存在许多来源物种:例如,人、猪、牛、山羊、小鼠、大鼠、兔子、鸡和其他动物来源。此外,存在许多组织来源:例如,心脏、脑、膀胱、小肠、骨骼肌、肾、肝、肺、血管以及其他组织和器官。

[0055] 在实施方式中,首先使组织脱细胞,仅留下细胞外基质,诸如在美国专利公开US2013/0251687中公开的,其全文通过援引并入。然后将基质冻干、碾磨或粉碎成细粉,用胃蛋白酶或其他酶溶解,以及随后进行中和和缓冲,如先前报道的。中和后,将消化物(预凝胶溶液)分级,以分离出可溶性和不溶性级分。处理可溶性和不溶性级分的分离可以通过离心、渗析、过滤或调节pH或盐度来实现。可以将可溶性级分渗析以去除盐、冻干,以及重新悬浮以调节ECM浓度。可以将ECM无菌过滤、冻干并储存在无菌容器中。可以将ECM重新悬浮到适当的/生理浓度以进行输注。

[0056] 可溶性ECM组合物是指已脱细胞、冻干、碾磨和消化的并且从其中去除了固体组分中的至少一部分的细胞外基质材料。。在实施方式中,可溶性ECM组合物获自离心上清液。在实施方式中,可溶性ECM组合物能够通过过滤器大小小于 $1\mu\text{m}$ 、 500nm 、 250nm 、 220nm 或 200nm 。从中去除了天然存在的固体ECM组分中的至少一部分的可溶性ECM组合物是比ECM固体去除之前更透明的材料。然而,应当理解,可溶性ECM组合物中可能仍然存在一定程度的不溶性小颗粒物质,诸如ECM胶体。当从中去除按体积计至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%的天然存在的ECM固体时,已基本上将可溶性ECM组合物分离出来。

[0057] 在调整浓度和/或无菌过滤之后,可以将可溶性ECM组合物冻干并冷冻储存(例如 -20C , -80C)至少3个月。然后,在注射或输注之前,可以将可溶性ECM组合物用无菌水再水合。

[0058] 可溶性ECM组合物可以通过导管输注、静脉内递送或通过具有或不具有球囊的血管内输注。可溶性ECM组合物可以通过受损的渗漏的脉管系统,诸如在急性心肌梗死、中风、其他缺血性组织、肿瘤等中发现的那些。一旦进入组织,可溶性ECM组合物然后将形成凝胶。

[0059] 可溶性ECM组合物可以通过导管输注、静脉内递送或通过具有或不具有球囊的血管内输注。可溶性ECM组合物可以在渗漏的脉管系统的内衬上组装成覆盖层或填充渗漏的脉管系统的孔,诸如在急性心肌梗死、中风、其他缺血性组织、肿瘤、遭受创伤的组织等中发现的那些。

[0060] 可溶性ECM组合物凝胶可以与戊二醛、甲醛、双-NHS分子或其他交联剂交联。可溶性ECM组合物可以与细胞、肽、蛋白质、DNA、药物、营养物、促进存活的添加剂、蛋白聚糖和/或糖胺聚糖组合。可溶性ECM组合物可以与合成聚合物组合和/或交联。可溶性ECM组合物可

以单独地或与上述组分组合使用以用于内源性细胞内生长、血管生成和再生。可溶性ECM组合合物可以单独地或与上述组分组合使用作为改变组织的机械特性的基质。可溶性ECM组合合物可以单独地或与上述成组分组合地与细胞一起递送以用于再生受损的组织。

[0061] 可溶性ECM组合合物可以用于组织损伤(诸如由心肌梗死、中风、颅脑损伤、外周动脉疾病、肝硬变、癌性肿瘤或肾损伤引起的)后的组织修复。可溶性ECM组合合物可以单独地使用或用作治疗性递送载体(vehicle)。

[0062] 本发明提供了用于治疗具有内皮细胞损伤或功能障碍、渗漏的脉管系统、内皮细胞连接破坏、血管舒张抑制和炎症的病症的可溶性ECM组合合物和方法。

[0063] 本发明提供了用于治疗具有潜在的再灌注损伤,包括心肌梗死、中风以及外周动脉和血管疾病的病症的可溶性ECM组合合物和方法。可溶性ECM组合合物可以用作组织工程支架,以减少再灌注损伤、减少细胞凋亡并促进组织修复。

[0064] 本发明提供了用于治疗导致内皮细胞激活和炎症的过量或持续的活性氧(ROS)产生/信号传导的可溶性ECM组合合物和方法。可溶性ECM组合合物可以通过物理屏蔽和/或ROS隔离(sequestration)来保护细胞和组织免受ROS损伤和炎症。

[0065] 本发明提供了用于治疗心脏病、缺血和灌注的可溶性ECM组合合物和方法。可溶性ECM组合合物可以促进新生血管形成并增加组织灌注。

[0066] 本发明提供了用于治疗糖尿病、胰岛素抵抗的可溶性ECM组合合物和方法。可溶性ECM组合合物可以治疗内皮细胞,恢复内皮依赖性血管舒张。

[0067] 本发明提供了用于治疗癌症,包括肿瘤生长、转移的可溶性ECM组合合物和方法。可溶性ECM组合合物可以治疗存在于癌症中的渗漏的血管和内皮功能障碍。已示出ECM降解产物抑制肿瘤生长和形成。

[0068] 本发明提供了用于治疗肺部疾病,诸如慢性阻塞性肺疾病、哮喘、肺动脉高压的可溶性ECM组合合物和方法。可以输注可溶性ECM组合合物以治疗肺的损伤的组织 and/或内皮细胞。

[0069] 本发明提供了用于治疗慢性肾衰的可溶性ECM组合合物和方法。可溶性ECM组合合物可以治疗血管以恢复血管舒张和收缩。

[0070] 本发明提供了用于治疗静脉栓塞形成的可溶性ECM组合合物和方法。可溶性ECM组合合物输注可以覆盖血管,以防止血栓形成和血小板聚集。

[0071] 本发明提供了用于治疗严重感染性疾病,特别是具有内皮屏障破坏的疾病(诸如包括登革出血热和汉坦病毒肺综合征的出血热病毒)的可溶性ECM组合合物和方法。可溶性基质输注可以治疗和恢复内皮屏障。

[0072] 本发明提供了用于治疗动脉粥样硬化的可溶性ECM组合合物和方法。可溶性ECM组合合物输注可以通过覆盖和稳定动脉粥样硬化斑块来防止斑块破裂,或者可以粘附到内皮细胞上并减少炎症。

[0073] 本发明提供了用于治疗肝硬化、急性肝衰竭的可溶性ECM组合合物和方法。可溶性ECM组合合物可以治疗肝硬化中的内皮功能障碍。可溶性ECM组合合物可以减弱炎症和氧化应激。

[0074] 本发明提供了用于治疗组织出血和水肿的可溶性ECM组合合物和方法。可溶性基质可以覆盖内皮细胞,填充内皮细胞层中的间隙,通过血管刺激作用增加组织灌注或减少进入组织的液体。

[0075] 本发明提供了用于治疗脑外伤和其他神经损伤的可溶性ECM组合物和方法。可溶性基质可以治疗内皮细胞以修复渗漏的血管,恢复内皮依赖性舒张和一氧化氮产生并减少炎症和氧化应激。

[0076] 冠状动脉内输注是经心内膜注射的替代的方法。在心肌梗死(MI)的典型治疗过程中,冠状动脉内递送可以伴随球囊血管成形术。急性MI后,冠状动脉内输注利用渗漏的脉管系统,因此允许生物材料进入梗死区域[5]。在现有技术的制剂中,基质材料(MM)由可溶性级分以及太大而不能通过或粘附到渗漏的脉管系统的不溶性亚微米颗粒(>800nm)组成。作为结果,已提供方法以至少部分地分离可以通过和/或覆盖泄漏的脉管系统并且仍然在体内形成水凝胶的可溶性级分(称为可溶性MM(So1MM))。由于So1MM源自MM,So1MM将具有相似的治疗效果,包括心肌细胞细胞凋亡减少、新生血管形成以及不良LV重构减少。

