(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111450119 A
(43)申请公布日 2020.07.28

(21)申请号 201910264077.2

(22)申请日 2019.04.03

(66)本国优先权数据
201910051744.9 2019.01.21 CN

(71)申请人 南开大学
地址 300071 天津市南开区天津市卫津路94号

(72)发明人 李宗金 王晨 崔凯歌

(51)Int.Cl.
A61K 35/50(2015.01)
A61K 35/51(2015.01)
A61K 9/06(2006.01)
A61P 43/00(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)
A61P 17/02(2006.01)
A61P 13/12(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种促进器官损伤修复的围产期组织来源的细胞外基质水凝胶制剂

(57)摘要

本发明是一种促进器官损伤修复的围产期组织来源的细胞外基质水凝胶制剂。器官损伤包括皮肤损伤、下肢缺血、肾脏损伤、心肌梗死等器官损伤模型。该制剂由围产期组织来源的细胞外基质水凝胶制备，通过原位注射的方式给药，本制剂不仅可以单独作为一种促进器官修复的制剂，还可作为细胞、药物等的载体，促进损伤器官组织结构和功能的恢复。这种制剂具有低免疫原性、蕴含丰富的生物活性成分、能为细胞提供更接近于天然组织的微环境，从而促进器官损伤修复。

CN 111450119 A

1.该制剂的有效成分为组织来源的细胞外基质，该细胞外基质从围产期组织中提取，携带提取组织中的胶原蛋白、糖蛋白、蛋白聚糖 、糖胺聚糖等生物活性分子，通过转移该分子到靶器官发挥治疗作用。

2.根据权利要求1所述的细胞外基质，其特征在于：该细胞外基质来源于哺乳动物组织，包括不同来源的围产期组织(胎盘、脐带等)。

3.该制剂的治疗损伤为器官损伤，其特征在于：器官损伤包括皮肤损伤、下肢缺血、肾脏损伤、心肌梗死等器官损伤模型。

4.一种促进器官损伤修复的围产期组织来源的细胞外基质水凝胶制剂，是将权利要求2所述人围产期组织来源的细胞外基质通过原位注射的方式到权利要求3的器官损伤模型中，通过权利要求1的方式来发挥治疗效果。

5.根据权利要求4所述，本制剂不仅可以单独作为一种促进器官修复的制剂，还可作为细胞、药物等的载体，为细胞提供与体内相近的环境，促进损伤器官组织结构和功能的恢复。

6.根据权利要求5所述的技术手段，其特征在于：所述技术可以增强细胞、药物在损伤部位的滞留率及稳定性，并可实现细胞外基质的生物相容性，并进一步增强细胞外基质的治疗效果。

一种促进器官损伤修复的围产期组织来源的细胞外基质水凝胶制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及利用围产期组织来源的细胞外基质水凝胶制剂增强其在器官损伤中的治疗效果，属于生物材料治疗与再生医学技术领域。

背景技术

[0002] 细胞外基质(extracellular matrix)是由多种具有生物活性的大分子物质构成的错综复杂的网络，其主要的物质组成包括胶原蛋白、非胶原蛋白、弹性蛋白、蛋白聚糖与糖胺聚糖。细胞外基质不仅可以支持细胞的生存及为细胞的生命活动提供适宜的场所，而且可以通过影响细胞间的信号传递和信息交流，进一步调控细胞的增殖、代谢、功能和迁移。细胞外基质的存在形式主要有两种，在上皮细胞的基底部以基底膜的形式存在，而在细胞间黏附结构以间质结缔组织的形式存在。细胞外基质的生物学功能主要体现在三个方面:第一，可以起到支持细胞生存和增殖、保护细胞基本结构、维持细胞间联系等物理功能;第二，作为细胞分泌代谢的产物，细胞外基质能够动态地调节细胞生物学行为;第三，通过与细胞的相互作用，维持细胞正常代谢、增殖、分化及细胞间信息交流等。

