



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119072301 A

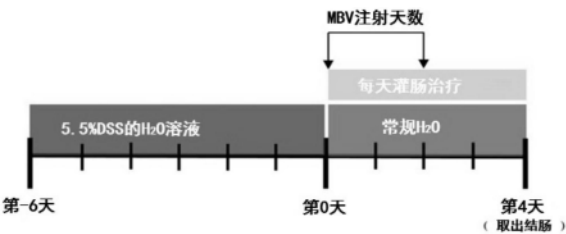
(43) 申请公布日 2024. 12. 03

(21) 申请号 202380032308.1  
(22) 申请日 2023.04.07  
(30) 优先权数据  
63/329,319 2022.04.08 US  
(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2024.09.30  
(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2023/065525 2023.04.07  
(87) PCT国际申请的公布数据  
W02023/196970 EN 2023.10.12  
(71) 申请人 联邦高等教育系统匹兹堡大学  
地址 美国宾夕法尼亚州  
(72) 发明人 S·F·巴迪拉克 G·S·赫西  
(74) 专利代理机构 北京华睿卓成知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11436  
专利代理师 程淼 刘海  
(51) Int.Cl.  
A61K 9/06 (2006.01)  
A61K 9/51 (2006.01)  
A61K 35/12 (2015.01)  
A61K 35/22 (2015.01)  
A61K 35/36 (2015.01)  
A61K 35/38 (2015.01)  
A61P 1/04 (2006.01)  
A61L 27/36 (2006.01)  
A61L 27/52 (2006.01)

权利要求书3页 说明书52页  
序列表(电子公布) 附图17页

(54) 发明名称  
包封在水凝胶中的基质结合纳米囊泡

(57) 摘要  
本文公开了包括细胞外基质(ECM)水凝胶和基质结合纳米囊泡(MBV)的组合物。这些组合物提供协同作用并且可用于治疗受试者。



1. 一种包含细胞外基质 (ECM) 水凝胶的组合物, 所述细胞外基质 (ECM) 水凝胶包含:
  - a) 溶解的细胞外基质 (ECM); 和
  - b) 衍生自细胞外基质的外源性基质结合纳米囊泡 (MBV), 其中所述MBV不表达CD63和CD81或是CD63<sup>10</sup>CD81<sup>10</sup>, 并且其中所述MBV不含碱性磷酸酶,  
其中所述外源性MBV在所述ECM水凝胶中存在的浓度为至少约 $1 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^{20}$ 颗粒/mL, 并且其中所述组合物:
    - i) 是剪切致稀的;
    - ii) 在37°C下储能模量 ( $G'$ ) 为约50Pa至约200Pa, 且损耗模量 ( $G''$ ) 为约5Pa至约20Pa, 且 $G'$ 与 $G''$ 比率为约4:1至约15:1, 以及
    - iii) 在24小时至14天的降解率为50%。
2. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述ECM水凝胶是声学水凝胶。
3. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述ECM水凝胶是酶促水凝胶。
4. 一种组合物, 包含:  
酸性溶液, 包含外源性酸性蛋白酶和溶解的细胞外基质; 和  
衍生自细胞外基质的外源性MBV, 其中所述MBV不表达CD63和CD81或是CD63<sup>10</sup>CD81<sup>10</sup>, 并且其中所述MBV不含碱性磷酸酶,  
其中所述外源性MBV在所述组合物中存在的浓度为至少约 $1 \times 10^5$ 至约 $1 \times 10^{20}$ 颗粒/mL, 其中当所述酸性溶液中和至pH为约7.0至约7.8时, 在温度高于25°C下形成凝胶。
5. 一种组合物, 包含:  
溶解的细胞外基质;  
失活的外源性酸性蛋白酶;  
衍生自细胞外基质的外源性MBV, 其中所述MBV不表达CD63和CD81或是CD63<sup>10</sup>CD81<sup>10</sup>, 并且其中所述MBV不含碱性磷酸酶,  
其中所述外源性MBV在所述组合物中存在的浓度为至少约 $1 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^{20}$ 颗粒/mL, 其中所述组合物在温度低于25°C下进入液相, 并在温度高于25°C下进入凝胶相;  
其中所述组合物的pH在约7和约7.8之间。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的组合物, 还包含粉碎的ECM。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的组合物, 其中所述外源性MBV在所述组合物中存在的浓度为约 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^7$ 。
8. 根据权利要求1-3或6-7中任一项所述的组合物, 其中所述溶解的ECM在所述ECM水凝胶中的存在量为1mg/mL至500mg/mL。
9. 根据权利要求4-7所述的组合物, 其中所述溶解的ECM在所述组合物中的存在量为1mg/mL至500mg/mL。
10. 根据权利要求9所述的组合物, 其中所述溶解的ECM的存在量为5mg/mL至50mg/mL。
11. 根据权利要求1-10中任一项所述的组合物, 其中所述ECM水凝胶或溶解的ECM包含完好无损的ECM。
12. 根据权利要求1-11中任一项所述的组合物, 其中所述MBV衍生自膀胱、小肠、心脏、真皮、肝脏、肾脏、子宫、大脑、血管、肺、骨骼、肌肉、胰腺、胎盘、胃、脾脏、结肠、脂肪组织或食道的细胞外基质。

13. 根据权利要求1-11中任一项所述的组合物,其中所述MBV并非衍生自骨骼ECM或心脏ECM。

14. 根据权利要求1-11中任一项所述的组合物,其中所述MBV衍生自膀胱、小肠、真皮、肝脏、肾脏、子宫、大脑、血管、肺、肌肉、胰腺、胎盘、胃、脾脏、结肠、脂肪组织或食道的细胞外基质。

15. 根据权利要求1-11中任一项所述的组合物,其中所述MBV衍生自膀胱基质(UBM)、小肠黏膜下层(SIS)或膀胱黏膜下层(UBS)。

16. 根据权利要求1-15中任一项所述的组合物,其中所述MBV衍生自哺乳类脊椎动物的细胞外基质,所述哺乳类脊椎动物选自人类、猴、猪、牛或羊。

17. 根据权利要求1-16中任一项所述的组合物,其中所述ECM水凝胶衍生自膀胱、小肠、心脏、真皮、肝脏、肾脏、子宫、大脑、血管、肺、骨骼、肌肉、胰腺、胎盘、胃、脾脏、结肠、脂肪组织或食道的细胞外基质。

18. 根据权利要求1-16中任一项所述的组合物,其中所述ECM水凝胶衍生自膀胱基质(UBM)、小肠黏膜下层(SIS)或膀胱黏膜下层(UBS)。

19. 根据权利要求4-18中任一项所述的组合物,其中所述酸性蛋白酶为胃蛋白酶或胰蛋白酶,或它们的组合。

20. 根据权利要求5-19中任一项所述的组合物,其中所述组合物的pH为约7.2。

21. 根据权利要求5-19中任一项所述的组合物,其中所述组合物的pH范围为7.2至7.4。

22. 根据权利要求1-21中任一项所述的组合物,其中所述溶解的ECM在所述组合物中的存在量为10mg/mL与30mg/mL之间。

23. 根据权利要求1-22中任一项所述的组合物,其中所述外源性MBV在所述组合物中存在的浓度为a) 约 $1 \times 10^{12}$ 颗粒/mL; b) 约 $1 \times 10^{11}$ 颗粒/mL; c) 约 $1 \times 10^{10}$ 颗粒/mL; d) 约 $1 \times 10^9$ 颗粒/mL; 或约 $1 \times 10^8$ 至约 $1 \times 10^{11}$ 。

24. 根据权利要求1-23中任一项所述的组合物,其配制用于局部施用或配制成灌肠剂进行施用。

25. 一种用于治疗患有炎症性肠病的受试者的方法,包含:

向所述受试者施用有效量的权利要求1-23中任一项所述的组合物,从而治疗所述受试者的炎症性肠病。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中通过灌肠将所述组合物施用到所述受试者的肠道中。

27. 根据权利要求25所述的方法,其中所述组合物是口服施用的。

28. 根据权利要求25-27中任一项所述的方法,其中所述方法减轻所述受试者结肠的炎症。

29. 根据权利要求25-28中任一项所述的方法,其中所述受试者患有溃疡性结肠炎。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述受试者的梅奥评分或溃疡性结肠炎疾病活动指数评分在施用所述组合物后降低。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中所述评分在自接受所述施用起的1个月、2个月、3个月或更长时间内降低。

32. 根据权利要求25-31中任一项所述的方法,其中所述受试者患有克罗恩病。

33.根据权利要求32所述的方法,其中所述受试者的克罗恩病活动指数评分在施用所述组合物后降低。

34.根据权利要求33所述的方法,其中所述克罗恩病活动指数评分在从接受所述组合物起的1个月、2个月、3个月或更长时间内降低。

35.一种用于治疗患有食道炎症的受试者的方法,包含:

向所述受试者的食道施用有效量的权利要求1-24中任一项所述的组合物,从而治疗所述受试者的食道炎症。

36.根据权利要求35所述的方法,其中所述组合物被局部施用到食道。

37.根据权利要求25-36中任一项所述的方法,其中所述受试者是人类。

38.根据权利要求25-34或37中任一项所述的方法,其中与受试者的肠道中的M1巨噬细胞相比,向所述受试者施用所述组合物增加了M2巨噬细胞的数量。

39.根据权利要求38所述的方法,其中所述受试者的肠道是所述受试者的结肠。

40.根据权利要求35-37中任一项所述的方法,其中与所述受试者食道中的M1巨噬细胞相比,向所述受试者施用所述组合物增加了M2巨噬细胞的数量。

## 封装在水凝胶中的基质结合纳米囊泡

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年4月8日提交的美国临时专利申请号63/329,319的优先权和权益,该申请通过全文引用的方式并入本文。

### 技术领域

[0003] 这涉及细胞外基质 (ECM) 组合物领域,具体是包括ECM水凝胶和基质结合纳米囊泡 (MBV) 的组合物,以及这些组合物的用途。

[0004] 电子序列表的引用

[0005] 电子序列表 (Sequences.xml; 大小:3,955字节; 创建日期:2023年4月6日) 通过全文引用的方式并入本文。

### 背景技术

[0006] 水凝胶由纯化的ECM组分 (例如胶原蛋白、透明质酸、丝素蛋白、层粘连蛋白和纤连蛋白) 组成,已广泛用于组织工程应用领域。然而,这些纯化的单组分ECM生物材料缺乏原生组织ECM的复杂生物化学特性。对整个组织或器官进行脱细胞处理提供了获取保留了原生组织ECM生物化学特性的ECM的替代方法。使用脱细胞ECM的一大进步是能够形成水凝胶,从而扩大了脱细胞ECM的临床适用性。然而,仍然需要增强ECM水凝胶的活性。

### 发明内容

[0007] 本文公开了包括ECM水凝胶和MBV的组合物。这些组合物提供协同作用,例如用于减少炎症的协同作用。

[0008] 在一些方面,公开了包括ECM水凝胶的组合物,所述ECM水凝胶包括a) 溶解的细胞外基质和b) 衍生自细胞外基质的外源性MBV,其中所述MBV不表达CD63和CD81或是CD63<sup>10</sup>CD81<sup>10</sup>,并且其中所述MBV不含碱性磷酸酶。所述外源性MBV在所述ECM水凝胶中存在的浓度为至少约 $1 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^{20}$ 颗粒/mL。所述组合物可以是:i) 剪切致稀的;ii) 在37°C下储能模量 ( $G'$ ) 为约50Pa至约200Pa,且损耗模量 ( $G''$ ) 为约5Pa至约20Pa并且 $G'$ 与 $G''$ 比率为约4:1至约15:1,以及iii) 24小时至14天的降解率为50%。

[0009] 在其他方面,公开了组合物,所述组合物包括:酸性溶液,包含外源性酸性蛋白酶和溶解的细胞外基质,例如完好无损的ECM;和衍生自细胞外基质的外源性MBV,其中所述MBV不表达CD63和CD81或是CD63<sup>10</sup>CD81<sup>10</sup>,并且其中所述MBV不含碱性磷酸酶。所述外源性MBV在所述组合物中存在的浓度为至少约 $1 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^{20}$ 颗粒/mL,当所述酸性溶液中和至pH为约7.0至约7.8时,在温度高于25°C下形成凝胶。

[0010] 在更多方面,公开了组合物,所述组合物包括溶解的细胞外基质,例如完好无损的ECM;钝化或失活的外源性酸性蛋白酶;和衍生自细胞外基质的外源性MBV。所述MBV不表达CD63和CD81或是CD63<sup>10</sup>CD81<sup>10</sup>,并且不含碱性磷酸酶。这些外源性MBV在所述组合物中存在的浓度为至少约 $1 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^{20}$ 颗粒/mL。所述组合物在温度低于25°C下进入液相,在温度

高于25℃下进入凝胶相,pH在约7至约7.8之间。所述ECM可能已经被酸性蛋白酶溶解。

[0011] 本发明的上述和其他特征和优势将根据下面参照附图对几个方面进行的详细描述变得显而易见。

## 附图说明

[0012] 图1提供了其中诱导研究动物的溃疡性结肠炎并提供治疗方案的研究的示意性概述。给予动物5.5%的DSS水6天,然后给予正常水至第4天。在第0天至第4天进行治疗,每天灌肠或是在第0天和第2天进行注射。在第4天从试验动物中取出结肠组织。

[0013] 图2A-2C的一系列照片示出了示例性灌肠递送准备和过程。图2A示出了用于执行灌肠的SURFLO®有翼输注导管和移除针头的切割位置。图2B示出了将所述针头从所述导管上切下,并制作两个标记(黑色箭头),一个在距离末端8cm处以确保灌肠深度的一致性,另一个在4cm处以确保在注射材料时均匀抽出所述导管。图2C的数字图像示出了如何将所述导管通过试验动物的肛门插入并进入结肠并缓慢递送5mL灌肠材料。

[0014] 图3提供了研究期间每天测量每只动物的食物消耗(右侧)和水消耗(左侧)的图。

[0015] 图4的图示出了研究期间动物初始体重分数。每天测量每只动物的体重,并将其归一化为所述动物在第-6天的初始体重。

[0016] 图5提供了每只动物每天得到的粪便硬度评分分数(左侧)和粪便血含量分数(右侧)的图。使用肉眼观察和COLOSCREEN®ES Lab Pack粪便隐血检测测定粪便血含量,并进行评分[0=无血,2=隐血,4=大出血]。对粪便硬度进行评分[0=正常,2=松软,4=腹泻]。通过将单个大鼠的评分归一化为第0天给出的评分来确定分数评分。

[0017] 图6提供的条形图是结肠长度(左侧)和取出的结肠的大体解剖评分(右侧)。对于左侧的条形图,在取出后测量每个结肠从盲肠到直肠的长度。与健康组相比,所有给予DSS的组结肠似乎都短。对于右侧的条形图,由盲法研究人员对取出的结肠进行溃疡和炎症的宏观证据评分。与患病对照相比,所有治疗组的评分都较低(病情较轻)。

[0018] 图7A-7G提供了对试验动物的H&E染色大鼠结肠组织切片进行组织学分析的图像,图7A-F中的图像提供了图7G中所示的较大组织样品切片的放大视图。图7A和7G(i)是健康动物的图像。图7B和7G(ii)是患病动物的图像。图7C和7G(vi)是接受MBV盐水灌肠的患病动物的图像。图7D和7G(iii)是接受ECM水凝胶灌肠的患病动物的图像。图7E和7G(v)是接受MBV注入的ECM水凝胶灌肠的患病动物的图像。图7F和7G(iv)是通过静脉注射接受MBV的患病动物的图像。

[0019] 图8A-8B对外泌体、骨骼微囊泡(MV)和MBV的表面标记物进行了比较。该图示出了EXO-CHECK™外泌体抗体试剂盒(System Biosciences)比较小鼠外泌体、小鼠骨骼基质囊泡(骨骼MV)和小鼠基质结合纳米囊泡(MBV)中所关注各种标记物水平的结果。图8A提供了所述试剂盒的数字图像,图8B的图示出了外泌体、骨骼MV与MBV中每个所关注标记物的相对表达。数据显示,基于表面标记物的概况(profile),MBV与外泌体、骨骼微囊泡(MV)不同。如下方平板图(panel)中的条形图所示,与骨骼MV或外泌体的这些标记物水平相比,MBV不表达或低表达CD63、EpCAM、ANXA5、TSG101、GM130、FLOT1、ICAM1、ALIX和CD81。

[0020] 图9的蛋白质印迹示出了骨骼MV标记物膜联蛋白V和组织非特异性碱性磷酸酶(TNAP)通过骨骼MV表达。将从1711A细胞制备的裂解物用作阳性对照。该实验的结果表明,

基质结合纳米囊泡 (MBV) 缺乏骨骼微囊泡标记物TNAP和膜联蛋白V的任何表达。血浆外泌体确实表达膜联蛋白V,但不表达TNAP。这些结果清楚地将MBV与外泌体和骨骼微囊泡区分开来。值得注意的是,所使用的MBV是从肌肉组织中分离出来的。

[0021] 图10的条形图示出了巨噬细胞激活的基因表达对外泌体、MV和MBV的不同影响。与没有这种作用的外泌体或骨骼MV相比,MBV具有不同的免疫调节作用,即它们增加M2巨噬细胞。从小鼠获取的骨髓衍生的巨噬细胞 (BMDM) 未经处理 (M0) 或用以下供试品处理24小时: IFN  $\gamma$  +LPS诱导M1表型 (M1)、IL-4诱导M2样表型 (M2)、衍生自血浆的外泌体、衍生自17A细胞的骨骼MV,或自肌肉分离的MBV。处理后,通过qPCR评估指定基因 (Arg、CD206、Fixx、IL-6、INOS和TNF) 表达的倍数变化。图10示出了MBV对促炎标记物IL-6和TNF- $\alpha$ 的下调明显有别于外泌体和骨骼MV对相同的两种炎症介质的下调。MBV具有强大的抗炎作用;而外泌体和骨骼MV没有这种作用。

[0022] 图11A-11E是表示每个治疗组结肠的组织学 (苏木精和伊红) 图像的高倍放大视图 (患病:图11A;ECM水凝胶灌肠:图11B;MBV+PBS灌肠:图11C;MBV注入的ECM水凝胶灌肠:图11D;双MV静脉注射:图11E)。这些代表了每组的结果。

[0023] 图12A-E的条形图示出了所处理样品以下各层中M2:M1巨噬细胞比率的量化情况:结肠 (图12A)、黏膜 (图12B)、肌层 (图12C) 和黏膜下层 (图12D)。在图12E中示出了每种处理的CD68+细胞的量化情况。

### 具体实施方式

[0024] MBV是所述ECM不可或缺的组分,不同于外泌体,并在临床前模型中有效地重定向过度炎症 (Hussey GS,et al. (2020) Lipidomics and RNA sequencing reveal a novel subpopulation of nanovesicle within extracellular matrix biomaterials. Sci Adv 6(12):eaay4361;van der Merwe Y,et al. (2019) Matrix-bound nanovesicles prevent ischemia-induced retinal ganglion cell axon degeneration and death and preserve visual function. Sci Rep 9(1):3482)。在某些方面,MBV含有免疫调节性miRNA、蛋白质和脂质,并被巨噬细胞迅速吸收,从而触发信号级联放大并调节表型转换所必需的基因表达,这一现象在基于ECM的生物材料背景下得到了充分的研究 (Hussey GS,et al. (2019) Matrix bound nanovesicle-associated IL-33 activates a pro-remodeling macrophage phenotype via a non-canonical, ST2-independent pathway. J Immunol Regen Med 3:26-35;Huleihel L,et al. (2017) Macrophage phenotype in response to ECM bioscaffold (生物支架)s. Semin Immunol 29:2-13)。此外,在某些方面,MBV施用使得调节性T细胞 ( $T_{REG}$ ) 上调,这是以前在基于ECM的生物材料背景下表征的现象。MBV在包括类风湿性关节炎、创伤性肌肉损伤、溃疡性结肠炎和食道癌症在内的恶劣环境中快速有效地诱导修复性免疫反应 (Huleihel L,et al. (2017) Matrix-Bound Nanovesicles Recapitulate Extracellular Matrix Effects on Macrophage Phenotype. Tissue Eng Part A 23(21-22):1283-1294;Dziki JL,et al. (2016) Immunomodulation and Mobilization of progenitor cells by Extracellular Matrix Bioscaffolds for Volumetric Muscle Loss Treatment. Tissue Eng Part A 22(19-20):1129-1139;Keane TJ,et al. (2017) Restoring Mucosal Barrier Function and Modifying Macrophage

Phenotype with an Extracellular Matrix Hydrogel: Potential Therapy for Ulcerative Colitis. *J Crohns Colitis* 11(3):360-368; Saldin LT, et al. (2019) Extracellular Matrix Degradation Products Downregulate Neoplastic Esophageal Cell Phenotype. *Tissue Eng Part A* 25(5-6):487-498.)

[0025] 储存在MBV内的细胞因子货物支持修复性和调节性M2巨噬细胞,并控制急性肺损伤后的细菌感染和炎症(Liu Q, et al. (2019) IL-33-mediated IL-13 secretion by ST2+ T<sub>REG</sub> controls inflammation after lung injury. *JCI Insight* 4(6)). ECM生物支架可用于涉及肌肉骨骼组织、胃肠道组织、泌尿生殖器组织和CNS组织的各种临床应用中(Badylak SF (2007) The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials*. 28(25):3587-3593)。ECM由每种组织固有细胞分泌的结构分子和功能分子组成,这些固有细胞限定了组织特性(tissue identity)。这种异种支架不会引起不良的先天性或适应性免疫反应,而是支持抗炎和修复性的先天性和适应性免疫反应(Brown BN, et al. (2009) Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. *Biomaterials*. 30(8):1482-1491)。使用这些天然生物材料通常与(至少)部分恢复功能性、适合部位的组织有关;一种被称为“构建性重塑”的过程(Badylak SF (2007) The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials*. 28(25):3587-3593)。ECM生物支架或ECM生物支架的降解产物,已被证明通过募集抗炎M2样巨噬细胞和辅助性T细胞2型(Th2)细胞反应来引导组织修复,此类反应通常与局部炎症减轻和与祖细胞的构建性串扰(crosstalk)有关。

[0026] 基质结合纳米囊泡(MBV)激活M2样修复性和抗炎巨噬细胞表型。研究表明,MBV是一类独特的与体液中发现外泌体区分开的细胞外囊泡(Hussey GS, et al. (2020) Lipidomics and RNA sequencing reveal a novel subpopulation of nanovesicle within extracellular matrix biomaterials. *Sci Advances*. 6(12):eaay4361)。由于MBV甚至能在恶劣的组织脱细胞过程中存活下来,因此它们可以在物种间的组织和器官发育和内稳态中发挥基本作用,并在组织对损伤的反应中发挥调节作用。MBV可以衍生自多种不同的组织来源。MBV丰富,可以冻干,稳定性高,可以容易地通过气管滴注或雾化施用。

[0027] MBV可以重现ECM对提高促重塑巨噬细胞表型的作用。通过吞噬活性、一氧化氮(NO)产生和所观察抗菌活性确定的巨噬细胞基因和蛋白质表达、细胞表面标记物以及功能能力最能代表MBV治疗后的调节/抗炎表型,这与之前描述基于ECM的生物支架对巨噬细胞表型和功能的影响的报告一致。(参见例如PCT公开号WO 2017/151862A1)。MBV已被证明通过miRNA、蛋白质和磷脂货物的组合发挥免疫调节作用。例如,与体液中存在的外泌体相比,MBV高度富集不同磷脂酶激活的促分解脂质介质,所述磷脂酶取决于细胞外环境的促/抗炎背景(Hussey GS, et al. (2020) Lipidomics and RNA sequencing reveal a novel subpopulation of nanovesicle within extracellular matrix biomaterials. *Sci Adv* 6(12):eaay4361)。此外,MBV是丰富而稳定的IL-33来源,它发出的信号将免疫细胞引向修复性M2样表型,同时也在受损肺中刺激T<sub>REG</sub>的修复和调节功能(Liu Q, et al. (2019) IL-33-mediated IL-13 secretion by ST2+ T<sub>REG</sub> controls inflammation after lung injury. *JCI Insight* 4(6))。IL-33递送通过提高细菌清除率来减少H1N1感染后的细菌超

级感染(Robinson KM,et al.(2018)Novel protective mechanism for interleukin-33at the mucosal barrier during influenza-associated bacterial superinfection.Mucosal immunology.11(1):199-208)。此外,MBV富集miRNA 125b-5p、143-3p和145-5p。抑制巨噬细胞内这些miRNA与更符合促炎表型而非抗炎/调节表型的基因和蛋白质表达谱相关(Huleihel L,et al.(2017)Matrix bound nanovesicles recapitulate extracellular matrix effects on macrophage phenotype.Tissue Eng Part A)。本文公开了包括MBV和ECM水凝胶两者的组合物。

[0028] 本文公开了包括细胞外基质(ECM)水凝胶和基质结合纳米囊泡(MBV)的组合物。这些组合物提供协同作用并且可用于治疗受试者。

[0029] 术语

[0030] 除非另有说明,否则按常规用法使用技术术语。分子生物学中许多常见术语的定义可见于Krebs et al.(eds.),Lewin's genes XII,published by Jones&Bartlett Learning,2017。提供以下对术语和方法的解释以更好地描述本公开,并指导本领域普通技术人员实施本公开。单数形式“a”、“an”和“the”指一个或一个以上,除非上下文另有明确约定。例如,术语“包含MBV”包括单个或更多个MBV,并被视为等效于短语“包含至少一个MBV”。术语“或”是指所述替代元素的单个元素或两个或更多个元素的组合,除非上下文另有明确说明。如本文所用,“包含”(comprises)意指“包括”(includes)。因此,“包含A或B”意指“包括A、B或A和B”,而不排除其他元素。还应理解,除非另有说明,否则就组合物给出的任何和所有分子量或分子质量值或比例都是近似值,并且供描述之用。本文提及的GENBANK®登录号日期是至少早在2021年4月5日即可获得的序列。本文引用的所有参考文献、专利申请和出版物以及GENBANK®登录号均通过引用并入本文。除非另有说明,否则“约”表示在5%以内。如有冲突,以本说明书(包括术语解释)为准。为便于查阅本公开的各个方面,现对特定术语解释如下:

[0031] 酸性蛋白酶:一种裂解肽键的酶,其中所述酶在酸性pH下裂解肽键活性增强。例如但不限于,酸性蛋白酶可包括胃蛋白酶和胰蛋白酶。

[0032] 施用:通过所选择途径将组合物(例如MBV或包括MBV的药物制剂)引入受试者体内。所述途径可以是局部的,也可以是全身的。例如,如果所选途径是静脉,则通过将所述组合物引入所述受试者的静脉来施用所述组合物。如果所选途径是局部的,则可以通过将所述组合物直接引入所述受试者的组织中来施用所述组合物。

[0033] 动物:活体多细胞脊椎动物生物,即包括例如哺乳动物和鸟的类别。术语“哺乳动物”包括人类和非人类哺乳动物。同样地,术语“受试者”包括人类受试者和动物受试者。

[0034] 生物相容性的:任何植入哺乳动物受试者体内时不会引起所述受试者不良反应的材料。生物相容性材料在引入个体时能够发挥其预期功能,对该个体无毒或无害,也不会诱导所述受试者体内对所述材料的免疫排斥反应。

[0035] 离心:对混合物施加离心力,使所述混合物中密度较高的组分相对于所述混合物中密度较低的组分远离离心机轴线的过程。施加在所述混合物上的力是离心机转子速度和旋转半径的函数。在大多数应用中,旋转的力会使沉淀(沉淀物(pellet))聚集在离心机管的底部,剩余的溶液被恰当地称为“上浮液体层”或“上清液”。在其他类似的应用中,基于密度的分离或“梯度离心”技术用于从混合物中分离特定物质(species),所述混合物含有比

所需组分密度更高和密度更低的组分。

[0036] 在离心机转子的圆周运动期间,所施加的力是旋转的半径和角速度的乘积,其中所述力习惯上表示为相对于“g”的加速度,“g”是地球表面因重力产生的标准加速度。所施加的离心力称为“相对离心力”(RCF),用“g”的倍数表示。

[0037] 粉碎(粉碎(comminution)和粉碎(comminuting)):将较大颗粒变为较小颗粒的过程,包括但不限于通过研磨、共混、切碎、切片、磨碎或切割。ECM可以以任何形式粉碎,包括但不限于水合形式、冷冻形式、风干形式、冻干形式、粉末形式或片状物形式。“粉碎的ECM”包括完好无损的胶原蛋白。粉碎的ECM未经过超声消化或酶促消化,例如未经蛋白酶(例如酸性蛋白酶)消化。

[0038] 接触:以直接物理联系的方式(可以是固体或液体形式)布置。

[0039] 细胞因子:术语“细胞因子”被用作不同组的可溶性蛋白质和肽的总称,这些蛋白质和肽在纳摩尔至皮摩尔浓度下起体液调节作用,在正常条件或病理条件下调节单个细胞和组织的功能活性。这些蛋白质还直接介导细胞之间的相互作用,并调节细胞外环境中发生的过程。细胞因子的实例包括但不限于肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白细胞介素(IL)-6、IL-10、IL-12、转化生长因子和干扰素- $\gamma$ 。

[0040] 诊断:通过疾病的体征、症状和各种检测的结果来识别疾病的过程。通过这一过程得出的结论也被称为“诊断”。通常进行的诊断检测形式包括但不限于血液检测、医学成像和活检。

[0041] 富集:混合物中所关注组分(例如纳米囊泡)在富集过程后与所述富集过程前相比,其量与所述混合物中其他组分量的比率有所增加的过程。

[0042] 细胞外基质(ECM):一种结构性和功能性生物分子和/或生物大分子的复杂混合物,这些分子包括但不限于结构性蛋白、特异性蛋白、蛋白聚糖、糖胺聚糖和生长因子,它们包围和支持组织内的细胞,除非另有说明,否则是无细胞的。ECM制剂可被认为是“脱细胞的”或“无细胞的”,意味着所述细胞已通过本文所述的过程和本领域已知的过程从来源组织中去除。所谓“ECM衍生材料”,例如“ECM衍生纳米囊泡”、“基质结合纳米囊泡”、“MBV”或“ECM衍生纳米囊泡”,是指由天然ECM或体外来源制备的纳米囊泡,其中所述ECM由所培养细胞产生。“完好无损的细胞外基质”和“完好无损的ECM”是指保留其结构性和非结构性生物分子活性的细胞外基质(例如但不限于本文所述粉碎的ECM),所述生物分子包括但不限于胶原蛋白、弹性蛋白、层粘连蛋白、糖胺聚糖、蛋白聚糖、抗菌剂、化学引诱剂、细胞因子和生长因子。所述ECM内生物分子的活性可以通过化学方式或机械方式去除,例如通过交联和/或通过渗析所述ECM。完好无损的ECM基本上没有经过交联和/或渗析,这意味着所述ECM在制备酶促ECM水凝胶溶解之前,没有经过渗析和/或交联过程或者经过ECM的储存和处理期间自然发生的过程以外的条件。因此,基本上交联和/或渗析(除了不会对本文所述用途的ECM的凝胶化和功能特征产生实质性影响的微不足道方式以外)的ECM不被认为是“完好无损的”。

[0043] 外源性:源自不同的来源。外源性MBV是单独产生的,例如,从ECM来源提取,并添加到ECM水凝胶中,ECM水凝胶中可能存在或可能不存在内源性MBV。外源性MBV可以衍生自与用于制备ECM水凝胶的所述ECM相同的组织,或不同的组织。外源性MBV可以衍生自与用于制备ECM水凝胶的ECM相同的物种,或不同的物种。

[0044] 凝胶:一种介于液体和固体之间的物质状态,通常定义为在液体介质中膨胀的交联聚合物网络。通常,凝胶是含有固体和液体的两相胶体分散体,其中固体量大于被称为“溶胶”的两相胶体分散体中的固体量。因此,“凝胶”具有液体的某些特性(即形状具有弹性和可变形性)和固体的某些特性(例如,形状离散,足以在二维表面上保持三维尺寸)。“凝胶化时间”,也称为“凝胶时间”,是指在适度应力下组合物变得不可流动所需的时间。

[0045] 凝胶化:由溶胶形成凝胶。

[0046] 水凝胶:亲水性聚合物链网络,有时以胶体凝胶的形式存在,其中水是分散介质。水凝胶是高吸水性的天然或合成聚合物网络。水凝胶也具有类似于天然组织的柔韧度。使用超声能量生产“声学”水凝胶,例如声学ECM水凝胶。本文公开了这些水凝胶的特征。对于水凝胶, $G'$ (储能模量)通常比 $G''$ (损耗模量)大一个数量级。“酶促”ECM水凝胶,由酶促消化的ECM产生。当加热到接近37°C的生理温度时,酶促水凝胶的黏度会增加。例如,酶促水凝胶由可注射溶液在温度低于37°C下形成,所述可注射溶液在37°C的生理温度下形成凝胶。

[0047] 炎症:炎症是由组织损伤引起的局部保护性反应,用于隔离致炎因子。炎症是由血管组织对有害刺激(例如病原体、受损细胞或刺激物)的复杂生物反应引起的。这是生物体试图清除有害刺激以及启动组织愈合过程的保护性尝试。炎症反应的特征在于白细胞在全身积聚或在炎症部位局部积聚。炎症反应可以通过许多方法来测量,包括但不限于测量白细胞的数量、多形核中性粒细胞(PMN)的数量、PMN激活程度的量度(例如鲁米诺增强的化学发光),或细胞因子存在量的量度。C-反应蛋白是全身炎症反应的标记物。

[0048] 炎症性病症是一类炎症扰乱正常或常规生理功能的病症。炎症性病症可包括多种病况,如自身免疫性病症(对内源性抗原的不适当炎症反应),以及因创伤性损伤或外源性抗原的炎症引起的病症。原发性炎症性病症是由炎症本身引起的疾病或病症。继发性炎症性病症是由另一种病症引起的炎症。炎症可导致炎症性病症,例如急性呼吸窘迫综合征(ARDS)。

[0049] 在一些方面,施用抗炎药以治疗炎症性疾病或病症,例如ARDS。抗炎药包括但不限于非类固醇类抗炎药(NSAID,例如阿司匹林、布洛芬和萘普生)、抗白三烯、免疫选择性抗炎衍生物(ImSAID)、生物活性化合物、类固醇(例如皮质类固醇)和阿片类药物。

[0050] 分离的:“分离的”生物组分(例如核酸、蛋白质细胞或纳米囊泡)已从所述组分自然存在的生物体细胞或ECM中其他生物组分中基本分离或纯化。已经“分离”的核酸和蛋白质包括通过标准纯化方法纯化的核酸和蛋白质。从所述ECM的纤维材料中除去已分离的MBV。所述术语还涵盖通过在宿主细胞中重组表达制备的核酸和蛋白质以及化学合成的核酸。