[0077] 为了促进对本发明的理解,本文所用的许多术语和缩写在下文中如下定义:

[0078] 当介绍本发明或其(一种或多种)优选的实施方式的要素时,冠词“一个或一种(a)”、“一个或一种(an)”、“所述或该(the)”以及“所述(said)”旨在意指表示存在一个(种)或多个(种)要素。术语“包括(comprising)”、“包括(including)”和“具有”旨在是包括性的并且意指可以存在除所列要素之外的额外的要素。

[0079] 当在两个或更多个条目的列表中使用术语“和/或”意指所列条目中的任何一个可以单独使用或与所列条目中的任何一个或多个组合使用。例如,表述“A和/或B”旨在意指A和B中的任何一个或两者,即仅A、仅B或A和B组合。表述“A、B和/或C”旨在意指仅A、仅B、仅C、A和B组合、A和C组合、B和C组合或A、B和C组合。

[0080] 应当理解,本文所述的本发明的方面和实施方式包括“由方面和实施方式组成”和/或“基本上由方面和实施方式组成”。

[0081] 应当理解,以范围格式的描述仅是为了方便和简洁,而不应当被解释为对本发明的范围的不灵活的限制。因此,应当认为对范围的描述已经具体公开了所有可能的子范围以及所述范围内的各个数值。例如,对范围诸如从1至6的描述应当被认为已经具体公开了子范围,诸如从1至3、从1至4、从1至5、从2至4、从2至6、从3至6等,以及所述范围内的各个数字,例如1、2、3、4、5和6。无论范围的广度如何,这都适用。值或范围在本文中也可以表达为“约”,从“约”一个特定值和/或至“约”另一个特定值。当表达这样的值或范围时,公开的其他实施方式包括所叙述的具体值,从一个特定值和/或至其他特定值。类似地,当通过使用先行词“约”将值表达为近似值时,应当理解,特定值形成另一个实施方式。还将进一步理解,存在其中公开的多个值,并且每个值在本文中还被公开为除所述特定值本身以外的“约”所述特定值。在实施方式中,“约”可以用于意指例如在所叙述的值的10%内、在所叙述的值的5%内或在所叙述的值的2%内。

[0082] 本文所用的术语“药物组合物”是指药物可接受的组合物,其中该组合物包括药学上活性剂,并且在一些实施方式中进一步包括药学上可接受的载体。在一些实施方式中,药物组合物可以是药学上活性剂和载体的组合。

[0083] 术语“组合”是指以一种剂量单位形式的固定组合或用于联合给药的部分的试剂盒,其中一种或多种活性化合物和组合伴侣(例如,下文所解释的另一种药物,也称为“治疗剂”或“共剂”)可以同时独立给药或在时间间隔内分别给药。在一些情况下,组合伴侣示出合作,例如协同效应。本文所用的术语“共同给药”或“联合给药”等意在涵盖将所选择的组

合伴侣给药到有此需要的单个受试者(例如,患者),并且旨在包括其中不一定通过相同的给药途径或在同一时间给药的治疗方案。如本文所用,术语“药物组合”意指由于混合或组合多于一种活性成分得到的产品,并且包括活性成分的固定组合和非固定组合两者。术语“固定组合”意指活性成分(例如,化合物和组合伴侣)均以单一实体或剂量的形式同时给药到患者。术语“非固定组合”意指活性成分(例如,化合物和组合伴侣)均作为单独的实体同时地、并发地或相继地以无特定时间限制的形式给药到患者,其中这样的给药在患者体内提供了治疗有效水平的两种化合物。后者也适用于鸡尾酒疗法,例如,给药三种或更多种活性成分。

[0084] 如本文所用,术语“药学上可接受的”意指除在动物(并且更具体地说人和/或非人类哺乳动物中)中安全使用的其他制剂之外的,由联邦或州政府的监管机构批准的或者在美国药典、其他普遍认可的药典中列出的。

[0085] 本文所用的术语“药学上可接受的载体”是指与一种或多种脱甲基化合物一起给药的赋形剂、稀释剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、佐剂和/或载体。这样的载体可以为无菌液体,诸如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等;聚乙二醇、丙三醇、丙二醇或其他合成溶剂。抗菌剂,诸如苯甲醇或对羟苯甲酸甲酯;抗氧化剂,诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,诸如乙二胺四乙酸;以及用于调整张力的试剂,诸如氯化钠或右旋糖也可以是载体。用于生产组合物与载体的组合的方法是本领域的技术人员已知的。在一些实施方式中,词语“药学上可接受的载体”旨在包括与药物给药相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、等渗剂和吸收延迟剂等。使用这样的介质和剂用于药学活性物质在本领域中是众所周知的。参见例如Remington, 药学科学与实践(The Science and Practice of Pharmacy), 第20版,(利平科特,威廉姆斯&威尔金斯2003)。除非到任何常规介质或剂与活性化合物不相容的程度,否则设想在组合物中使用这样的物质。

[0086] 本文所用的“治疗有效”是指足以治疗或改善或以某种方式减轻与疾病和医学病症相关的症状的一种或多种药学上活性化合物的量。当参考一种方法使用时,方法足以有效地治疗或改善或以某种方式减轻与疾病或病症相关联的症状。例如,关于年龄相关的眼睛疾病的有效量是足以阻断或预防发作;或者如果疾病病理已开始,则是足以缓和、改善、稳定、逆转或减慢疾病进展,或者以其他方式减轻疾病的病理后果的量。在任何情况下,有效量可以以单剂量或分次剂量给予。

[0087] 本文所用的术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”至少涵盖与患者的疾病相关联的症状的改善,其中改善在广义上用于指至少参数(例如,与所治疗的疾病或病症相关联的症状)量级的降低。因此,“治疗(treatment)”还包括疾病、疾患或病理状况、或者至少与之相关联的症状被完全抑制(例如,阻止发生)或停止(例如,终止),使得患者不再患有所述病症,或至少表征所述病症的症状。

[0088] 如本文所用的并且除非另外指明,否则术语“预防(prevent)”、预防(preventing)和预防(prevention)是指预防疾病或病症或者其一种或多种症状的发作、复发或传播。在某些实施方式中,术语是指在症状发作之前,特别是针对具有本文提供的疾病或疾患的风险的受试者,在具有或不具有一种或多种其他额外的活性剂的情况下,用本文提供的化合物或剂型治疗或者给药本文提供的化合物或剂型。此术语涵盖抑制或减轻特定疾病的症

状。在某些实施方式中,具有家族病史的受试者是预防方案的潜在候选者。在某些实施方式中,具有复发病史的受试者也是预防方案的潜在候选者。在这方面,术语“预防(prevention)”可以与术语“预防性治疗(prophylactic treatment)”互换使用。

[0089] 如本文所用并且除非另外指明,否则化合物的“预防有效量”是足以预防疾病或疾患或者防止其复发的量。化合物的预防有效量意指单独的或者与一种或多种其他剂组合使用的治疗剂的量,其在疾病的预防中提供预防益处。术语“预防有效量”可以涵盖改善总体预防或增强其他预防剂的预防功效的量。

[0090] 如本文所用并且除非另外指明,否则术语“受试者”在本文中被定义为包括动物,诸如哺乳动物,包括但不限于灵长类动物(例如人)、牛、绵羊、山羊、马、狗、猫、兔子、大鼠、小鼠等。在具体实施方式中,受试者是人。在本文中提到的例如哺乳动物受试者(诸如人)时,术语“受试者”和“患者”可以互换使用。

[0091] 实施例

[0092] 实验1-So1MM产生和表征

[0093] 心肌基质(MM)的制剂可以基于先前描述的方案生成(图1)[3]。简言之,从猪(约30-45kg)收获新鲜的心脏,并将LV心肌分离。去除大血管和结缔组织,并将其余组织切成小于 5mm^3 的碎片(图1A)。将组织在1% (w/v) 十二烷基硫酸钠(SDS)中脱细胞4-5天,直到组织完全变白,紧接着用水冲洗额外的一天以去除残留的SDS(图1B)。将材料冻干并研磨成细粉(图1C),以及随后部分地酶促消化48小时。然后将材料中和并缓冲以匹配体内条件,生产能够热诱导凝胶作用的MM(图1D)。