[0003] 细胞外基质在组织损伤修复和再生医学中发挥着重要作用。细胞外基质是指通过物理、化学或生物方法将组织或器官的细胞组分彻底地去除后，保留的细胞外基质成分。与其他生物材料相比，细胞外基质具有极低的免疫原性、蕴含丰富的生物活性成分、能为细胞提供更接近于天然组织的微环境，因此更适于促进组织细胞的增殖和种子细胞的生长。

[0004] 围产期组织是胎儿与母体之间物质交换的重要器官，其中，胎盘是人类妊娠期间由胚胎胚膜和母体子宫内膜联合长成的母子间组织结合器官，脐带是连接胎儿和胎盘的管状结构。围产期组织如胎盘和脐带内富含细胞外基质和基底膜，而细胞外基质中含有丰富的生长因子，如，表皮细胞生长因子(EGF，epidermal growth factor)、成纤维细胞生长因子(bFGF，basic fibroblast growth factor)、转化生长因子(TGF，transforming growth factor)、血管内皮生长因子(VEGF，vascular endothelial growth factor)、肝细胞生长因子(HGF，hepatocyte growth factor)，因此可用于促进组织器官损伤修复。

[0005] 器官损伤包括皮肤损伤、下肢缺血、肾脏损伤、心肌梗死等器官损伤模型。组织损伤修复是一个复杂的交互式生物学过程，大量细胞和细胞因子参与该过程。水凝胶作为能够促进组织损伤修复的材料，已经展现出是一种在生物及医学领域具有巨大潜力的生物材料。细胞外基质的主要成分胶原蛋白和糖胺聚糖也广泛分布于组织器官中。其中糖胺聚糖具有十分重要的生物学功能，硫酸软骨素不仅充当结缔组织中细胞外基质的组成成分，而且参与神经的生长和发育、创伤愈合、经纤维蛋白原系统而发挥的抗凝作用、生长因子信号转导等生理或病理过程;硫酸乙酰肝素不仅能够调节FGF信号和其他生长因子促进伤口愈合，而且在生物医用材料中也有所应用并且效果明显;透明质酸能够诱导新生血管生成，是促进组织损伤修复水凝胶的优选物质。目前用于促进组织损伤修复的水凝胶种类繁多，虽然各有各的特点，但总存在一些缺陷，而围产期组织来源的细胞外基质水凝胶制剂具有显

著的组织损伤修复和医学再生功能，其所包含的胶原蛋白、糖胺聚糖及生物活性因子是器官损伤愈合的关键，以水凝胶制剂的形式治疗器官损伤可被更为方便、广泛的应用，为组织损伤修复及其治疗提供了新的思路和方法。

发明内容

[0006] 本发明是一种促进器官损伤修复的围产期组织来源的细胞外基质水凝胶制剂。

[0007] 该发明是一种围产期组织来源的细胞外基质水凝胶制剂，该水凝胶制剂通过原位注射的方法递送至靶细胞、靶器官发挥治疗作用，从而达到促进器官损伤修复的效果。

[0008] 所述细胞外基质为围产期组织来源的细胞外基质，所述组织包括胎盘、脐带等。

[0009] 本发明可以有效增强器官损伤后的治疗效果，细胞外基质中的有效分子可以与受损的器官相互作用，释放具有生物活性和治疗效果的分子，促进损伤组织结构和功能的恢复。

[0010] 所述器官损伤包括皮肤损伤、下肢缺血、肾脏损伤、心肌梗死等器官损伤模型。

附图说明

[0011] 图1A为细胞外基质水凝胶的状态；图1B为细胞外基质水凝胶的流变力学鉴定；图1C为细胞外基质水凝胶的扫描电镜鉴定；图1D为细胞外基质水凝胶的DNA含量鉴定；图1E为细胞外基质水凝胶的总糖含量鉴定，图1F为细胞外基质水凝胶的蛋白含量鉴定，该细胞外基质水凝胶为人胎盘来源的细胞外基质水凝胶。