[0051] 等渗缓冲溶液:缓冲至pH在7.2和7.8之间的溶液,具有平衡的盐浓度,以促进等渗环境。

[0052] 赖氨酸氧化酶(Lox):一种铜依赖性酶,催化胶原蛋白和弹性蛋白前体中赖氨酸残基形成醛。这些醛是高度反应性的,并与其他赖氨酸氧化酶衍生的醛残基或未修饰的赖氨酸残基发生自发的化学反应。在体内,这使得胶原蛋白和弹性蛋白进行交联,从而对胶原蛋白原纤维的稳定以及成熟弹性蛋白的完整性和弹性起作用。在胶原蛋白(由三个赖氨酸残基衍生的吡啶啉)和弹性蛋白(由四个赖氨酸残基衍生的锁链素)中形成结构不同的复杂交联。编码Lox酶的基因已经从多种生物体中克隆出来(Hamalainen et al., Genomics 11:

508,1991;Trackman et al.,Biochemistry 29:4863,1990;通过引用并入本文)。人类赖氨酸氧化酶序列的残基153-417和残基201-417已被证明对催化功能重要。有四种Lox样的亚型,称为LoxL1、LoxL2、LoxL3和LoxL4。

[0053] 巨噬细胞:吞噬并降解细胞碎片、外来物质、微生物和癌症细胞的白细胞。除了在吞噬作用中发挥作用外,这些细胞在发育、组织维持和修复以及先天性免疫和适应性免疫中发挥着重要作用,因为它们募集并影响其他细胞,包括免疫细胞(例如淋巴细胞)。巨噬细胞可以以多种表型存在,包括被称为M1和M2的表型。主要进行促炎性功能的巨噬细胞被称为M1巨噬细胞(CD86<sup>+</sup>/CD68<sup>+</sup>),而减少炎症并促进和调节组织修复的巨噬细胞则被称为M2巨噬细胞(CD206<sup>+</sup>/CD68<sup>+</sup>)。确定巨噬细胞各种表型的标记物因物种而异。应该注意的是,巨噬细胞表型由范围是M1和M2极端值之间的谱(spectrum)表示。F4/80(由粘附性G蛋白偶联受体E1(ADGRE1)基因编码)是巨噬细胞标记物,参见GENBANK®登录号NP\_001243181.1,2018年4月6日和NP\_001965,2018年3月5日,两者均通过引用并入本文。在不希望拘泥于理论的情况下,人们认为MBV具有调节巨噬细胞表型的能力,使得M2样、调节性或促重塑巨噬细胞增加。MBV对巨噬细胞的作用在PCT公开号W0 2017/151862A1中进一步进行表征,该专利全文通过引用并入本文。在一些方面,本发明的MBV可用于诱导受试者体内巨噬细胞M2表型并抑制M1巨噬细胞。

[0054] 微RNA:长度为约17至约25个核苷酸碱基的小型非编码RNA,通常通过抑制靶mRNA翻译进行转录后调节基因表达。微RNA(“miRNA”或“miR”)可以作为负调控因子发挥作用,因此特异性miRNA的量越高,靶基因表达水平越低。miRNA有三种形式,初级miRNA(pri-miRNA)、前体miRNA(pre-miRNA)和成熟miRNA。初级miRNA(pri-miRNA)以约几百个碱基到超过1kb的茎环结构转录物的形式表达。所述pri-miRNA转录物在细胞核中被一种名为Drosha的RNase II核酸内切酶裂解,所述内切酶在所述茎环底部附近裂解茎的两条链。Drosha以交错的切割方式裂解RNA双链体,在3'端留下5'磷酸酯和2核苷酸的悬突部分。裂解产物即前体miRNA(pre-miRNA)长约60至约110个核苷酸,具有以折回方式形成的发夹结构。Pre-miRNA通过Ran-GTP和输出蛋白-5从细胞核转运到细胞质。Pre-miRNA在细胞质中被另一种称为Dicer的RNase II核酸内切酶进一步处理。Dicer识别5'磷酸酯和3'悬突部分,并在所述茎环连接处裂解环以形成miRNA双链体。所述miRNA双链体与RNA诱导的沉默复合物(RISC)结合,其中反义链优先降解,有义链成熟的miRNA将RISC引导至其靶位点。成熟的miRNA正是生物活性形式的所述miRNA,长度为约17至约25个核苷酸。

[0055] 纳米囊泡:细胞外囊泡,即直径约10至约1,000nm的纳米颗粒。纳米囊泡是脂质膜结合的颗粒,携带具有生物活性信号传导分子(例如微RNA、蛋白质)和其他分子。通常,所述纳米囊泡受到脂质双层的限制,并且所述生物分子被封闭和/或可以嵌入所述双层中。因此,纳米囊泡包括被质膜包围的管腔。基于直径、亚细胞来源、密度、形状、沉积速率、脂质组成、蛋白质标记物、核酸含量和来源(例如来自所述细胞外基质区或分泌的),可以区分不同类型的囊泡。纳米囊泡可以通过其来源(例如ECM的基质结合纳米囊泡(见上文))、蛋白质含量和/或miR含量来识别。

[0056] “外泌体”或“液相细胞外囊泡(EV)”是由细胞分泌的膜性囊泡,直径范围为10至150nm。通常,晚期内体或多囊泡体含有管腔内囊泡,其通过囊泡从有限的内体膜向内出芽和断裂进入这些封闭的囊泡而形成。然后,在与质膜融合后的胞吐期间,这些管腔内囊泡从

所述多囊泡体管腔释放到细胞外环境中,通常是体液(例如血液、脑脊液或唾液)中。当一段膜内陷并被内吞时,细胞内会产生外泌体。所内化的片段被分解成更小的囊泡,最终从细胞中排出,所述片段含有蛋白质和RNA分子,例如mRNA和miRNA。血浆衍生的外泌体主要缺乏核糖体RNA。细胞外基质衍生的外泌体包括特异性miRNA和蛋白质组分,并已被证明存在于几乎所有体液中,例如血液、尿液、唾液、精液和脑脊液。外泌体可以表达CD11c、CD63、CD81和/或CD9,并且因此可以是CD11c<sup>+</sup>和/或CD63<sup>+</sup>和/或者CD81<sup>+</sup>和/或者CD9<sup>+</sup>。外泌体表面没有高水平的赖氨酸氧化酶。

[0057] “衍生自ECM的纳米囊泡”、“基质结合纳米囊泡”、“MBV”或“ECM衍生的纳米囊泡”都是指存在于所述细胞外基质中相同的膜结合颗粒,大小范围是10nm-1000nm,含有生物活性信号传导分子,例如影响细胞行为的蛋白质、脂质、核酸、生长因子和细胞因子。这些术语是可互换的,指的是相同的囊泡。这些纳米囊泡嵌入所述ECM内并与所述ECM结合,而不是简单地附着在表面或在体液中自由循环。这些纳米囊泡耐受恶劣的分离条件,例如冻融和用蛋白酶(例如胃蛋白酶、弹性蛋白酶、透明质酸酶、蛋白酶K和胶原酶)消化,以及用洗涤剂消化。MBV不同于包括外泌体在内的其他细胞外囊泡,并且具有的磷脂组成不同于外泌体。MBV与骨骼基质囊泡不同,不表达碱性磷酸酶。在某些情况下,由于外泌体通常缺乏某些标记物,基于此MBV也可以与外泌体区分开来。

[0058] 在一些方面,MBV的特征在于以下蛋白质表达或脂质含量特征的一种或更多种:

[0059] (i) 与其他囊泡(例如外泌体)相比,MBV可能不表达CD63和/或CD81和/或CD9中的一种或更多种,或者具有低水平或几乎不可检测水平的CD63和/或CD81和/或CD9(CD63<sup>10</sup>和/或CD81<sup>10</sup>和/或CD9<sup>10</sup>)(参见例如实施例1)。可以使用多种方法来区分MBV中CD63和/或CD81和/或CD9的低表达、几乎不可检测的表达或缺失表达,例如基于抗体的方法,例如蛋白质印迹或流式细胞术(参见,例如Bashashati and Brinkman, Adv Bioinformatics, 2009: 584603)。在一些方面,与其他囊泡相比,如果MBV中CD63和/或CD81和/或CD9的表达比其他囊泡(例如外泌体)的平均表达低至少一个标准差或低至少两个标准差,则认为CD63和/或CD81和/或CD9的MBV表达低或几乎检测不到;

[0060] (ii) MBV具有其中至少55%的总磷脂包含组合的磷脂酰胆碱(PC)和磷脂酰肌醇(PI)的磷脂含量;

[0061] (iii) MBV具有其中10%或更少的总磷脂包含鞘磷脂(SM)的磷脂含量;

[0062] (iv) MBV具有其中20%或更少的总磷脂包含磷脂酰乙醇胺(PE)的磷脂含量;

[0063] (v) MBV具有其中15%或更多的总磷脂含量包含磷脂酰肌醇(PI)的磷脂含量,所述百分比表示脂质浓度的百分比。

[0064] 在一些方面,MBV的特征在于所有以下特征:

[0065] (i) 不表达CD63和/或CD81和/或CD9中的一种或更多种,或具有低水平或几乎不可检测水平的CD63和/或CD81和/或CD9(CD63<sup>10</sup>和/或CD81<sup>10</sup>和/或CD9<sup>10</sup>)(如上所述);

[0066] (ii) 其中至少55%的总磷脂包含组合的磷脂酰胆碱(PC)和磷脂酰肌醇(PI)的磷脂含量;

[0067] (iii) 其中10%或更少的总磷脂包含鞘磷脂(SM)的磷脂含量;

[0068] (iv) 其中20%或更少的总磷脂包含磷脂酰乙醇胺(PE)的磷脂含量;和

[0069] (v) 其中15%或更多的总磷脂含量是磷脂酰肌醇(PI)的磷脂含量。

[0070] 在一些方面,MBV的特征在于所有以下特征:

[0071] (i) 其中至少55%的总磷脂包含组合的磷脂酰胆碱(PC)和磷脂酰肌醇(PI)的磷脂含量;

[0072] (ii) 其中10%或更少的总磷脂包含鞘磷脂(SM)的磷脂含量;

[0073] (iii) 其中20%或更少的总磷脂包含磷脂酰乙醇胺(PE)的磷脂含量;和

[0074] (iv) 其中15%或更多的总磷脂含量是磷脂酰肌醇(PI)的磷脂含量。

[0075] 在一些方面,MBV的特征在于以下特征中的一种或更多种:

[0076] (i) 其中至少55%的总磷脂包含组合的磷脂酰胆碱(PC)和磷脂酰肌醇(PI)的磷脂含量;

[0077] (ii) 其中10%或更少的总磷脂包含鞘磷脂(SM)的磷脂含量;

[0078] (iii) 其中20%或更少的总磷脂包含磷脂酰乙醇胺(PE)的磷脂含量;和

[0079] (iv) 其中15%或更多的总磷脂含量是磷脂酰肌醇(PI)的磷脂含量。

[0080] 在一些方面,MBV的特征在于以下特征中的一种或更多种:

[0081] (i) 不含可检测水平的碱性磷酸酶;

[0082] (ii) 不含有可检测水平的骨桥蛋白;

[0083] (iii) 不含有可检测水平的骨保护素;

[0084] (iv) 不含有可检测水平的补体C5;和/或

[0085] (v) 不含可检测水平的c-反应蛋白。

[0086] 在一些方面,MBV含有IL33并且是IL33<sup>+</sup>。

[0087] 从中分离MBV的ECM可以是组织的ECM,可以由培养中的细胞产生,或者可以从商业来源购买。

[0088] 药学上可接受的载体:用于所要求保护的药物制剂的药学上可接受的载体是常规的。Remington's Pharmaceutical Sciences, by E.W.Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975) 描述了适用于药物递送本文所公开的融合蛋白的组合物和配制物。

[0089] 一般来说,所述载体的性质将取决于所采用的特定施用模式。例如,肠胃外配制物通常包含可注射流体,所述可注射流体包括药学和生理学可接受的流体,例如水、生理盐水、平衡盐溶液、葡萄糖水溶液、甘油等作为媒介物。对于固体组合物(例如,粉末剂、丸剂、片剂或胶囊剂形式),常规无毒固体载体可以包括例如药用级别的甘露醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除了生物中性载体外,要施用的药物制剂还可以含有少量无毒辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、防腐剂和pH缓冲剂等,例如乙酸钠或山梨醇酐单月桂酸酯。

[0090] 药剂:当适当地施用于受试者或细胞时能够诱导所需治疗效果或预防效果的化合物或组合物。

[0091] 磷脂:一类结构由两个疏水性脂肪酸尾部和亲水性头部(由磷酸酯基团组成)组成的脂质。磷脂的主要类别包括磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酰肌醇(PG)、鞘磷脂(SM)、心磷脂(CL)、磷脂酸(PA)和双单酰基甘油磷酸酯(BMP)。磷脂可以通过多种方式进行测量。例如,可以使用基于液相色谱-质谱(LC-MS)的全局脂质组学和氧化还原脂质组学。在一些方面,特定磷脂含量表示为总磷脂(例如MBV中的总磷脂)的百分比浓度,其中百分比浓度为重量/重量(w/w)。

[0092] 多核苷酸:任何长度的核酸序列(例如线性序列)。因此,多核苷酸包括寡核苷酸,也包括染色体中发现的基因序列。“寡核苷酸”是通过天然磷酸二酯键连接的多个连接的核苷酸。寡核苷酸是长度在6至300个核苷酸之间的多核苷酸。寡核苷酸类似物是指功能类似于寡核苷酸但具有非天然存在部分的部分。例如,寡核苷酸类似物可以含有非天然存在的部分,例如改变的糖部分或糖间连接,例如硫代磷酸酯寡脱氧核苷酸。天然存在的多核苷酸的功能类似物可以与RNA或DNA结合,并包括肽核酸(PNA)分子。

[0093] 预防性:本文所用是指为预防疾病或病症发生而设计和使用的药物或治疗方法。本文所用术语“预防性”和“预防”可互换使用。

[0094] 纯化:术语“纯化”不要求绝对纯度;相反,它旨在作为相对术语。因此,例如,纯化的核酸分子制剂是指其中所指的核酸比在细胞内自然环境中的核酸更纯的制剂。例如,纯化核酸制剂,使得所述核酸占所述制剂总蛋白质含量的至少50%。类似地,纯化的MBV制剂是其中外泌体比在包括细胞在内的环境中更纯的制剂,其中存在微囊泡和外泌体。纯化的核酸或MBV总体(population)的纯度分别大于约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%,或不合其他核酸或细胞组分。

[0095] 预防或治疗疾病:“预防”疾病是指抑制疾病的发展,例如抑制已知有疾病易感性的人的疾病发展。已知易感性的人的实例是家族中有疾病史的人,或者暴露于使所述受试者易患疾病因素的人。“治疗”是指在疾病或病理状况开始发展后,改善其体征或症状的治疗干预。

[0096] 溶解的ECM:经过超声空化或酶促消化处理,从而例如分别通过物理破坏蛋白质聚集体或消化使得微观结构变化的ECM。

[0097] 受试者:人类和非人类动物,包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,例如非人类灵长类动物、老鼠、兔、羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖动物和爬行动物。在所描述的方法的某些方面,所述受试者是人类。“受试者”可与术语“患者”互换使用。受试者可以是被诊断出高风险患有疾病或病症(例如传染病或病症)的个体(例如免疫功能低下的个体、医疗保健专业人员)、已被诊断出患有疾病或病症(例如传染病或病症)的人、以前患有疾病或病症(例如感染性疾病或病症)的人,或因疾病或病症(例如感染性疾病或病症)的症状或迹象进行评估的个体。

[0098] 治疗有效量:特定物质(例如MBV)的量,足以在接受治疗的受试者体内达到预期效果。当向受试者施用,通常将使用能达到靶组织浓度(例如在肺中)的剂量,所述剂量已被证明能达到所需的体外效果。

[0099] 热可逆水凝胶:由于聚合物链的缠结而形成的水凝胶,其中黏度在凝胶化的特征温度下发生变化。所公开的声学ECM水凝胶是热可逆水凝胶,冷却时出现凝胶化(溶胶到凝胶的转变)。

[0100] 局部应用:局部应用的药剂只应用于特定区域,而不是全身。在特定实例中,所述组合物在需要止血的区域应用于皮肤或眼睛。例如,所述药物组合物可以局部制剂的形式应用于伤口,例如上皮伤口或缺损,例如创伤伤口或手术伤口,例如皮肤或角膜擦伤或手术切口。

[0101] 总磷脂含量:本文所用的“总磷脂”或“总磷脂含量”,就MBV而言,是指给定量的分离MBV(即从所述ECM中分离的MBV)中存在的所有磷脂总和。MBV可以通过例如酶促消化脱细

胞的ECM和差速离心来分离。总磷脂含量可通过诸如基于LC-MS的全局脂质组学和氧化还原脂质组学的方法测定。总磷脂含量以重量计。总磷脂含量的百分比是指基于重量/重量的百分比浓度。

[0102] 移植:将生物相容性基材(例如MBV)植入有需要的受试者体内。

[0103] 治疗(treating)、治疗(treatment)和疗法:在减轻或改善损伤、病理或病况方面的任何成功或成功迹象,包括任何客观或主观参数,例如减少、缓解、减轻症状或使患者更能忍受病况,减缓退化或衰退的速度,使退化的最终点不那么衰弱,或改善受试者的身心健康。治疗可以通过客观或主观参数进行评估;包括身体检查、神经系统检查或精神鉴定的结果。

[0104] 超声处理:暴露频率高于20kHz超声波的过程。

[0105] 概述

[0106] 在一些方面,公开了一种组合物,包括细胞外基质(ECM)水凝胶,所述水凝胶包括a)溶解的细胞外基质;和b)衍生自细胞外基质的外源性基质结合纳米囊泡(MBV),其中所述MBV不表达CD63和CD81或是CD63<sup>1°</sup>CD81<sup>1°</sup>,并且其中所述MBV不含碱性磷酸酶。所述外源性MBV在ECM水凝胶中存在的浓度低于1mg/mL。例如,所述MBV在所述ECM水凝胶中存在的浓度可以是至少约 $1 \times 10^5$ 至约 $1 \times 10^{20}$ 颗粒/mL。在另一个实例中,所述MBV在所述ECM水凝胶中存在的浓度为约 $1 \times 10^6$ 至约 $1 \times 10^{12}$ 颗粒/mL。

[0107] 在一些方面,公开了一种组合物,包括细胞外基质(ECM)水凝胶,所述水凝胶包括a)溶解的细胞外基质;和b)衍生自细胞外基质的外源性基质结合纳米囊泡(MBV),其中所述MBV不表达CD63和CD81或是CD63<sup>1°</sup>CD81<sup>1°</sup>,并且其中所述MBV不含碱性磷酸酶。所述外源性MBV在所述ECM水凝胶中存在的浓度低于1mg/mL。例如,所述MBV在所述ECM水凝胶中存在的浓度可以是至少约 $1 \times 10^5$ 至约 $1 \times 10^{20}$ 颗粒/mL。在一些方面,所述组合物具有以下特征的一种或更多种:i)是剪切致稀的;ii)在37°C下储能模量( $G'$ )为约50Pa至约200Pa,且损耗模量( $G''$ )为约5Pa至约20Pa并且 $G'$ 与 $G''$ 比率为约4:1至约15:1,和/或iii)在24小时至14天的降解率为50%。

[0108] 在一些方面,公开了一种组合物,包括细胞外基质(ECM)水凝胶,所述水凝胶包括a)溶解的细胞外基质;和b)衍生自细胞外基质的外源性基质结合纳米囊泡(MBV),其中所述MBV不表达CD63和CD81或是CD63<sup>1°</sup>CD81<sup>1°</sup>,并且其中所述MBV不含碱性磷酸酶。所述外源性MBV在所述ECM水凝胶中存在的浓度低于1mg/mL。例如,所述MBV在所述ECM水凝胶内存在的浓度可以是至少约 $1 \times 10^5$ 至约 $1 \times 10^{20}$ 颗粒/mL。在一些方面,所述组合物i)是剪切致稀的;ii)在37°C下储能模量( $G'$ )是约50Pa至约200Pa,且损耗模量( $G''$ )是约5Pa至约20Pa并且 $G'$ 与 $G''$ 比率是约4:1至约15:1,以及iii)在24小时至14天的降解率为50%。在某些方面,所述ECM水凝胶中溶解的ECM的量在1mg/mL和500mg/mL之间。在某些方面,所述ECM水凝胶中溶解的ECM的量为1mg/mL至400mg/mL,或1mg/mL至350mg/mL,或1mg/mL至300mg/mL,或1mg/mL至250mg/mL,或1mg/mL至200mg/mL,或1mg/mL至150mg/mL,或1mg/mL至100mg/mL,或1mg/mL至50mg/mL,或5mg/mL至250mg/mL,或20mg/mL至200mg/mL,或5mg/mL至200mg/mL,或5mg/mL至100mg/mL。在更多方面,所述ECM水凝胶中溶解的ECM的量在约5mg/mL至约50mg/mL之间,例如约10mg/mL至约50mg/mL、约20mg/mL至约50mg/mL、约30mg/mL至约50mg/mL、约40mg/mL至约50mg/mL、约5mg/mL至约40mg/mL、约5mg/mL至约30mg/mL、约5mg/mL至约20mg/mL,或约5mg/

mL至约10mg/mL。所述ECM水凝胶可以含有浓度为约5mg/mL、10mg/mL、15mg/mL、20mg/mL、25mg/mL、30mg/mL、35mg/mL、40mg/mL、45mg/mL、50mg/mL、60mg/mL、65mg/mL、70mg/mL、75mg/mL、80mg/mL、85mg/mL、90mg/mL、95mg/mL、100mg/mL、150mg/mL、200mg/mL、250mg/mL、300mg/mL、350mg/mL、400mg/mL、450mg/mL或500mg/mL溶解的ECM。在一个非限制性实例中,所述ECM水凝胶中溶解的ECM的量在10mg/mL和30mg/mL之间。在一个非限制性实例中,所述ECM水凝胶中溶解的ECM的量在4mg/mL和50mg/mL之间。在一些方面,所述ECM水凝胶中的ECM或溶解的ECM存在的浓度为约5至约100mg/mL,例如50至100mg/mL、25至75mg/mL、60至80mg/mL、40至60mg/mL、50至80mg/mL或约30至约60mg/mL。

[0109] 在一些方面,所述外源性MBV在所述ECM水凝胶中存在的浓度为约 $1 \times 10^5$ 至约 $1 \times 10^{18}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^5$ 至约 $1 \times 10^{16}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^5$ 至约 $1 \times 10^{14}$ 颗粒/mL,或例如约 $1 \times 10^5$ 至约 $1 \times 10^{12}$ 颗粒/mL。在一些方面,所述外源性MBV在所述ECM水凝胶中存在的浓度为约 $1 \times 10^6$ 至约 $1 \times 10^{20}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^6$ 至约 $1 \times 10^{18}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^6$ 至约 $1 \times 10^{16}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^6$ 至约 $1 \times 10^{14}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^6$ 至约 $1 \times 10^{12}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^7$ 至约 $1 \times 10^{12}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^7$ 至约 $1 \times 10^{11}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^8$ 至约 $1 \times 10^{12}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^8$ 至约 $1 \times 10^{11}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^9$ 至约 $1 \times 10^{12}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^9$ 至约 $1 \times 10^{11}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^{10}$ 至约 $1 \times 10^{12}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^{10}$ 至约 $1 \times 10^{11}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^{11}$ 至约 $1 \times 10^{12}$ 颗粒/mL。在一个非限制性实例中,所述外源性MBV在所述ECM水凝胶中存在的浓度为约 $1 \times 10^8$ 至 $1 \times 10^{11}$ 颗粒/mL。在一个非限制性实例中,所述外源性MBV在所述ECM水凝胶中存在的浓度为约 $1 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^{12}$ 颗粒/mL。在一个非限制性实例中,所述外源性MBV在所述ECM水凝胶中存在的浓度为约 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^{12}$ 颗粒/mL。在一些方面,所述外源性MBV在所述ECM水凝胶中存在的浓度为约 $1 \times 10^6$ 颗粒/mL、 $1 \times 10^7$ 颗粒/mL、 $1 \times 10^8$ 颗粒/mL、 $1 \times 10^9$ 颗粒/mL、 $1 \times 10^{10}$ 颗粒/mL、 $1 \times 10^{11}$ 颗粒/mL、 $1 \times 10^{12}$ 颗粒/mL、 $1 \times 10^{14}$ 颗粒/mL、 $1 \times 10^{16}$ 颗粒/mL、 $1 \times 10^{18}$ 颗粒/mL或约 $1 \times 10^{20}$ 颗粒/mL。在其他方面,所述外源性MBV在所述ECM水凝胶中存在的浓度为约 $5 \times 10^6$ 颗粒/mL、 $5 \times 10^7$ 颗粒/mL、 $5 \times 10^8$ 颗粒/mL、 $5 \times 10^9$ 颗粒/mL、 $5 \times 10^{10}$ 颗粒/mL、 $5 \times 10^{11}$ 颗粒/mL或约 $5 \times 10^{12}$ 颗粒/mL。在特定的非限制性实例中,所述外源性MBV在所述ECM水凝胶中存在的浓度为约 $1 \times 10^{11}$ 颗粒/mL。在另一个非限制性实例中,所述外源性MBV在所述ECM水凝胶中存在的浓度为约 $1 \times 10^{12}$ 颗粒/mL。在另一个非限制性实例中,所述外源性MBV在所述ECM水凝胶中存在的浓度为约 $1 \times 10^{10}$ 颗粒/mL或约 $1 \times 10^9$ 颗粒/mL。在一些方面,所述外源性MBV在所述ECM水凝胶中存在的浓度为约 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^{18}$ 颗粒/mL,例如,约 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^{14}$ 颗粒/mL、约 $1 \times 10^{10}$ 至 $1 \times 10^{14}$ 颗粒/mL、 $1 \times 10^{12}$ 至 $1 \times 10^{18}$ 颗粒/mL、 $1 \times 10^{14}$ 至 $1 \times 10^{18}$ 颗粒/mL或 $1 \times 10^{10}$ 至 $1 \times 10^{18}$ 颗粒/mL。在另一个非限制性实例中,所述外源性MBV在所述ECM水凝胶中存在的浓度小于1mg/mL,例如 $\leq 0.9$ mg/mL、 $\leq 0.8$ mg/mL、 $\leq 0.7$ mg/mL、 $\leq 0.6$ mg/mL、 $\leq 0.5$ mg/mL、 $\leq 0.4$ mg/mL、 $\leq 0.3$ mg/mL、 $\leq 0.2$ mg/mL、 $\leq 0.1$ mg/mL、 $\leq 90$  $\mu$ g/mL、 $\leq 80$  $\mu$ g/mL、 $\leq 70$  $\mu$ g/mL、 $\leq 60$  $\mu$ g/mL、 $\leq 50$  $\mu$ g/mL、 $\leq 40$  $\mu$ g/mL、 $\leq 30$  $\mu$ g/mL、 $\leq 20$  $\mu$ g/mL或 $\leq 10$  $\mu$ g/mL,但大于0 $\mu$ g/mL,例如大于0.1 $\mu$ g/mL,或大于0.5 $\mu$ g/mL或大于1 $\mu$ g/mL。

[0110] 在一些方面,所述组合物的储能模量( $G'$ )为约50Pa至约200Pa,例如约75Pa至约200Pa、约100Pa至约200Pa、约125Pa至约200Pa、约150Pa至约200Pa、约175Pa至约200Pa、约50Pa至约75Pa、约50至约100Pa、约50至约125Pa、约50至约150Pa,或约50至约175Pa。所述组

合物的储能模量可以是约50Pa、60Pa、70Pa、80Pa、90Pa、100Pa、110Pa、120Pa、130Pa、140Pa、150Pa、160Pa、170Pa、180Pa、190Pa或200Pa。所述组合物的储能模量可以是约50-60Pa、60-70Pa、70-80Pa、80-90Pa、90-100Pa、100-110Pa、110-120Pa、120-130Pa、130-140Pa、150-150Pa、150-160Pa、160-170Pa、170-180Pa、180-190Pa或190-200Pa。

[0111] 在更多方面,所述组合物的损耗模量( $G''$ )为约5Pa至约20Pa,例如约10Pa至约20Pa、约15Pa至约20Pa、约5Pa至约10Pa、约5Pa至约15Pa。所述组合物的损耗模量可以是约5Pa、6Pa、7Pa、8Pa、9Pa、10Pa、11Pa、12Pa、13Pa、14Pa、15Pa、16Pa、17Pa、18Pa、19Pa或20Pa。

[0112] 在其他方面,所述组合物的 $G'$ 与 $G''$ 比率在37°C下为约4:1至约15:1。在一些方面,所述组合物的 $G'$ 与 $G''$ 比率可以为约4:1至约5:1、约4:1至约6:1、约4:1至约7:1、约4:1至约8:1、约4:1至约9:1、约4:1至约10:1、约4:1至约11:1、约4:1至约12:1、约4:1至约13:1,或约4:1至约14:1。在其他方面,所述组合物的 $G'$ 与 $G''$ 比率可以为约5:1至约15:1、约6:1至约15:1、约7:1至约15:1、约8:1至约15:1、约9:1至约15:1、约10:1至约15:1、约11:1至约15:1、约12:1至约15:1、约13:1至约15:1,或约14:1至约15:1。所述组合物 $G'$ 与 $G''$ 比率可以是约4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1。

[0113] 在其他方面,所述组合物是剪切致稀的,因此随着注射速率(例如ml/sec)增加,通过注射递送变得更容易。在一些非限制性实例中,随着剪切速率(以1/sec表示)增加,黏度(以Pa\*sec表示)降低。

[0114] 在更多方面,所述组合物在24小时至14天内的降解率为50%。所述组合物可以在以下时间的降解率是50%:约1至约13天、约1至约12天、约1至约11天、约1至约10天、约1至约9天、约1至约8天、约1至约7天、约1至约6天、约1至约5天、约1至约4天、约1至约3天、约1至约2天。所述组合物可以在以下时间的降解率是50%:约2至约14天、约3至约14天、约4至约14天后、约5至约14天、约6至约14天、约7至约14天、约8至约14天、约9至约14天、约10至约14天、约11至约14天、约12至约14天或约13至约14天。所述组合物可以在以下时间的降解率是50%:约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天。MBV在递送到解剖部位后从所述水凝胶释放的速率可以取决于水凝胶的降解情况、所述解剖部位和组织的炎症程度。

[0115] 在一些方面,所述ECM水凝胶可以是声学ECM水凝胶。根据本申请适合使用的声学水凝胶公开于例如PCT公开号W02020/186082中,该专利通过引用并入本文。在其他方面,所述ECM水凝胶可以是酶促ECM水凝胶。根据本申请适合使用的酶促ECM水凝胶公开于例如美国专利号8,361,503中,该专利通过整体引用并入本文。

[0116] 在其他方面,公开了组合物,所述组合物包括:酸性溶液,包含外源性酸性蛋白酶和溶解的细胞外基质,例如溶解的完好无损的ECM;和衍生自细胞外基质的外源性MBV,其中所述MBV不表达CD63和CD81或是CD63<sup>10</sup>CD81<sup>10</sup>,并且其中所述MBV不含碱性磷酸酶。所述外源性MBV在所述组合物中存在的浓度小于1mg/mL的量。例如,所述MBV在所述组合物内的存在量为约 $1 \times 10^5$ 至约 $1 \times 10^{20}$ 颗粒/ml,当中和至pH为约7.0至约7.8时,所述酸性溶液在温度高于25°C下形成凝胶。在一些方面,所述酸性蛋白酶是胃蛋白酶和/或胰蛋白酶。在一些方面,所述组合物的pH小于7.0。

[0117] 在更多方面,公开了组合物,所述组合物包括溶解的细胞外基质(例如完好无损的ECM),已被酸性蛋白酶消化;钝化的外源性酸性蛋白酶;和衍生自细胞外基质的外源性MBV。

所述MBV不表达CD63和CD81,或者是CD63<sup>10</sup>CD81<sup>10</sup>,并且不含碱性磷酸酶。这些外源性MBV在所述组合物中存在的浓度低于1mg/mL的量。例如,所述MBV在所述组合物中的存在量为约 $1 \times 10^5$ 至约 $1 \times 10^{20}$ 颗粒/mL。所述组合物在温度低于25°C下进入液相,在温度高于25°C下进入凝胶相,pH在7至7.8之间,例如约7.2至约7.8、约7.3至7.8、7.4至7.8或约7.5至7.8。所述组合物的pH可以是例如约7.2、约7.3、约7.4、约7.5或约7.6。在一些方面,所述酸性蛋白酶是胃蛋白酶和/或胰蛋白酶。在其他方面,所述组合物的pH为约7.2。在更多方面,所述组合物的pH范围是7.2至7.4内,例如约7.2、7.3或7.4。

[0118] 在一些方面,所公开组合物中溶解的ECM的量在1mg/mL和500mg/mL之间。在一些方面,所公开组合物中溶解的ECM的量是1mg/mL至400mg/mL,或1mg/mL至350mg/mL,或1mg/mL至300mg/mL,或1mg/mL至250mg/mL,或1mg/mL至200mg/mL,或1mg/mL至150mg/mL,或1mg/mL至100mg/mL,或1mg/mL至50mg/mL,或5mg/mL至250mg/mL,或20mg/mL至200mg/mL,或5mg/mL至200mg/mL,或5mg/mL至100mg/mL。在更多方面,所公开组合物中溶解的ECM的量在约5mg/mL至约50mg/mL之间,例如约10mg/mL至约50mg/mL、约20mg/mL至约50mg/mL、约30mg/mL至约50mg/mL、约40mg/mL至约50mg/mL、约5mg/mL至约40mg/mL、约5mg/mL至约30mg/mL、约5mg/mL至约20mg/mL,或约5mg/mL至约10mg/mL。所公开组合物含有的溶解的ECM浓度可以是约5mg/mL、10mg/mL、15mg/mL、20mg/mL、25mg/mL、30mg/mL、35mg/mL、40mg/mL、45mg/mL、50mg/mL、60mg/mL、65mg/mL、70mg/mL、75mg/mL、80mg/mL、85mg/mL、90mg/mL、95mg/mL、100mg/mL、150mg/mL、200mg/mL、250mg/mL、300mg/mL、350mg/mL、400mg/mL、450mg/mL或500mg/mL。在一个非限制性实例中,所公开组合物中溶解的ECM的量在10mg/mL和30mg/mL之间。在一个非限制性实例中,所公开组合物中溶解的ECM的量在4mg/mL和50mg/mL之间。在某些方面,所公开组合物中的ECM或溶解的ECM存在的浓度为约5至约100mg/mL,例如50至100mg/mL、25至75mg/mL、60至80mg/mL、40至60mg/mL、50至80mg/mL或约30至约60mg/mL。