[0094] 接下来,将MM在 4°C 下以15,000RCF离心以分离可溶性和不溶性级分(图1E)。将上清液与不溶性团块分离,并且将此上清液称为可溶性MM级分(So1MM)。然后将So1MM渗析并冻干以调节盐的浓度和比率,以为So1MM维持生理条件。然后将So1MM以高浓度(16mg/mL)重新悬浮,通过 $0.22\mu\text{m}$ 过滤器进入无菌容器中,冻干、称重并在 -80°C 下储存直至需要。然后在注射之前约30分钟,将So1MM在无菌水中重新悬浮至适当的浓度。这种悬浮液在皮下注射到大鼠后5分钟内即可形成凝胶(图1F, 10mg/mL, $500\mu\text{L}$)。可以通过以下来评估材料的一致性:用于蛋白质分布的聚丙烯酰胺凝胶电泳、用于DNA含量的Picogreen测定、用于硫酸化糖胺聚糖(sGAG)含量的二甲基亚甲基蓝测定以及用于SDS含量的亚甲基蓝测定。由于生成MM和得到的So1MM的消化过程,因此无法从质谱仪中获得精确的数据。但是,PAGE示出MM与So1MM之间的蛋白质重叠分布,排他性包括So1MM中的高分子量蛋白质(图2,泳道4)。

[0095] 实验2-So1MM与人血液的血液相容性

[0096] 在So1MM与全人血或富含血小板的血浆的不同稀释度(1:1、1:2、1:10)下,评估了So1MM与人血液样品($n=4$)之间的相互作用。基于冠状动脉脉管系统的体积流速和预期的输注速率($1\text{mL}/\text{min}$),1:1表示血液与So1MM之间的最高可能比率,而1:10表示生理上相关的稀释。如先前针对MM所述评估血液相容性[4]。用自体血浆将血细胞比容调节至45%之后,将在取样的4小时内Myrenne聚集仪(Myrenne GmbH)上进行红细胞聚集。在停滞(M0)或低剪切速率(3Hz;M1)之后评估聚集,同时测量吸光度(800nm)5秒。类似地,血小板聚集是用在lumi-聚集仪(Chrono-log)上分离的富含血小板的血浆来测量的。使用与以上样品与富含血小板的血浆的稀释度相同的稀释度,添加高浓度凝血级联激动剂(腺苷二磷酸、肾上腺素和胶原)(1:200-1:1000稀释),并通过吸光度(600-620nm)测量血小板聚集。

[0097] 来自1:1以及1:10稀释度(材料比人血液)的结果表明So1MM具有血液相容性,因为所有值均在正常生理范围内(表1)。

[0098] 表1

	标准范围	盐水对照	1:1 可溶性基质	1:10 可溶性基质
凝血时间(s)	20-36	24 ± 3	33 ± 3	26 ± 2
血纤蛋白原(mg/dl)	100-200	163 ± 25	154 ± 20	161 ± 14
血小板($10^3/\text{mm}^3$)	100-200	145 ± 21	174 ± 13	146 ± 25
血小板聚集				
ADP 3 mM (%)	60-80	64 ± 3	75 ± 4	67 ± 2
ADP 1 mM (%)	60-80	71 ± 2	77 ± 1	75 ± 3
肾上腺素(%)	60-80	67 ± 4	73 ± 2	75 ± 3
胶原(%)	60-80	73 ± 5	76 ± 5	81 ± 4

[0099]

[0100] 表1示出了可溶性基质的血液相容性。10mg/ml可溶性基质与人血的1:1稀释度表示最高比率,而1:10稀释度(1mg/ml)则表示生理上相关的稀释度。

[0101] 实验3-小动物缺血再灌注模型中的分布、保留和功效

[0102] 使用MI的Sprague Dawley大鼠(225-250g)缺血-再灌注模型,将左冠状动脉闭塞45分钟,紧接着再灌注。在再灌注后5分钟内,将主动脉夹住约15秒以模拟冠状动脉内输注,以及将200 μ l的So1MM以6、10或14mg/mL的浓度注射至LV腔内。这将迫使材料进入冠状动脉,然后分布到梗死的心肌中[12]。注射后60分钟将心脏(n=2/浓度)分离以确定该材料是否首先分布,以及然后保留在心脏中,因为非胶凝性材料在一小时内从心脏清除[5]。将So1MM与Alexa Fluor™ 568N-羟基琥珀酰亚胺基酯(Invitrogen)缀合以允许荧光检测和分析。在注射后6、12、24小时、2、3、4和5天以及1周的时间点(n=2-3/时间点)以最佳浓度测试材料的保留以评估降解。将盐水(n=3/时间点)与未缀合的Alexa Fluor™ 568混合以作为对照。将心脏新鲜冷冻在OCT Tissue-Tek化合物中,以及将短轴切成16个均匀间隔的区域(区域之间约300 μ m),4个载玻片/区域,一式两份,10 μ m/切片。使用一个载玻片/区域进行H&E以确认梗死,以及使用一个载玻片/区域进行So1MM的荧光分析。

[0103] 使用6、10和14mg/mL的浓度注射后1小时(n=2/组),梗死区域中的分布随浓度增加而增加,如由预先标记的凝胶分布越多,则梗死区域的强度(在图2中示出10mg/mL)越增加所表明的;然而,基于So1MM产生的产量,10mg/mL将用于将来的实验。基于实验1中提到的过滤步骤,产量特别地受限制,因为将So1MM以16mg/mL重新悬浮以及随后过滤,得到约10mg/mL的浓度。高于16mg/mL的重新悬浮的浓度通常不会通过过滤器。

[0104] 基于时间历程组织学,在输注后最长达约3天之内在梗死的心脏中观察到材料。

[0105] 在大鼠缺血再灌注模型中,将左冠状动脉闭塞35分钟以模拟心肌梗死。然后对心脏再灌注,并使用主动脉交叉钳(aortic-cross clamp)模型通过冠状动脉输注可溶性基质。输注后24小时和5周使用磁共振成像对大鼠成像。左心室(LV)容积和射血分数在图5中示出。输注后二十四小时,与生理盐水输注的对照组相比,观察到LV容积(收缩末期和舒张末期)显著保留。射血分数示出比生理盐水对照增加的趋势。五周后,与盐水输注的对照组相比,基质输注的LV容积也显著减少,示出基质输注减轻了不良左心室重构。

[0106] 实验4:使用球囊输注导管的可输注的(infusible)细胞外基质在心肌梗死后修复

心脏。

[0107] 心肌梗死后,使用球囊输注导管通过心脏的血管(例如左前降支或左主干)输注细胞外基质,以进行靶向递送。图4示出了在使用球囊输注导管的猪缺血-再灌注模型中,在冠状动脉内输注1小时后的可溶性心肌基质(So1MM)的分布和保留。图4左侧示出了梗死的猪心脏的短轴总体组织学。以蓝色灰度概括梗死。图4右侧示出了梗塞的心肌,在红色灰度通道中显示了贯穿梗死的心肌的So1MM微凝胶。

[0108] 盲的组织病理学家估计了附属器官(Satellite organs)(脑、肾、肝、肺、脾),并且在基质输注后1小时未示出缺血或炎症的任何异常迹象(表2)。在任何附属器官中均未观察到可溶性基质凝胶,表明可输注的基质对缺血性组织的靶向能力。

[0109] 表2

PI Lab 动物 ID/载玻片编号	组织	正常/ 异常/自体分解
[0110] P050	脑	N
	肾	N
	肝	N
	肺	N
	脾	N
P057	脑	N
	肾	N
	肝	N
	肺	N
	脾	N