[0012] 图2为胎盘来源的细胞外基质水凝胶制剂促进皮肤损伤组织结构和功能修复。图2A为H&E染色，显示细胞外基质水凝胶治疗组组织结构恢复；图2B为Masson染色，显示皮肤伤口愈合后纤维程度。

[0013] 图3A为胎盘来源的细胞外基质水凝胶制剂促进皮肤损伤组织血管新生情况；3B为使用Living Image软件定量分析胎盘来源的细胞外基质水凝胶制剂处理后，皮肤损伤创面区域的荧光素酶表达情况，显示细胞外基质水凝胶治疗后对皮肤损伤情况的改善；3C为RT-PCR检测损伤部位促血管新生相关基因表达。

具体实施方式

[0014] 下述实施例中如无特殊说明所用方法均为常规方法，所用试剂均可以从商业途径获得。

[0015] 实施例1，本发明提供一种组织来源的细胞外基质水凝胶的制备方法。

[0016] 氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、三羟甲基氨基甲烷、乙二胺四乙酸等试剂均购于Solarbio公司；双抗、制霉菌素、胃蛋白酶等试剂均购于Gibco公司；所用血清为Hyclone公司。

[0017] (1)取组织进行匀浆、离心，除去组织中的血液；

(2)向(1)中加入无菌PBS溶液，充分振荡、洗涤，离心，保留其沉淀部分；

(3)室温下，向沉淀中加入Tris-EDTA缓冲液(pH=7.4)，振荡、洗涤24小时；

(4)离心，向沉淀中加入SDS溶液进行重悬，于室温下振荡、洗涤24小时；

(5)取无菌PBS溶液对沉淀部分洗涤三次，将离心后的沉淀组分转移至预热的37℃的

FBS溶液(含1%双抗和1%制霉菌素)中,振荡洗涤3小时。离心,用PBS溶液反复洗涤沉淀,至将FBS完全除去,离心,得白色絮状沉淀;

(6)收集沉淀部分,将其冻干,研磨后获得组织细胞外基质粉末;

(7)将得到的粉末使用盐酸-胃蛋白酶溶液溶解,振荡至溶解状态,调节pH值至7.4,然后将该溶液置于37℃,形成水凝胶胶体。

[0018] 实施例 2,本发明提供一种组织来源的细胞外基质水凝胶制剂的性质鉴定方法。

[0019] 细胞外基质水凝胶DNA含量测定:使用组织基因组DNA提取试剂盒提取脱细胞处理前后胎盘组织中的DNA。提取得到DNA后,通过酶标仪在260 nm 条件下进行检测,并以正常胎盘组织作为对照,比较脱细胞处理前后胎盘组织中DNA含量的变化。

[0020] 细胞外基质水凝胶蛋白质含量测定:利用BCA法检测蛋白浓度。将B液与A液以50:1混合并配制成适当体积的工作液。每200 μL BCA液中加入10 μL 蛋白样品,37℃反应30分钟,并立即用分光光度计比色测定,记录其分光光度值,将其代入标准曲线得到蛋白浓度。

[0021] 细胞外基质水凝胶总糖含量测定:取半乳糖标准品准确配置成0.02 mg/mL,0.04 mg/mL,0.06 mg/mL,0.08 mg/mL,0.10 mg/mL的标准品溶液,分别取100 μL,加入200 μL 6%苯酚溶液,1.5 mL的浓硫酸,震荡混匀,100 ℃反应10分钟,冷却后在490 nm检测吸光度,并绘制标准曲线。将待测冻干样品配制成0.2 mg/mL的溶液,取100 μL,按照上述步骤检测吸光度,以标准曲线回归方程计算总糖浓度。