[0119] 在一些方面,所述外源性MBV在所公开组合物存在的浓度为约 $1 \times 10^5$ 至约 $1 \times 10^{20}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^5$ 至约 $1 \times 10^{18}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^5$ 至约 $1 \times 10^{16}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^5$ 至约 $1 \times 10^{14}$ 颗粒/mL,或例如约 $1 \times 10^5$ 至约 $1 \times 10^{12}$ 颗粒/mL。在一些方面,所述外源性MBV在所公开组合物存在的浓度为约 $1 \times 10^6$ 至约 $1 \times 10^{20}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^6$ 至约 $1 \times 10^{18}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^6$ 至约 $1 \times 10^{16}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^6$ 至约 $1 \times 10^{14}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^6$ 至约 $1 \times 10^{12}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^7$ 至约 $1 \times 10^{12}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^7$ 至约 $1 \times 10^{11}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^8$ 至约 $1 \times 10^{12}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^8$ 至约 $1 \times 10^{11}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^9$ 至约 $1 \times 10^{12}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^9$ 至约 $1 \times 10^{11}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^{10}$ 至约 $1 \times 10^{12}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^{10}$ 至约 $1 \times 10^{11}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^{11}$ 至约 $1 \times 10^{12}$ 颗粒/mL。在一个非限制性实例中,所述外源性MBV在所公开组合物中存在的浓度为约 $1 \times 10^8$ 至 $1 \times 10^{11}$ 颗粒/mL。在一个非限制性实例中,所述外源性MBV在所公开组合物中存在的浓度为约 $1 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^{12}$ 颗粒/mL。在一个非限制性实例中,所述外源性MBV在所公开组合物中存在的浓度为约 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^{12}$ 颗粒/mL。在一些方面,所述外源性MBV在所公开组合物中存在的浓度为约 $1 \times 10^6$ 颗粒/mL、 $1 \times 10^7$ 颗粒/mL、 $1 \times 10^8$ 颗粒/mL、 $1 \times 10^9$ 颗粒/mL、 $1 \times 10^{10}$ 颗粒/mL、 $1 \times 10^{11}$ 颗粒/mL、 $1 \times 10^{12}$ 颗粒/mL、 $1 \times 10^{14}$ 颗粒/mL、 $1 \times 10^{16}$ 颗粒/mL、 $1 \times 10^{18}$ 颗粒/mL或约 $1 \times 10^{20}$ 颗粒/mL。在其他方面,所述外源性MBV在所公开组合物中存在的浓度为约 $5 \times 10^6$ 颗粒/mL、 $5 \times 10^7$ 颗粒/mL、 $5 \times 10^8$ 颗粒/mL、 $5 \times 10^9$ 颗粒/mL、 $5 \times 10^{10}$ 颗粒/mL、 $5 \times 10^{11}$ 颗粒/mL或约 $5 \times 10^{12}$

颗粒/mL。在特定非限制性实例中,所述外源性MBV在所公开组合物中存在的浓度为约 $1 \times 10^{11}$ 颗粒/mL。在另一个非限制性实例中,所述外源性MBV在所公开组合物中存在的浓度为约 $1 \times 10^{12}$ 颗粒/mL。在又一个非限制性实例中,所述外源性MBV在所公开组合物中存在的浓度为约 $1 \times 10^{10}$ 颗粒/mL至约 $1 \times 10^9$ 颗粒/mL。在一些方面,所述外源性MBV在所公开组合物中存在的浓度为约 $1 \times 10^6$ 颗粒/mL至 $1 \times 10^{18}$ 颗粒/mL,例如约 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^{14}$ 颗粒/mL、约 $1 \times 10^{10}$ 至 $1 \times 10^{14}$ 颗粒/mL、 $1 \times 10^{12}$ 至 $1 \times 10^{18}$ 颗粒/mL、 $1 \times 10^{14}$ 至 $1 \times 10^{18}$ 颗粒/mL或 $1 \times 10^{10}$ 至 $1 \times 10^{18}$ 颗粒/mL。在另一个非限制性实例中,所述外源性MBV在所述ECM水凝胶中存在的浓度小于1mg/mL,例如, $\leq 0.9$ mg/mL、 $\leq 0.8$ mg/mL、 $\leq 0.7$ mg/mL、 $\leq 0.6$ mg/mL、 $\leq 0.5$ mg/mL、 $\leq 0.4$ mg/mL、 $\leq 0.3$ mg/mL、 $\leq 0.2$ mg/mL、 $\leq 0.1$ mg/mL、 $\leq 90$  $\mu$ g/mL、 $\leq 80$  $\mu$ g/mL、 $\leq 70$  $\mu$ g/mL、 $\leq 60$  $\mu$ g/mL、 $\leq 50$  $\mu$ g/mL、 $\leq 40$  $\mu$ g/mL、 $\leq 30$  $\mu$ g/mL、 $\leq 20$  $\mu$ g/mL或 $\leq 10$  $\mu$ g/mL,但大于0 $\mu$ g/mL,例如大于0.1 $\mu$ g/mL,或大于0.5 $\mu$ g/mL,或大于1 $\mu$ g/mL。

[0120] 在一些方面,所公开组合物的ECM水凝胶或溶解的ECM衍生自膀胱、小肠、心脏、真皮、肝脏、肾脏、子宫、大脑、血管、肺、骨骼、肌肉、胰腺、胎盘、胃、脾脏、结肠、脂肪组织或食道的细胞外基质。在更多方面,所公开组合物的ECM水凝胶或溶解的ECM衍生自膀胱基质(UBM)、小肠黏膜下层(SIS)或膀胱黏膜下层(UBS)。在其他方面,所公开组合物的ECM水凝胶或溶解的ECM衍生自哺乳类脊椎动物,所述哺乳类脊椎动物选自人类、猴、猪、牛或羊。在其他方面,所公开组合物的ECM水凝胶或溶解的ECM衍生自非人类哺乳动物。在一些方面,所公开组合物的ECM水凝胶或溶解的ECM非衍生自UBM。

[0121] 在一些方面,所述MBV不表达CD63和CD81,或者是CD63<sup>lo</sup>CD81<sup>lo</sup>,并且所述MBV不含有可检测的碱性磷酸酶。在一些方面,在所述MBV上未能检测到CD63、CD81和/或CD9的表达。因此,在一些方面,所述MBV不表达CD63和/或CD81和/或CD9。在一个特定实例中,在所述纳米囊泡上未能检测到CD63、CD81和CD9。在其他方面,所述MBV具有几乎不可检测水平的CD63、CD81和CD9,例如通过蛋白质印迹可检测的水平。这些MBV是CD63<sup>lo</sup>CD81<sup>lo</sup>CD9<sup>lo</sup>。在其他方面,MBV不表达可检测水平的CD63、CD81或CD9中一种或更多种。在其他方面,所述MBV不含有可检测的碱性磷酸酶、骨桥蛋白、骨保护素、补体C5和/或c-反应蛋白。

[0122] 在更多方面,所述MBV(例如所述外源性MBV),衍生自膀胱、小肠、心脏、真皮、肝脏、肾脏、子宫、大脑、血管、肺、骨骼、肌肉、胰腺、胎盘、胃、脾脏、结肠、脂肪组织和/或食道的细胞外基质。在更多方面,所述MBV(例如所述外源性MBV),衍生自膀胱、小肠、真皮、肝脏、肾脏、子宫、大脑、血管、肺、肌肉、胰腺、胎盘、胃、脾脏、结肠、脂肪组织和/或食道的细胞外基质。在特定非限制性实例中,所述MBV(例如所述外源性MBV),衍生自膀胱基质(UBM)、小肠黏膜下层(SIS)或膀胱黏膜下层(UBS)。在一个方面,所述MBV(例如所述外源性MBV),衍生自真皮。在另一方面,所述MBV(例如所述外源性MBV),衍生自UBM。在其他方面,所述MBV(例如所述外源性MBV)衍生自哺乳类脊椎动物的细胞外基质,所述哺乳类脊椎动物选自人类、猴、猪、牛或羊。在特定的非限制性实例中,所述MBV(例如所述外源性MBV),衍生自非人类哺乳动物。在一些方面,所述MBV(例如所述外源性MBV),并非衍生自骨骼ECM。在一些方面,所述MBV(例如所述外源性MBV),并非衍生自心脏(心脏的(cardiac))ECM。在一些方面,所述MBV(例如所述外源性MBV),并非衍生自心脏(心脏的(cardiac))ECM或骨骼ECM。

[0123] 在一些方面,所述组合物可以包括粉碎的ECM。在其他方面,所述组合物可以包括海藻糖。

[0124] 所公开组合物可以配制用于局部施用。这些局部组合物可用于治疗炎症。例如,所公开组合物可用于治疗食道中的炎症,例如食道炎或食道溃疡。在一个方面,本发明所述的组合物被局部应用以涂覆食道组织。所公开组合物可用于治疗肛瘘。所公开组合物可以用作黏膜下衬垫物。

[0125] 本文公开了用于治疗患有炎症性肠病或食道炎症的受试者的方法。这些方法包括向所述受试者的受影响器官局部施用有效量的所公开组合物,从而治疗所述受试者的炎症性肠病或食道炎症。在某些方面,所述受试者患有炎症性肠病,受影响的器官是肠道。在其他方面,所述受试者患有溃疡性结肠炎,因此受影响的器官是结肠。在更多方面,所述受试者患有食道炎症,因此受影响的器官是食道。在一些非限制性的实例中,所述受试者是人类。

[0126] 通过将本文所公开组合物局部应用于患有咽喉或胃炎症或伤口(例如胃溃疡或咽喉溃疡)的受试者的咽喉或胃,所述组合物还可用于治疗咽喉或胃的炎症或促进伤口愈合。所述组合物可通过肠内施用(例如通过口腔),或通过外科手术(例如用导管或内窥镜)应用,或通过注射局部应用以在炎症、溃疡或伤口部位实现局部施用。

[0127] 基质结合纳米囊泡,衍生自细胞外基质(ECM)

[0128] 衍生自ECM的纳米囊泡(也称为基质结合纳米囊泡,“MBV”)通常描述于PCT公开号WO 2017/151862、WO 2018/204848,以及WO 2019/213482,这些专利通过引用并入本文。据公开,MBV嵌入在所述细胞外基质中。这些MBV可以被分离并具有生物活性。MBV不表达CD63和CD81,或者是CD63<sup>lo</sup>CD81<sup>lo</sup>,并且不含碱性磷酸酶。所述MBV可以含有IL-33。这些MBV可以用于治疗目的。在一些方面,所述MBV不包含碱性磷酸酶、骨桥蛋白、骨保护素、补体C5和/或c-反应蛋白。

[0129] 细胞外基质是结构性和功能性生物分子和/或生物大分子的复杂混合物,这些分子包括但不限于结构性蛋白、特异性蛋白、蛋白聚糖、糖胺聚糖和生长因子,它们包围和支持哺乳动物组织内的细胞,除非另有说明,否则是无细胞的。通常,所公开的MBV嵌入任何类型的细胞外基质(ECM)中,并且可以从该位置分离。因此,MBV并非可分离地存在于所述ECM表面,并且不是外泌体(也称为细胞外囊泡或EV)。

[0130] 细胞外基质在例如但不限于以下美国专利号中公开:4,902,508、4,956,178、5,281,422、5,352,463、5,372,821、5,554,389、5,573,784、5,645,860、5,771,969、5,753,267、5,762,966、5,866,414、6,099,567、6,485,723、6,576,265、6,579,538、6,696,270、6,783,776、6,793,939、6,849,273、6,852,339、6,861,074、6,887,495、6,890,562、6,890,563、6,890,564;以及6,893,666,这些专利中的每一件通过全文引用的方式并入本文。然而,ECM可以由任何组织产生,或由任何体外来源产生,其中所述ECM由培养的细胞产生,并包含天然ECM的一种或更多种聚合物组分(成分)。ECM制剂可以被认为是“脱细胞的”或“无细胞的”,这意味着所述细胞已经从来源组织或培养物中去除。

[0131] 在一些方面,所述ECM从脊椎动物分离,例如从哺乳类脊椎动物(包括但不限于人类、猴、猪、牛、羊等)分离。所述ECM可以衍生自任何器官或组织,包括但不限于膀胱、肠道(例如小肠或大肠)、心脏、真皮、肝脏、肾脏、子宫、大脑、血管、肺、骨骼、肌肉、胰腺、胎盘、胃、脾脏、结肠、脂肪组织或食道。在特定的非限制性实例中,所述细胞外基质从食道组织、膀胱(例如膀胱基质或膀胱黏膜下层)、小肠黏膜下层、真皮、脐带、心包、心脏组织或骨骼肌

肉中分离。所述ECM可以包含从器官获得的任何部分或组织,包括但不限于黏膜下层、上皮基底膜、固有膜等。在一个非限制性方面,所述ECM从膀胱分离。在某些方面,所述ECM来自人类受试者。在其他方面,所述ECM来自猪受试者。在某些方面,所述ECM不是猪ECM。在某些方面,所述ECM不是猪UBM。

[0132] 所述ECM可以包括也可以不包括基底膜。在另一个非限制性方面,所述ECM包括所述基底膜的至少一部分。所述ECM材料可以保留或可以不保留构成原始组织的一些细胞元件,例如毛细血管内皮细胞或纤维细胞。在一些方面,所述ECM含有基底膜表面和非基底膜表面。

[0133] 在一些方面,所述ECM是从猪膀胱(也称为膀胱基质或UBM)获取的。简言之,所述ECM是通过从哺乳动物(如猪)体内取出膀胱组织,并修剪残留的外部结缔组织(包括脂肪组织)来制备的。所有残留的尿液都通过用自来水反复冲洗来去除。通过首先将所述组织浸泡在去上皮溶液(例如但不限于高渗盐水(例如1.0N盐水))中10分钟至4小时的时间段来剥离所述组织。暴露在高渗盐水溶液中会将上皮细胞从下面的基底膜上移除。任选地,可以将钙螯合剂添加到所述盐水溶液中。初始剥离过程后残留的组织包括上皮基底膜和所述上皮基底膜远腔(abluminal)的组织层。相对脆弱的上皮基底膜总是被管腔表面的任何机械磨损损坏和去除。接下来,对该组织进行进一步处理,以去除大部分远腔组织,但保留上皮基底膜和固有膜。通过机械磨损或结合酶促处理(例如使用胰蛋白酶或胶原酶),然后进行水化和磨损,从剩余的去上皮组织中去除外浆膜(outer serosal)、外膜(adventitial)、肌层黏膜(tunica muscularis mucosa)、黏膜下层和大部分黏膜肌层(muscularis mucosa)。机械去除这些组织是通过用例如但不限于阿森-布朗镊子(Adson-Brown forceps)和梅岑鲍姆剪刀(Metzenbaum scissors)切除肠系膜组织,并使用手术刀手柄或其他包裹在湿润纱布中的硬质物体进行纵向擦拭动作,从而擦去肌层和黏膜下层来完成的。还考虑了涉及切割刀片、激光和其他组织分离方法的自动化机器人程序。去除这些组织后,所得的ECM主要由上皮基底膜和下固有膜组成。

[0134] 在另一方面,所述ECM是通过用手术刀手柄和湿润的纱布进行纵向擦拭动作来磨损猪膀胱组织以去除外层(包括浆膜和肌层)来制备的。在组织节段外翻之后,使用相同的擦拭动作将黏膜的管腔部分从下层组织剥离。注意防止黏膜下层穿孔。在去除这些组织之后,所得的ECM主要由黏膜下层组成(参见美国专利号9,277,999的图2,通过引用并入本文)。

[0135] ECM也可以制成粉末。这种粉末可以根据Gilbert et al., Biomaterials 26 (2005) 1431-1435的方法制备,该专利通过全文引用的方式并入本文。例如,UBM片状物可以被冻干,然后被切成小片以浸入液氮中。然后,可以对快速冷冻的材料进行粉碎,使颗粒足够小,可以放入旋转刀磨机中,对所述ECM进行粉末化。类似地,通过在ECM组织内析出NaCl,材料将碎裂成大小均匀的颗粒,这些颗粒可以快速冷冻、冻干和粉末化。

[0136] 在一个非限制性方面,所述ECM衍生自小肠黏膜下层或SIS。市售制剂包括但不限于SURGISIS™、SURGISISES™、STRATASIS™和STRATASIS-ES™(Cook Urological Inc.; Indianapolis, Ind.)和GRAFTPATCH™(Organogenesis Inc.; Canton Mass.)。在另一个非限制性方面,所述ECM衍生自真皮。市售制剂包括但不限于PELVICOL™(在欧洲以PERMACOL™出售; Bard, Covington, Ga.)、REPLIFORM™(Microvasive; Boston, Mass.)和ALLODERM™

(LifeCell; Branchburg, N.J.)。在另一方面,所述ECM衍生自膀胱。市售制剂包括但不限于UBM(ACell Corporation; Jessup, Md.)。

[0137] MBV可以使用以下公开的方法衍生自细胞外基质(从细胞外基质释放)。例如,MBV可以根据美国专利申请公开号2019/0117837中公开的方法从细胞外基质获得,就所有目的而言,该专利的内容以引用方式并入本文。在一些方面,所述ECM用酶(例如胃蛋白酶、胶原酶、弹性蛋白酶、透明质酸酶和/或蛋白酶K)消化,并且分离所述MBV。在其他方面,通过用溶液(例如甘氨酸HCL、柠檬酸、氢氧化铵)改变pH,使用螯合剂(例如但不限于EDTA、EGTA),通过使用盐(例如但不限于氯化钾(KCl)、氯化钠、氯化镁、碘化钠、硫氰酸钠)的离子强度和/或离液效应,或通过将ECM暴露于变性条件(例如盐酸胍或尿素),将所述MBV从所述ECM释放和分离。

[0138] 所述MBV可以衍生自膀胱、小肠、心脏、真皮、肝脏、肾脏、子宫、大脑、血管、肺、骨骼、肌肉、胰腺、胎盘、胃、脾脏、结肠、脂肪组织和/或食道的细胞外基质。在特定的非限制性实例中,所述MBV衍生自膀胱基质(UBM)、小肠黏膜下层(SIS)或膀胱黏膜下层(UBS)。在一个方面,所述MBV衍生自真皮。在另一方面,所述MBV衍生自UBM。在其他方面,所述MBV衍生自哺乳类脊椎动物的细胞外基质,所述哺乳类脊椎动物选自人类、猴、猪、牛或羊。在特定的非限制性实例中,所述MBV来自非人类哺乳动物。在一些方面,所述MBV并非衍生自骨骼ECM。在一些方面,所述MBV并非衍生自心脏(heart)(心脏的(cardiac))ECM。在一些方面,所述MBV并非衍生自心脏(heart)(心脏的(cardiac))ECM或骨骼ECM。在具体方面,所述MBV是在ECM用酶(例如胃蛋白酶、弹性蛋白酶、透明质酸酶、蛋白酶K、盐溶液和/或胶原酶或它们的组合)消化后制备的。所述ECM可能被冻融,或受到机械降解。

[0139] 在一些方面,不能在所述MBV上检测到CD63、CD81和/或CD9的表达。因此,在一些方面,所述MBV不表达CD63和/或CD81和/或CD9。在一个特定的实例中,在所述纳米囊泡上不能检测到CD63、CD81和CD9。在其他方面,所述MBV具有几乎不可检测水平的CD63、CD81和CD9,例如通过蛋白质印迹可检测的水平。这些MBV是CD63<sup>lo</sup>CD81<sup>lo</sup>CD9<sup>lo</sup>。在其他方面,MBV不表达可检测水平的CD63、CD81或CD9中一种或更多种。在其他方面,MBV表达几乎不可检测水平的CD63、CD81或CD9中一种或更多种。本领域技术人员可以使用例如特异性结合CD63、CD81和CD9的抗体容易地识别CD63<sup>lo</sup>和/或CD81<sup>lo</sup>和/或CD9<sup>lo</sup>的MBV。可以使用诸如荧光激活细胞分选(FACS)和荧光标记抗体的程序来确定低水平的这些标记物,以确定CD63、CD81和CD9的低量和高量阈值。所公开的MBV不同于纳米囊泡(例如外泌体),外泌体由于存在于生物流体中,可以暂时附着于所述ECM的表面,而体内的MBV与所述ECM结合,因此未见于生物流体中。

[0140] 例如,与外泌体相比,MBV具有独特的磷脂含量。在一些方面,所述MBV的总磷脂含量为至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、85%或90%,或约50%-90%、50%-65%、50%-60%、50%-70%、60%-70%、60%-90%或70%-90%的組合的磷脂酰胆碱(PC)和磷脂酰肌醇(PI)。在特定方面,所述MBV的总磷脂含量为至少55%的組合的磷脂酰胆碱(PC)和磷脂酰肌醇(PI)。在特定方面,所述MBV的总磷脂含量为至少60%的組合的磷脂酰胆碱(PC)和磷脂酰肌醇(PI)。在一些方面,所述MBV的磷脂含量包含比率小于8:1(例如,小于7:1、小于6:1、小于5:1、小于4:1、小于3:1或小于2:1)的磷脂酰胆碱(PC)与磷脂酰肌醇(PI)。在一些方面,所述MBV的磷脂含量包含比率范围为0.5-1:1,或1:0.5-1,或0.5-1:2,或2:0.5-1,或0.8-1:1,或1:0.8-1的磷脂酰胆碱(PC)与磷脂酰肌醇(PI)。在一个方面,所述MBV的磷脂

含量包含比率为约1:1的磷脂酰胆碱(PC)与磷脂酰肌醇(PI)。在特定方面,所述MBV的磷脂含量包含比率为约0.9:1的磷脂酰胆碱(PC)与磷脂酰肌醇(PI)。

[0141] 在一些方面,所述MBV的总磷脂含量为15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%或更低,或约5%-10%、5%-15%、10%-15%或8%-12%的鞘磷脂(SM)。在特定方面,所述MBV的总磷脂含量为10%或更低的鞘磷脂(SM)。在一些方面,所述MBV的总磷脂含量为15%或更低的鞘磷脂(SM)、14%或更低的鞘磷脂、13%或更低的鞘磷脂、12%或更低的鞘磷脂、11%或更低的鞘磷脂、10%或更低的鞘磷脂、9%或更低的鞘磷脂、8%或更低的鞘磷脂、7%或更低的鞘磷脂、6%或更低的鞘磷脂、5%或更低的鞘磷脂或4%或更低的鞘磷脂。

[0142] 在一些方面,所述MBV的总磷脂含量为20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%或10%或更低,或约10%-20%、15%-20%、14%-18%或12%-16%的磷脂酰乙醇胺(PE)。在特定方面,所述MBV的总磷脂含量为20%或更低的磷脂酰乙醇胺(PE)。

[0143] 在一些方面,所述MBV的总磷脂含量为5%、10%、12%、15%、18%、20%、25%或30%或更高,或约5%-30%、10%-20%、10%-25%、15%-25%或12%-18%的磷脂酰肌醇(PI)。在特定方面,MBV包括磷脂含量为15%或更高的磷脂酰肌醇(PI)。

[0144] 在特定方面,所述MBV的总磷脂含量包含15%或更高的磷脂酰肌醇、20%或更低的磷脂酰乙醇胺和10%或更低的鞘磷脂。在特定方面,所述MBV的总磷脂含量为15%或更高的磷脂酰肌醇和20%或更低的磷脂酰乙醇胺。在特定方面,所述MBV的总磷脂含量为15%或更高的磷脂酰肌醇和10%或更低的鞘磷脂。在特定方面,所述MBV的总磷脂含量包含20%或更低的磷脂酰乙醇胺和10%或更低的鞘磷脂。在特定方面,所述MBV的总磷脂含量是多于15%的磷脂酰肌醇、20%或更低的磷脂酰乙醇胺、10%或更低的鞘磷脂以及至少55%的組合的磷脂酰肌醇和磷脂酰胆碱。在一个方面,所述MBV的总磷脂含量为至少55%的組合的磷脂酰胆碱(PC)和磷脂酰肌醇(PI)以及10%或更低的鞘磷脂(SM)。在特定方面,所述MBV的总磷脂含量为至少55%的組合的磷脂酰肌醇和磷脂酰胆碱和多于15%的磷脂酰肌醇。在特定方面,所述MBV的总磷脂含量为55%的組合的磷脂酰肌醇和磷脂酰胆碱和20%或更低的磷脂酰乙醇胺。

[0145] 所述MBV还可以包含赖氨酸氧化酶(Lox)。通常,衍生自所述ECM的纳米囊泡具有的Lox含量比外泌体更高。Lox在MBV表面上表达。Nano-LC MS/MS蛋白质组学分析可用于检测Lox蛋白质。可以进行Lox的量化(参见,例如Hill RC, et al., Mol Cell Proteomics. 2015; 14(4):961-73,通过全文引用并入本文)。

[0146] 在某些方面,所述MBV包含一种或更多种miRNA。在特定的非限制性实例中,所述MBV包含miR-143、miR-145和miR-181中的一种、两种或全部三种。MiR-143、miR-145和miR-181是本领域已知的。

[0147] miR-145核酸序列在MiRbase登录号MI0000461(通过引用并入本文)中提供。miR-145核酸序列是CACCUUGUCCUCACGGUCCAGUUUCCAGGAAUCCCUUAGAUG CUAAGAUGGGGAUUCUG GAAAUACUGUUCUUGAGGUCAUGGUU (SEQ ID NO:1)。miR-181核酸序列在miRbase登录号MI0000269(通过引用并入本文)中提供。miR-181核酸序列为:AGAAGGGCUAUCAGGCCAGCCUUC AGAGGACUCCAAGGAACAUC AACGCUGUCGGUGAGUUUGGAUUUGAAAAACACUGACCGUUGACUGUACC UUGGGGUCCUUA (SEQ ID NO:2)。miR-143核酸序列在2018年3月30日的NCBI登录号NR\_029684.1(通过引用并入本文)中提供。编码miR-143核酸序列的DNA是:GC GCAGCGCC

CTGTCTCCCA GCCTGAGGTG CAGTGCTGCA TCTCTGGTCA GTTGGG AGTC TGAGATGAAG CACTGTAGCT CAGGAAGAGA GAAGTTGTTC TGCAGC(SEQ ID NO:3)。

[0148] 施用后,所述MBV保持所述受试者巨噬细胞上F4/80(巨噬细胞标记物)和CD-11b的表达。纳米囊泡处理的巨噬细胞主要是F4/80+Fizz1+,表明表型为M2。

[0149] 本文所公开的MBV可以配制成用于药物递送的组合物。在PCT公开号W0 2017/151862中对MBV进行了进一步公开和描述,该专利通过引用并入本文。

[0150] 从所述ECM分离MBV

[0151] 为了产生MBV,ECM可以由任何所关注的细胞产生,或者可以如上所述自商业来源采用。所述MBV可以由与被治疗的受试者相同的物种或不同的物种产生。在一些方面,这些方法包括用酶消化所述ECM以产生消化的ECM。在特定方面,所述ECM用胃蛋白酶、弹性蛋白酶、透明质酸酶、胶原酶、金属蛋白酶和/或蛋白酶K或它们的组合中的一种或更多种消化。在特定的非限制性实例中,所述ECM仅用弹性蛋白酶和/或金属蛋白酶消化。在另一个非限制性实例中,所述ECM不用胶原酶和/或胰蛋白酶和/或蛋白酶K消化。在其他方面,所述ECM用洗涤剂处理。在其他方面,所述方法不包括使用酶。在特定的非限制性实例中,所述方法利用离液剂或离子强度来分离MBV,例如盐(例如氯化钾)。在另外的方面,在分离MBV之前可以对ECM进行处理以增加MBV含量。例如,在美国专利申请公开号2019/0117837中描述了用于将MBV从ECM分离的技术,就所有目的而言,该专利的内容通过引用并入本文。用于分离MBV的技术也公开于Quijano et al.,Tissue Eng Part C Methods.2020Oct;26(10):528-540,该文献也通过引用并入本文。

[0152] 在某些方面,所述ECM是用酶消化的。所述ECM可以用酶消化约12至约48小时,例如约12至约36小时。所述ECM可以用酶消化约12小时、约24小时、约36小时或约48小时。在一个特定的非限制性实例中,所述ECM在室温下用酶消化。然而,所述消化可在约4°C或约4°C至25°C之间的任何温度下进行。通常,用所述酶消化所述ECM,时间和温度不限,足以去除胶原蛋白原纤维。消化过程可以根据组织来源而变化。任选地,在用所述酶消化之前或之后,通过冷冻和解冻来处理所述ECM。所述ECM可以用洗涤剂处理,包括离子洗涤剂和/或非离子洗涤剂。

[0153] 然后,例如通过离心处理所消化的ECM,以分离出无原纤维的上清液。在一些方面,对所消化的ECM例如以约300至约1000g进行第一步离心。因此,所消化的ECM可以以约400g至约750g,例如约400g、约450g、约500g或约600g离心。这种离心可以进行约10至约15分钟,例如约10至12分钟,例如约10分钟、约11分钟、约12分钟、约13分钟、约14分钟或约15分钟。收集包括所消化ECM的上清液。

[0154] 在一些方面,所述MBV包含Lox。在一些方面,分离这种MBV的方法包括用弹性蛋白酶和/或金属蛋白酶消化所述细胞外基质以产生所消化的细胞外基质,离心所消化的细胞外基质以去除胶原蛋白原纤维残余物,从而产生无原纤维上清液,离心所述无原纤维上清液以分离固体材料,并且将所述固体材料悬浮在载体中。

[0155] 在一些方面,所消化的ECM也可以以约2000g至约3000g进行第二步离心。因此,可以将所消化的ECM以约2,500g至约3,000g离心,例如以约2,000g、2,500g、2,750g或3,000g离心。这种离心可以进行约20至约30分钟,例如约20至25分钟,例如约20分钟、约21分钟、约22分钟、约23分钟、约24分钟、约25分钟、约26分钟、约27分钟、约28分钟、约29分钟或约30分

钟。收集包括所消化的ECM的上清液。

[0156] 在其他方面,所消化的ECM可以以约10,000至约15,000g进行第三步离心。因此,所消化的ECM可以以约10,000g至约12,500g,例如约10,000g、11,000g或12,000g离心。这种离心可以进行约25至约40分钟,例如约25至30分钟,例如约25分钟、约26分钟、约27分钟、约28分钟、约29分钟、约30分钟、约31分钟、约32分钟、约33分钟、约34分钟、约35分钟、约36分钟、约37分钟、约38分钟、约39分钟或约40分钟。收集包括所消化的ECM在内的上清液。可以独立地利用这些离心步骤中的一个、两个或全部三个。在一些方面,利用了所有三个离心步骤。所述离心步骤可以重复,例如重复2次、3次、4次或5次。在一个方面,将所有三个离心步骤重复三次。

[0157] 在一些方面,将所消化的ECM以约500g离心约10分钟,以约2,500g离心约20分钟,和/或以约10,000g离心约30分钟。这些步骤(例如所有三个步骤)重复2次、3次、4次或5次,例如三次。因此,在一个非限制性实例中,将所消化的ECM以约500g离心约10分钟,以约2,500g离心约20分钟,并以约10,000g离心约30分钟。这三个步骤重复三次。因此,产生了无原纤维上清液。然后将所述无原纤维上清液离心以分离所述MBV。在一些方面,将所述无原纤维上清液以约100,000g至约150,000g离心。因此,将所述无原纤维上清液以约100,000g至约125,000g离心,例如以约100,000g、约105,000g、约110,000g、约115,000g或约120,000g离心。这种离心可以进行约60至约90分钟,例如约70至约80分钟,例如约60分钟、约65分钟、约70分钟、约75分钟、约80分钟、约85分钟或约90分钟。在一个非限制性实例中,将所述无原纤维上清液以约100,000g离心约70分钟。收集固体物质,即MBV。然后,这些MBV可以被重新悬浮在任何所关注的载体中,例如但不限于缓冲液。

[0158] 在其他方面,所述ECM不被酶消化。在这些方法中,ECM悬浮在等渗盐水溶液中,例如磷酸盐缓冲盐水。然后将盐加入悬浮液中,使所述盐的最终浓度大于约0.1M。浓度可是例如,高达约3M,例如,约0.1M至约3M,或约0.1M至约2M。所述盐可以是例如,约0.1M、0.15M、0.2M、0.3M、0.4M、0.5M、0.6M、0.7M、0.8M、0.9M、1.0M、1.1M、1.2M、1.3M、1.4M、1.5M、1.6M、1.7M、1.8M、1.9M或2M。在一些非限制性实例中,所述盐为氯化钾、氯化钠或氯化镁。在其他方面,所述盐是氯化钠、氯化镁、碘化钠、硫氰酸钠、钠盐、锂盐、铯盐或钙盐。

[0159] 在一些方面,所述ECM在所述盐溶液中悬浮约10分钟至约2小时,例如约15分钟至约1小时、约30分钟至约1小时或约45分钟至约1小时。所述ECM可以在所述盐溶液中悬浮约15分钟、20分钟、25分钟、30分钟、35分钟、40分钟、45分钟、50分钟、55分钟、60分钟、65分钟、70分钟、75分钟、80分钟、85分钟、90分钟、95分钟、100分钟、105分钟、110分钟、115分钟或120分钟。所述ECM可以在4°C至约50°C的温度(例如但不限于约4°C至约25°C或约4°C至约37°C)下悬浮在所述盐溶液中。在特定的非限制性实例中,所述ECM在约4°C下悬浮在所述盐溶液中。在其他特定的非限制性实例中,所述ECM在约22°C或约25°C(室温)下悬浮在所述盐溶液中。在其他非限制性实例中,所述ECM在约37°C下悬浮在所述盐溶液中。

[0160] 在一些方面,所述方法包括在大于约0.4M的盐浓度下培育细胞外基质;离心所消化的细胞外基质以去除胶原蛋白原纤维残余物,并分离所述上清液;离心所述上清液以分离所述固体材料;以及将所述固体材料悬浮在载体中,从而从所述细胞外基质中分离MBV。

[0161] 在所述盐溶液中培育后,离心所述ECM以去除胶原蛋白原纤维。在一些方面,所消化的ECM也可以以约2000g至约5000g离心。因此,所消化的ECM可以以约2,500g至约4,500g,

例如约2,500g、约3,000g、3,500g、约4,000g或约4,500g离心。在一个特定的非限制性实例中,以约3500g离心。这种离心可以进行约20至约40分钟,例如约25至约35分钟,例如约20分钟、约21分钟、约22分钟、约23分钟、约24分钟、约25分钟、约26分钟、约27分钟、约28分钟、约29分钟、约30分钟、约31分钟、约32分钟、约33分钟、约34分钟或约35分钟。然后收集所述上清液。

[0162] 在其他方面,然后可以将所述上清液以约100,000至约150,000g进行第三步离心。因此,可将所消化的ECM以约100,000g至约125,000g离心,例如以约100,000g、110,000g或120,000g离心。这种离心可以进行约30分钟至约2.5小时,例如约1小时至约3小时,例如,约30分钟、约45分钟、约60分钟、约90分钟或约120分钟(2小时)。将所述固体材料收集并悬浮在溶液中,例如缓冲盐水中,从而分离所述MBV。

[0163] 在其他方面,所述ECM悬浮在等渗缓冲盐溶液中,例如但不限于磷酸盐缓冲盐水。可以使用离心或其他方法去除大颗粒(见下文)。然后利用超滤从所述ECM中分离MBV,颗粒在约10nm至约10,000nm之间,例如在约10至约1,000nm之间,例如在约10nm至约300nm之间。