[0111] 表2示出了在猪缺血-再灌注模型中,冠状动脉内可溶性基质输注未示出附属器官(脑、肾、肝、肺和脾)中的缺血或炎症的异常迹象。

[0112] 实验5:可输注的基质可以用作支架,以促进缺血性或损伤的组织中的血管生成。

[0113] 图6示出了在心肌梗死模型中在基质输注后梗死的小动脉密度的增加。在大鼠缺血-再灌注模型中在输注后5周对梗死成像。通过共同染色 α -平滑肌肌动蛋白和同工凝集素(isolectin)识别小动脉,并在ImageJ中手动追踪。血管生成途径的上调在图6中示出。

[0114] 实验6:可输注的基质可用作支架,以减少细胞凋亡或缺血性或损伤的组织的坏死。

[0115] 图7示出了在心肌梗死模型中在基质输注后心肌细胞细胞凋亡减少。用 α -辅肌动蛋白染色心肌细胞的梗死和梗死的边缘区,以及用切割的胱天蛋白酶3染色细胞凋亡。在ImageJ中对凋亡的心肌细胞进行手动计数。减少的细胞凋亡可以扩展到其他细胞类型,但不限于内皮细胞、免疫细胞、成纤维细胞、神经元以及(心)肌细胞。减少的细胞凋亡/坏死途径在图9中示出。减少的细胞凋亡可以通过增加的活性氧(ROS)代谢来解释,如上调的ROS代谢途径在图8中示出。

[0116] 图8和9示出了差别的基因表达,表明了用于修复可输注的细胞外基质治疗的途径。在基质输注和缺血-再灌注损伤后的第1天和第3天,从左心室游离壁组织分离RNA。在第1天,血管生成和活性氧代谢途径被上调。在第3天,观察到减少的细胞凋亡/坏死以及减少的纤维化途径。LRG1下调牵涉心脏纤维化,并且在相反的方向上观察到趋势。盐水输注用作

对照。

[0117] 实验7:基质输注可以治疗内皮细胞损伤/功能障碍。可溶性基质可以覆盖内皮细胞以减少活性氧损伤、增加内皮细胞的存活率和/或填充缺血性损伤后渗漏的脉管系统间隙。

[0118] 缺血性损伤和基质输注后,观察到可溶性基质覆盖小血管(毛细血管/内皮细胞)的腔。图10示出了覆盖有可溶性基质(红色灰度)的内皮细胞(绿色灰度)腔。注意,基质不阻塞腔。另外,图11示出了在大血管中与内皮细胞重叠的可溶性基质,而没有阻塞腔。在输注和模拟心肌梗死后最长达24小时使用共聚焦显微镜对心脏成像。

[0119] 实验8:可输注的基质可以与药物、生长因子、微RNA或其他治疗剂共同递送

[0120] 可溶性细胞外基质组合物具有生长因子、微RNA和其他潜在药物或治疗剂的潜在的结合结构域。由于可输注的基质输注后在组织中形成凝胶,因此可以将它用于治疗的缓慢释放。

[0121] 图12示出了在缺血-再灌注模型中,基质输注后24小时在梗死组织中的可溶性ECM保留。从左至右,向心脏输注盐水、与w/VivoTag 750缀合的基质、与w/VivoTag750缀合的三赖氨酸以及w/VivoTag 750缀合的基质。输注后二十四小时,收获心脏并在Licor Odyssey上成像。与盐水输注的和三赖氨酸输注的心脏相比,基质输注的心脏示出更强的信号强度。具有VivoTag 750的三赖氨酸用作小肽对照,并且未示出可看到的保留。

[0122] 图13示出了可溶性基质水凝胶的纳米纤维架构。将10mg/ml的预凝胶溶液皮下注射到大鼠的背部,其然后形成凝胶,以及将其收获用于扫描电子显微镜成像。凝胶结构让人联想到天然的细胞外基质。

[0123] 实验9:动态光散射分析示出MM与SolMM之间的差异。

[0124] 图14示出了1:50稀释度(分别为1.0mg/ml和0.6mg/ml)的可溶性基质(SolMM)和完全基质(MM)的动态光散射数据,示出了直径小于100nm的可溶性基质颗粒,而完全基质具有更大的颗粒。

[0125] 图15示出了可溶性基质(SolMM)在1:10和1:100稀释度(分别为1.0mg/ml和0.1mg/ml)下的动态光散射数据,示出了直径小于100nm的颗粒。

[0126] 图16示出了盐水、可溶性基质(SolMM)和完全基质(MM)的吸光度(左)和透射率(右)。

[0127] 图17示出了可溶性基质(SolMM)和完全基质(MM)的相对吸光度(左)和透射率(右)。

[0128] 参考文献

[0129] [1] Benjamin等人,美国心脏协会统计资料(American Heart Association Statistics),O.b.o.t.A.H.A.S.C.中风统计小组委员会(Stroke Statistics Subcommittee),S.中风,心脏病和中风统计资料-2017更新(Heart Disease and Stroke Statistics-2017Update):来自美国心脏协会的报告,发行(Circulation) 135(10)(2017) e146-e603。

[0130] [2] Singelyn等人,天然来源的心肌基质作为用于心脏组织工程的可注射支架(Naturally derived myocardial matrix as an injectable scaffold for cardiac tissue engineering),生物材料(Biomaterials) 30(29)(2009) 5409-16。

[0131] [3]Singelyn等人,源自脱细胞的心室细胞外基质的可导管递送的水凝胶增加内源性心肌细胞并保存心肌梗死后的心脏功能(Catheter-deliverable hydrogel derived from decellularized ventricular extracellular matrix increases endogenous cardiomyocytes and preserves cardiac function post-myocardial infarction),美国心脏病学会杂志59(8)(2012)751-63。

[0132] [4]Seif-Naraghi等人,用于治疗心肌梗死的可注射的细胞外基质水凝胶的安全性和功效(Safety and efficacy of an injectable extracellular matrix hydrogel for treating myocardial infarction),科学转化医学(Science translational medicine)5(173)(2013)173ra25。

[0133] [5]Nguyen等人,心肌梗死之后用于心脏组织中的靶点累积和延长保留的酶促响应纳米颗粒(Enzyme-Responsive Nanoparticles for Targeted Accumulation and Prolonged Retention in Heart Tissue after Myocardial Infarction),先进材料(Advanced Materials)27(37)(2015)5547-5552。

[0134] [6]Wassenaar等人,心肌基质水凝胶对在MI后治疗的功能益处的潜在机制的证据(Evidence for mechanisms underlying the functional benefits of a myocardial matrix hydrogel for post-MI treatment),美国心脏病学会杂志67(9)(2016)1074-86。

[0135] [7]Schuster等人,透壁性心肌梗死的扩张:心脏破裂的病理生理因素(Expansion of transmural myocardial infarction:a pathophysiologic factor in cardiac rupture),发行60(7)(1979)1532-1538。

[0136] [8]Arsenos等人,心律失常性心脏性猝死:用于心肌梗死后的患者的底物、机制和当前风险分层策略(Arrhythmic sudden cardiac death:substrate,mechanisms and current risk stratification strategies for the post-myocardial infarction patient),心脏病学希腊杂志(Hellenic JCardiol)54(4)(2013)301-315。

[0137] [9]Leor等人,猪心肌梗死之后冠状动脉内注射原位形成褐藻胶水凝胶逆转左心室重构(Intracoronary Injection of In Situ Forming Alginate Hydrogel Reverses Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction in Swine),美国心脏病学会杂志54(11)(2009)1014-1023。

[0138] [10]Frey等人,冠状动脉内递送可注射的可生物吸收支架(IK-5001)以治疗ST抬高性心肌梗死之后的左心室重构:首次人研究(Intracoronary delivery of injectable bioabsorbable scaffold(IK-5001) to treat left ventricular remodeling after ST-elevation myocardial infarction:Afirst-in-man study),发行:心血管介入(Cardiovascular Interventions)7(6)(2014)806-812。