[0022] 细胞外基质水凝胶流变力学测定:将制得的样品置于流变仪平板间,平行板直径20 mm,间距1 mm,频率1 Hz。记录温度自0℃至40℃过程中,样品的储能模量(G')和损耗模量(G″)的变化,探讨该水凝胶的稳定性。

[0023] 细胞外基质水凝胶扫描电镜鉴定:细胞外基质在真空状态下进行喷金,使其外被金-钯包裹,然后在加速电压为10 kV 的条件下进行SEM 观察并拍照记录。最后用ImagJ 软件(National Institute of Health,美国)进行计算并测量孔径。

[0024] 实施例3,本发明提供小鼠切除性皮肤损伤、下肢缺血、肾脏损伤及心肌梗死等模型的构建方法。

[0025] 小鼠切除性皮肤损伤构建:小鼠称重,腹腔注射4%水合氯醛(330 mg / kg)麻醉小鼠;将麻醉后的小鼠进行俯卧位固定,使用剃毛器去除背部毛发,碘伏消毒术区皮肤;用无菌眼科剪在其背部形成一直径约1cm皮肤全层损伤创面,深及筋膜;将3毫米厚的环状有机硅胶用尼龙缝线缝合在伤口上,以防止伤口非病理性收缩;手术后将小鼠平卧于加热垫上复温,待苏醒后放回饲养笼。

[0026] 小鼠下肢缺血模型的构建:称取小鼠体重,腹腔注射4%水合氯醛(330 mg / kg)麻醉小鼠;沿着右腿膝内侧至腹股沟中点做切口,并钝性分离皮下结缔组织;用眼科手术镊分离并暴露出股动脉及大隐动脉,旋髂外动静脉和股动静脉肌支,轻轻分离伴行的神经,用8/0号线结扎股动脉两端并移除中间段;缝合好皮肤切口,将动物置于加热垫上直至苏醒。

[0027] 小鼠急性肾损伤模型的构建:称取小鼠体重,腹腔注射4%水合氯醛(330 mg / kg)麻醉小鼠;于背部中部、脊柱左侧 0.2 厘米处纵行切开皮肤(0.8-1厘米),分离皮下结缔组织,离断背部肌肉进入腹腔,探查并暴露左肾,可见正常肾脏呈现鲜红色;用尖镊游离肾周脂肪及筋膜,向左侧轻轻牵拉肾脏暴露肾蒂,使用微型血管夹略靠近肾脏夹闭肾蒂,约 1分钟可见肾脏出现淤血呈紫黑色;肾脏缺血期间,使用浸沾温生理盐水的纱布覆盖切口并

保持纱布湿润，小鼠上方暖灯照射并保持加热垫温度(37°C)恒定；缺血 40 分钟后移除血管夹，肉眼可见肾脏颜色即刻变为红色；在肾包膜下注射细胞外基质水凝胶制剂后，使用 4-0 丝线逐层缝合肌层和皮肤关闭背部切口，将动物置于加热垫上直至苏醒

小鼠心肌梗死模型的构建：用 5%的异氟烷气体预麻小鼠并固定，剪开颈部气管，气管插管后接通麻醉呼吸机正压通气，调节异氟烷的含量约为 1%-1.5%，呼吸频率为 120 次/分钟；进行胸廓切开术，并于第四肋间处暴露心脏左心室前壁；左冠状动脉起始端的下方距离左心耳约 1 毫米处，用 7-0 的缝合线结扎冠状动脉左前降支；于结扎位点左下、右下各 1 毫米处分别注射所需药物；关胸，缝合肌肉和皮肤，将动物置于加热垫上直至苏醒。