[0164] 在特定的非限制性实例中,所述等渗缓冲盐水溶液的总盐浓度为约0.164mM,且pH为约7.2至约7.4。在一些方面,所述等渗缓冲盐水溶液包括0.002M KCl至约0.164M KCl,例如约0.0027M KCl(KCl在磷酸盐缓冲盐水中的浓度)。然后通过超速离心处理该悬浮液。

[0165] 在所述等渗缓冲盐溶液中培育后,离心所述ECM以去除胶原蛋白原纤维。在一些方面,所消化的ECM也可以以约2000g至约5000g离心。因此,所述消化的ECM可以以约2,500g至约4,500g,例如约2,500g、约3,000g、约3,500g、约4,000g或约4,500g离心。在一个特定的非限制性实例中,以约3500g离心。这种离心可以进行约20至约40分钟,例如约25至约35分钟,例如约20分钟、约21分钟、约22分钟、约23分钟、约24分钟、约25分钟、约26分钟、约27分钟、约28分钟、约29分钟、约30分钟、约31分钟、约32分钟、约33分钟、约34分钟或约35分钟。

[0166] 可以使用微滤和离心,并将其结合起来从所述悬浮液中去除大分子量材料。在一个方面,使用微滤去除大尺寸(例如大于200nm)分子材料。在另一方面,通过使用离心来去除大尺寸材料。在第三方面,微滤和超速离心均用于去除大分子量材料。从悬浮的ECM中去除大分子量材料,例如大于约10,000nm、大于约1,000nm、大于约500nm或大于约300nm的材料。

[0167] 然后对微滤的流出物或上清液进行超滤。因此,收集并利用包括小于约10,000nm、小于约1,000nm、小于约500nm或小于约300nm颗粒的流出物。然后用截留分子量(MWCO)为3,000至100,000的膜对该流出物进行超滤。

[0168] 制备细胞外基质水凝胶

[0169] 任何类型的细胞外基质可用于生产哺乳动物ECM水凝胶(参见与ECM相关的美国专利号4,902,508;4,956,178;5,281,422;5,352,463;5,372,821;5,554,389;5,573,784;5,645,860;5,771,969;5,753,267;5,762,966;5,866,414;6,099,567;6,485,723;6,576,265;6,579,538;6,696,270;6,783,776;6,793,939;6,849,273;6,852,339;6,861,074;6,887,495;6,890,562;6,890,563;6,890,564;以及6,893,666)。在某些方面,所述ECM从脊椎动物中分离,例如但不限于从哺乳动物(包括但不限于人类、猴、马、猪、牛和羊)中分离。在特定的非限制性实例中,所述ECM是猪ECM。

[0170] ECM可以衍生自任何器官或组织,包括但不限于膀胱、肠道(例如小肠或大肠)、心

脏、肾脏、子宫、大脑、血管、肺、骨骼、肌肉、胰腺、胃、脾脏、脂肪组织、肝脏、食道和真皮。所述ECM可以从细胞培养物中获得。在一个方面,所述ECM从膀胱分离。另一方面,所述ECM从食道分离。另一方面,所述ECM从真皮分离。在另一方面,所述ECM从小肠黏膜下层(SIS)分离。所述ECM可以包括也可以不包括所述ECM的基底膜部分。在某些方面,所述ECM包括所述基底膜的至少一部分。可以对组织进行脱细胞,从而例如从源组织或器官去除细胞和细胞材料,从而产生ECM。希望使用脱细胞材料来防止发生免疫反应,例如当将ECM植入受试者体内例如作为本文公开的水凝胶的组分时。去除细胞材料(例如当使用ECM形成水凝胶时),可以防止这种免疫反应。

[0171] 美国专利号8,361,503(就所有目的而言,通过全文引用并入本文)公开了膀胱ECM的制备,例如猪膀胱ECM是通过用手术刀手柄和湿润的纱布进行纵向擦拭动作来磨损膀胱组织以去除包括浆膜和肌层的外层来制备的。在组织节段外翻之后,使用相同的擦拭动作将黏膜的管腔部分从下面的组织剥离。在某些方面,可以防止黏膜下层穿孔。去除这些组织后,所生成的ECM主要由黏膜下层组成。

[0172] 由真皮ECM生产水凝胶公开于Wolf et al.,Biomaterials 33:7028-7038,2012中,该文献通过引用并入本文。例如,在Badylak et al.J Pediatr Surg.35(7):1097-103,2000和Badylak et al.,J Surg Res.2005September;128(1):87-97,2005中,公开了由食道组织生产ECM,这两篇文献均通过引用并入本文。美国专利号6,893,666(通过引用并入本文)公开了由膀胱、皮肤、食道和小肠生产ECM。ECM可以由这些组织中的任何一种生产。

[0173] 也可以使用市售的ECM制剂。在一个方面,所述ECM衍生自小肠黏膜下层或SIS。市售制剂包括但不限于SURGISIS™、SURGISIS-ES™、STRATASIS™以及STRATASIS-ES™(Cook Urological Inc.;Indianapolis,Ind.)和GRAFTPATCH™(Organogenesis Inc.;Canton Mass.)。在另一方面,所述ECM衍生自真皮。市售制剂包括但不限于PELVICOL™(在欧洲以PERMACOL™出售;Bard,Covington,Ga.)、REPLIFORM™(Microvasive;Boston,Mass.)和ALLODERM™(LifeCell;Branchburg,N.J.)。在另一方面,所述ECM衍生自膀胱。市售制剂包括但不限于UBM(Acell Corporation;Jessup,Md.)。

[0174] 用于制备ECM的组织可以多种方式获取,并且一旦获取,就可以使用所获取组织的多个部分。ECM也已由食道和小肠制备,参见例如Keane et al.,Tissue Eng.Part A,21(17-18):2293-2300,2015,该文献通过引用并入本文。食道ECM可通过机械分离黏膜和黏膜下层与外肌层,并在包括胰蛋白酶的缓冲液中消化黏膜层,然后暴露于蔗糖、TRITON-x 100®、脱氧胆酸、过乙酸和DNA酶来制备。小肠黏膜下层(SIS)可以通过机械地从完好无损的小肠中去除黏膜浅层、浆膜浅层和外肌层浅层,使黏膜下层、黏膜肌层和基底致密层保持完好无损来制备。然后用过乙酸处理SIS。Keane et al提供了示例性方案。例如,如Wolf et al,J Biomed Mater Res A.2013.35(25):6838-49.PMID:23873846.PMCID:3808505(通过引用并入本文)中所公开的,可以生产真皮水凝胶。

[0175] 在一个方面,从所获取猪膀胱中分离所述ECM以制备膀胱基质(UBM)。从膀胱中去除多余的结缔组织和残余尿液。浆膜、外肌层、黏膜下层和大部分黏膜肌层可以通过机械磨损或酶促处理、水合和磨损的组合去除。机械去除这些组织可以通过使用纵向擦拭运动磨损以去除外层(特别是远腔平滑肌层),甚至是黏膜的管腔部分(上皮层)来实现。机械去除这些组织是通过用例如阿森-布朗镊子(Adson-Brown forceps)和梅岑鲍姆剪刀

(Metzenbaum scissors) 切除肠系膜组织, 并使用手术刀手柄或其他包裹在湿润纱布中的硬质物体进行纵向擦拭, 从而擦去肌层和黏膜下层来完成的。黏膜的上皮细胞也可以通过将所述组织浸泡在去上皮溶液 (例如但不限于高渗盐水) 中而解离。所得的UBM包含黏膜和相邻固有膜的基底膜, 其进一步用过乙酸处理, 冻干并粉末化, 参见美国专利号8,361,503, 通过引用并入本文。

[0176] 真皮切片可用于制备所述ECM水凝胶, 参见PCT申请号2015/15164728, 通过引用并入本文。在特定的非限制性实例中, 真皮可以在室温下用0.25%胰蛋白酶/1% TRITON-X®-100 (即无SDS) 在涡流振荡器上以300RPM在以下溶液中脱细胞: 0.25%胰蛋白酶6小时, 1×; 去离子水, 15分钟, 3×; 70%乙醇, 10至12小时, 1×; 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 15分钟, 1×, 去离子水, 15分钟, 2×; 1% TRITON-X®-100的0.26% EDTA/0.69% Tris溶液, 6小时, 1×, 然后过夜, 1×; 去离子水, 15分钟, 3×; 0.1% 过乙酸/4% 乙醇, 2小时, 1×; PBS, 15分钟, 2×; 最后去离子水, 15分钟, 2×。然后冻干真皮片状物, 随后使用瓦林 (Waring) 混碎机和带有#20目筛网的维利氏磨粉机 (Wiley Mill) 将其变成颗粒形式。

[0177] 在一些方面, 上皮细胞可以首先通过将所述组织浸泡在去上皮溶液 (例如高渗盐水, 例如但不限于1.0N盐水) 中10分钟至4小时的时间段而被剥离。暴露在高渗盐水溶液中可以有效地将上皮细胞从下面的基底膜上去除。初始剥离过程后残留的组织包括上皮基底膜和上皮基底膜远腔的组织层。接下来对所述组织进行进一步处理, 以去除大部分远腔组织, 但不去除上皮基底膜。通过机械磨损或酶促处理、水合和磨损的组合, 从剩余的去上皮组织中去除外浆膜 (outer serosal)、外膜 (adventitial)、平滑肌组织、黏膜下层和大部分黏膜肌层。

[0178] 在一些方面, 所述ECM本身可以通过许多标准技术进行灭菌, 包括但不限于暴露于过乙酸、低剂量  $\gamma$  辐射、气体等离子体灭菌、环氧乙烷处理或电子束处理。更一般地, ECM的灭菌是通过在0.1% (v/v) 过乙酸、4% (v/v) 乙醇和95.9% (v/v) 无菌水中浸泡两小时进行的。通过用PBS (pH=7.4) 洗涤两次15分钟和用无菌水洗涤两次15分钟来去除过乙酸残留物。ECM材料可通过环氧丙烷或环氧乙烷处理、 $\gamma$  辐射处理 (0.05至4mRad)、气体等离子体灭菌、过乙酸灭菌或电子束处理进行灭菌。所述ECM也可以通过戊二醛处理来灭菌, 这会使得所述蛋白质材料进行交联, 但这种处理会大大改变所述材料, 使其吸收缓慢或完全不吸收, 并引发不同类型的宿主重塑, 这种重塑更类似于疤痕组织的形成或包封, 而不是构建性重塑。所述蛋白质材料的交联也可以用碳化二亚胺或脱氢热方法或光氧化方法诱导。如美国专利号8,361,503中所公开的, 通过浸入0.1% (v/v) 过乙酸 (a)、4% (v/v) 乙醇和96% (v/v) 无菌水中2小时对ECM进行消毒。然后用PBS (pH=7.4) 洗涤所述ECM材料两次15分钟, 和用去离子水洗涤两次15分钟。

[0179] 通常, 在分离所关注的组织后, 通过各种方法进行脱细胞, 例如但不限于暴露于高渗盐水、过乙酸、TRITON-X®或其他洗涤剂。灭菌和脱细胞可以同时进行。例如但不限于, 上述用过乙酸灭菌也可用于脱细胞。然后, ECM可以通过冻干 (冷冻干燥) 或风干的方式进行干燥。干燥的ECM可以通过包括但不限于撕碎、磨碎、切割、研磨和剪切的方法进行粉碎。粉碎的ECM也可以通过例如但不限于在冷冻或冷冻干燥状态下研磨或磨碎的方法进一步加工成粉末形式。

[0180] 哺乳动物ECM也可通过商业途径获得。这包括AVITENE™、MICROMATRIX®和

XENMATRIX™。这些市售产品也可用于生产哺乳动物声学ECM水凝胶。

[0181] 声学ECM水凝胶

[0182] 在一些方面,将粉碎的ECM(例如哺乳动物ECM),在液体中稀释以制备声学ECM水凝胶。所述ECM可以在粉碎前冻干,或者可以不冻干。所述ECM可以被粉碎,例如通过研磨、切碎或切割所述ECM粉碎。粉碎的ECM应具有的碎片范围是约10 $\mu$ m至约5000 $\mu$ m、约10 $\mu$ m至约4000 $\mu$ m、约10 $\mu$ m至约3000 $\mu$ m、约10 $\mu$ m至约2000 $\mu$ m、约10 $\mu$ m至约1000 $\mu$ m、约10 $\mu$ m至约500 $\mu$ m、约30 $\mu$ m至约300 $\mu$ m、约40 $\mu$ m至约400 $\mu$ m、约25 $\mu$ m至约500 $\mu$ m、约50 $\mu$ m至约500 $\mu$ m、约100 $\mu$ m至约300 $\mu$ m、约10 $\mu$ m至约50 $\mu$ m或约10 $\mu$ m至约100 $\mu$ m。在一个方面,提供所述ECM的碎片范围是从约10 $\mu$ m至约1000 $\mu$ m。在另一个优选方面,提供所述ECM的碎片范围是从约10 $\mu$ m至约2000 $\mu$ m。在一个非限制性实例中,所述碎片范围是约30 $\mu$ m至约300 $\mu$ m。所述液体可以是中性pH的缓冲液,例如pH为约7.0至约7.6,例如约7.1至约7.5,例如约7.2至约7.4,例如约7.0至7.2,例如约7.0至7.4,例如约7.1、7.2、7.3、7.4、7.5或7.6。所述ECM可以在等渗缓冲盐水溶液中稀释,例如但不限于磷酸盐缓冲盐水(PBS)或Tris缓冲盐水。在一些方面,所述缓冲盐水溶液的渗透压为约290mOsm/L。所述液体可以是水。在一些方面,所述等渗缓冲液,包括但不限于磷酸盐缓冲盐水(PBS),可用于使所述溶液达到目标pH,或有助于将凝胶的pH和离子强度维持在目标水平,例如生理pH和离子条件。这就形成了液体ECM溶液。

[0183] 声学水凝胶的制备方法通常不涉及使用酸性蛋白酶,包括胃蛋白酶、胰蛋白酶或透明质酸酶,或对所述ECM组织进行酶促消化。参见PCT申请号WO 2015/164728,该通过引用并入本文。通常,所述液体中溶解的ECM不与酸性蛋白酶接触。

[0184] 通过应用声学技术(例如超音频率)制备细胞外基质水凝胶的方法可以见于美国专利申请公开号2022/0143265,就所有目的而言,该专利内容通过引用并入本文。在一些方面,使用的所述ECM在所述液体中的浓度大于约25mg/ml。使用的所述ECM在所述液体(例如缓冲液)中的浓度可以是约25mg/ml至约600mg/ml。合适的浓度还包括约25mg/ml至约300mg/ml、约25mg/ml至约200mg/ml和约25mg/ml至约150mg/ml。使用的所述ECM在所述液体(例如缓冲液)中的浓度可以是约50mg/ml至600mg/ml。合适的浓度还包括约50mg/ml至约300mg/ml、约50mg/ml至约200mg/ml和约50mg/ml至约150mg/ml。合适的浓度包括约25mg/ml、30mg/ml、35mg/ml、40mg/ml、45mg/ml、50mg/ml、55mg/ml、60mg/ml、65mg/ml、70mg/ml、75mg/ml、80mg/ml、85mg/ml、90mg/ml、95mg/ml、100mg/ml、105mg/ml、110mg/ml、115mg/ml、120mg/ml、125mg/ml、130mg/ml、135mg/ml、140mg/ml、150mg/ml、155mg/ml、160mg/ml、165mg/ml、170mg/ml、175mg/ml、180mg/ml、185mg/ml、190mg/ml、195mg/ml和200mg/ml。示例性浓度包括约25mg/ml、100mg/ml和150mg/ml。在一个非限制性实例中,所述ECM在液体中的浓度为约25mg/ml至约150mg/ml。在一个非限制性实例中,所述ECM在液体中的浓度为100mg/ml。

[0185] 用超声频率处理所述ECM的液体(例如缓冲盐水溶液)溶液。在一个方面,超声的频率为约20kHz至约100kHz。所述ECM的液体溶液可以用频率为约20kHz至约30kHz、约20Hz至约40kHz、约20kHz至约50kHz、约20kHz至约60kHz、约20kHz至约70kHz、约20kHz至约80kHz,或约20kHz至约90kHz的超声处理。所述ECM的液体溶液可以用频率约为20kHz、30kHz、40kHz、50kHz、60kHz、70kHz、80kHz、90kHz或100kHz的超声进行处理。在一个非限制性实例中,所述ECM的液体溶液可以用频率为约20kHz的超声进行处理。

[0186] 所述ECM的液体(例如缓冲盐水溶液)溶液,用超声处理至少20秒,例如至少30秒。所述ECM的液体(例如缓冲盐水溶液)溶液,用超声处理至少60秒。在一些方面,所述ECM的液体溶液用超声处理至少60秒至约一小时。在其他方面,所述ECM的液体溶液用超声处理至少60秒至约30分钟。在其他方面,所述ECM的液体溶液用超声处理至少30秒至约30分钟。在更多方面,所述ECM的液体溶液用超声处理至少60秒至约15分钟。在更多方面,所述ECM的液体溶液用超声处理至少30秒至约15分钟。在一些方面,所述ECM的液体溶液用超声处理至少60秒至约10分钟。在一些方面,所述ECM的液体溶液用超声处理至少30秒至约10分钟。在一些方面,所述ECM的液体溶液用超声处理至少60秒至约5分钟。在一些方面,所述ECM的液体溶液用超声处理至少30秒至约5分钟。所述ECM的液体溶液可以用超声处理约1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、11分钟、12分钟、13分钟、14分钟、15分钟、16分钟、17分钟、18分钟、19分钟、20分钟、21分钟、22分钟、23分钟、24分钟、25分钟、26分钟、27分钟、28分钟、29分钟、30分钟、31分钟、32分钟、33分钟、34分钟、35分钟、36分钟、37分钟、38分钟、39分钟、40分钟、41分钟、42分钟、43分钟、44分钟、45分钟、46分钟、47分钟、48分钟、49分钟、50分钟、51分钟、52分钟、53分钟、54分钟、55分钟、56分钟、57分钟、58分钟、59分钟或60分钟。在一些方面,所述ECM的液体溶液用超声脉冲处理如本文所列的总时间。因此,在一些方面,所述ECM的液体(例如缓冲盐水溶液)溶液用脉冲处理,例如所述脉冲长度为至少约30秒,例如长度为约30秒、约40秒或约60秒。所述ECM的液体(例如缓冲盐水溶液)溶液可以用超声处理1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次,使得处理的总时间为60秒至一小时,或所列出总时间中任何一个。所述ECM的液体溶液可以被处理20秒、21秒、22秒、23秒、24秒、25秒、26秒、27秒、28秒、29秒、30秒、31秒、32秒、33秒、34秒、35秒、36秒、37秒、38秒、39秒、40秒、41秒、42秒、43秒、44秒、45秒、46秒、47秒、48秒、49秒、50秒、51秒、52秒、53秒、54秒、55秒、56秒、57秒、58秒、59秒或60秒。所述ECM的液体(例如缓冲盐水溶液)溶液可以被处理至少30秒。通常,如果使用多种治疗方法,它们会在不到1小时的时间内进行。示例性方法是30秒的超声脉冲,随后30至45秒不进行治疗,随后进行另一种治疗。该处理被应用2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次或10次或更多次。一个示例性的非限制性方法是6次30秒的超声脉冲,例如约20kHz的超声脉冲,然后停止45秒,重复6次,共用超声治疗3分钟。

[0187] 超声的振幅为约20 $\mu\text{m}$ 至320 $\mu\text{m}$ 。通常,振幅是从用于产生超声的探头中心测量的。所述探针振动表面的振幅是探头在完全伸展和完全收缩状态下位置之间的距离,单位为微米( $\mu\text{m}$ )。在一些方面,振幅为约30 $\mu\text{m}$ 至约200 $\mu\text{m}$ 。在其他方面,振幅为约36 $\mu\text{m}$ 至约180 $\mu\text{m}$ 。振幅可以是约30 $\mu\text{m}$ 、40 $\mu\text{m}$ 、50 $\mu\text{m}$ 、60 $\mu\text{m}$ 、70 $\mu\text{m}$ 、80 $\mu\text{m}$ 、90 $\mu\text{m}$ 、100 $\mu\text{m}$ 、110 $\mu\text{m}$ 、120 $\mu\text{m}$ 、130 $\mu\text{m}$ 、140 $\mu\text{m}$ 、150 $\mu\text{m}$ 、160 $\mu\text{m}$ 、170 $\mu\text{m}$ 、180 $\mu\text{m}$ 、190 $\mu\text{m}$ 、200 $\mu\text{m}$ 、210 $\mu\text{m}$ 、220 $\mu\text{m}$ 、230 $\mu\text{m}$ 、240 $\mu\text{m}$ 、250 $\mu\text{m}$ 、260 $\mu\text{m}$ 、270 $\mu\text{m}$ 、280 $\mu\text{m}$ 、290 $\mu\text{m}$ 或300 $\mu\text{m}$ 。在一些方面,振幅可以是约30-40 $\mu\text{m}$ 、40-50 $\mu\text{m}$ 、50-60 $\mu\text{m}$ 、60-70 $\mu\text{m}$ 、70-80 $\mu\text{m}$ 、80-90 $\mu\text{m}$ 、90-100 $\mu\text{m}$ 、100-110 $\mu\text{m}$ 、110-120 $\mu\text{m}$ 、120-130 $\mu\text{m}$ 、130-140 $\mu\text{m}$ 、140-150 $\mu\text{m}$ 、150-160 $\mu\text{m}$ 、160-170 $\mu\text{m}$ 、170-180 $\mu\text{m}$ 、180-190 $\mu\text{m}$ 、190-200 $\mu\text{m}$ 、200-210 $\mu\text{m}$ 、210-220 $\mu\text{m}$ 、220-230 $\mu\text{m}$ 、230-240 $\mu\text{m}$ 、240-250 $\mu\text{m}$ 、250-260 $\mu\text{m}$ 、260-270 $\mu\text{m}$ 、270-280 $\mu\text{m}$ 、280-290 $\mu\text{m}$ 或290-300 $\mu\text{m}$ 。在一个特定的非限制性实例中,所述超声的频率为约20kHz,振幅为约36 $\mu\text{m}$ 至180 $\mu\text{m}$ 。在另一个非限制性实例中,所述超声的频率为约20kHz,振幅为约36 $\mu\text{m}$ 至约180 $\mu\text{m}$ ,治疗总共约1分钟、2分钟、3分钟、4分钟或5分钟,例如约3分钟。所述超声处理可以持续约1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5

分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、11分钟、12分钟、13分钟、14分钟、15分钟、16分钟、17分钟、18分钟、19分钟或20分钟。所述超声处理可以是约30秒至约5分钟。所述超声处理可以是例如在约1至约5分钟之间。所述超声处理可以是约1分钟至约10分钟。所述超声处理可以是,例如,在1分钟至约20分钟之间。在更多方面,所述超声处理可以小于约1小时、小于约30分钟、小于约20分钟或小于约10分钟。在一些方面,所述超声处理可以持续至少30秒。在其他方面,所述超声处理可以是约10分钟至约24小时,例如约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、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时或24小时。在一些方面,所述超声处理可以长达48小时。

[0188] 在一些方面,在约30°C至约43°C的温度范围内用超声处理所述ECM的液体溶液。在一个方面,在约35°C至约40°C的温度范围内用超声处理所述ECM的液体溶液。在一个方面,在约36°C至约38°C的温度范围内用超声处理所述ECM的液体溶液。在另一方面,在约37°C或更高的温度范围内,例如约37°C至约55°C的温度,例如约37°C至约50°C,例如约37°C至约45°C,例如约37°C至约40°C的范围内,用超声处理所述ECM的液体溶液。在约37°C、38°C、39°C、40°C、41°C、42°C、43°C、44°C、45°C、46°C、47°C、48°C、49°C、50°C、51°C、52°C、53°C、54°C或55°C的温度下用超声处理所述ECM的液体溶液。在其他方面,在大于约38°C,例如约38°C至约50°C,例如约38°C至约45°C,例如约38°C至约40°C的温度下用超声处理所述ECM的液体溶液。

[0189] 在一些方面,用超声处理产生声学ECM水凝胶。所述声学ECM水凝胶通常在37°C左右经历从溶胶到凝胶的相变,因此在高于37°C时转变为液相,在低于37°C下转变为凝胶相。在37°C下,所述声学ECM水凝胶足够粘稠,类似凝胶;然而,当温度升高到37°C以上时,凝胶转变为溶胶。当温度降低到37°C以下时,所述声学ECM水凝胶形成凝胶(溶胶到凝胶的转变)。因此,在一些方面,在超声处理之后,所述声学ECM水凝胶被冷却到低于37°C的温度,例如约4°C至约36°C。所述声学ECM水凝胶可以冷却到室温,通常约为25°C。在一些方面,将所述声学ECM水凝胶冷却到约15°C至约25°C。所述声学ECM水凝胶可以冷却到约23°C至约27°C。所述声学ECM水凝胶可以冷却到约4°C、5°C、6°C、7°C、8°C、9°C、10°C、11°C、12°C、13°C、14°C、15°C、16°C、17°C、18°C、19°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C或30°C以诱导所述凝胶相。

[0190] 在一些方面,可以在超声处理之前将外源性MBV添加到ECM溶液中。在另一些方面,可以在超声处理后将外源性MBV添加到所述声学ECM水凝胶中。所述外源性MBV可以在所述水凝胶转变为凝胶之前(例如,当其处于液相时)添加到所述ECM水凝胶中;因此,在一个方面,在大于37°C的温度下将外源性MBV添加到所述声学ECM水凝胶中,以产生包含本文公开的声学水凝胶(含有外源性MBV)的组合物。在另一方面,在声学ECM水凝胶的凝胶阶段,例如,在低于37°C的温度下,将所述外源性MBV添加到所述声学ECM水凝胶中。例如,本文中所公开的是包含外源性MBV的声学ECM水凝胶。

[0191] 在一些方面,公开了声学哺乳动物ECM水凝胶,其中所述水凝胶是热可逆的,其中所述水凝胶在低于约37°C的温度下为固(凝胶)相,在高于37°C温度下为液(溶胶)相。所述声学水凝胶可以使用本文所公开方法的任一种来制备。在一些方面,所述声学ECM水凝胶的储能模量( $G'$ )比损耗模量( $G''$ )高约一个数量级。在其他方面,其中所述声学ECM水凝胶的黏

度在约15至约37°C的温度下,例如在约15°C、15°C、16°C、17°C、18°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C和/或36°C下,随着应力的增加而降低。在其他方面,所述声学ECM水凝胶的黏度在室温下和/或在约23°C至约27°C和/或约15°C至约25°C下随着应力的增加而降低。在一个方面,所述声学ECM水凝胶从凝胶到溶胶的转变是在约37°C下,因此所述水凝胶可以用作黏膜下衬垫物,因为它在体温下足够粘稠。

[0192] 这些声学ECM水凝胶可以由上述公开的任何哺乳动物ECM制成。在特定的非限制性实例中,所述ECM是人类ECM。在其他非限制性实例中,所述ECM是膀胱ECM、小肠黏膜下ECM、食道ECM或真皮ECM。在一个方面,所述ECM是膀胱ECM。在另一方面,所述ECM是真皮ECM。在另一方面,所述ECM是食道ECM。ECM的来源可以是,例如,猪、牛或羊。

[0193] 在一些方面,所述声学ECM水凝胶包括浓度为约25mg/ml至约600mg/ml的ECM。在其他方面,所述声学ECM水凝胶包括浓度为约20mg/ml至约600mg/ml、约25mg/ml至约300mg/ml、约25mg/ml至约200mg/ml以及约25mg/ml至约150mg/ml的ECM。在更多的方面,所述ECM包括在液体中(例如在缓冲液中)浓度为约50mg/ml至600mg/ml的ECM。所述声学ECM水凝胶的ECM浓度还可以是约50mg/ml至约300mg/ml、约50mg/ml至约200mg/ml、约50mg/ml至约150mg/ml、约50-100mg/ml或约100-150mg/ml。在一些非限制性实例中,所述声学ECM水凝胶包括浓度为约20mg/ml、25mg/ml、30mg/ml、35mg/ml、40mg/ml、45mg/ml、50mg/ml、55mg/ml、60mg/ml、65mg/ml、70mg/ml、75mg/ml、80mg/ml、85mg/ml、90mg/ml、95mg/ml、100mg/ml、105mg/ml、110mg/ml、115mg/ml、120mg/ml、125mg/ml、130mg/ml、135mg/ml、140mg/ml、150mg/ml、155mg/ml、160mg/ml、165mg/ml、170mg/ml、175mg/ml、180mg/ml、185mg/ml、190mg/ml、195mg/ml和200mg/ml的ECM。在一些非限制性实例中,所述声学ECM水凝胶包括浓度为约20-25mg/ml、25-30mg/ml、30-35mg/ml、35-40mg/ml、40-45mg/ml、45-50mg/ml、50-55mg/ml、55-60mg/ml、60-65mg/ml、65-70mg/ml、70-75mg/ml、75-80mg/ml、80-85mg/ml、85-90mg/ml、90-95mg/ml、95-100mg/ml、100-105mg/ml、105-110mg/ml、110-115mg/ml、115-120mg/ml、120-125mg/ml、125-130mg/ml、130-135mg/ml、135-140mg/ml、140-145mg/ml、145-150mg/ml、150-155mg/ml、155-160mg/ml、160-165mg/ml、165-170mg/ml、170-175mg/ml、175-180mg/ml、180-185mg/ml、185-190mg/ml、190-195mg/ml和195-200mg/mL的ECM。ECM的示例性非限制性浓度还包括约25mg/ml、100mg/ml和150mg/ml。在一个非限制性实例中,所述声学ECM水凝胶包括浓度为约25mg/ml至约150mg/ml的ECM。在一个方面,所述ECM浓度为约100mg/ml。

[0194] 在一些方面,当ECM的浓度为约150mg/mL时,所述声学ECM水凝胶在15°C下的黏度为约1400Pa\*s,在25°C的温度下的黏度为约400Pa\*s。在其他方面,当ECM的浓度为约150mg/mL时,所述声学ECM水凝胶的储能模量是15°C下约2700Pa\*s、25°C下约800Pa\*s和37°C下600Pa\*s。

[0195] 所述液相声学ECM水凝胶可以在冷却前放入三维铸模中,也可以铺在TEFLON®片材上形成膜。ECM在所述声学ECM水凝胶中的高浓度(50至600mg/ml)能够形成非常薄的片状物,例如薄至4微米的片状物。所述声学ECM水凝胶可以配置为大于4微米的任何尺寸和任何二维或三维形状。在一些方面,形成厚度为约4至约10微米的片状物,例如厚度为约4微米、5微米、6微米、7微米、8微米、9微米或10微米。所述声学ECM水凝胶可以形成任何三维形状,包

括但不限于圆柱体、球体、椭球体、圆盘、片状物、立方体、长方体、圆锥体、三角形或矩形棱柱,以及空心球体、空心椭球体和开放式空心圆柱体等。所述声学ECM水凝胶也可以用作注射剂,例如通过将其置于注射器中并以凝胶相或溶胶相从所述注射器中挤出。

[0196] 在一些方面,所述哺乳动物声学ECM水凝胶包括浓度大于约0.1mg/ml溶解的ECM。所述哺乳动物声学ECM凝胶可以包括浓度为约0.1mg/ml至约1,000mg/ml溶解的ECM。合适的浓度还包括约1mg/ml至约1,000mg/ml、1mg/ml至约500mg/ml、1mg/ml至约300mg/ml、1mg/ml至约200mg/ml、约1mg/ml至约100mg/ml、约10mg/ml至约100mg/ml、约10mg/ml至约200mg/ml、约100mg/ml至约500mg/ml、约50mg/ml至约150mg/ml、约20mg/ml至约70mg/ml、约4mg/ml至约20mg/ml或约40mg/ml至约66mg/ml溶解的ECM。所述哺乳动物声学ECM水凝胶可以包括在所述液体(例如缓冲液)中浓度为约10mg/ml至约500mg/ml溶解的ECM。所述哺乳动物声学ECM水凝胶可以包括10mg/ml、25mg/ml、30mg/ml、35mg/ml、40mg/ml、45mg/ml、50mg/ml、55mg/ml、60mg/ml、65mg/ml、70mg/ml、75mg/ml、80mg/ml、85mg/ml、90mg/ml、95mg/ml、100mg/ml、105mg/ml、110mg/ml、115mg/ml、120mg/ml、125mg/ml、130mg/ml、135mg/ml、140mg/ml、150mg/ml、155mg/ml、160mg/ml、165mg/ml、170mg/ml、175mg/ml、180mg/ml、185mg/ml、190mg/ml、195mg/ml和200mg/ml溶解的ECM。示例性浓度包括约20mg/ml、40mg/ml、66mg/ml、70mg/ml和150mg/ml溶解的ECM。在一个非限制性实例中,所述哺乳动物声学ECM水凝胶包括浓度为约20mg/ml至约70mg/ml溶解的ECM。在一个非限制性实例中,所述哺乳动物声学ECM水凝胶包括浓度为约40mg/ml或约66mg/ml溶解的ECM。在一个非限制性实例中,所述哺乳动物声学ECM水凝胶包括浓度约为10mg/ml至约100mg/ml溶解的ECM。在一个非限制性实例中,所述哺乳动物声学ECM水凝胶包括浓度为约50mg/ml至约150mg/ml溶解的ECM。在一个非限制性实例中,所述哺乳动物声学ECM水凝胶包括浓度为约10mg/ml至约200mg/ml溶解的ECM。在一个非限制性实例中,所述哺乳动物声学ECM水凝胶包括浓度为约10mg/ml至约500mg/ml溶解的ECM。

[0197] 示例性浓度包括约20mg/ml、40mg/ml、66mg/ml、70mg/ml和150mg/ml溶解的ECM。在一个非限制性实例中,所述哺乳动物声学ECM水凝胶包括约20mg/ml至约70mg/ml溶解的ECM。在一个非限制性实例中,所述哺乳动物声学ECM水凝胶包括约40mg/ml或约66mg/ml溶解的ECM。