[0139] [11]Spang等人,细胞外基质水凝胶疗法:体内应用与开发(Extracellular matrix hydrogel therapies:In vivo applications and development),生物材料学报(Acta Biomater)68(2018)1-14。

[0140] [12]Cheng等人,在缺血/再灌注的大鼠模型中,在冠状动脉内递送源自心脏的干细胞后磁性增强细胞保留、植入和功能益处(Magnetic enhancement of cell retention, engraftment,and functional benefit after intracoronary delivery of cardiac-derived stem cells in a rat model of ischemia/reperfusion),细胞移植(Cell

transplantation) 21 (6) (2012) 1121-35。

[0141] [13]Rane等人,通过生物惰性材料增加的梗死壁厚不足以防止心肌梗死后的不良左心室重构 (Increased infarct wall thickness by a bio-inert material is insufficient to prevent negative left ventricular remodeling after myocardial infarction),科学公共图书馆综合 (PloS one) 6 (6) (2011) e21571。

[0142] [14]Conesa等人,用于RNA-seq数据分析的最佳实践的调查 (A survey of best practices for RNA-seq data analysis),基因组生物学 (Genome biology) 17 (2016) 13-13。

[0143] [15]Costa-Silva等人, RNA-Seq 差异表达分析: 扩展的综述和软件工具 (RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool), 科学公共图书馆综合 (PLOS ONE) 12 (12) (2017) e0190152-e0190152。

[0144] [16]Wang等人,用于评估人对异种和同种异体脱细胞的生物材料的免疫响应的人源化小鼠模型 (Humanized mouse model for assessing the human immune response to xenogeneic and allogeneic decellularized biomaterials),生物材料 129 (2017) 98-110。

[0145] [17]Sonnenberg等人,递送在源自细胞外基质的水凝胶中的工程化的HGF片段防止心肌梗死后的不良左心室重构 (Delivery of an engineered HGF fragment in an extracellular matrix-derived hydrogel prevents negative LV remodeling post-myocardial infarction),生物材料 45 (2015) 56-63。

[0146] [18]Seif-Naraghi等人,源自可注射的细胞外基质的水凝胶为增强肝素结合生长因子的保留和递送提供了平台 (Injectable extracellular matrix derived hydrogel provides a platform for enhanced retention and delivery of a heparin-binding growth factor),生物材料学报 8 (10) (2012) 3695-703。

[0147] [19]van den Akker等人,心肌内干细胞注射: 伴随流动 (Intramyocardial stem cell injection: go (ne) with the flow),欧洲心脏病学杂志 (European heart journal) (2016) ehw056-ehw056。

[0148] [20]Wassenaar等人,调节可注射细胞外基质水凝胶的体内降解速率 (Modulating in vivo degradation rate of injectable extracellular matrix hydrogels),材料化学杂志 B (J. Mater. Chem. B.) 4 (16) (2016) 2794-2802。

[0149] [21]Grover等人,用于组织工程的心肌基质-聚乙二醇杂化水凝胶 (Myocardial matrix-polyethylene glycol hybrid hydrogels for tissue engineering),纳米技术 (Nanotech.) 25 (1) (2014) 014011。

[0150] [22]Gallet等人,由源自心球的细胞分泌的外泌体减弱疤痕、减轻不利重构并改善急性和慢性猪心肌梗死的功能 (Exosomes secreted by cardiosphere-derived cells reduce scarring, attenuate adverse remodelling, and improve function in acute and chronic porcine myocardial infarction),欧洲心脏病学杂志 38 (3) (2016) ehw240-ehw240。

[0151] [23]Dawn等人,血管内递送的心脏干细胞穿过血管屏障使梗死的心肌再生并改善心脏功能 (Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel

barrier,regenerate infarcted myocardium,and improve cardiac function),美国国家科学院院刊(Proceedings of the National Academy of Sciences)102(10)(2005)3766-3771。

[0152] [24]Gallet等人,自我组装的源自心脏微组织(心球)的冠状动脉内给药防止在恢复期心肌梗死的猪模型中产生不利重构(Intracoronary delivery of self-assembling heart-derived microtissues (cardiospheres) for prevention of adverse remodeling in a pig model of convalescent myocardial infarction),循环心血管介入(Circ Cardiovasc Interv.) 8(5).(2015) e002391. doi:10.1161/CIRCINTERVENTIONS.115.002391-e002391. doi:10.1161/CIRCINTERVENTIONS.115.002391。

[0153] [25]Bollli等人,在慢性缺血性心肌病的猪模型中,冠状动脉内递送自体心脏干细胞改善心脏功能(Intracoronary Delivery of Autologous Cardiac Stem Cells Improves Cardiac Function in a Porcine Model of Chronic Ischemic Cardiomyopathy),发行128(2)(2013)122-131。

[0154] [26]McKay、Raymond G.等人,“心肌梗死之后的左心室重构:梗死扩张的必然结果(Left ventricular remodeling after myocardial infarction:a corollary to infarct expansion)”,发行74,no.4(1986):693-702。

[0155] [27]Harpster、Mark H.等人,“心肌梗死后的左心室转录组的最早变化(Earliest changes in the left ventricular transcriptome post-myocardial infarction)”,哺乳动物基因组(Mammalian genome)17,no.7(2006):701-715。