[0028] 实施例4，本发明提供检测细胞外基质水凝胶水凝胶对器官损伤治疗功能影响的方法。

[0029] 苏木素&伊红染色评价损伤组织结构恢复情况：使用细胞外基质水凝胶治疗切除型皮肤损伤模型小鼠，在第7、14天时，处死小鼠对损伤组织取材，制作石蜡切片，并对其进行苏木素&伊红染色，对损伤组织肌纤维坏死情况及炎症浸润进行评估，表明细胞外基质水凝胶可以减轻损伤组织坏死，抑制炎症反应，并促进损伤组织结构的恢复(图 2A)。

[0030] Masson染色评价损伤组织纤维化情况：使用细胞外基质水凝胶切除型皮肤损伤模型小鼠，在第7、14天时，处死小鼠对损伤组织取材，制作石蜡切片，并对其进行Masson染色，对损伤组织纤维化水平进行评估，表明细胞外基质水凝胶可以减轻损伤组织纤维化，并促进损伤组织结构和功能的恢复(图2B)。

[0031] 实时荧光定量PCR：评价细胞外基质水凝胶对皮肤炎症因子基因表达情况改变；使用TRIzol法提取细胞内总RNA，通过反转录获得cDNA后，通过Real-time PCR对炎症相关基因进行RNA水平的检测。结果表明细胞外基质水凝胶，可以更好的抑制皮肤炎症基因的表达(图3C)。

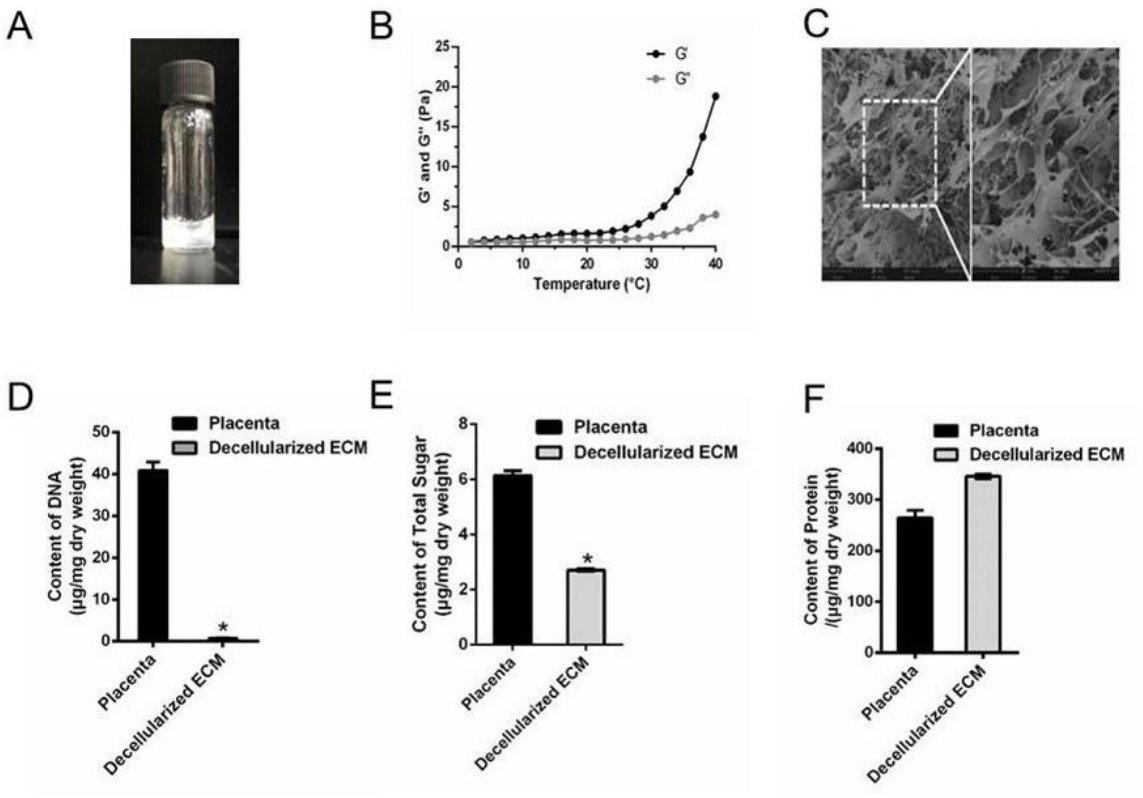
A
B
G'
G"
G' and G" (Pa)
Temperature (°C)
C
D
Placenta
Decellularized ECM
Content of DNA (μg/mg dry weight)
E
Content of Total Sugar (μg/mg dry weight)
F
Content of Protein /(μg/mg dry weight)