[0198] 在一些方面,所述哺乳动物声学ECM水凝胶包括浓度为约25mg/ml至约600mg/ml溶解的ECM。在其他方面,所述哺乳动物声学ECM凝胶包括浓度为约20mg/ml至约600mg/ml、约25mg/ml至约500mg/ml、约25mg/ml至约400mg/ml、约25mg/ml至约300mg/ml、约25mg/ml至约200mg/ml以及约25mg/ml至约150mg/ml溶解的ECM。在更多方面,所述哺乳动物声学ECM凝胶包括浓度为约50mg/ml至约600mg/ml溶解的ECM。所述哺乳动物声学ECM凝胶包括浓度为约50mg/ml至约300mg/ml、约50mg/ml至约200mg/ml、约50mg/ml至约150mg/ml、约50-100mg/ml或约100-150mg/ml溶解的ECM。在一些非限制性实例中,所述哺乳动物声学ECM水凝胶包括浓度为约20-25mg/ml、25-30mg/ml、30-35mg/ml、35-40mg/ml、40-45mg/ml、45-50mg/ml、50-55mg/ml、55-60mg/ml、60-65mg/ml、65-70mg/ml、70-75mg/ml、75-80mg/ml、80-85mg/ml、85-90mg/ml、90-95mg/ml、95-100mg/ml、100-105mg/ml、105-110mg/ml、110-115mg/ml、115-120mg/ml、120-125mg/ml、125-130mg/ml、130-135mg/ml、135-140mg/ml、140-145mg/ml、145-150mg/ml、150-155mg/ml、155-160mg/ml、160-165mg/ml、165-170mg/ml、170-175mg/ml

ml、175-180mg/ml、180-185mg/ml、185-190mg/ml、190-195mg/ml和195-200mg/mL溶解的ECM。

[0199] 在一些方面,制备包括所述哺乳动物声学ECM水凝胶和海藻糖的组合物。在更多方面,所使用的组合物包括约0.1mg/ml至约700mg/ml的海藻糖。在一些方面,所述组合物包括约1mg/ml海藻糖至约700mg/ml海藻糖。在其他方面,所述组合物包括50mg/ml至约500mg/ml的海藻糖。在其他方面,所述组合物包括约10mg/ml海藻糖至约600mg/ml、约10mg/ml至约500mg/ml、约10mg/ml至约400mg/ml、约10mg/ml至约300mg/ml、约10mg/ml至约200mg/ml,或约10mg/ml至约100mg/ml海藻糖。在其他方面,所述组合物可包含约0.1至约100mg/ml海藻糖、约0.1至约10mg/ml海藻糖或约0.1至约1mg/ml海藻糖。在更多方面,所述组合物可包含约50mg/ml至约400mg/ml海藻糖、约50mg/ml至约300mg/ml海藻糖、约50mg/ml至约200mg/ml海藻糖,或约50mg/ml至约100mg/ml海藻糖。在一些方面,所述组合物包括约20mg/ml至约70mg/ml的海藻糖。在一些方面,所述组合物包括约10mg/ml至约100mg/ml的海藻糖。在一些方面,所述组合物包括15-30mg/ml海藻糖。在一些方面,所述组合物包括60-70mg/ml的海藻糖。在一些方面,所述组合物包括20mg/ml的海藻糖。在一些方面,所述组合物包括66mg/ml的海藻糖。在其他方面,所述组合物可包括约1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、6mg/ml、7mg/ml、8mg/ml、9mg/ml、10mg/ml、20mg/ml、30mg/ml、40mg/ml、50mg/ml、60mg/ml、66mg/ml、70mg/ml、80mg/ml、90mg/ml、100mg/ml、200mg/ml、300mg/ml、400mg/ml、500mg/ml或600mg/ml的海藻糖。在其他方面,所述组合物包括约100mg/ml至约700mg/ml海藻糖,例如约100mg/ml、150mg/ml、200mg/ml、250mg/ml、300mg/ml、350mg/ml、400mg/ml、450mg/ml、500mg/ml、550mg/ml或600mg/ml的海藻糖。在更多方面,所述组合物可包括约0.1mg/ml、0.2mg/ml、0.3mg/ml、0.4mg/ml、0.5mg/ml、0.6mg/ml、0.7mg/ml、0.8mg/ml、0.9mg/ml或1mg/ml的海藻糖。

[0200] 在更多方面,所述组合物包括所述哺乳动物声学ECM水凝胶(包含溶解的ECM)、另外粉碎的哺乳动物ECM和任选的海藻糖。所粉碎的ECM未经超声处理,也未溶解到所述水凝胶中。所粉碎的ECM还包括所述哺乳动物ECM水凝胶的组合物的独特添加剂。所述组合物可以包括约1至约30%的粉碎ECM,重量/体积(w/v),其未溶解在所述声学ECM水凝胶中。在不受拘泥于理论的前提下,所粉碎的ECM通常具有完好无损的胶原蛋白颗粒,而声学ECM水凝胶具有已被超声破坏的胶原蛋白,从而使得可溶性胶原蛋白含量增加(Hussey et al., ultrasonic cavitation to prepare ECM hydrogels Acta Biomater.2020May;108:77-86,通过引用全文并入本文)。因此,含有另外粉碎的哺乳动物ECM的声学ECM水凝胶组合物包括完好无损的胶原蛋白和破坏的胶原蛋白。

[0201] 所述组合物可以包括约5%至约30%w/v、约10%至约30%、约15%至约30%、约20%至约30%、约25%至约30%、约1%至约20%、约5%至约20%、约10%至约20%、约15%至约20%、约10%至约20%,或约15%至约20%的粉碎ECM(w/v)。所述组合物可以包括约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%或30%的粉碎ECM(w/v)。所述组合物可以包括不超过1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%或30%粉碎的ECM(w/v)。所述组合物可以包括至少约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%或30%粉碎的ECM(w/v)。

[0202] 所粉碎的ECM可以来自与所述哺乳动物声学ECM水凝胶相同的物种。在一个特定的

非限制性实例中,所述哺乳动物声学ECM水凝胶和所粉碎的ECM都是猪的。在其他非限制性实例中,所述哺乳动物声学ECM水凝胶和所粉碎的ECM都是人类的。

[0203] 所粉碎的ECM可以来自与所述哺乳动物声学ECM水凝胶相同或不同的组织。在一个方面,所述哺乳动物声学ECM水凝胶和所粉碎的ECM来自相同的组织。在一个方面,所述哺乳动物声学ECM水凝胶和所粉碎的ECM是真皮ECM。在一个方面,所述哺乳动物声学ECM水凝胶和所粉碎的ECM是猪真皮ECM。

[0204] 所述组合物可以在应用于受试者之前进行灭菌。所述组合物可以使用本领域技术人员已知的任何方法灭菌,包括过滤和辐射。在一些方面,用电离辐射(例如电子束或 $\gamma$ 辐射)对所述组合物进行灭菌。所述组合物可使用 $\gamma$ 辐射灭菌,例如,所述组合物使用10至50kGy辐射灭菌,例如15至45kGy辐射、20至40kGy辐射或10至30kGy辐射灭菌。在一些非限制性实例中,使用10kGy、15kGy、20kGy、25kGy、30kGy、35kGy、40kGy、45kGy或50kGy辐射对所述组合物进行灭菌。通常,将所述组合物灭菌足够的时间以实现不存在可检测的活体病原体,例如但不限于病毒和细菌。

[0205] 酶促ECM水凝胶

[0206] 制备ECM水凝胶的方法公开于例如美国专利号8,361,503中,就所有目的而言,该专利内容通过引用并入本文。任何类型的细胞外基质组织可用于制备可用于本文所公开方法的水凝胶(参见与ECM相关的美国专利号4,902,508;4,956,178;5,281,422;5,352,463;5,372,821;5,554,389;5,573,784;5,645,860;5,771,969;5,753,267;5,762,966;5,866,414;6,099,567;6,485,723;6,576,265;6,579,538;6,696,270;6,783,776;6,793,939;6,849,273;6,852,339;6,861,074;6,887,495;6,890,562;6,890,563;6,890,564;以及6,893,666)。在某些方面,所述ECM从脊椎动物体内分离,例如但不限于从温血哺乳类脊椎动物体内分离,所述温血哺乳类脊椎动物包括但不限于人类、猴、马、猪、牛和羊。在特定的非限制性实例中,所述ECM是猪或人类的。

[0207] 所述ECM可以衍生自任何器官或组织,包括但不限于膀胱、肠道、肝脏、食道和真皮。例如,所述ECM可以衍生自膀胱、小肠、心脏、真皮、肝脏、肾脏、子宫、大脑、血管、肺、骨骼、肌肉、胰腺、胎盘、胃、脾脏、结肠、脂肪组织和/或食道。所述ECM可以从细胞培养物中获得。在一个方面,所述ECM是从膀胱分离的。另一方面,所述ECM是从食道分离的。所述ECM可以包括也可以不包括所述ECM的基底膜部分。在某些方面,所述ECM包括所述基底膜的至少一部分。

[0208] 在一些方面,如美国专利号8,361,503(通过引用并入本文)所述,膀胱ECM(例如猪膀胱ECM)是通过用手术刀手柄和湿润的纱布进行纵向擦拭动作来磨损膀胱组织以去除包括浆膜和肌层两者的外层而制备的。在组织节段外翻之后,使用相同的擦拭动作将黏膜的管腔部分从下面的组织剥离。在某些方面,可以防止黏膜下层穿孔。去除这些组织后,所得的ECM主要由黏膜下层组成。Wolf et al., *Biomaterials* 33:7028-7038, 2012(通过引用并入本文)公开了从脱细胞真皮ECM生产水凝胶。例如,由食道组织生产ECM的方法公开于 Badylak et al. *J Pediatr Surg.* 35(7):1097-103, 2000以及 Badylak et al., *J Surg Res.* 2005 September; 128(1):87-97, 2005, 两者均通过引用并入本文。美国专利号6,893,666公开了由膀胱、皮肤、食道和小肠生产ECM。

[0209] 市售ECM制剂也可用于本文所述的方法、装置和组合物中。在一个方面,所述ECM衍

生自小肠黏膜下层或SIS。市售制剂包括但不限于SURGISIS™、SURGISIS-ES™、STRATASIS™和STRATASIS-ES™ (Cook Urological Inc.; Indianapolis, Ind.) 和GRAFTPATCH™ (Organogenesis Inc.; Canton Mass.)。在另一方面,所述ECM衍生自真皮。市售制剂包括但不限于PELVICOL™ (在欧洲以PERMACOL™出售; Bard, Covington, Ga.)、REPLIFORM™ (Microvasive; Boston, Mass.) 和ALLODERM™ (LifeCell; Branchburg, N.J.)。在另一方面,所述ECM衍生自膀胱。市售制剂包括但不限于UBM (Acell Corporation; Jessup, Md.)。

[0210] 用于制备ECM的组织可以多种方式获取,并且一旦获取,就可以使用所获取组织的多个部分。ECM也已由食道和小肠制备,并且用该ECM制备了水凝胶,参见例如Keane et al., Tissue Eng. Part A, 21 (17-18): 2293-2300, 2015, 通过引用并入本文。食道ECM可通过机械分离黏膜和黏膜下层与外肌层,并在包括胰蛋白酶的缓冲液中消化黏膜层,然后暴露于蔗糖、TRITON-X100®、脱氧胆酸、过乙酸和DNA酶来制备。小肠黏膜下层 (SIS) 可以通过机械地从完好无损的小肠中去除黏膜浅层、浆膜浅层和外肌层浅层,使黏膜下层、黏膜肌层和基底致密层保持完好无损来制备。然后用过乙酸处理所述SIS。Keane et al 提供了示例性方案。例如,如Wolf et al., J Biomed Mater Res A. 2013. 35 (25): 6838-49. PMID: 23873846. PMCID: 3808505 (通过引用并入本文) 中所公开的,可以生产真皮水凝胶。

[0211] 在一个方面,从获取的猪膀胱中分离所述ECM以制备膀胱基质 (UBM)。从膀胱中去除多余的结缔组织和残余尿液。浆膜、外肌层、黏膜下层和大部分黏膜肌层可以通过机械磨损或酶促处理、水合和磨损的组合去除。机械去除这些组织可以通过使用纵向擦拭动作的磨损,以去除外层 (特别是远腔平滑肌层),甚至是黏膜的管腔部分 (上皮层) 来实现。机械去除这些组织是通过用例如阿森-布朗镊子 (Adson-Brown forceps) 和梅岑鲍姆剪刀 (Metzenbaum scissors) 去除肠系膜组织,并使用手术刀手柄或其他包裹在湿润的纱布中硬质物体进行纵向擦拭动作,从而擦去肌层和黏膜下层来完成的。黏膜的上皮细胞也可以通过将所述组织浸泡在去上皮溶液 (例如但不限于高渗盐水) 中而解离。所得的UBM包含黏膜和相邻固有膜的基底膜,进一步用过乙酸处理,冻干并粉末化,参见美国专利号8,361,503,通过引用并入本文。

[0212] 真皮切片可用于制备所述酶促ECM水凝胶,参见PCT申请号2015/15164728,通过引用并入本文。在特定的非限制性实例中,真皮可以在室温下用0.25%胰蛋白酶/1% Triton X-100 (即无SDS) 在涡流振荡器上以300RPM在以下溶液中脱细胞: 0.25%胰蛋白酶6小时, 1×; 去离子水, 15分钟, 3×; 70%乙醇, 10至12小时, 1×; 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 15分钟, 1×, 去离子水, 15分钟, 2×; 1% Triton X-100的0.26% EDTA/0.69% Tris溶液, 6小时, 1×, 然后过夜, 1×; 去离子水, 15分钟, 3×; 0.1% 过乙酸/4%乙醇, 2小时, 1×; PBS, 15分钟, 2×; 最后去离子水, 15分钟, 2×。然后冻干真皮片状物,随后使用瓦林 (Waring) 混碎机和带有#20目筛网的维利氏磨粉机 (Wiley Mill) 将其变成颗粒形式。

[0213] 在一些方面,可以通过首先将所述组织浸泡在去上皮溶液 (例如高渗盐水,例如但不限于1.0N盐水) 中10分钟至4小时的时间段来剥离上皮细胞。暴露在高渗盐水溶液中可以有效地将上皮细胞从下面的基底膜上去除。初始剥离程序后剩余的组织包括上皮基底膜和上皮基底膜远腔的组织层。接下来对该组织进行进一步处理,以去除大部分远腔组织,但不去除上皮基底膜。通过机械磨损或酶促处理、水合和磨损的组合,从剩余的去上皮组织中去除外浆膜 (outer serosal)、外膜 (adventitial)、平滑肌组织、黏膜下层和大部分肌层黏

膜。

[0214] ECM可以通过许多标准技术进行灭菌,包括但不限于暴露于过乙酸、低剂量 $\gamma$ 辐射、气体等离子体灭菌、环氧乙烷处理或电子束处理。更一般地,ECM的灭菌是通过在0.1% (v/v) 过乙酸、4% (v/v) 乙醇和95.9% (v/v) 无菌水中浸泡两小时来进行的。通过用PBS (pH=7.4) 洗涤两次15分钟和用无菌水洗涤两次15分钟来去除过乙酸残留物。ECM材料可通过环氧丙烷或环氧乙烷处理、 $\gamma$ 辐射处理(0.05至4mRad)、气体等离子体灭菌、过乙酸灭菌或电子束处理进行灭菌。ECM也可以通过戊二醛处理进行灭菌,这会使得所述蛋白质材料交联,但这种处理会大大改变所述材料,使其吸收缓慢或完全不吸收,并引发不同类型的宿主重塑,这种重塑更类似于疤痕组织形成或包封,而不是构建性重塑。所述蛋白质材料的交联也可以用碳化二亚胺或脱氢热方法或光氧化方法诱导。如美国专利号8,361,503中所公开的,通过浸入0.1% (v/v) 过乙酸(a)、4% (v/v) 乙醇和96% (v/v) 无菌水中2小时对ECM进行消毒。然后用PBS (pH=7.4) 洗涤所述ECM材料两次15分钟,和用去离子水洗涤两次15分钟。

[0215] 在分离所关注的组织后,通过各种方法进行脱细胞,例如但不限于暴露于高渗盐水、过乙酸、TRITON-X®或其他洗涤剂。灭菌和脱细胞可以同时进行。例如,但不限于,如上所述的用过乙酸灭菌也可以用于使所述ECM脱细胞。脱细胞的ECM然后可以被干燥,或者冻干(冷冻干燥)或者风干。干燥的ECM可以通过包括但不限于撕碎、磨碎、切割、研磨和剪切的方法进行粉碎。所粉碎的ECM也可以通过例如但不限于在冷冻或冷冻干燥状态下研磨或磨碎的方法进一步加工成粉末状。为了制备溶解的ECM组织,用酸性蛋白酶的酸性溶液消化粉碎的ECM以形成消化溶液。所述酸性蛋白酶可以是胰蛋白酶和/或胃蛋白酶,例如,或它们的组合。

[0216] 在一个方面,所脱细胞的ECM材料被所述酸性蛋白酶部分消化。在一个实例中,与用1mg/mL胃蛋白酶的0.01M HCl溶液消化1mg/mL冻干的粉末状ECM材料48小时相比,所脱细胞ECM材料的消化不完全。在另一个实例中,与用1mg/mL胃蛋白酶的0.01M HCl溶液消化10mg/mL冻干的粉末状ECM材料48小时相比,所脱细胞的ECM材料的消化不完全。在另一方面,与未消化的ECM材料相比,所述ECM材料中透明质酸的消化率低于50%、40%、30%、25%、20%或10%,参见PCT申请号WO 2015/164728,通过引用并入本文。

[0217] ECM的消化溶液通常在室温下持续恒定搅拌一定时间。ECM消化物可以立即使用,也可以在-20°C下储存,或在例如但不限于在-20°C或-80°C的温度下冷冻。因此,所述ECM消化物可以保持在溶解的状态。例如,在2016年9月10日提交的PCT申请号PCT/US16/52261(通过引用并入本文)中公开了将水凝胶保持在溶解状态的方法。

[0218] 一旦所述ECM溶解(通常基本上完全溶解),所述溶液的pH升高到7.2和7.8之间,并且根据一个方面,升高到pH 7.4。pH可以升高至约7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7或7.8。碱(例如含有氢氧根离子的碱,包括NaOH)可以用来提高所述溶液的pH。同样地,缓冲液(例如等渗缓冲液,包括但不限于磷酸盐缓冲盐水(PBS))可以用于使所述溶液达到目标pH,或者有助于将凝胶的pH和离子强度维持在目标水平,例如生理的pH和离子条件。这形成了“预凝胶”溶液,即溶解的ECM水凝胶。所中和的消化溶液(预凝胶,即溶解的ECM水凝胶)可以在下临界溶液温度下凝胶化,参见PCT公开号2015/164728,通过引用并入本文。

[0219] 所述ECM水凝胶在温度升高时形成凝胶(溶胶到凝胶的转变)。反相凝胶的下临界溶解温度(LCST)是反相凝胶聚合物可溶于其溶剂(例如水或水性溶剂)的温度。当温度上升

到反相凝胶的LCST以上时,形成水凝胶。聚合物反相凝胶化的一般概念及其与LCST的关系在化学领域广为人知。本文所述的ECM凝胶例如由如下所述脱细胞的完好无损的ECM制备,方法是:通过用酸性蛋白酶消化所述ECM材料,中和所述材料以形成预凝胶,将所述预凝胶温度升高到所述预凝胶的LCST以上以使预凝胶凝胶化,例如形成水凝胶。酸性蛋白酶消化从溶液到凝胶的转变温度通常在10°C到40°C的范围内,以及两者间的任何增量或范围,例如20°C到35°C。例如,可以将所述预凝胶加热到37°C以形成水凝胶。例如,预凝胶。

[0220] 因此,所述ECM通常可以衍生自哺乳动物组织,例如但不限于膀胱、食道或小肠中的一种。在一个特定的非限制性实例中,所述ECM衍生自膀胱。根据一个方面,在用所述酸性蛋白酶进行部分或完全消化之前,不对由所述组织制备的脱细胞ECM材料进行渗析,和/或在用酸性蛋白酶消化之后、所中和消化的ECM材料胶凝化之前,不对由所述组织制备的脱细胞ECM材料进行渗析。

[0221] 在一个非限制性方面,所述ECM被冻干并粉碎。然后用酸性蛋白酶的酸性溶液溶解所述ECM以产生消化的ECM,例如膀胱ECM。所述酸性蛋白酶可以是但不限于胃蛋白酶或胰蛋白酶,或它们的组合。然后,所述ECM可以在适合或最适合所述酶的酸性pH(例如大于约pH 2,或在pH和4之间)下溶解,例如在0.01M HCl溶液中溶解。所述ECM通常在混合(搅拌、搅动、掺合、共混、旋转、倾斜等)下溶解约12至约48小时,这取决于组织类型(例如,参见下面的实例)。ECM水凝胶是通过以下步骤制备的:(i)粉碎细胞外基质,(ii)通过用酸性蛋白酶的酸性溶液消化溶解完好无损的、未渗析的或未交联的细胞外基质以产生消化溶液,(iii)将所述消化溶液的pH提高到pH在7.2和7.8之间以产生中和的消化溶液(预凝胶溶液),以及(iv)将所述溶液凝胶化。

[0222] 因此,公开了在酸性溶液中用酸性蛋白酶酶促消化的ECM的组合物,其含有外源性MBV。当被中和时(例如,至pH为7.0-7.8),并且当被加热至约37°C时,所述组合物形成凝胶并且所述蛋白酶失活。在一个方面,所述外源性MBV并非衍生自骨骼或心脏组织。在另一方面,所述组合物中外源性MBV的浓度大于5mg/mL。

[0223] 还公开了在中性溶液(例如pH为7.0-7.8)中酶促消化的ECM的组合物,其中所述溶液含有失活的酸性蛋白酶,例如失活的胃蛋白酶和/或胰蛋白酶,或另一种其活性形式适合消化ECM的失活酸性蛋白酶;所述组合物还含有外源性MBV。当将所述溶液加热至约37°C时就会形成凝胶。在一个方面,所述外源性MBV并非衍生自骨骼或心脏组织。在另一方面,所述组合物中外源性MBV的浓度大于5mg/mL。酸性蛋白酶可以由于例如pH变化而失活或钝化。

[0224] 在另一方面,所述ECM水凝胶可以离心,并收集可溶性级分。用于分离(fractionation)ECM水凝胶的示例性方法公开于例如PCT公开号WO 2015/164728中,其通过引用并入本文。该PCT出版物中公开的所述方法包括用酸性蛋白酶(例如胃蛋白酶)部分或完全消化由组织制备的脱细胞ECM材料;将所消化的ECM材料中和至pH为7.0-8.0、7.2-7.8或7.4;在高于其下临界溶解温度的温度下凝胶化所述中和、消化的ECM材料;离心所述凝胶化ECM材料以产生沉淀物和上清液;以及分离所述上清液和所述沉淀物,从而分离所述ECM材料的结构级分和可溶性级分。

[0225] 当ECM水凝胶暴露在高于下临界溶解温度的温度下,例如约37°C的温度下时,形成所述凝胶。“预凝胶”形式的ECM水凝胶(溶解的ECM水凝胶)可以冷冻和储存在例如但不限于-20°C或-80°C的温度下。“预凝胶”形式的ECM水凝胶可以储存在室温下,例如约25°C。在

一些非限制性实例中,所述ECM水凝胶在低于37°C时,例如在25°C、24°C、23°C、22°C、21°C、20°C、19°C、18°C、17°C、16°C、15°C、14°C、13°C、12°C、11°C、10°C、9°C、8°C、7°C、6°C、5°C、4°C时为所述预凝胶形式。所述ECM水凝胶可以冷冻储存,因此可以在0°C以下储存。如本文所用,术语“预凝胶形式”或“预凝胶”是指所述ECM水凝胶,其中pH增加,但尚未凝胶化。例如,但不限于,预凝胶形式的ECM水凝胶的pH在7.2和7.8之间。在一些方面,溶解的ECM水凝胶用于本文所公开的方法中。例如,在2016年9月10日提交的PCT申请号PCT/US16/52261(通过引用并入本文)中公开了使水凝胶保持在溶解形式的方法。在一些方面,通过本文所述任何方法制备的所述ECM组合物吸收到或以其他方式分散到生物相容性基材上或生物相容性基材中。生物相容性基材的非限制性实例包括:网状物、非织造脱细胞的组织、聚合物组合物、聚合物结构、细胞生长支架(scaffold)、植入物、矫形植入物和人工晶体、缝线、血管内植入物、支架(stents)和移植物。本文所述的组合物可通过任何合适的方法应用于非织造材料(例如绷带)、缝线、植入物(例如陶瓷、金属或聚合物植入物(例如假体、人造或以其他方式改造的血管、瓣膜、人工晶体或组织植入物)),或并入其中。如本文所用,术语“涂覆”(coat)及相关的同源词(例如“涂覆”(coated)和“涂覆”(coating)),是指由本文的组合物部分或全部覆盖无机结构组成的过程。例如但不限于,用溶解的级分涂覆无机结构可以包括诸如浇注、嵌入、分层、浸渍、喷涂的方法。超声处理可用于辅助涂覆无机结构。

[0226] 使用的组合物包括ECM水凝胶,即含有外源性MBV的“酶促”ECM水凝胶。添加外源性MBV以丰富所述ECM水凝胶的生物活性,并提高其在施用至或植入受试者时减轻炎症和增强组织生长和修复的治疗功效。酶促ECM水凝胶是由溶解的ECM制成的。为了制备溶解的ECM组织,用酸性蛋白酶的酸性溶液消化粉碎的ECM以形成消化溶液。如本文所用,术语“酸性蛋白酶”是指裂解肽键的酶,其中所述酶的裂解肽键活性在酸性pH下增强。例如但不限于,酸性蛋白酶可包括胃蛋白酶和胰蛋白酶。在一个方面,所述ECM在粉碎之前被冻干。

[0227] ECM的所述消化液通常在室温下持续恒定搅拌一定时间。所述ECM消化物可以立即使用,或在-20°C下储存或在例如但不限于-20°C或-80°C下冷冻。为了形成“预凝胶”溶液,将所述消化溶液的pH提高到7.2至7.8之间。可以通过添加一种或更多种碱或等渗缓冲溶液(例如但不限于pH 7.4的NaOH或PBS)来提高pH。所述方法通常不包括在凝胶化之前的渗析步骤,从而得到更完整的ECM样基质,其通常在37°C下比同类的胶原蛋白或渗析的ECM制剂更慢地凝胶化。因此,所述凝胶更适合注射到患者体内,并且由于保留了许多天然可溶性因子(例如但不限于细胞因子),因此也保留了更多的天然ECM特性。

[0228] 如本文所用,术语“等渗缓冲溶液”是指缓冲至pH在7.2和7.8之间的溶液,其盐浓度平衡以促进等渗环境。如本文所用,术语“碱”是指pH大于7的任何化合物或化合物溶液。例如但不限于,所述碱是碱性氢氧化物或碱性氢氧化物的水溶液。在某些方面,所述碱是NaOH或NaOH的PBS溶液。

[0229] 此时,这种“预凝胶”溶液可以在适当温暖的温度(例如但不限于在约37°C)下培育以凝胶化。所述预凝胶可以冷冻并储存在例如但不限于-20°C或-80°C下。如本文所用,术语“预凝胶溶液”或“预凝胶”是指pH提高的消化溶液。例如但不限于,预凝胶的pH在7.2和7.8之间。本发明所述的ECM水凝胶组合物可以包括失活的酸性蛋白酶。本发明所述的ECM水凝胶组合物的pH可以在7.2和7.8之间。所述“预凝胶”可能含有外源性MBV。在一个方面,所述外源性MBV并非衍生自心脏或骨骼ECM。

[0230] 所述ECM水凝胶、所述消化溶液或预凝胶可以含有浓度在1mg/mL和500mg/mL之间溶解的ECM。在一些方面,所述ECM水凝胶、所述消化溶液或预凝胶中溶解的ECM的量在1mg/mL和400mg/mL之间,例如,1mg/mL至350mg/mL,或1mg/mL至300mg/mL,或1mg/mL至250mg/mL,或1mg/mL至200mg/mL,或1mg/mL至150mg/mL,或1mg/mL至100mg/mL,或1mg/mL至50mg/mL,或5mg/mL至250mg/mL,或20mg/mL至200mg/mL,或5mg/mL至200mg/mL,或5mg/mL至100mg/mL。在更多方面,所述ECM水凝胶、所述消化溶液或预凝胶中溶解的ECM的量在约5mg/ml至约50mg/ml之间,例如约10mg/ml至约50mg/mL、约20mg/ml至约50mg/ml,约例如30mg/ml至约50mg/ml、约40mg/ml至约50mg/ml、约5mg/ml至约40mg/ml、约5mg/ml至约30mg/ml、约5mg/mL至约20mg/mL,或约5mg/ml至约10mg/ml。例如,所述ECM水凝胶、所述消化溶液或预凝胶可含有浓度为约5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml、25mg/ml、30mg/ml、35mg/ml、40mg/ml、45mg/ml、50mg/ml、60mg/ml、65mg/ml、70mg/ml、75mg/ml、80mg/ml、85mg/ml、90mg/ml、95mg/ml、100mg/ml、150mg/ml、200mg/ml、250mg/ml、300mg/ml、350mg/ml、400mg/ml、450mg/ml或500mg/ml溶解的ECM。在一个非限制性实例中,所述ECM水凝胶、所述消化溶液或预凝胶中溶解的ECM的量在10mg/mL和30mg/mL之间。在另一非限定性实例中,ECM水凝胶、所述消化溶液或预凝胶中溶解的ECM的量是在1mg/mL和20mg/mL之间。在又一个非限制性实例中,所述ECM水凝胶、所述消化溶液或预凝胶中溶解的ECM的量是在4mg/mL和20mg/mL之间。在另一个非限制性实例中,所述ECM水凝胶、所述消化溶液或预凝胶中溶解的ECM的量是在1mg/mL和50mg/mL之间。在一些方面,所述ECM水凝胶、所述消化溶液或预凝胶中的溶解的ECM的量是约5至约100mg/mL,例如50至100mg/mL、25至75mg/mL、60至80mg/mL、40至60mg/mL、50至80mg/mL,或约30至约60mg/mL。

#### [0231] 其他注意事项

[0232] 在一些方面,所公开组合物被吸收或以其他方式分散到生物相容性基材上或生物相容性基材中。生物相容性基材的非限制性实例包括:网状物、非织造的脱细胞组织、聚合物组合物、聚合物结构、细胞生长支架(scaffold)、植入物、矫形植入物和人工晶体、缝线、血管内植入物、支架(stents)和移植物。在某些方面,所述基材是合成的。在其他方面,所述基材是天然的。本文所述的组合物可通过任何合适的方法应用于非织造材料(例如绷带)、缝线、植入物(例如陶瓷、金属或聚合物植入物(例如假体、人造或以其他方式改造的血管、瓣膜、人工晶体或组织植入物)),或并入其中。如本文所用,术语“涂覆”(coat)及相关的同源词(例如“涂覆”(coated)和“涂覆”(coating)),是指由本文所述的组合物部分或全部覆盖无机结构组成的过程。例如但不限于,用所公开的液相组合物涂覆无机结构可以包括诸如浇注、嵌入、分层、浸渍、喷涂的方法。

[0233] 在另一方面,将所公开组合物以液相涂覆到生物相容性结构材料(例如金属、无机钙化合物(例如氢氧化钙、磷酸钙或碳酸钙),或陶瓷组合物)上。合适金属的非限制性实例是可包括非金属组分和金属组分(例如钼、钽、铌、锆、铁、锰、铬、钴、镍、铝和镧)的钴-铬合金、不锈钢合金、钛合金、钽合金、钛-钽合金,包括但不限于各种等级的CP Ti(市售纯钛)或Ti 6Al 4V(90%wt.Ti、6%wt.Al和4%wt.V)、不锈钢316、Nitinol(镍-钛合金)、羟磷灰石涂覆的钛合金。金属因高强度、柔性和生物相容性而有用。金属也可以形成复杂的形状,许多金属可以承受生物环境中的腐蚀,减少磨损,不会对组织造成损害。其他组合物,包括陶瓷、钙化合物,例如但不限于霰石。也可以使用金属、陶瓷和/或其他材料的组合。

[0234] 任何有用的药剂都可以混入本文所述的任何组合物、与其共同递送、共同应用或以其他方式组合。例如但不限于,有用的药剂包括干扰素、白细胞介素、趋化因子、单核因子、激素、凝血剂、化疗药物和抗生素。

[0235] 可以将抗生素或抗菌剂添加到所述组合物中以减少治疗部位感染的可能性。多种抗生素是众所周知的,包括靶向细菌细胞壁的抗生素(例如青霉素和头孢菌素)或靶向细胞膜的抗生素(例如多粘菌素),或干扰基本细菌酶的抗生素(例如喹诺酮和磺酰胺)。抗生素包括但不限于,克林霉素、红霉素、四环素、米诺环素、多西环素、青霉素、氨苄青霉素、羧苄青霉素、甲氧西林、头孢菌素、万古霉素和杆菌肽、链霉素、庆大霉素、氯霉素、夫西地酸、环丙沙星和其他喹诺酮、磺酰胺、甲氧苄啶、氨苯砜、异烟肼、替考拉宁、阿伏霉素、达福普汀、维及霉素、头孢噻肟、头孢曲松、哌拉西林、替卡西林、头孢吡肟、头孢匹罗、利福平、吡嗪酰胺、环丙沙星、左氧氟沙星、恩诺沙星、阿米卡星、奈替卡星、亚胺培南、美罗培南、利奈唑胺、其药学上可接受的盐及其前药。抗菌剂还包括环状脂肽(例如达托霉素)、甘氨酸环素(例如替加环素)和恶唑烷酮(例如利奈唑胺)。抗生素可以是窄谱或广谱抗生素。所述抗生素可以靶向革兰氏阴性细菌或革兰氏阳性细菌。局部抗生素可以包括,例如大环内酯物抗生素(例如红霉素)、磺胺抗生素(例如磺胺酰肟)、环肽(例如杆菌肽、多粘菌素)、假单胞菌酸(例如莫匹罗星)、氨基糖苷(例如新霉素)或喹诺酮(例如环丙沙星或氧氟沙星)、硝基咪唑(例如甲硝唑)或药物组合(例如杆菌素/多粘菌素或新霉素/多粘菌素B/杆菌肽)。

[0236] 此外,可以在所述组合物中加入局部麻醉剂以尽量减少不适,例如利多卡因。可以使用任何合适的添加剂,只要其与所述组合物和正在治疗的特定患者和疾病状态相匹配即可。

[0237] 在一些方面,所述组合物,例如灭菌的组合物,可通过5Fr/16G导管注射。在一个方面,所述组合物可在室温下或在室温和约37°C下通过5Fr/16G导管注射。

[0238] 使用方法

[0239] 巨噬细胞已被证实是损伤后正常愈合和正常组织发育的重要调节因子。所公开组合物可以重现整个ECM对巨噬细胞表型的影响,从而使得M2样、调节性或促重塑巨噬细胞增加。因此,本文所公开的组合物任一种都可用于改变巨噬细胞表型,例如用于诱导调节性M2巨噬细胞。例如,ECM水凝胶,无论是声学ECM水凝胶还是酶促ECM水凝胶,都可以与外源性MBV结合,以提供用于改变巨噬细胞表型的组合物。

[0240] 在一些方面,公开了通过施用治疗有效量的本文所公开组合物在所述受试者体内诱导M2巨噬细胞的方法。在其他方面,公开了减少了受试者体内M1(促炎)巨噬细胞的方法。所述方法包括施用治疗有效量的所公开组合物,从而抑制所述受试者体内的M1巨噬细胞。所述受试者可以是任何所关注的受试者,包括人类受试者和动物受试者。