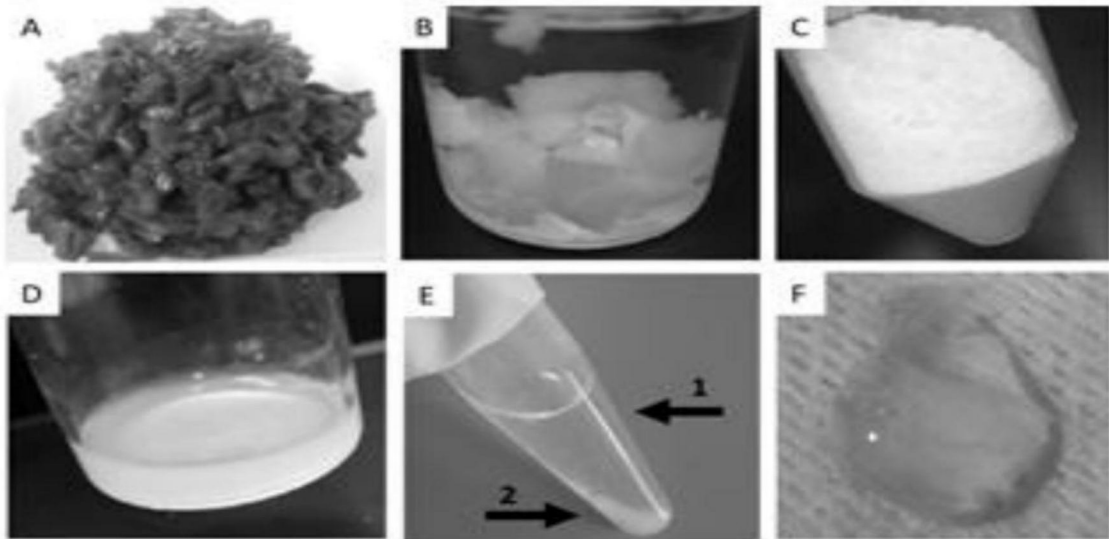


图1A-1F

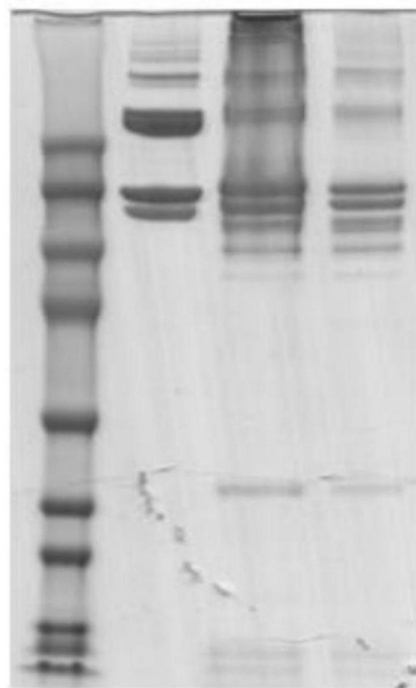


图2

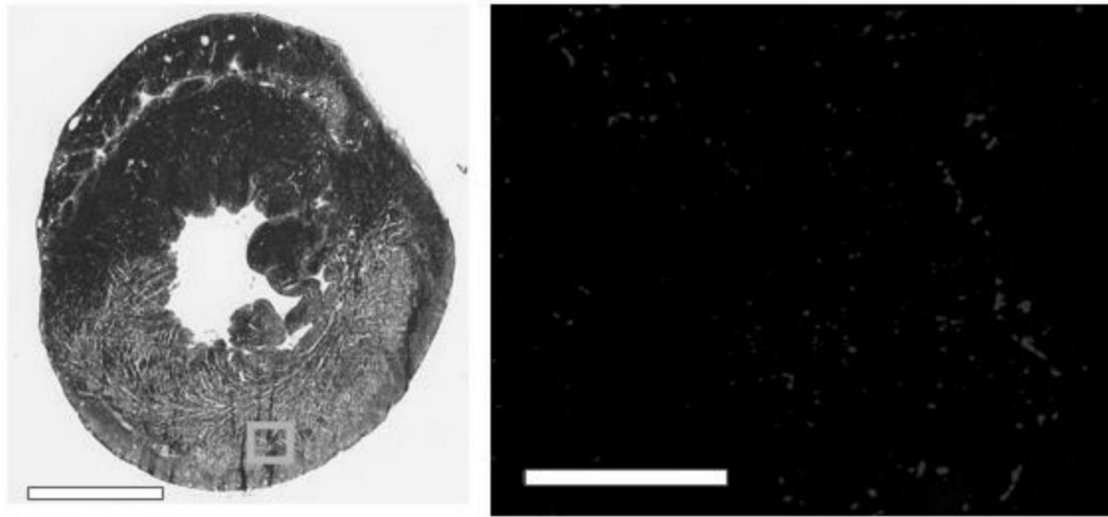


图3

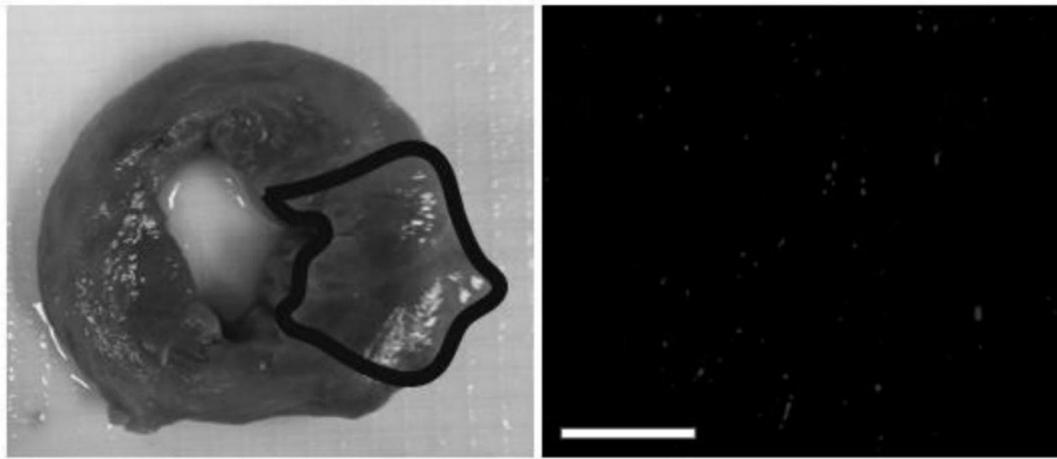


图4

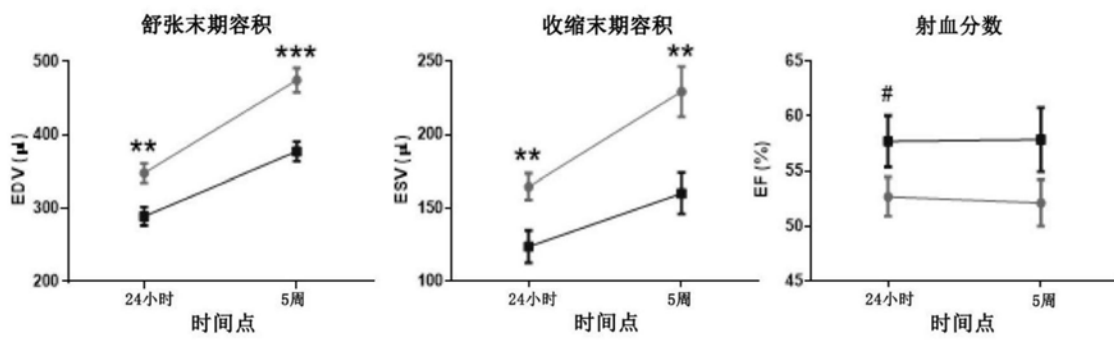


图5

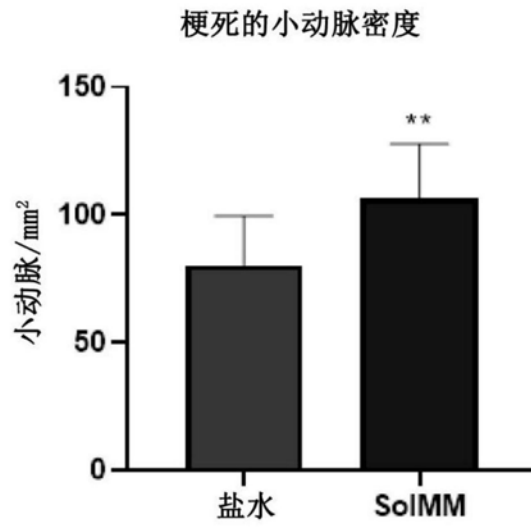