图1

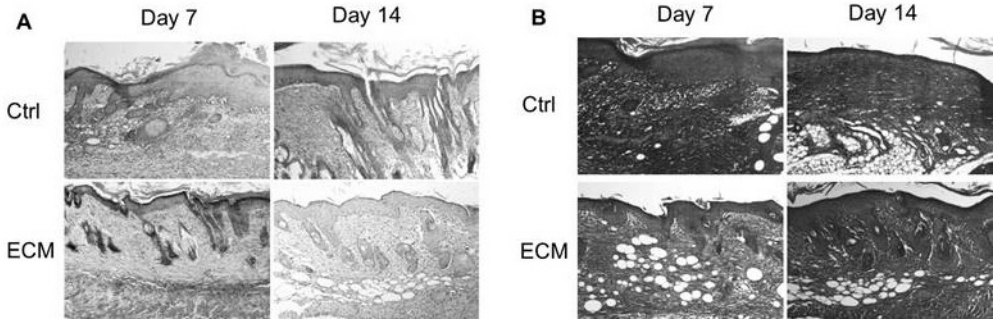
A
Day 7
Day 14
Ctrl
ECM
B

图2

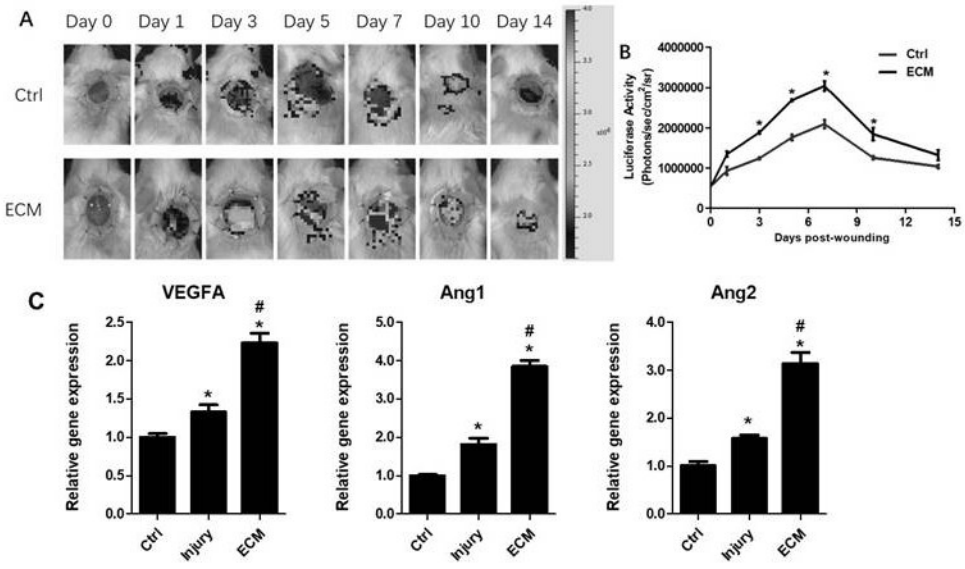
A
Day 0
Day 1
Day 3
Day 5
Day 7
Day 10
Day 14
Ctrl
ECM
B
Ctrl
ECM
Luciferase Activity (Photons/sec/cm²/sr)
Days post-wounding
C
VEGFA
Ang1
Ang2
Relative gene expression
Ctrl
Injury
ECM

图3