[0241] 所公开组合物增强了受试者病变处的止血作用。因此,还公开了用于加速伤口凝血和/或减少伤口流血时间的方法。在一些方面,在向所述受试者施用含有外源性MBV的声学ECM水凝胶后约10至约100秒内,例如约10秒、20秒、30秒、40秒、50秒、60秒、70秒、80秒、90秒或100秒内,诱导止血作用。所公开组合物可用于治疗中风。

[0242] 在一些方面,可以将治疗有效量的所述组合物局部施用到受试者部位以诱导止血作用。所述受试者可能有伤口。所述伤口可以是外部伤口,或患者外部无法看到的内部伤口。所公开组合物可用作任何类型伤口的止血剂。所述方法可以包括选择所关注受试者中

的任一个,例如有任何伤口的受试者。

[0243] 在一些方面,公开了用于治疗患有炎症或有伤口的受试者的方法。所述方法包括将治疗有效量的所述组合物局部应用于所述炎症或伤口。在某些方面,所述炎症或伤口在胃中,例如溃疡。在一些方面,所述炎症或伤口在咽喉中,例如溃疡。本文所公开的组合物可通过局部(local)施用(例如局部(topical)施用、注射),或通过注射或通过肠内施用等方式应用于胃或溃疡的炎症、伤口或炎症部位。在一些非限制性实例中,所述受试者患有炎症性病症,例如但不限于炎症性肠病、溃疡性结肠炎、克罗恩病或类风湿性关节炎。所述方法可以包括将所述ECM水凝胶应用于组织表面。

[0244] 例如,公开了通过向受试者施用有效量的含有本文所公开外源性MBV的ECM水凝胶组合物来治疗受试者体内的炎症性肠病(例如溃疡性结肠炎或克罗恩病)的方法。所述组合物可以例如,通过灌肠、通过口服、通过肠道内局部施用(例如,局部注射)或通过全身施用(例如,通过静脉施用)施用给受试者,例如人类受试者。例如,施用可以是肠内施用,例如通过口腔施用。例如,可以通过灌肠直接施用到肠道。所述组合物的施用量足以减轻与炎症性肠病(例如溃疡性结肠炎或克罗恩病)相关的肠道炎症。例如,与施用所述组合物之前的炎症水平相比,所述组合物的施用量减轻了肠道炎症。例如,所述组合物可以每周、每隔一周、每月、每两个月或每三个月施用给所述受试者。所述方法还可以减轻与炎症性肠病相关的症状。

[0245] 所公开组合物和方法可用于治疗克罗恩病。可以使用所公开的方法和组合物来治疗多种类型的克罗恩病,包括回结肠克罗恩病、克罗恩结肠炎、胃十二指肠克罗恩病和空肠回肠炎。可以治疗由某种因素(agent)引起的克罗恩病,例如由免疫系统功能紊乱(例如自身免疫或先天性免疫受损)、遗传因子、肠道细菌变化和环境因子引起的克罗恩病。可以使用多种技术来识别患有克罗恩病的受试者。例如,克罗恩病的检测可以包括内窥镜检查(例如结肠镜检查)、成像(例如使用钡跟踪X射线、CT扫描和MRI扫描)和血液检测(例如以确定铁、维生素D或维生素B12缺乏症;红细胞沉降率(ESR);和C-反应蛋白水平)。施用本文公开的所述组合物的方法可以降低克罗恩病发作的严重程度或频率。这些方法还可以使得克罗恩病临床缓解和内窥镜缓解。例如,在一些方面,与治疗前的评分相比,施用所公开组合物使得克罗恩病活动指数(CDAI)降低。在一个方面,患者出现了CDAI评分降低到150以下并经历缓解。在另一方面,患者出现了CDAI评分降低到450以下或更低(450或更高表示严重疾病)。在另一方面,患者因为接受根据所公开方法的治疗,出现了至少70个CDAI点的下降(表明治疗反应)。例如,在另一方面,患者因为从施用所公开组合物开始进行治疗,出现了至少70个CDAI点的下降(表明治疗反应),所述下降在施用后1个月、2个月或3个月或更长时间内保持。在一个方面,所述受试者从施用所公开组合物时起出现了CDAI评分下降,所述下降在施用后1个月、2个月或3个月内保持。在一个方面,所述受试者的CDAI评分在用所公开组合物治疗的1个月、2个月或3个月内降低。在一个方面,治疗克罗恩病的疗效超过疗程的持续时间,例如超过一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月或更长时间。

[0246] 所公开组合物可用于治疗患有溃疡性结肠炎的受试者。可以使用多种技术来识别受试者溃疡性结肠炎。例如,溃疡性结肠炎的检测可以包括全血细胞计数(例如以识别贫血或血小板增多症)、电解质或肾功能检测(例如以识别低钾血症、低镁血症或肾前性衰竭)、肝功能检测(例如以识别原发性硬化性胆管炎)、X光、尿分析、粪便培养(例如以识别寄生虫

或传染性病原体)、红细胞沉降率或C-反应蛋白测量(例如以识别炎症),或乙状结肠镜检查(例如以识别大肠溃疡)。在一些实例中,临床结肠炎活动指数可用于评估溃疡性结肠炎的严重程度。在一些方面,所公开组合物通过口服施用。所公开的组合物可局部施用至例如肠道(gut)或肠道(bowel),例如通过肠内或灌肠或注射施用。所述方法可降低溃疡性结肠炎发作的严重程度或频率。所述方法还可使得溃疡性结肠炎疾病临床缓解和内窥镜缓解。例如,在某些方面,与治疗前的评分相比,施用所公开的组合物使得溃疡性结肠炎的梅奥评分或溃疡性结肠炎疾病活动指数(UCDAI)降低。在一个方面,患者出现了梅奥评分降低到2分或更低,并经历缓解。在另一方面,患者出现了梅奥评分降低到5分或更低。在另一方面,患者出现了梅奥评分降低到小于10分。在一个方面,所述受试者在接受所公开组合物治疗后的一定时间段内,例如施用后1个月、2个月或3个月内,出现了梅奥评分或UCDAI评分的降低。在一个方面,治疗溃疡性结肠炎的疗效超过疗程的持续时间,例如,超过从接受治疗时起一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月或更长时间。

[0247] 与M1巨噬细胞相比,所公开组合物可以有效地增加受试者胃肠道中M2巨噬细胞的数量、比率或比例,以治疗炎症性肠病,例如克罗恩病或溃疡性结肠炎。例如,当用所公开组合物治疗受试者时,所述受试者的胃肠道(例如结肠)中M2巨噬细胞与M1巨噬细胞的数量、比例或比率提高。这种提高可以在至少一周、两周或一个月内出现,例如,从施用本文公开所述的组合物开始。

[0248] 因此例如,在用本文公开的组合物和方法治疗时,所述受试者的胃肠道组织(例如结肠组织)的组织病理学评估将会表现出炎症和疾病特征的表型特点(例如,黏膜破裂、上皮细胞汇合层缺失、固有层和黏膜下层中细胞量增加)更少和健康肠道组织(例如,结肠组织)特征的表型特点(例如,完好无损的黏膜肌层、存在健康汇合层黏膜上皮细胞以及固有层和黏膜下层的正常细胞量)更多。在其他非限制性实例中,所述受试者是器官移植接受者、患有移植物抗宿主病的受试者、患有心肌梗死的受试者或有伤口的受试者,例如但不限于有手术伤口或非手术创伤伤口的受试者。因此,公开了一种加速有需要个体伤口愈合和/或增强止血作用的方法,包含施用治疗有效量的如本文所公开的组合物。施用可以是局部施用至所述伤口或移植物的部位。

[0249] 所述组合物可以应用于任何伤口部位以增强止血作用和/或促进伤口愈合。所述伤口可以是皮肤上的伤口,也可以是任何表面(包括但不限于眼睛)上的伤口。还提供了用于缺血和缺血性损伤造成的伤口(例如静脉循环系统回流障碍和/或不足造成的慢性腿部静脉性溃疡)的方法。因此,本发明的所述方法可以利用局部真皮施用或眼部施用。

[0250] 通常,在这些应用中,所述组合物被配制用于局部施用。所述水凝胶可以应用于任何器官的组织表面。例如,本文公开的所述组合物可以应用于食道以治疗食道炎。在对患有食道炎的受试者施用所公开组合物后,例如施用至食道,可以减轻食道的炎症。此外,与M1巨噬细胞相比,所公开组合物可以有效地增加受试者食道中M2巨噬细胞的数量、比率或比例,以治疗食道炎。例如,当用所公开组合物治疗受试者时,所述受试者的食道组织中M2巨噬细胞相对于M1巨噬细胞的数量、比例或比率提高。这种提高可以例如从施用本文公开的所述组合物开始的至少一周、两周或一个月内发生。

[0251] 本文公开了用于愈合伤口(例如真皮伤口)的局部组合物。这些可以治疗的伤口可能是浅表性伤口,或者可能是深层伤口,涉及皮肤真皮和表皮的损伤。所述伤口可以是外科

手术伤口。因此,提供了促进受试者伤口愈合和/或促进所述受试者凝血(增强止血作用)的方法。

[0252] 所述组合物可以直接应用于目标位置,例如以局部制剂的形式(例如片状物、药塞)应用,或作为敷料或绷带的一部分应用。绷带和伤口敷料可以含有所述组合物。这些可以通过将所述组合物与任何其他所需添加剂一起应用于绷带或伤口敷料来制备。这些片状物、药塞、绷带或敷料可以用来缩短凝血时间和/或加快伤口愈合。所述声学水凝胶可以通过注射施用到目标位置,以促进伤口愈合,例如,作为凝胶相中的固体施用,或者可以在施用前将温度升高到37°C以上,使得所述水凝胶以液相施用。

[0253] 所述组合物可以单次应用。或者,根据所述伤口的性质,所述声学ECM水凝胶可以例如,在约3至14天的时间内周期性地通常每天约1至10次施加到受影响区域。在某些情况下,可能需要无限期地应用所述组合物。例如,与外源性MBV结合的ECM水凝胶,无论是声学ECM水凝胶还是酶促ECM水凝胶,都可以局部(locally)(例如局部(topically))应用于所述受试者的身体组织,无论该组织是外部组织(例如皮肤),还是内部组织(例如结肠、小肠、食道、咽喉或胃)。

[0254] 在一些方面,与对照(例如标准值、在不治疗的情况下实现的伤口愈合率或止血率,或ECM水凝胶单独治疗或MBV单独治疗的情况下实现的伤口愈合率或止血率)相比,所述组合物增强止血作用和/或促进伤口愈合至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少100%或至少200%。

[0255] 所公开组合物也可用于治疗手术伤口和其他有意的干预措施,在所述措施中所述组合物可在手术完成后立即应用。提供了刺激伤口愈合和增强伤口部位止血作用的方法,所述伤口包括手术伤口、切除性伤口、涉及真皮和表皮损伤的深度伤口、眼组织伤口、牙组织伤口、口腔伤口、糖尿病溃疡、真皮溃疡、肘部溃疡、动脉溃疡、静脉淤积性溃疡以及由热暴露或化学物质引起的烧伤。

[0256] 所述受试者可以是任何所关注的哺乳动物受试者,包括人类受试者或动物受试者。所述受试者可以是儿童受试者或成人受试者,例如年轻受试者、中年受试者或老年受试者。在人类中,成年受试者大于18岁,年轻受试者是约18至约35岁,中年受试者通常被认为是约35岁至约55岁,而高龄(或老年)人类受试者超过约55岁(例如超过60岁、超过65岁、超过70岁、超过75岁或超过80岁)。

[0257] 所述受试者可以以正常速度愈合伤口,或者可能出现愈合障碍。许多不适和病况会导致愈合障碍。这些包括糖尿病(例如II型糖尿病)、类固醇和其他药物治疗以及缺血性阻塞或损伤(例如外周血管疾病或创伤性血管闭塞中的缺血性阻塞或损伤)。诱导伤口愈合异常的病况包括但不限于尿毒症,营养不良,维生素缺乏,肥胖,感染,免疫抑制以及与用类固醇、放射治疗、抗肿瘤药物和抗代谢药物全身治疗相关的并发症。已证实会造成伤口愈合障碍的类固醇包括可的松、氢化可的松、地塞米松和甲基强的松龙。非类固醇化合物(例如醋酸奥曲肽),也已被证实会造成伤口愈合障碍(Waddell et al., Am. Surg. 63:446-449, 1997)。

[0258] 所述受试者可能患有凝血障碍,或正在接受抗凝血剂(例如但不限于华法林或PLAAVIX®)治疗。所述受试者可能患有因子II、V、VII、X或XII缺乏症。所述受试者可能患有血友病A、血友病B、冯·维勒布兰德病、纤维蛋白原或凝血酶原缺乏症或结构异常。因此,

在某些方面,选择这些受试者进行治疗。

[0259] 本文还提供了增强皮肤移植物与伤口床的粘附性并刺激所述伤口床再上皮化的方法。移植物的类型包括但不限于:自体皮肤移植物、人造皮肤、同种异体移植物、自体真皮移植物、自体表皮移植物、无血管移植物、布-布二氏移植物、骨骼移植物、胚胎移植物、皮肤移植物、延迟移植物、真皮移植物、表皮移植物、筋膜移植物、全层皮移植物、异源移植物、异种移植物、同源移植物、增生性移植物、角膜板层移植物、网状移植物、黏膜移植物、奥-提二氏移植物、网膜移植物、补片移植物、蒂状移植物、穿透性角膜移植物、分层皮移植物和厚分层皮移植物。所述方法包括向具有所述移植物的所述受试者施用治疗有效量的本文公开的所述组合物,从而增强所述移植物的粘附性和可接受性,并控制或消除细菌生长。在一些方面,用所述组合物处理的细胞或组织被移植到受试者体内。在一个特定非限制性的实例中,在移植之前将所述组合物施用于移植物,例如皮肤移植物。

[0260] 还提供了治疗由于磨损或化学损伤引起的水泡和烧伤的方法。这些方法包括治疗皮肤或内脏器官。这些方法包括治疗卵巢损伤(例如,由于化疗药物治疗或环磷酰胺治疗);辐射或化疗诱导的膀胱炎;或高剂量化疗诱导的肠道损伤。所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的如本文所公开组合物,以促进水泡或烧伤的愈合并减少或消除细菌生长。

[0261] 提供了促进由个体外科手术引起的吻合伤口和其他伤口愈合的方法。这些方法包括在吻合手术或其他手术之后和/或期间施用有效量的本文公开的所述组合物。吻合术是连接两个管状结构,例如,当肠道中段被切除,其余部分被连接在一起以重建肠道时。与皮肤愈合不同,吻合伤口的愈合过程通常是不可见的。此外,伤口愈合,至少在胃肠道中,在没有并发症的情况下迅速进行;然而,并发症通常需要通过另外的手术进行矫正(Thornton and Barbul, Surg.Clin.North Am.77:549-573(1997))。所述方法可以包括选择需要吻合伤口愈合的受试者。所述受试者可以是由于上述病况之一而伤口愈合障碍的受试者,或者可以是伤口正常愈合的受试者,例如未患有上述任何病况的受试者。

[0262] 在一些方面,所述组合物用于治疗或防止手术粘连,例如,形成结合通常不会连接的组织或器官的瘢痕组织带。本文公开的包含ECM水凝胶(含有外源性MBV)的组合物可以例如通过在外科手术期间局部施用或注射布置在不需要粘连的组织表面上或组织之间。外科手术可以是腹部外科手术,例如疝手术、剖腹产术、阑尾切除术或胃肠道任何部分(例如结肠、直肠或肛门)的切除术。例如,将所公开组合物应用于腹壁和引起疝的组织或器官,例如小肠、大肠或胃。将所公开组合物应用于子宫和周围组织以防止剖腹产后粘连。

[0263] 在一些方面,对所述组合物进行灭菌。灭菌对于确保组合物充分去除病原体污染并适合医疗用途(例如植入人体或动物体内)非常重要。尽管本领域已知的其他灭菌方法也可以适用,但诸如 $\gamma$ 辐射、环氧乙烷、超临界CO<sub>2</sub>、过氧化氢气体等离子体或臭氧的方法可以适用于灭菌。 $\gamma$ 灭菌是可接受的灭菌方法。

[0264] 作为黏膜下衬垫物的用途

[0265] 内窥镜检查是在不进行侵入性手术的情况下,通过称为内窥镜的仪器对体内中空器官或空腔内部进行检查的手术。内窥镜检查可用于外科手术,例如烧灼出血血管,去除息肉、腺瘤和小肿瘤,进行活检或去除异物。内窥镜手术可以在胃肠道、呼吸道、耳朵、泌尿道、女性生殖系统中进行,也可以通过小切口在通常封闭的体腔中进行,例如腹腔或盆腔(腹腔镜检查)、关节内部(关节镜检查)和胸部器官(胸腔镜检查 and 纵隔镜检查)。内窥镜检查可以

在上胃肠道或下胃肠道进行。内窥镜是一种照明仪器,通常是光纤、柔性或刚性的管状仪器,用于观察中空器官或部分(例如膀胱、食道、胃或肠道)的内部以达到诊断或治疗目的,它通常具有一个或更多个工作通道,以使仪器(例如钳子、电手术刀、内窥镜注射针或剪刀)能够通过或有助于取出生物切片样品。它包括在其远端部分处的合适的灯和成像装置,并且可以通过身体的自然开口插入,例如口腔、肛门、耳朵、鼻子或通过小的手术切口插入。鉴于可以通过内窥镜手术检查的身体器官或体腔种类繁多,存在几种类型的专用内窥镜,例如喉镜、胸腔镜、血管镜、结肠镜、肠镜、乙状结肠镜、直肠镜、直肠窥镜、肛镜、关节镜、鼻镜、腹腔镜、宫腔镜、脑镜、肾镜、食道镜、支气管镜、胃镜、羊膜镜、膀胱镜。

[0266] 内窥镜手术广泛应用于胃肠道,包括上胃肠道和下胃肠道。例如,内窥镜手术可用于检查覆盖胃肠腔的黏膜,并检测大小病理性病变,例如炎症组织、息肉、假息肉、锯齿状病变、腺瘤、溃疡、发育不良、瘤前形成和瘤形成以及肿瘤。内窥镜手术可用于活检和去除病理性病变(息肉、腺瘤、发育不良、瘤前形成和瘤形成、肿瘤)。外科干预措施包括两种常用于胃肠道内窥镜检查以去除病理性病变的内窥镜切除手术:内窥镜黏膜切除术(EMR)和内窥镜黏膜下剥离术(ESD)。这两种技术能够微创治疗胃肠道息肉、腺瘤、发育不良和早期癌症,涉及的淋巴结转移风险最低。

[0267] 本文公开了从受试者器官区域的固有肌层解剖黏膜和黏膜下层的方法。所述器官可以在胃肠道中,例如食道、十二指肠、胃、小肠、大肠(结肠)或直肠。所述器官可以是膀胱、口腔呼吸系统器官(肺、咽喉(咽)、舌头、鼻腔通道、鼻窦)、皮肤或子宫和阴道。特定组织的实例是呼吸道上皮、鼻上皮、真皮组织或表皮组织以及子宫上皮。一个示例性器官是食道。另一个示例性器官是结肠。所述方法可用于具有黏膜和黏膜下层的任何器官,其中可形成浅表病变,例如恶性病变或恶性前病变。

[0268] 这些方法包括将所公开的ECM水凝胶(含有外源性MBV)的组合物从黏膜下注射到所述受试者器官中,从而在所述器官区域的黏膜下层和下面的固有肌层之间形成衬垫物。在一个方面,所述器官不是食道。另一方面,所述器官是食道。在另一方面,所述器官是大肠(结肠)。所述方法可以是内窥镜黏膜切除术(EMR)或内窥镜黏膜下剥离术(ESD)。

[0269] EMR是一种内窥镜技术,用于去除局限于胃肠道(GI)浅层(黏膜和黏膜下层)的固着或扁平肿瘤。EMR通常用于去除小于2cm的病变或逐个去除较大的病变。EMR在评估所切除样本以进行准确病理分期方面也发挥着重要作用。与息肉切除术相反,EMR涉及通过将流体剂(通常为生理盐水(NS)溶液)注射到黏膜下层来从肌肉层提起病变。EMR也可用于获得准确组织病理学分期的样本,以确定淋巴结转移的风险。EMR有助于通过切除肠壁黏膜下层的中间或更深部分,彻底去除受影响的黏膜。已经描述了各种EMR技术,并且通常使用四种涉及勒除器切除的方法:(1)注射和切割法;(2)注入、提起和切割方法;(3)透明帽辅助EMR(EMRC);和(4)带结扎的EMR(EMRL)。在注射和切割技术中,通过产生含有外源性MBV的ECM水凝胶组合物的黏膜下流体衬垫物,将病变黏膜从肌肉层提起,捕获,使用电外科勒除器勒紧,然后切除。然而,注射到薄黏膜下层是细致的过程,所注射溶液往往会迅速消散,与突出的病变相比,扁平凹陷的病变很难用勒除器捕获,并且大型或位置不佳的病变可能很难去除(Uraoka et al., Drug Design, Development and Therapy 2008:2 131-138)。注射辅助的EMR经常用于治疗大型扁平结肠息肉。

[0270] 内窥镜黏膜下剥离术(ESD)是专门为去除较大病变而研发的。使用电手术刀直接

沿着黏膜下层解剖病变,使得即使是大型病变也可以进行整块切除。预测在治疗某些癌症阶段,ESD取代传统手术,但由于ESD的穿孔和出血并发症发生率高于传统EMR,因此比EMR需要更高程度的内窥镜技术和经验。ESD可以使用许多电外科手术刀,例如绝缘头透热刀、针刀、钩状刀、螺旋伸缩刀(flex knife)、三角刀、冲洗刀(flush knife)、防溅针和小口径顶端透明罩(small-caliber tip transparent hood)。这些刀可以与高频电外科电流(HFEC)发电机一起使用。ESD的特征在于三个步骤:(1)注射材料(例如含有外源性MBV的ECM水凝胶)以形成黏膜下衬垫物,从而从所述肌肉层提升所述病变;(2)对所述病变的周围黏膜进行周向切割;和(3)剥离所述病变下黏膜下层结缔组织(参见Kakushima et al., *World J. Gastroenterol.* 14(9):2962-2967, 2008, 通过引用并入本文)。之前已经研发了各种黏膜下注射溶液,并且证实在EMR期间使用效果令人满意,但是引入更长的ESD手术需要更持久的溶液以有助于在黏膜下层剥离期间识别切割线(Uraoka et al., *Drug Design, Development and Therapy* 2008:2 131-138)。现在公开的方法满足这种需要。

[0271] 将黏膜下注射用于EMR,因为将流体注射到黏膜下衬垫物中有利于临到捕获目标病变之前分离待除去的组织,例如用勒除器去除,由此减少热损伤和穿孔与出血的风险,同时也有利于切除。黏膜下注射在EMR手术中起到重要作用,因为所述溶液必须保持在适当位置足够的时间,并且需要形成半球形以便于勒除。此外,进行足够高的黏膜下提升能够在ESD手术期间进行安全的黏膜下切割(Uraoka et al., *Drug Design, Development and Therapy* 2008:2 131-138)。此外,由于该手术造成炎症,因此保留在所述手术部位的任何衬垫物都应具有抗炎性质。包括外源性MBV的所公开ECM水凝胶组合物将减轻狭窄并促进再上皮化。现在公开的方法也满足这种需要。

[0272] 在一些方面,所公开的组合物具有抗炎性质,并且廉价、无毒、易于注射并提供高的持久的黏膜下衬垫物。将所述组合物以其凝胶状态施用在注射部位以形成衬垫物。在所述手术期间可以剥离所述衬垫物以便一些水凝胶保留在下面的固有肌层上,从而有助于愈合。所公开的组合物利于通过去除被切除的黏膜/黏膜下层而产生伤口的闭合。在一些方面,所述手术是ESD。在其他方面,所述手术是EMR。

[0273] 生理盐水溶液(NS)和稀释剂溶液(例如,ELEVIEW™,参见美国专利号9,226,996,通过引用并入本文)已被用作内窥镜切除术的黏膜下衬垫物,但由于所述溶液快速分散,这些溶液的固有特征使得难以制造适当的黏膜下流体衬垫物,保持所需高度,并将所述衬垫物保持在所需位置。此外,在ESD中,一旦黏膜/黏膜下层被去除,这些药剂将不会保留在下面的固有肌层上。此外,这些药剂未有助于愈合过程,例如通过减少炎症有助于愈合过程。使用包括ECM水凝胶(含有外源性MBV)的所公开组合物满足这些需求。

[0274] 本文所公开的组合物(例如结合MBV的ECM水凝胶)可用于任何ESD或ESR中。如在美国专利号9,364,580(通过引用并入本文)中公开的,内窥镜注射针是可以长(长达约230cm)并且包括相对长的导管的装置,在所述导管内可滑动地布置具有远侧注射针的内部注射管。近端致动手柄耦接到所述导管和注射管,以便在需要时使一个相对于另一个运动。通常通过手柄上的勒尔(leer)连接器提供通向所述注射管的流体通路。内窥镜注射针装置通常通过所述内窥镜的工作通道被递送到所述注射部位。为了保护所述内窥镜工作通道的内腔不受损害,在将所述装置插入所述内窥镜之前,操控输注针装置的手柄以将所述远侧注射针缩回到所述导管的内腔中。这防止了当所述装置移动通过所述内窥镜内腔时暴露所述注

射针的锋利尖端。当所述内窥镜注射针装置的远端位于所述注射部位处时,再次操控其手柄以使所述注射针向远侧移动到所述导管的内腔外。当前进到最远侧位置时,所述注射针暴露部分的长度为大约4-6mm。

[0275] 在所述注射部位刺穿后,可将包括所述ECM水凝胶(例如酶促或声学生产的ECM水凝胶)和MBV的所述组合物(通常装在5ml至10ml的注射器中,注射器带有鲁尔锁配件(luer-lock fitting),与所述注射针的手柄相连)通过所述注射管和所述注射针递送到所述注射部位,例如黏膜下层和下面的固有肌层之间。

[0276] 在内窥镜手术期间通常使用的注射针和其他附件,例如用于息肉切除术的勒除器、夹持装置、活检钳等,穿过所述内窥镜的一个或更多个特定通道,通常称为工作通道或操作通道。根据GI内窥镜检查中使用的内窥镜的类型(例如胃镜、肠镜、结肠镜、十二指肠镜、乙状结肠镜等),所述工作通道的内径可以明显地变化。然而,用于GI内窥镜检查的最常用内窥镜的工作通道内径在约2mm到约5mm范围内。通常,内窥镜附件制造商生产的附件所具有的外径能够使其配合所有工作通道。在一些方面,所述内窥镜注射针,导管的外径范围是从1.9mm至2.3mm,例如约1.9cm、2.0cm、2.1cm、2.2cm或2.3cm。因此,考虑到内部注射管容纳在外部导管中,其内径通常为1mm或更小。所公开的凝胶或液体形式的ECM水凝胶可容易地通过这些导管。

[0277] 包括所述ECM水凝胶和外源性MBV的组合物可用于内窥镜切除手术,方式是:通过注射器从其主容器中吸取一定体积的所述水凝胶,通过插入所述内窥镜工作通道中的内窥镜注射针将合适体积的所述水凝胶直接注射在浅表黏膜层下方,以将所述组合物沉积到黏膜下层中,其在适当位置时成为衬垫物:黏膜表面的升高使得内窥镜师容易地切除在内窥镜手术执行期间发现的黏膜病变,即使所述病变是扁平的,因而没有突出到肠腔、食道腔或胃腔等内腔内也是如此。在体温下,声学ECM水凝胶是向液相转变的黏性但可流动的凝胶,并且可以容易地注射到浅表黏膜层下方以形成用于该手术的衬垫物。因为凝胶-溶胶转变需要时间,所以所述衬垫物保持在适当位置足够的时间以进行切除。含有外源性MBV的酶促ECM水凝胶也适用于此类内窥镜手术,因为它们体温下开始凝固,从而为切除组织提供足够的支撑,并保持在适当位置以促进切除部位的愈合。

[0278] 所述衬垫物中存在至少一种染料可有助于内窥镜师观察所述黏膜下面的结构(例如黏膜下层和外肌肉壁),从而降低内窥镜师进行切除手术可能对所述结构造成损伤的风险。所述染料的使用可以观察到所述衬垫物空腔和黏膜基底。从黏膜表面除去病变产生黏膜伤口。由注射体积的药物组合物所产生衬垫物的持久性能够使内窥镜切除手术无须再注射即可执行。将所述声学ECM水凝胶从黏膜下注射到所述受试者器官的所关注区域(例如病变或肿瘤区域)中,以便在所述器官区域处的黏膜下层和下面的固有肌层之间形成衬垫物。所述衬垫物可被剥离,使得一部分所述组合物保持在下面的固有肌层上并有助于愈合过程。

[0279] 所公开的方法用于食道。在一个非限制性实例中,所述方法包含从食道剥离食道癌或腺癌的方法。在另一个非限制性实例中,所述方法包含从患有巴雷特食道的受试者的食道剥离黏膜和黏膜下层。在这些方面,所述ECM水凝胶可以是由膀胱ECM、小肠黏膜下(SIS)ECM、食道ECM、气管ECM、肝脏ECM或真皮ECM制成。

[0280] 所公开的方法也用于其他器官。所述器官可以是任何所关注的器官,例如胃肠道

的器官。所述器官可以在上胃肠道中,例如咽、舌头或口腔。所述器官可以是膀胱、阴道或子宫。在一些方面,所述器官是结肠、十二指肠、胃、盲肠、结肠、乙状结肠、直肠、小肠或大肠。在一个非限制性实例中,所述器官是胃、小肠或大肠,并且所述方法包含从胃剥离癌或腺癌的方法。在其他非限制性实例中,所述器官是结肠,并且其中所述方法包含从结肠剥离息肉或癌。在这些方面,组合物可以包括声学ECM水凝胶,可以是膀胱声学ECM水凝胶、小肠黏膜下声学ECM水凝胶、食道声学ECM水凝胶、气管声学ECM水凝胶、肝脏声学ECM水凝胶或真皮声学ECM水凝胶。所述MBV的来源可以相同或不同。

[0281] 如本文所公开的包括所述ECM水凝胶和外源性MBV的组合物被保持在一定温度或低于该温度,使其凝胶化从而以黏膜下衬垫物的形式应用。

[0282] 包括所述ECM水凝胶(例如声学水凝胶)和外源性MBV的所述组合物可在施用前保持在例如约4°C或约室温。在一个方面,所述声学ECM水凝胶可在例如从4°C至低于37°C,或4°C至25°C的温度下施用。在一个方面,所述组合物在低于37°C的温度下施用。然后使用有效量的作为凝胶的所述组合物。包括所述ECM水凝胶和外源性MBV的所述组合物在温度为大约37°C的受试者组织中保持为凝胶。在一个方面,所述声学ECM水凝胶(具有所述外源性MBV)的凝胶至溶胶转变温度为约37°C,因此所述组合物可用作黏膜下衬垫物,因为它在体温具有足够的黏性。

[0283] 在一些方面,在所述水凝胶中ECM的浓度为25mg/ml至约200mg/ml,例如约25mg/ml至约100mg/ml。在其他方面,所述水凝胶中ECM的浓度为约50至约150mg/ml,例如约75至约125mg/ml,例如约75mg/ml、80mg/ml、85mg/ml、90mg/ml、95mg/ml、100mg/ml、105mg/ml、110mg/ml、115mg/ml、120mg/ml或125mg/ml。在一个特定的非限制性实例中,所述水凝胶中ECM浓度为约100mg/ml。

[0284] 所述组合物可以在室温、低温(例如约4°C)或冷冻(例如约-20°C)下以冻干形式提供,并且恰好在施用至所述受试者所关注解剖区域之前复原。

[0285] 所公开的方法用于任何受试者,包括人类受试者和动物受试者。所述受试者可以是任何年龄。所述受试者可以是成年人或青少年。在一个方面,将包括ECM水凝胶的组合物注射到器官的靶组织中以形成衬垫物,然后任选地对其进行内窥镜外科手术,例如切除手术。所述ECM可以来自与接受治疗的受试者相同的物种,或者可以来自不同的物种。在一些方面,所述受试者是人类,并且所述ECM水凝胶/MBV衍生自人类ECM或猪ECM。在其他方面,所述ECM水凝胶/MBV衍生自非人类灵长类动物、狗、猫、马或牛。所述ECM也可来自商业来源。在一些方面,所述ECM水凝胶/MBV可衍生自任何哺乳动物组织,例如但不限于猪组织或人类组织,并且在一些非限制性实例中,可以衍生自膀胱、小肠或食道。

[0286] 所公开的方法是侵入性的,因为它们需要注射,从受试者肠道器官区域的固有肌层剥离黏膜和黏膜下层。在一些方面,所述组合物未应用至器官(例如胃肠道器官,例如食道)的表面。所公开的方法可以用于食道,但也可以用于其他组织。在其他方面,所述组合物应用至所述器官表面。

[0287] 本文所公开方法中任一种可包括将包括ECM水凝胶和外源性MBV的药物组合物从黏膜下注射到所述受试者器官中,以在所述器官区域的黏膜下层和下面的固有肌层之间形成衬垫物。所述组合物凝胶化并从下面的固有肌层剥离黏膜和黏膜下层,并抑制所述受试者器官区域中的炎症。作为凝胶的所述组合物可通过内窥镜或通过导管施用。在一些方面,

所述器官是食道、结肠、胃、盲肠、结肠、乙状结肠、直肠、小肠或大肠。所述组合物,作为凝胶或溶胶,也可以通过内窥镜或通过导管施用。

[0288] 在一些方面,所述切除手术是内窥镜黏膜切除术或食道内窥镜黏膜下剥离术,并且所述方法包含从食道剥离食道癌或腺癌的方法。在更多方面,所述方法包括从患有发育不良的患者食道剥离黏膜和黏膜下层。在更多方面,所述方法包括从患有巴雷特食道的受试者食道剥离黏膜和黏膜下层。

[0289] 在一些方面,所述切除手术是内窥镜黏膜切除术或内窥镜黏膜下剥离术。在其他方面,所述器官是胃、小肠或大肠,并且所述方法包含从结肠剥离息肉、癌或腺癌的方法。在更多方面,所述方法包括从患有发育不良的患者器官剥离黏膜和黏膜下层。在特定的非限制性实例中,所述方法包括从结肠剥离息肉或癌。

[0290] 所述方法还可以包括在所述衬垫物上进行内窥镜切除术。在一些方面,所述方法包括分开所述衬垫物,使得水凝胶保留在食道的下面固有肌层上,并且从食道区域移除黏膜和黏膜下层。在一些非限制性实例中,保留在下面固有肌层上的水凝胶衬垫物的部分下调食道中的促炎性巨噬细胞活化。