图6

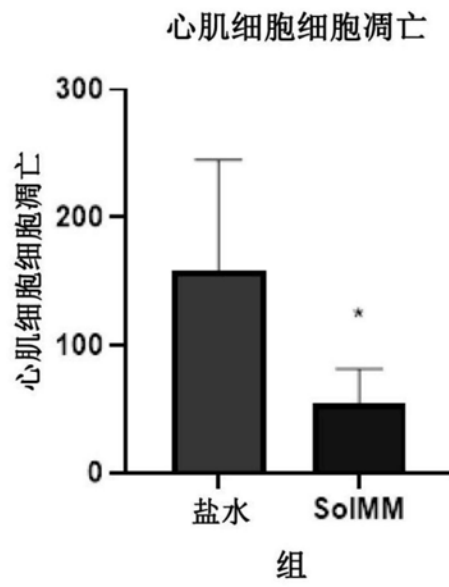


图7

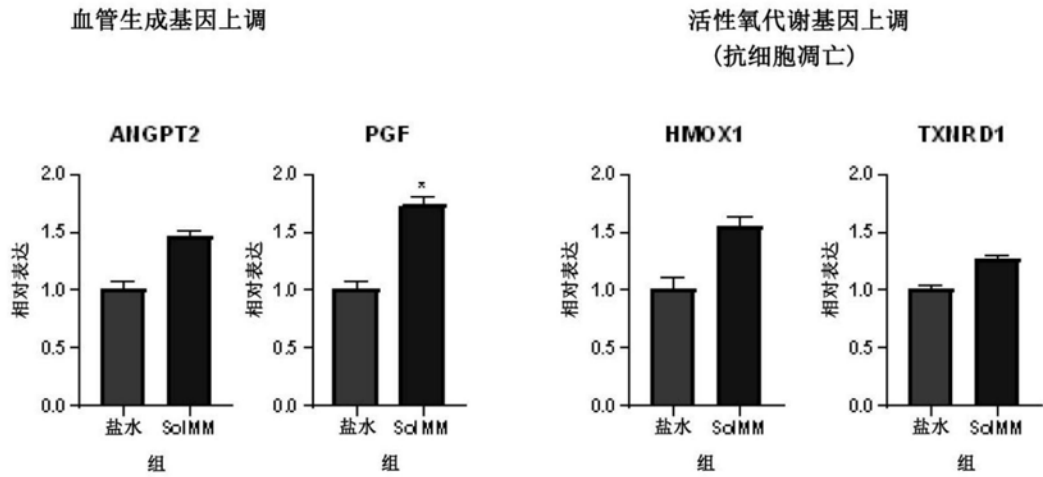


图8

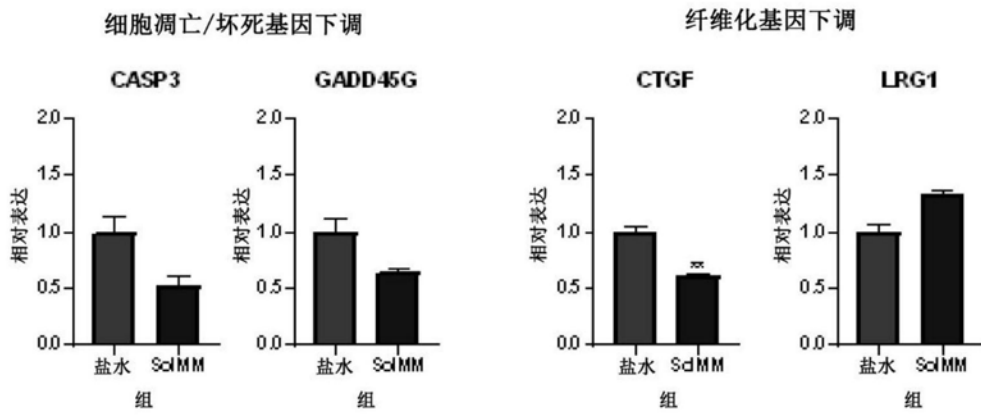


图9

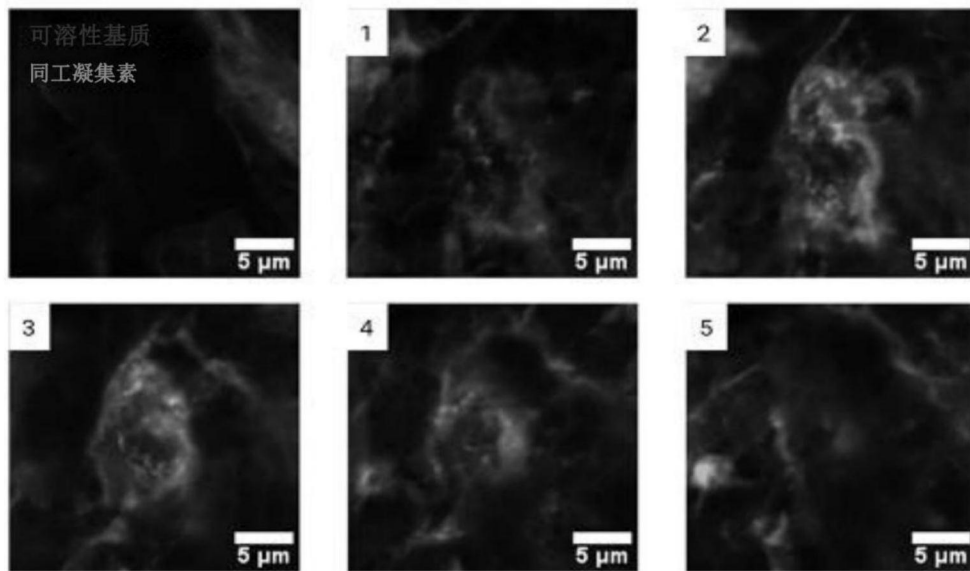


图10

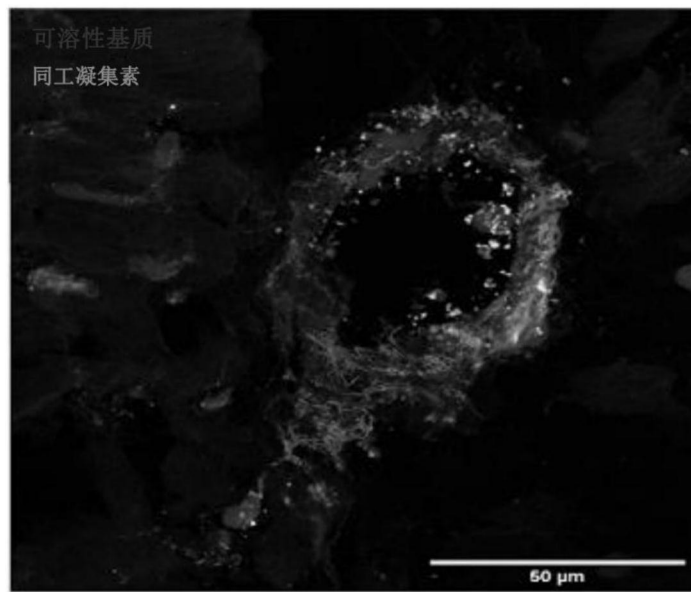


图11