[0291] 提供以下实例以说明本公开某些方面的特定特征,但权利要求的范围不应局限于所举例说明的那些特征。

#### [0292] 实施例

##### [0293] 实施例1:溃疡性结肠炎的治疗

[0294] 为了证明联合使用ECM水凝胶和MBV的有效性,进行了一项研究,以评估DSS诱导大鼠溃疡性结肠炎后结肠的愈合情况。

##### [0295] 研究设计概述

[0296] 研究群体为15只雌性Sprague-Dawley大鼠。将大鼠随机分为健康对照组(N=3)或葡聚糖硫酸钠(DSS)治疗组(N=12)。将暴露于DSS的动物进一步分为5个亚组:(1)未治疗对照组(N=3)、(2)MBV灌肠组(N=2)、ECM水凝胶灌肠组(N=2)、MBV注入真皮ECM声学水凝胶灌肠组(N=2)和多次MBV静脉注射组(N=3)。

##### [0297] 表1. 实验组和说明

| [0298] | 治疗             | 动物数量(N) | 说明                                                |
|--------|----------------|---------|---------------------------------------------------|
|        | 无 DSS 诱导 (-对照) | 3       | 结肠健康的动物                                           |
|        | 未治疗 (+对照)      | 3       | 用 5.5%DSS 诱导且未进行任何治疗的动物                           |
|        | MBV 灌肠         | 2       | 第 0、1、2、3 天以灌肠方式施用 MBV + PBS                      |
|        | ECM 水凝胶灌肠      | 2       | 在第 0、1、2、3 天以灌肠方式施用真皮 ECM 水凝胶                     |
|        | MBV 注入的水凝胶灌肠   | 2       | 第 0、1、2、3 天以灌肠方式施用 MBV 注入的真皮声学水凝胶                 |
|        | 多次 MBV 静脉注射    | 3       | 第 0 天和第 2 天静脉注射含 $3.3 \times 10^{11}$ 颗粒的 MBV 注射液 |

[0299] 通过将大鼠暴露于5.5%葡聚糖硫酸钠(DSS)的饮用水,并在治疗前随意饮用6天,以诱导大鼠溃疡性结肠炎(UC)。在整个疾病诱导过程中,评估动物的体重减轻、食物和水的消耗、粪便硬度和粪便血含量。按照图1所示的方案进行治疗,并在第4天取出动物结肠进行组织学分析。

[0300] 详细程序

[0301] 动物和饲养:动物研究是根据匹兹堡大学机构动物护理和使用委员会制定的关于人道处理实验动物的所有规定进行的。雌性Sprague-Dawley大鼠,8-12周龄,从认证供应商(Jackson Labs)处获取。装运后,对大鼠进行7-10天的环境适应。动物被安置在标准实验室条件下,温度为21-23°C,黑暗/光照周期为12小时。大鼠可自由地获取食物和水。研究时,将动物单独安置以收集适当的数据。

[0302] 葡聚糖硫酸钠的制备和施用:葡聚糖硫酸钠(DSS)盐(分子量为36,000-50,000)从MP Biomedical获得。用高压灭菌的自来水制备5.5%DSS溶液,并通过自由地饮用施用6天。

[0303] MBV分离:猪膀胱细胞外基质(ubECM)粉末从ECM Therapeutics(Warrendale,PA)获得。在37°C下对所述UBM-ECM粉末进行酶促消化(0.05mg/mL Liberase,5mM CaCl<sub>2</sub>的1xPBS溶液)3小时。将酶促消化的ECM在4°C下以10,000×g离心30分钟。上清液以28,000×g进行超速离心70分钟。沉淀物用PBS洗涤一次,然后再悬浮在无颗粒的1xPBS中。所述MBV悬浮液的平均粒径和浓度使用NanoSight NS500通过纳米颗粒跟踪分析(NTA)确定。MBV悬浮液(238nm,1.10×10<sup>12</sup>颗粒/mL)在-20°C下储存直至使用。

[0304] MBV灌肠:用1xPBS将MBV悬浮液的体积增加到5mL,并放入5mL注射器中,使浓度为1.38×10<sup>11</sup>颗粒/mL,或每次灌肠6.9×10<sup>11</sup>颗粒。

[0305] 真皮ECM声学水凝胶灌肠:真皮ECM粉末由ECM Therapeutics(Warrendale,PA)提供。通过以40%的振幅超声处理所述ECM 5分钟来制备50mg/mL真皮ECM粉末的PBS溶液。然后将所述溶液加入5-mL注射器中,并在4°C下放置。将含有5-mL体积真皮ECM声学水凝胶的注射器储存在4°C下直至使用。

[0306] MBV注入的真皮ECM声学水凝胶灌肠:真皮ECM粉末由ECM Therapeutics(Warrendale,PA)提供。制备50mg/mL真皮ECM粉末的PBS溶液,并以40%的振幅超声处理5分钟。在室温下冷却5-10分钟后,将5mL MBV悬浮液加入35mL超声处理的溶液中,轻轻混合,使得MBV浓度为1.38×10<sup>11</sup>颗粒/mL。然后将所述溶液加入5mL注射器中,使其凝胶化,从而使得每次灌肠6.9×10<sup>11</sup>颗粒。将含有水凝胶的注射器储存在4°C下直至使用。

[0307] MBV静脉注射:将体积为300μL MBV悬浮液的1×PBS溶液放入1mL注射器中,每次注射含有1.10×10<sup>12</sup>颗粒/mL或3.3×10<sup>11</sup>颗粒。

[0308] 灌肠递送:用吸入的0.5-5%异氟烷对大鼠进行麻醉,并用柔性SURFLO®有翼输注导管(Terumo,OD=2mm)进行灌肠(图2A-C)。灌肠溶液利用附接到所述导管的注射器沿着结肠的长度施用;具体而言,从8cm开始一直到肛门,同时逐渐拔出所述导管,总输注时间约60秒。注射器中总共含有5mL指定的治疗材料。灌肠递送的速率和灌肠材料的体积旨在确保从近端到远端位置完全覆盖结肠。治疗组在从饮用水中去除5.5%DSS后立即开始接受为期4天的每日灌肠。

[0309] MBV注射递送:用吸入的0.5-5%异氟烷对大鼠进行麻醉,并将300uL体积的材料施用至尾侧静脉中。在从饮用水中去除5.5%DSS后和去除DSS后2天,立即对合适组进行注射。

[0310] 活体观察:经过培训的人员每天记录以下数据:(1)食物消耗,(2)水消耗,(3)动物体重,(4)粪便硬度,(5)粪便血存在。基于硬度(0=正常,2=松软,4=腹泻)和是否有血(0=无,2=隐血,4=大出血)对粪便进行评分。隐血使用ColoScreen ES Lab Pack粪便隐血检测进行检测。

[0311] 结肠取出方案:如图1所示,在第4天处死动物。根据美国兽医协会 (AVMA) 的规定,通过吸入CO<sub>2</sub>和随后的颈椎脱位实施安乐死。安乐死后,通过腹中线切口切除结肠。纵向切开从直肠到盲肠的结肠以露出管腔表面,用PBS冲洗,然后对所述组织进行大体评分。对取出的结肠进行拍照和评分。将结肠远端8cm固定在10%中性福尔马林固定液中2天,并进行石蜡包埋和组织切片(5um)。样品用苏木精和伊红染色,拍摄代表性图像,并进行组织学检查和评分。

[0312] 结肠组织的大体评分:根据表2中列出的指标对结肠损伤进行大体评估。评分由对治疗组不知情的研究人员确定。

[0313] 表2. 大体解剖评分标准

[0314]

| 评分   | 外观                         |
|------|----------------------------|
| 0    | 正常                         |
| 1    | 局部充血,没有溃疡                  |
| 2    | 炎症,没有溃疡                    |
| 3    | 一个部位出现溃疡和炎症                |
| 4    | 两个或更多个部位出现溃疡和炎症            |
| 5    | 多个部位溃疡,沿结肠长度方向延伸大于1cm      |
| 6-10 | 当损伤区域沿结肠延伸>2cm时,每cm评分增加1分。 |

[0315] 组织学评估:如前所述,对取出组织进行显微镜分析。如表3所示,对H&E染色切片进行结肠组织形态学变化评分。对每个组织切片的溃疡程度、轻度黏膜炎症、重度黏膜炎症、轻度黏膜下炎症和重度黏膜下炎症给出单独评分。评分由对治疗组不知情的研究人员确定。为了实现评分的统一性,向每位评分员提供了限定评分标准和展示实例的指导文件。

[0316] 表3. H&E染色切片组织学评分标准

[0317]

| 标准    |     | 评分 | 描述      |  |
|-------|-----|----|---------|--|
| 溃疡    | 存在? | 0  | 无       |  |
| 黏膜炎症  | 轻度  | 1  | 1-10%   |  |
|       | 重度  | 2  | 11-30%  |  |
| 黏膜下炎症 | 轻度  | 3  | 31-60%  |  |
|       | 重度  | 4  | 61-100% |  |

[0318] 通过免疫荧光染色进行巨噬细胞分析:通过免疫荧光染色巨噬细胞来分析取出的结肠。载玻片通过一系列二甲苯和乙醇洗涤及随后的水洗进行脱蜡。用柠檬酸盐抗原修复缓冲液(10mM柠檬酸盐,pH 6.0)在微波炉中高温15分钟,并在硫酸铜缓冲液(10mM CuSO<sub>4</sub>, 50mM乙酸铵)中冷却,便于组织切片的抗原修复。将封闭液(Pierce无蛋白封闭缓冲液、4%山羊血清、2%BSA、0.1%Triton、0.1%吐温;Pierce无蛋白封闭缓冲液)分别在载玻片上培育10分钟。然后在中低设置下将所述组织与一抗(山羊抗-CD2061:100;兔抗-TNFα1:100;小鼠抗CD68 1:100)微波加热3分钟,培育3分钟,然后用TBS-T洗涤。在中低设置下将二抗(兔抗-山羊HRP 1:100;山羊抗-兔HRP 1:100;山羊抗-小鼠HRP 1:100)与组织用微波加热3分钟,并培育3分钟,然后洗涤。将Opal试剂(绿色、红色和蓝色1:100的适当稀释剂溶液)与组织在黑暗中培育10分钟,然后洗涤。每种染色重复进行抗原修复和抗体培育。使用DRAQ5作为核标记物。然后用防褪色试剂固定组织切片并成像。

[0319] 结果——活体观察

[0320] 食物和水消耗:从第-5天到第4天,每天测量每只大鼠消耗的食物和水(图3)。在去除DSS水并给予正常水后的第1天,进行疾病诱导组的水摄入量似乎有所增加。总体而言,在整个研究过程中,食物消耗保持稳定。

[0321] 体重变化:从第-6天到第4天,每天对大鼠称重一次。将个体大鼠体重归一化为第-6天它们的起始体重(图4)。在所述大鼠暴露于DSS的前三天,体重似乎总体减轻。总体而言,一旦去除DSS水并开始治疗,体重似乎就稳定了。

[0322] 粪便硬度和血含量:每天测定每只大鼠的粪便硬度评分和血评分。在这两个指标的评分系统中,评分越高表示疾病水平越高。将粪便硬度和血含量的个体大鼠评分归一化为第0天给出的评分,以确定从疾病诱导结束到治疗结束的变化(图5)。所有治疗组似乎都显示出疾病进展的缓解。

[0323] 临床和组织学结果

[0324] 取出后,测量从盲肠到直肠的结肠长度,作为疾病活性的指标,较短的结肠对应于更严重的疾病状态。总体而言,所有给予DSS的动物结肠似乎如预期比健康对照组更短。对结肠进行宏观检查是否有充血、炎症和溃疡的证据。总体而言,如图6所示,接受治疗动物的总评分似乎低于未接受治疗的动物。

[0325] 组织学分析示出于图7A-7G,并在下文详细讨论。

[0326] 正常健康结肠组织:图7A和图7G(i)所示的结肠组织获取自健康动物,特征在于具有上皮细胞汇合层的厚度均匀的黏膜。固有层具有正常的细胞量,并且下面黏膜肌层明确。黏膜下层含有正常数量的单核细胞,其中大多数是休眠的巨噬细胞。最深层是厚肌肉层,称为外肌层。该组织切片代表正常健康结肠组织。

[0327] 患病结肠:图7B和图7G(ii)所示的结肠组织获取自5.5%DSS处理6天的动物,随后该动物没有接受治疗干预。黏膜形态明显被破坏。存在广泛分布的小团簇黏膜上皮细胞,这是试图再生黏膜上皮和恢复黏膜层正常屏障功能的证据。与正常、健康的结肠不同,没有任何上皮细胞汇合层。固有层的细胞量增加,这表明宿主对组织损伤和毒性结肠内容物侵入的炎症反应。通常将黏膜与下面的黏膜下层分隔开的黏膜肌层明显破坏。固有层和黏膜下层的细胞量显著增加,在患病结肠的黏膜下层内可以看到两个淋巴细胞积聚结节(黑色圆形区域)。外肌层是正常的(所有样本均如此)。

[0328] ECM水凝胶治疗组:图7D和图7G(iii)所示的结肠组织获取自由真皮ECM制成的ECM声学水凝胶治疗的动物。结肠黏膜部分恢复,这由与患病结肠组相比,黏膜上皮细胞数量增加所证实。固有层和黏膜下层的细胞量小于患病组的细胞量,但不如正常结肠组的细胞量低。黏膜肌层清晰可见且完好无损。这种组织学外观代表结肠黏膜部分愈合。

[0329] MBV+盐水治疗组:如图7C和图7G(vi)所示,该组结肠组织的组织学外观与所述ECM水凝胶治疗组非常相似。结肠黏膜部分复原,黏膜肌层保持完好无损,黏膜下层含有的巨噬细胞数量略有增加。

[0330] ECM水凝胶+MBV治疗组:该组的示例性组织如图7E和图7G(v)所示,并且表现出显著且几乎完全替换黏膜、黏膜肌层和黏膜下层。与患病结肠组有明显区别。黏膜上皮细胞群几乎完全被替换,固有层和黏膜下层的细胞量接近正常。黏膜肌层完好无损。令人惊讶和出乎意料的是,ECM水凝胶+MBV组的组织学样本几乎与正常、健康的结肠黏膜几乎无法区分,

这表明ECM水凝胶+MBV的组合对结肠组织的愈合具有协同作用,而在单独使用ECM水凝胶或MBV(灌肠或静脉施用)时看不到这种作用。

[0331] 总结:未以任何方式接受ECM的组得出了明显的破坏性结果,只有极少的结肠黏膜替换修复尝试。所有MBV组均显示结肠黏膜部分替换,而仅疾病组则显示最小程度的替换。ECM水凝胶和MBV的组合诱导结肠黏膜几乎完全修复。IV MBV和ECM水凝胶的组合明显优于所有其他MBV组的结果。

[0332] 进一步的组织学评估

[0333] 对上述治疗组织的组织学样品进行了更高倍显微镜评估,并且肉眼观察显示治疗样品的炎症程度低于患病样品。就隐窝的存在和组织而言,治疗动物的黏膜定性地似乎更健康。通过肉眼观察苏木精和伊红染色的样品,ECM水凝胶和MBV的组合治疗的样品(图11D)呈现出更健康的黏膜和黏膜下层,表现为组织清晰的肠道隐窝和极少的细胞浸润。在患病样品(图11A)中,肠道隐窝在许多区域完全消失,而在治疗样品(图11B-11E)中,细胞似乎开始向健康(图7A)结肠黏膜和黏膜下层常见的方向和结构重组。

[0334] 此外,如图11D所示,与局部施用MBV+PBS(图11C)或局部单独施用ECM水凝胶(图11B)相比,如组织学所证实的,向大鼠结肠局部施用MBV注入的ECM水凝胶的效果提高了黏膜和黏膜下层的健康水平,这表明所述组合对愈合结肠可能具有协同作用。

[0335] MBV治疗显示将巨噬细胞向M2或促重塑表型调节

[0336] MBV先前已被证明可将巨噬细胞向促愈合、抗炎表型调节。这在DSS诱导的溃疡性结肠炎的治疗中得到了进一步证实。在图12A-12E中进一步证实了所述治疗大鼠整个各组织层的M2:M1巨噬细胞比率。数据显示,与ECM水凝胶单独灌肠或MBV单独灌肠相比,全身MBV施用或ECM水凝胶-MBV灌肠组合显著提高结肠组织中M2:M1比率。用MBV水凝胶灌肠治疗结肠组织中的M2:M1比率大于用MBV单独灌肠或水凝胶单独灌肠治疗结肠组织的效果,即使两者相加也是如此,这表明MBV和水凝胶的组合对结肠组织中巨噬细胞向M2表型调节具有协同作用,因此对M2:M1巨噬细胞比率具有协同作用。除了计数整个结肠中的M2和M1细胞(图12A),还计数结肠组织的各种组织学层(即黏膜、肌层、黏膜下层,分别见图12B、图12C和图12D)内的M2(CD68+、CD206+)或M1(CD68+、TNF $\alpha$ +)巨噬细胞的数量。总体而言,数据显示,将MBV添加到ECM水凝胶中对M2:M1比率产生协同效应,而不仅仅是相加效应。此外,全身施用MBV或在ECM水凝胶中施用MBV大幅减少了CD68+细胞的数量(图12E),表明这些组织中巨噬细胞总数减少。

[0337] 总结

[0338] 如上所述,通过活体观察(包括水消耗、食物消耗、体重、粪便硬度和粪便血的存在)跟踪研究期间的疾病进展。随着体重的下降、粪便硬度评分的提高以及粪便中存在血,证实了刺激试验动物DSS诱导的溃疡性结肠炎是成功的。

[0339] 总体而言,数据显示,基于活体观察、组织学分析和巨噬细胞极化分析,添加外源性MBV的ECM水凝胶提高DSS诱导的溃疡性结肠炎(UC)大鼠模型的愈合率。活体观察显示,与所述疾病对照相比,所有治疗组的恢复速度更快。大体评分和组织学证实了活体观察,其从宏观和微观上显示结肠疾病的严重程度较低。治疗组黏膜和黏膜下层的组织和密度表明,通过肠道隐窝的存在愈合率有提高的迹象,炎症水平较低,黏膜组织水平较高。仅与疾病组相比,治疗组的巨噬细胞表现出更多地转向重塑表型,这进一步证实了因治疗而提高愈合

率的能力和结果。

[0340] 上述研究的结果表明,MBV注入的ECM水凝胶在治疗肠道炎症性疾病(例如诸如克罗恩病和溃疡性结肠炎的炎症性肠病)方面具有强大的治疗潜力。

[0341] 鉴于本发明的原理可以应用于许多可能的方面,应当认识到,所示的方面仅仅是本发明的实例,不应当被认为是对本发明范围的限制。相反,本发明的范围由以下权利要求限定。因此,我们要求所有在这些权利要求范围和精神内的内容作为我们的发明。

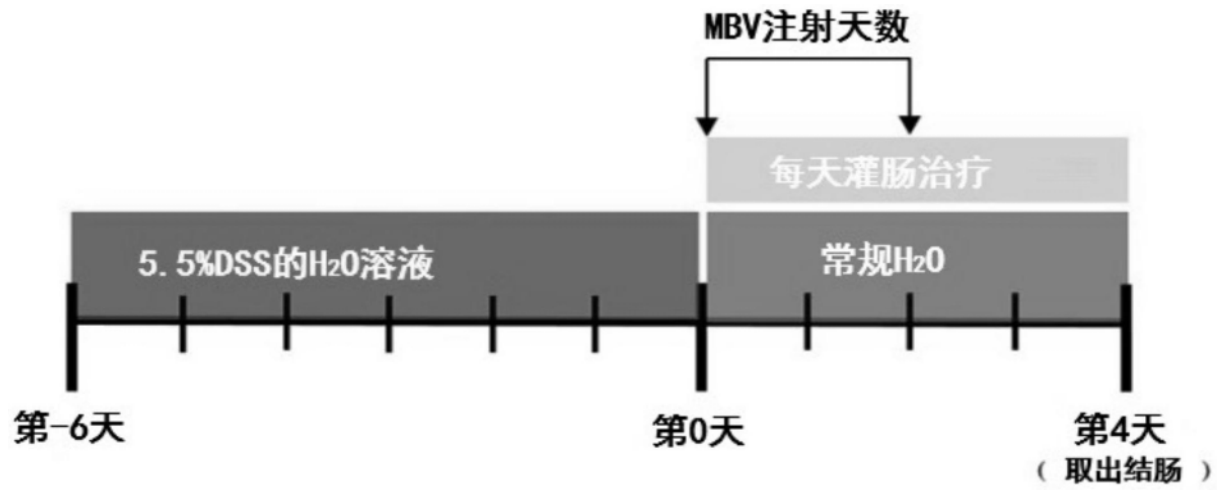


图1

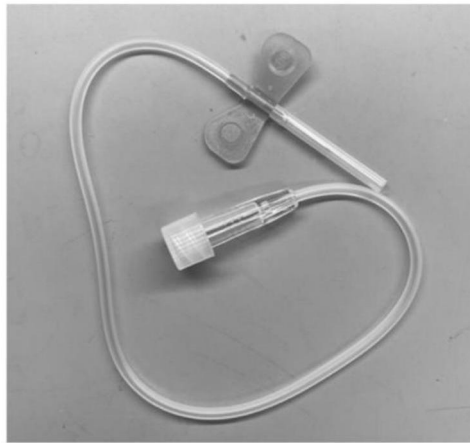


图2A

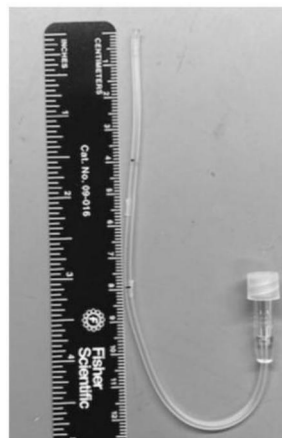


图2B

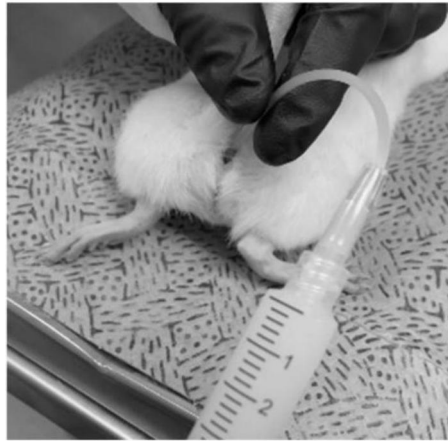


图2C

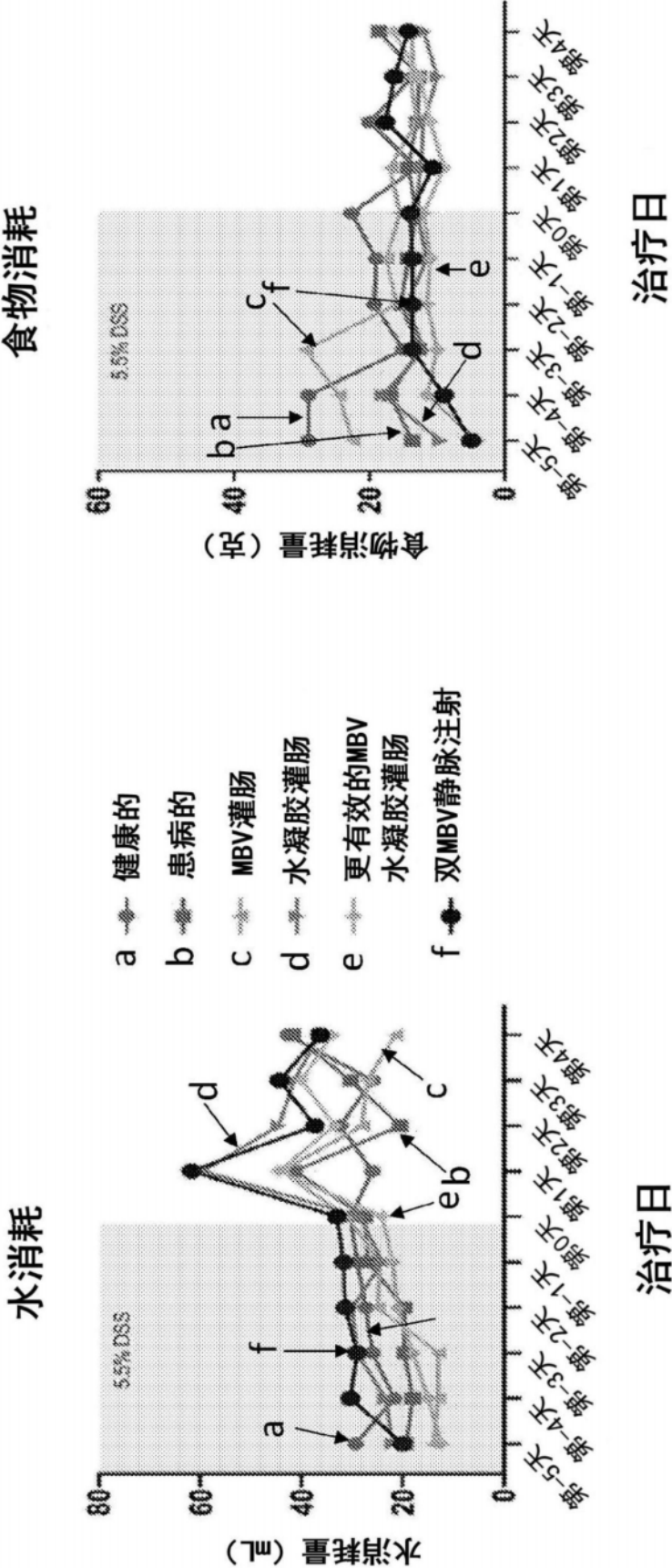


图3

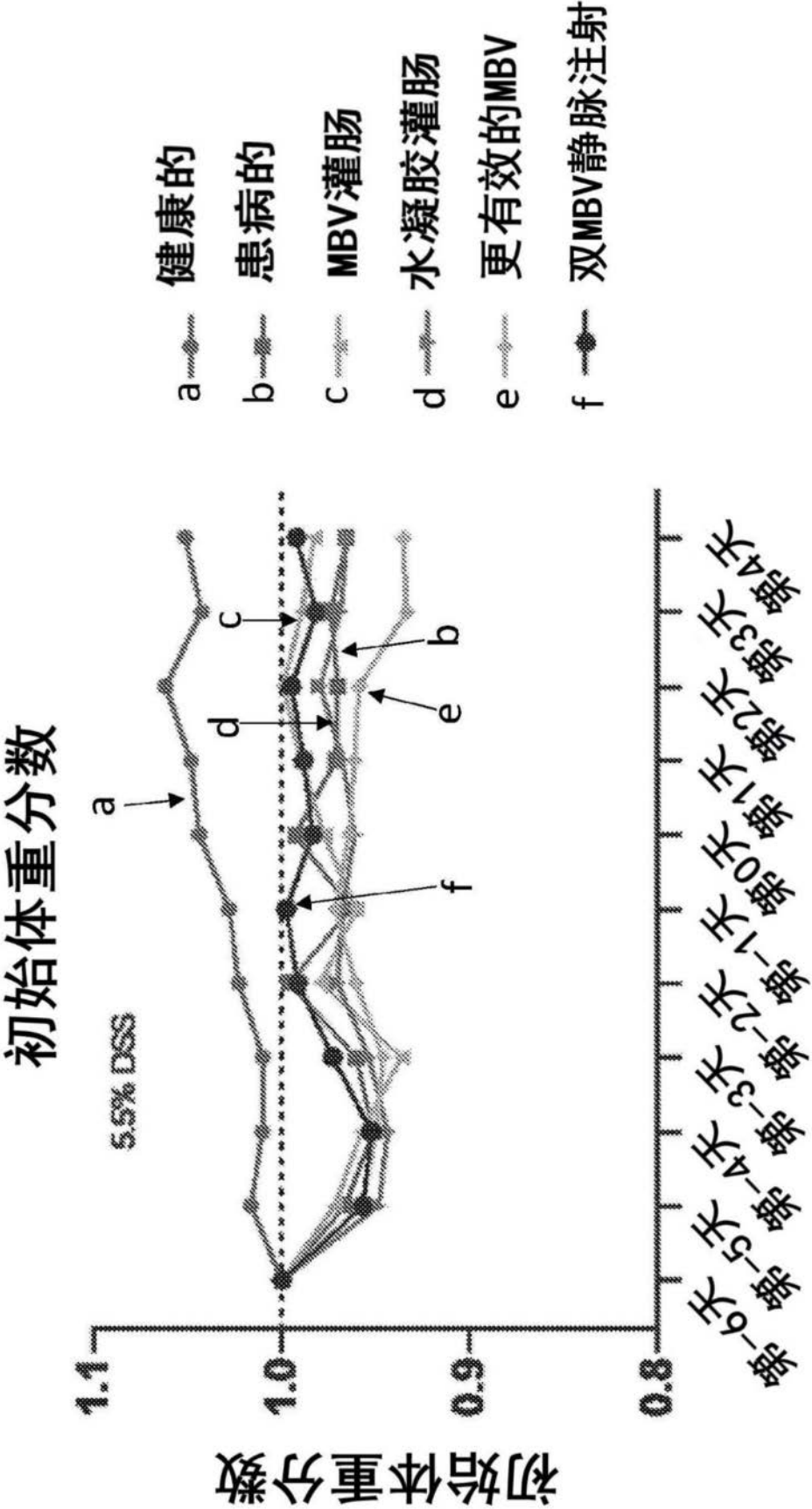


图4

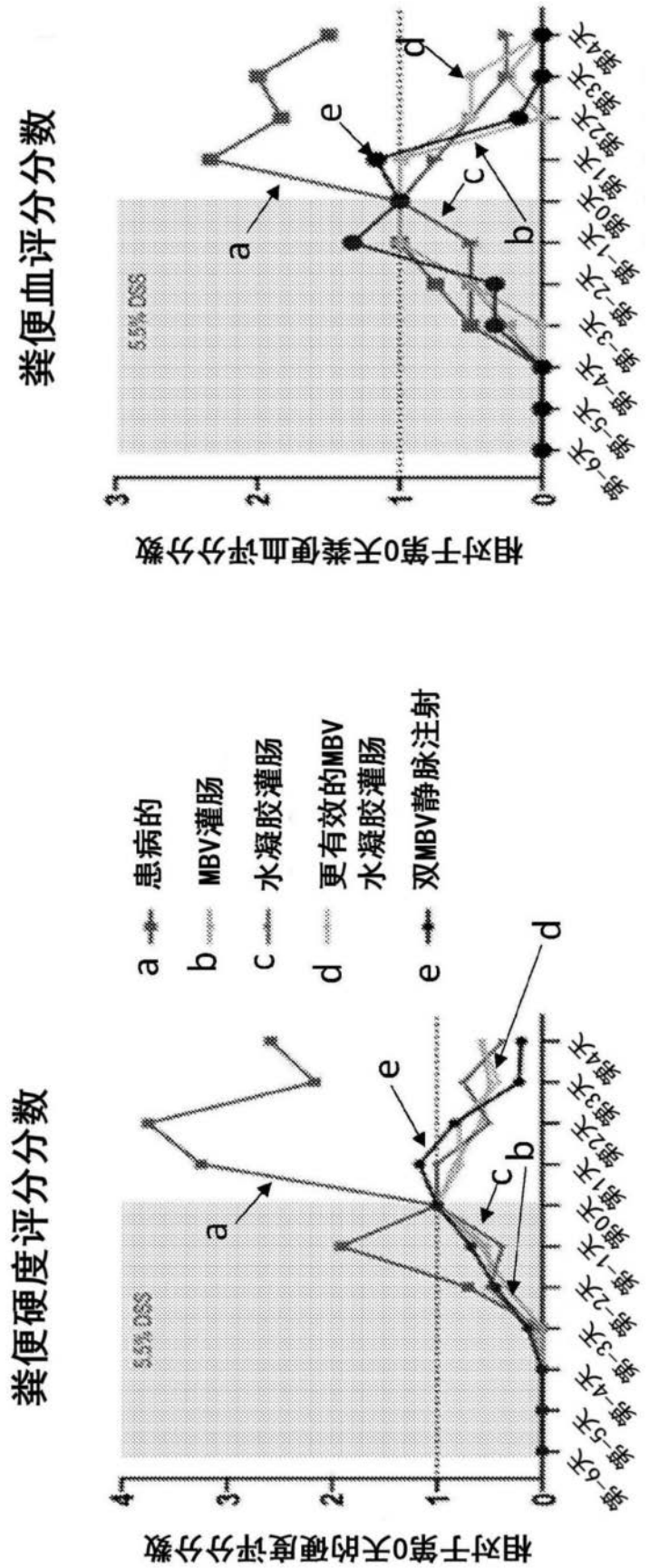


图5

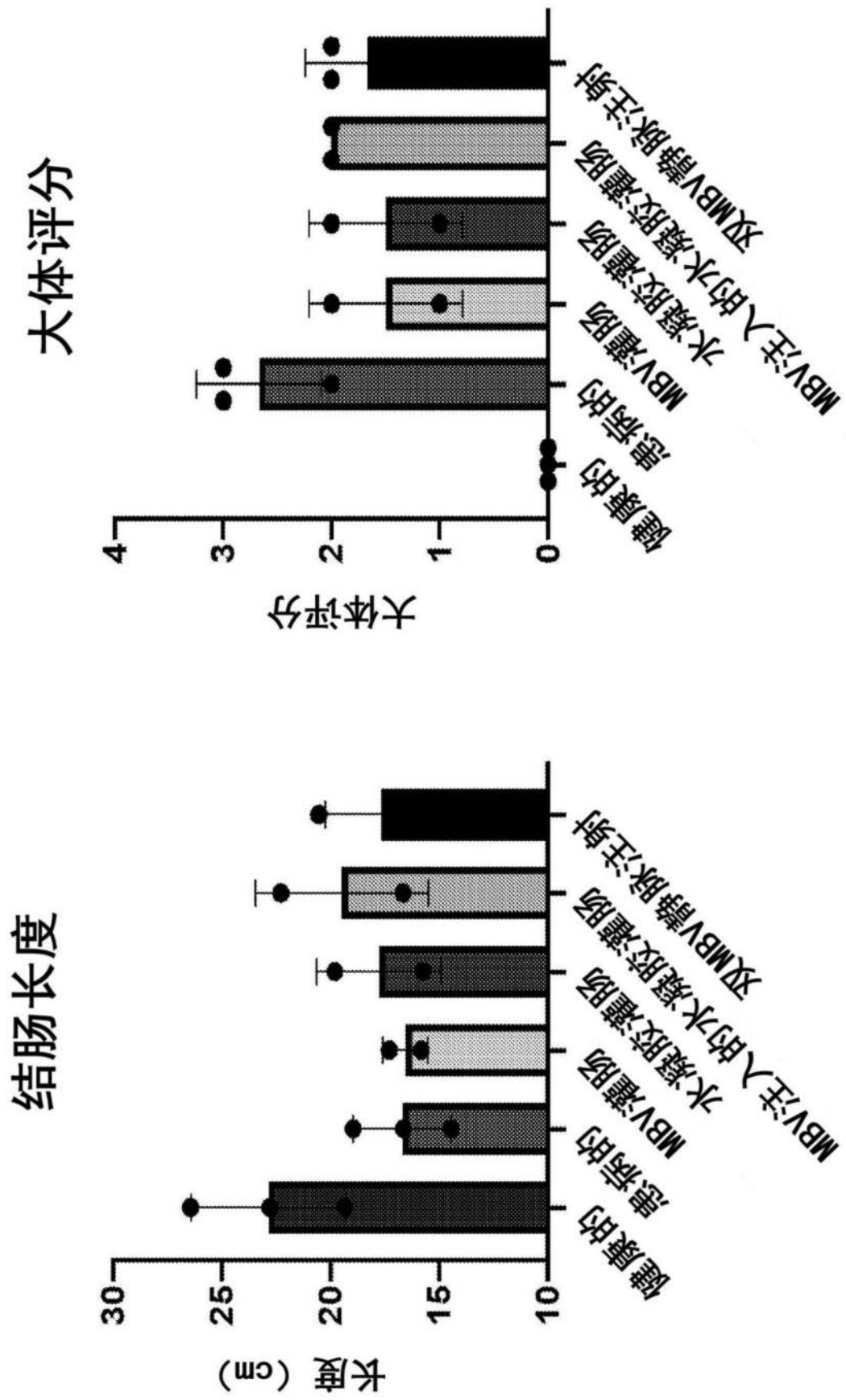


图6

健康的



图7A

患病的

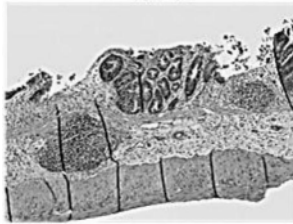


图7B

MBV+PBS灌肠



图7C

真皮声学水凝胶灌肠

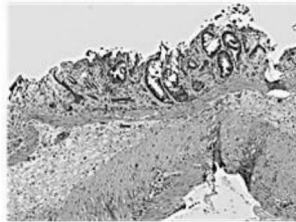


图7D

MBV注入的水凝胶灌肠

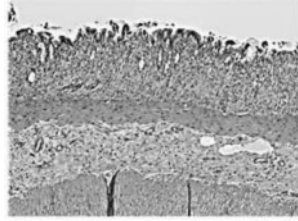


图7E

双MBV静脉注射

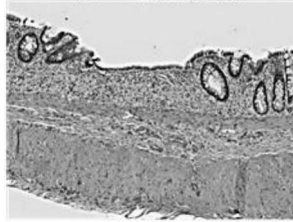


图7F

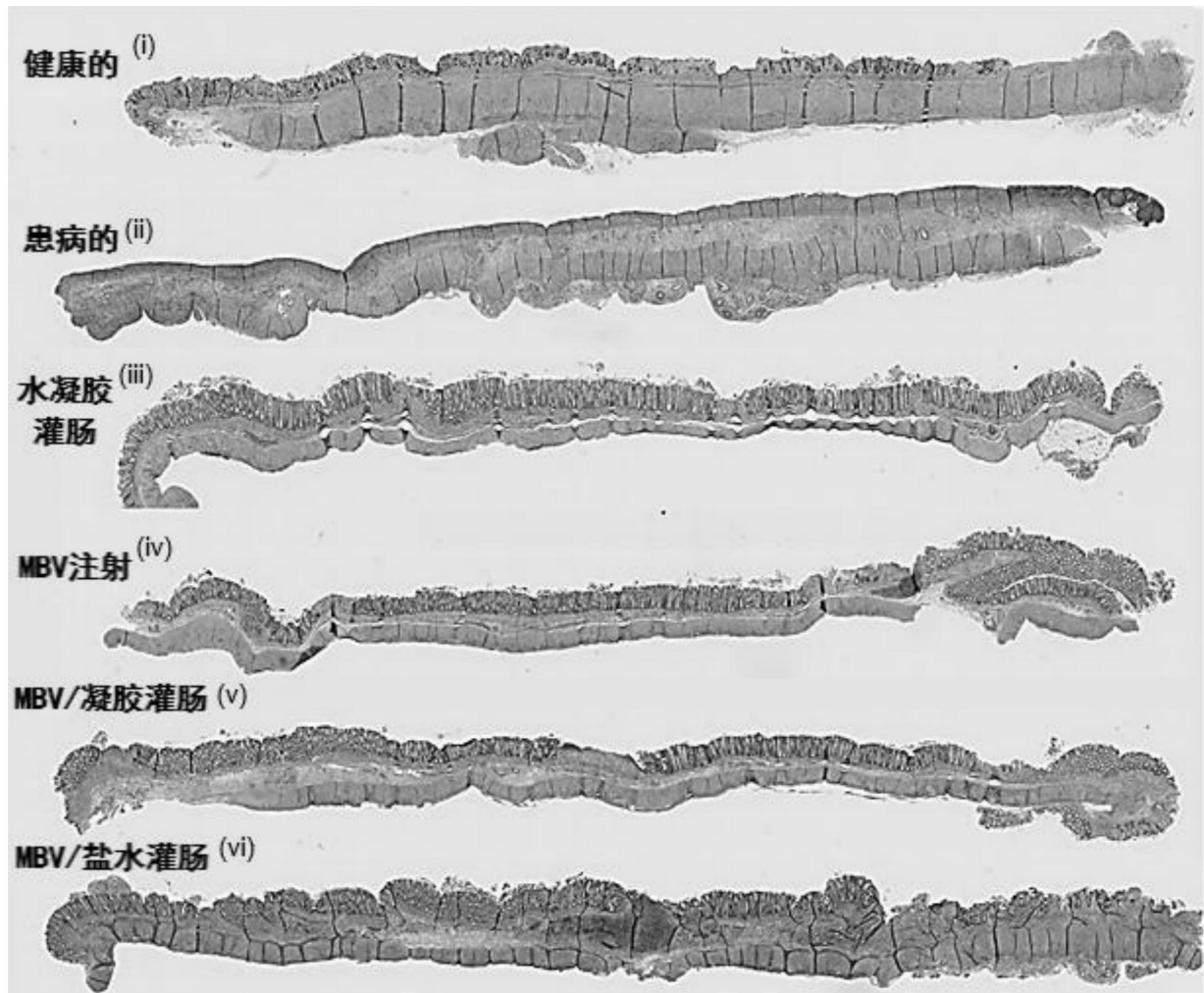


图7G

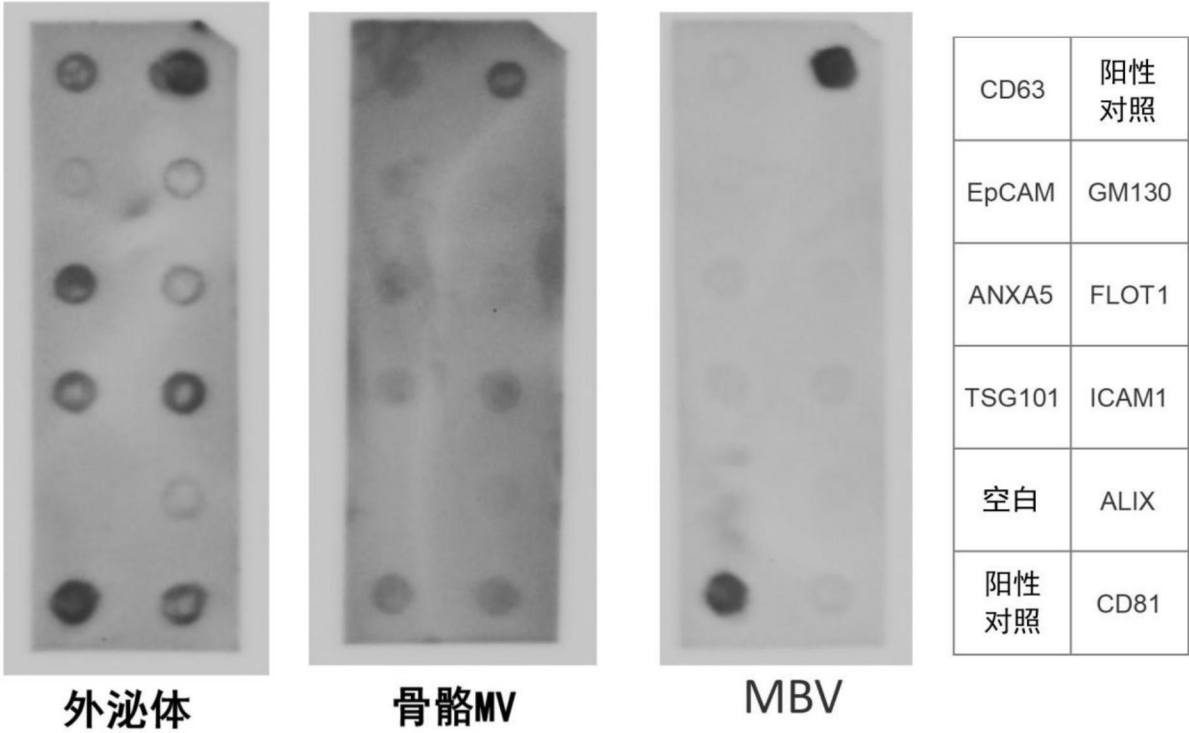


图8A

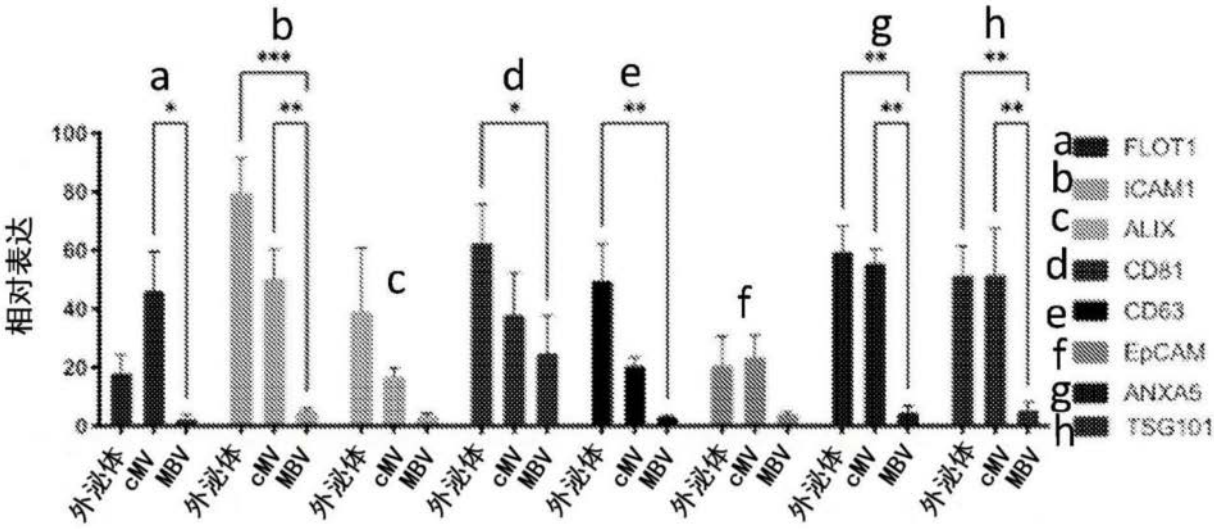
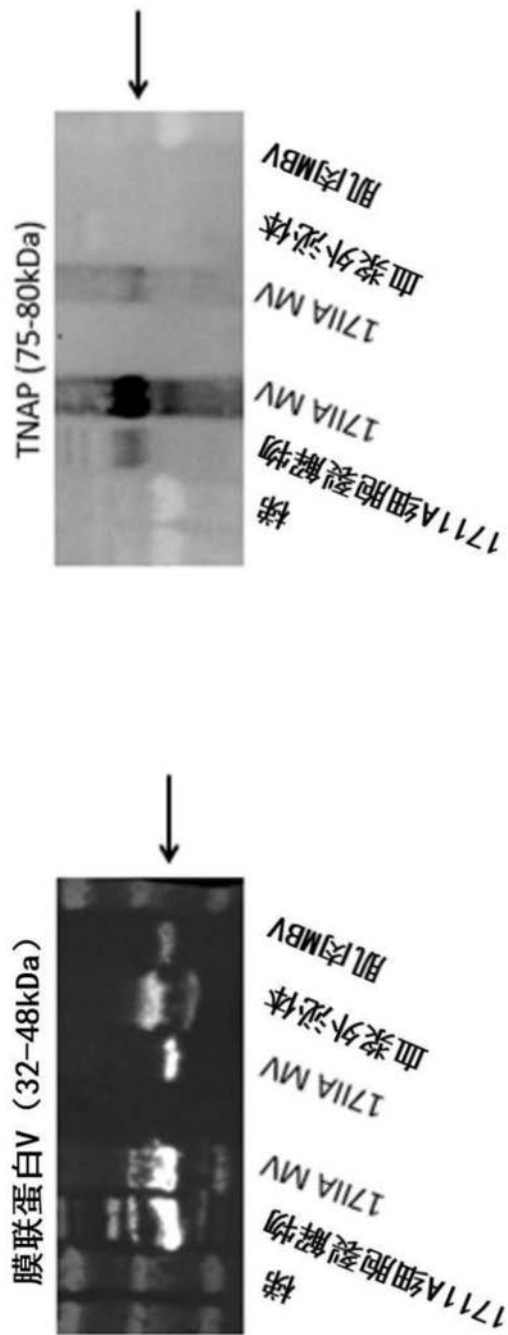


图8B



| 泳道 | 样品名称                       | 浓度                     | 添加的体积             | 添加的质量                |
|----|----------------------------|------------------------|-------------------|----------------------|
| 1  | 17A裂解物对照 (Napierala lab)   | 2130 $\mu\text{g/mL}$  | 4.7 $\mu\text{L}$ | 10 $\mu\text{g}$     |
| 2  | 1711A MV对照 (Napierala lab) | 未知                     | 10 $\mu\text{L}$  | 未知                   |
| 3  | 711A MV                    | 458.1 $\mu\text{g/mL}$ | 10 $\mu\text{L}$  | 4.581 $\mu\text{g}$  |
| 4  | 血浆外泌体                      | 501.0 $\mu\text{g/mL}$ | 10 $\mu\text{L}$  | 5.010 $\mu\text{g}$  |
| 5  | 肌肉MBV                      | 745.6 $\mu\text{g/mL}$ | 10 $\mu\text{L}$  | 7.1456 $\mu\text{g}$ |

图9

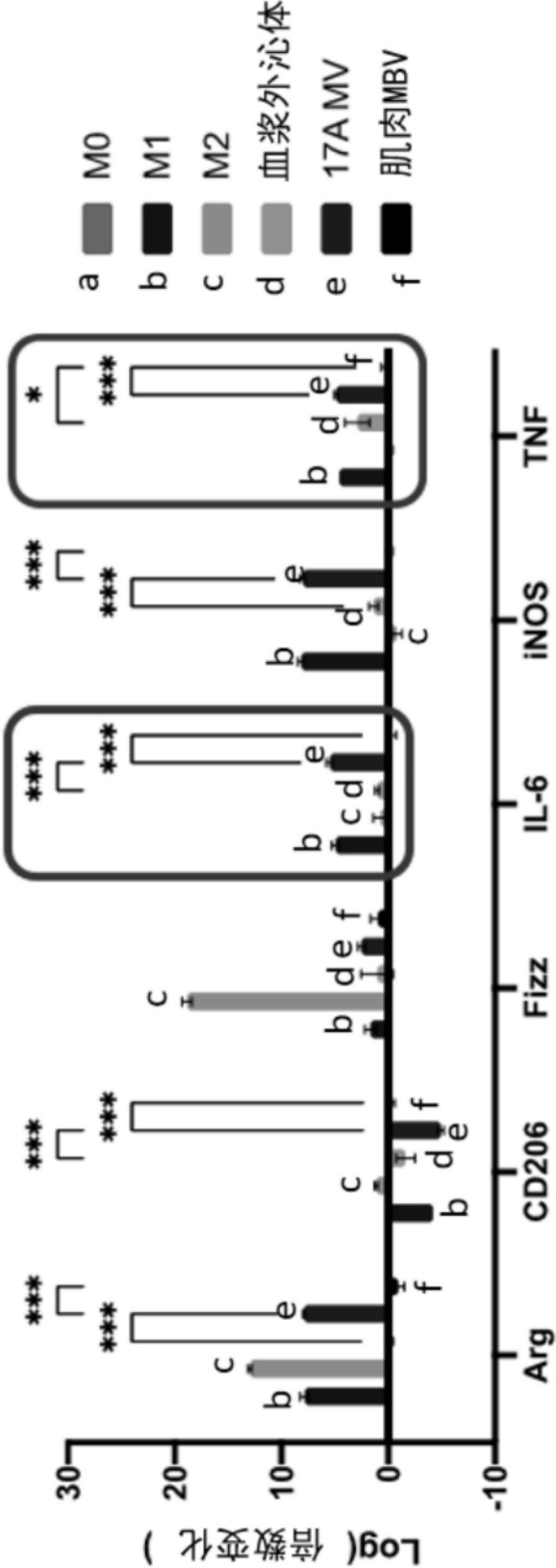


图10

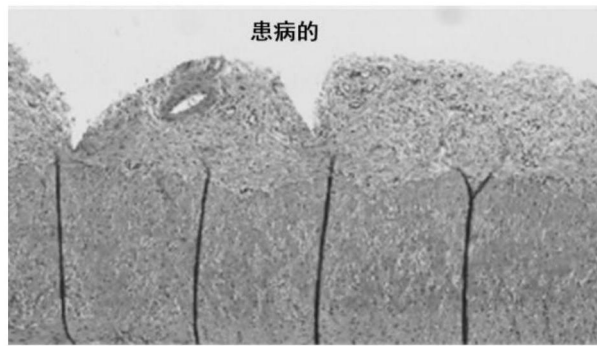


图11A

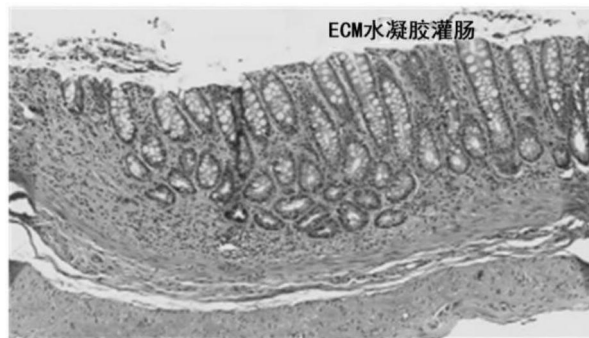


图11B

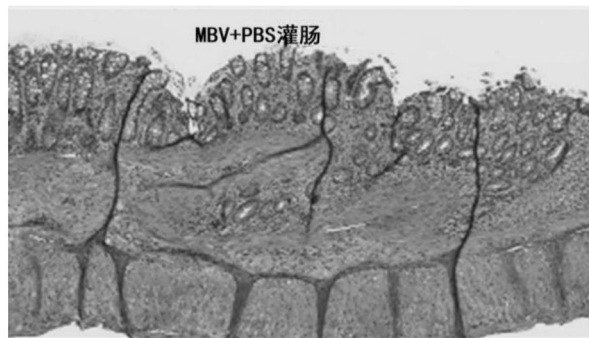


图11C

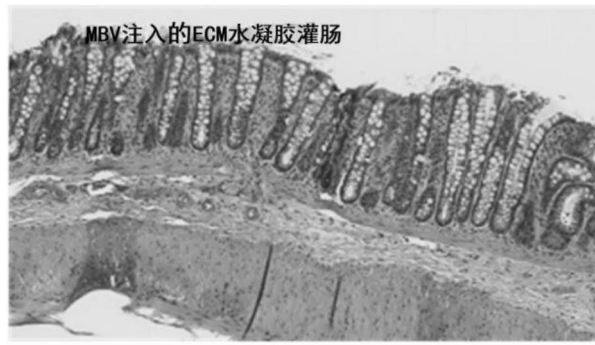


图11D

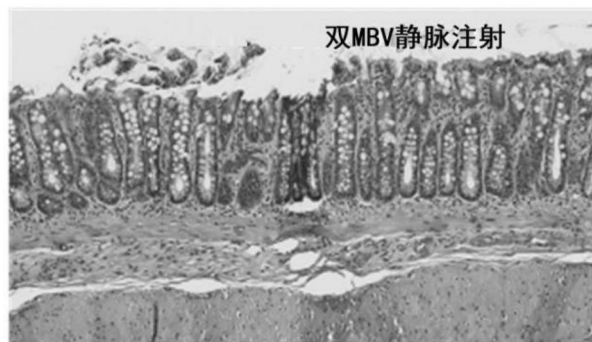


图11E

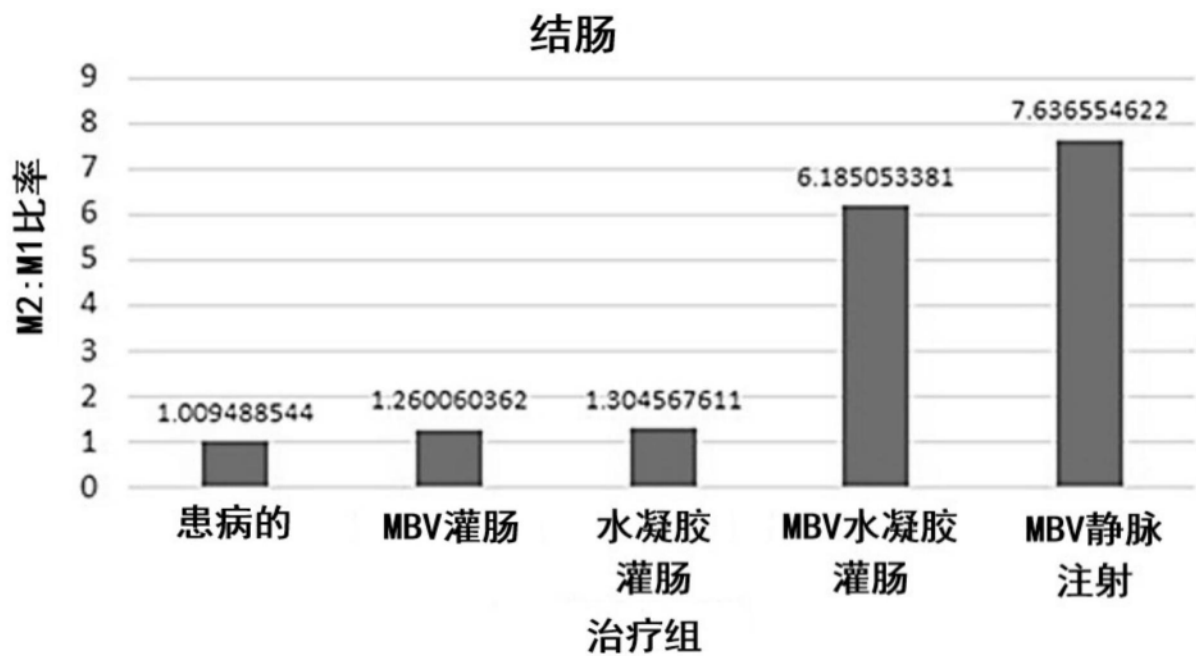


图12A

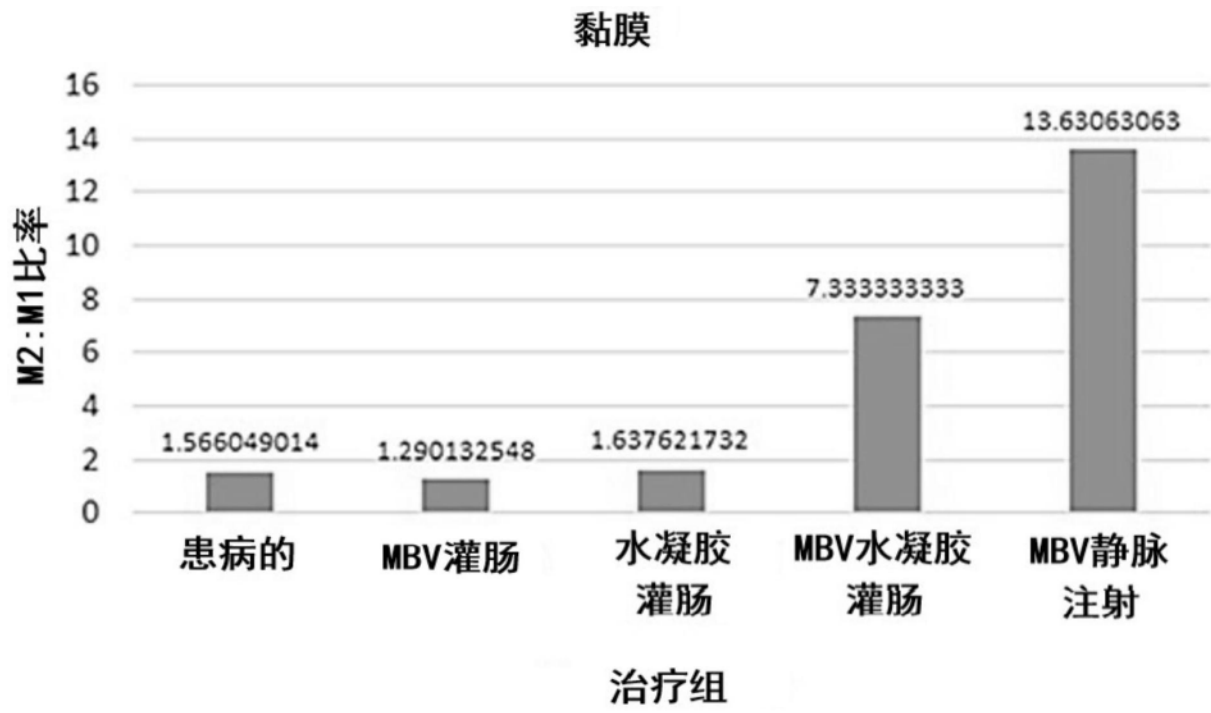


图12B

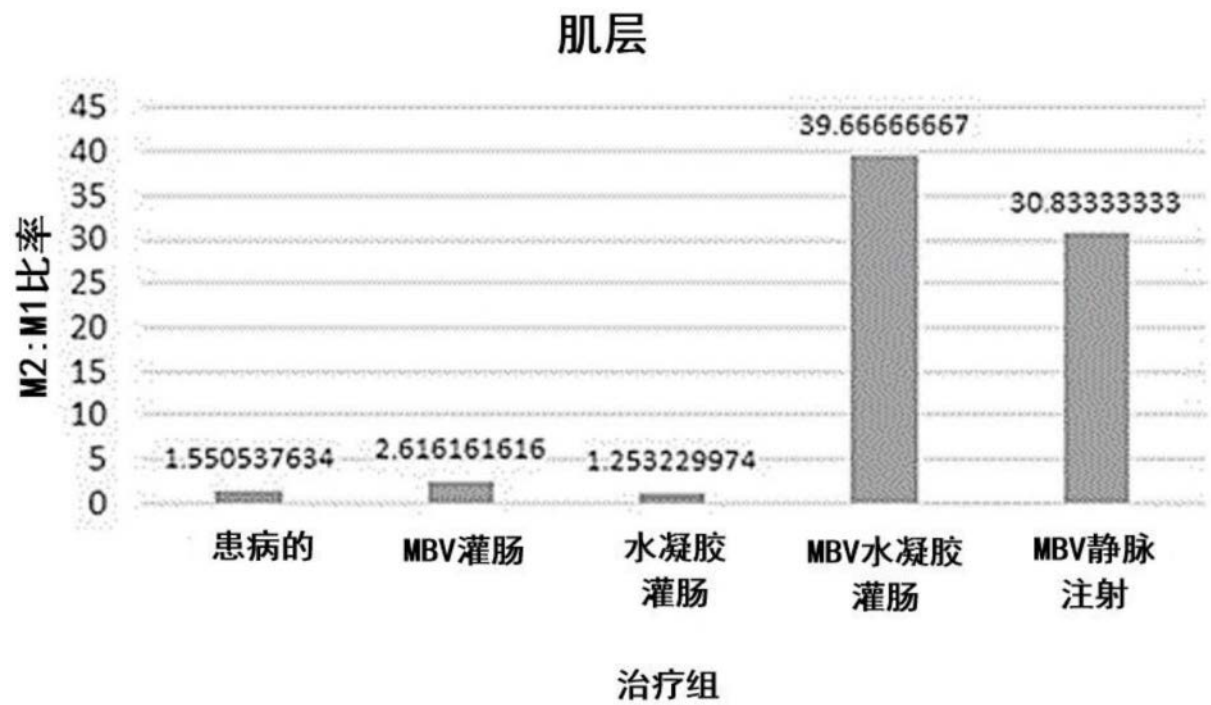


图12C

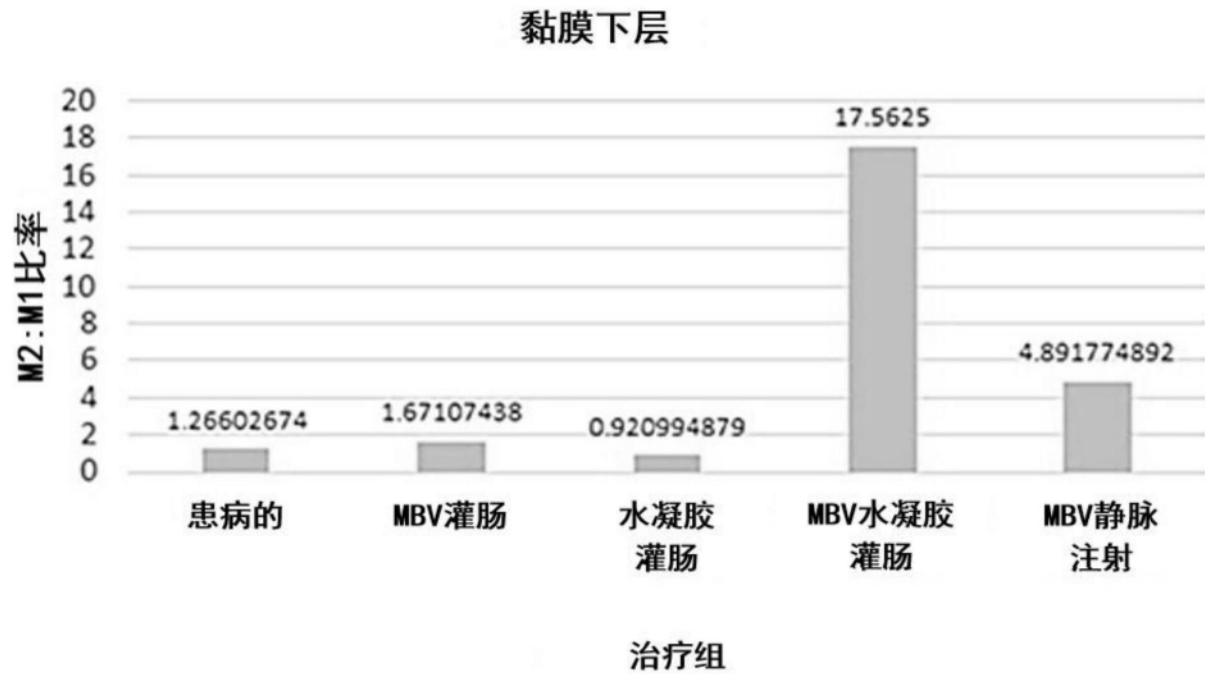


图12D

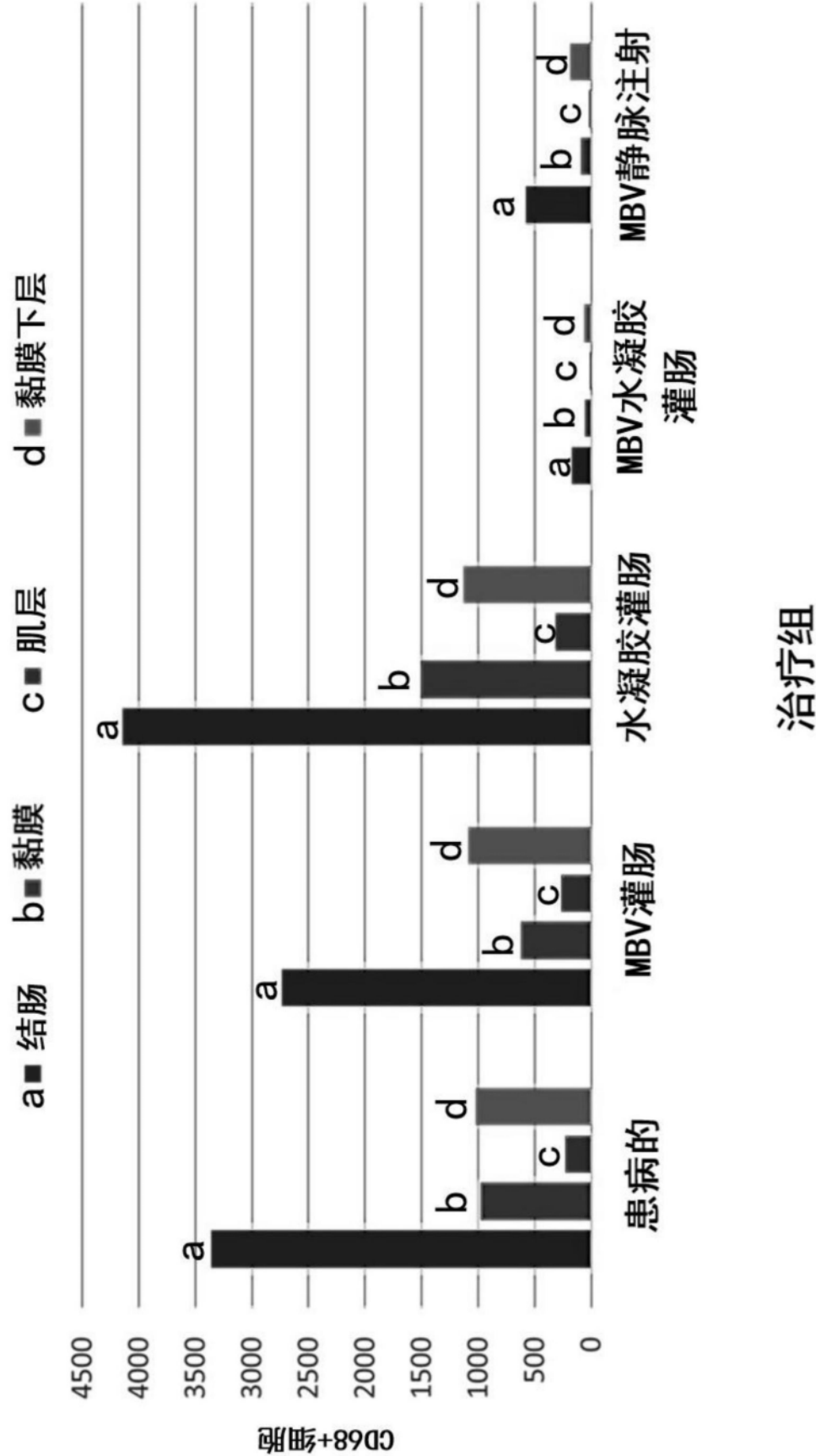


图12E