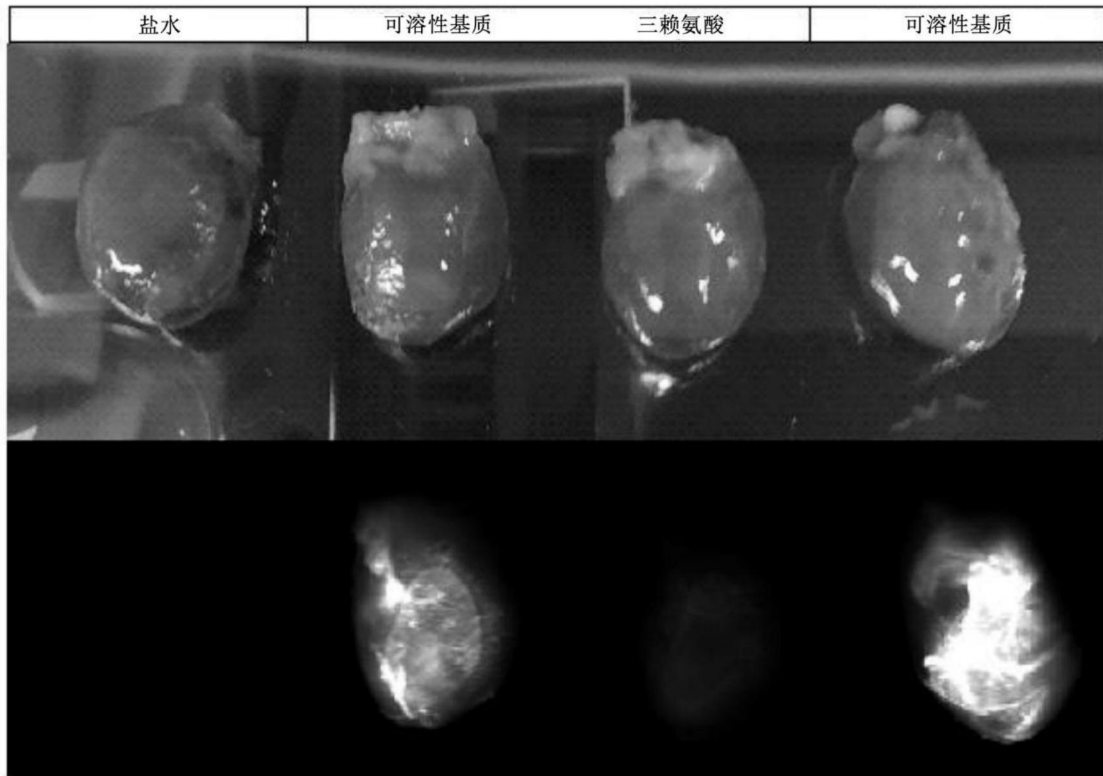


图12

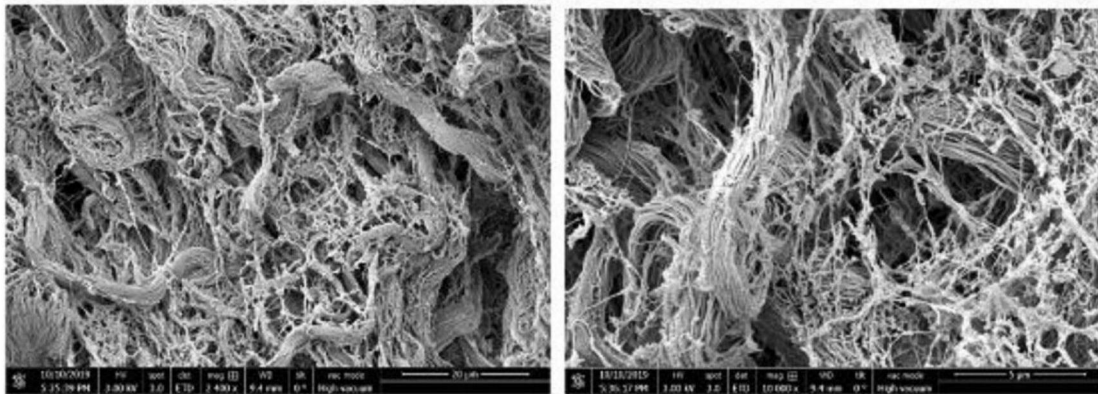


图13

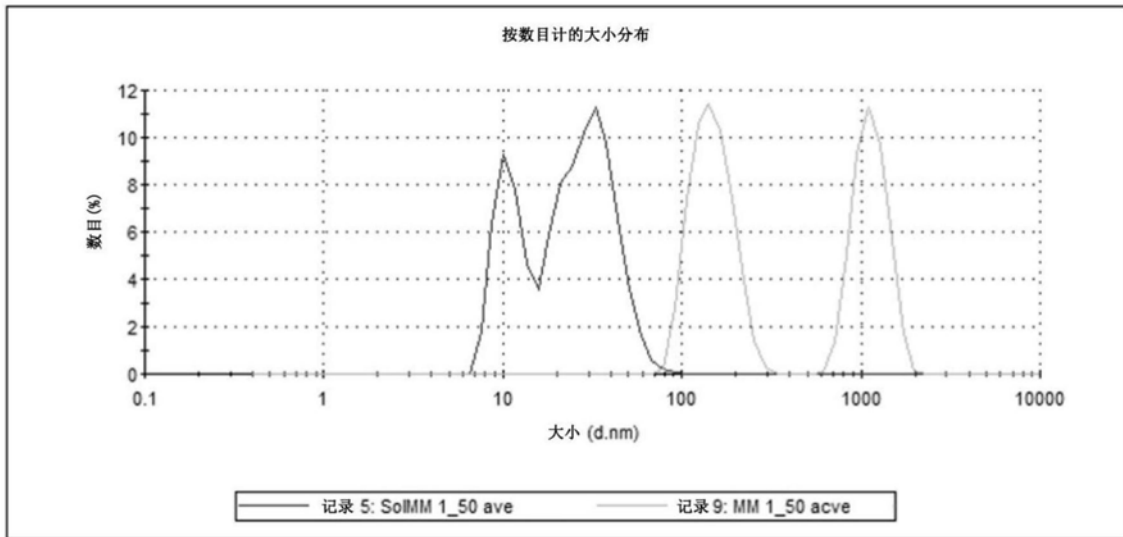


图14

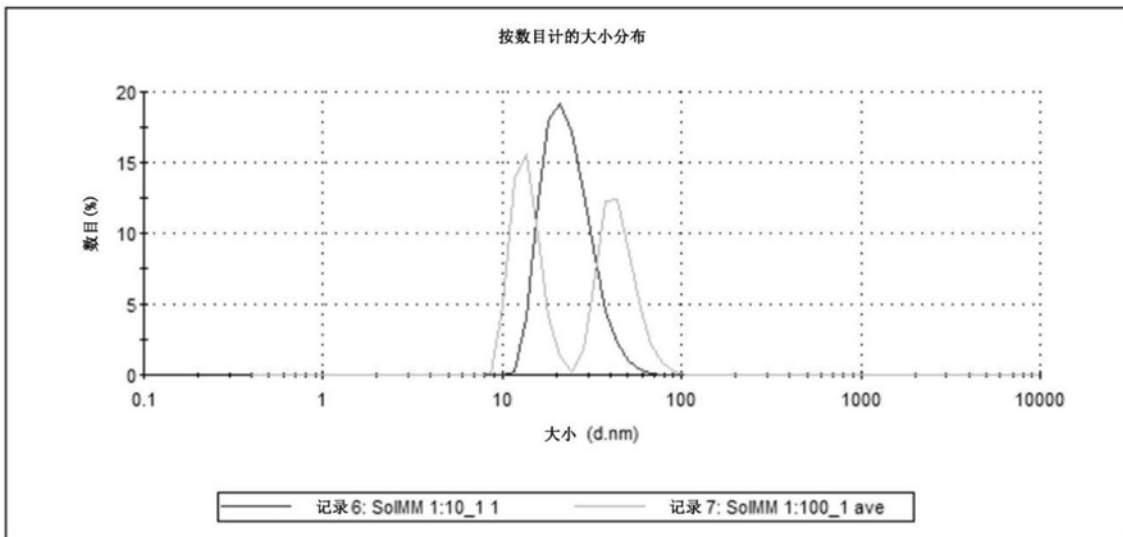


图15

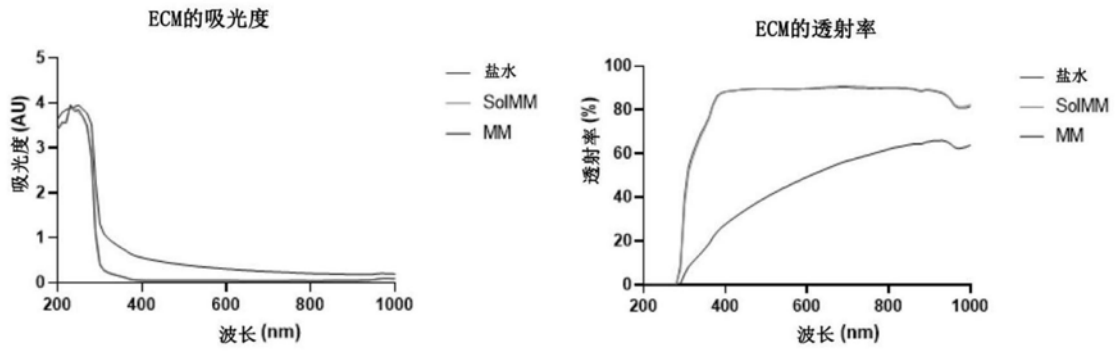


图16

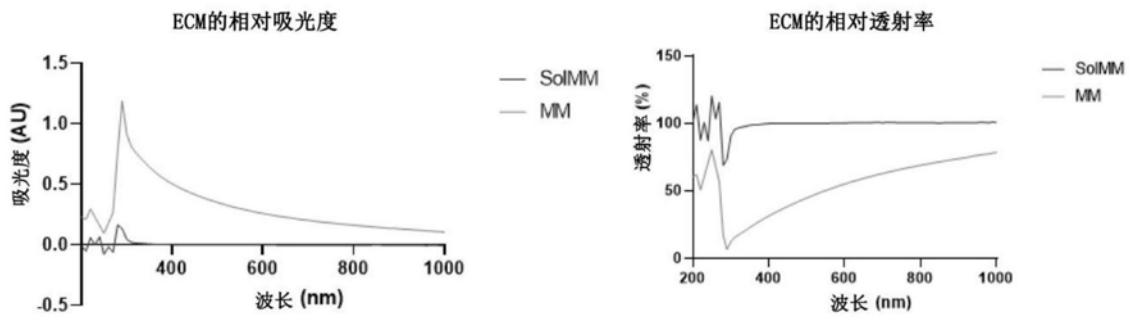


图17