



등록특허 10-2745611



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년12월20일

(11) 등록번호 10-2745611

(24) 등록일자 2024년12월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/12 (2020.01) A61P 1/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/12 (2013.01)

A61P 1/04 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2019-7026981

(22) 출원일자(국제) 2018년03월02일

심사청구일자 2021년03월02일

(85) 번역문제출일자 2019년09월16일

(65) 공개번호 10-2019-0120258

(43) 공개일자 2019년10월23일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/020758

(87) 국제공개번호 WO 2018/161028

국제공개일자 2018년09월07일

(30) 우선권주장

62/465,985 2017년03월02일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

W02008109407 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

유니버시티 오브 피츠버그 - 오브 더 커먼웰스 시스템 오브 하이어 에듀케이션

미국 펜실베이니아 15260, 피츠버그, 130 새커리 애비뉴, 퍼스트 플로어 가드너 스틸 컨퍼런스 센터

(72) 발명자

베이디락, 스티븐 프란시스

미국, 47906 인디애나, 웨스트 라파예트, 킹스우드 로드 사우스 1150

나랑호 구티아레스, 후안 디에고

콜롬비아, 마니살레스, 칼레 70 넘버 27-27 에이 피티 401

살딘, 린지 타미코

미국, 90245 캘리포니아, 엘 세건도, 로미타 스트리트 720

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 여경숙

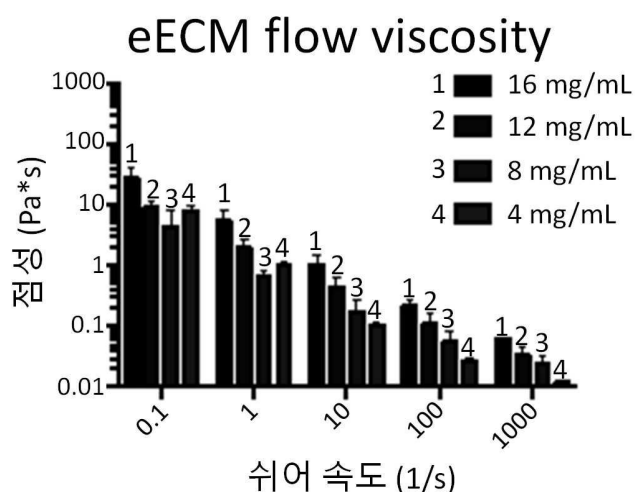
(54) 발명의 명칭 식도 염증 치료를 위한 ECM 하이드로겔

(57) 요약

한 대상에서 염증을 억제하고 및/또는 식도 염증 효과를 완화시키는 방법들을 공개한다. 식도의 제약(stricture)을 감소시키는 방법들은 또한 공개 한다. 이 방법들에는, 식도 염증 또는 제약 또는 제약의 위험을 가지고 있는 대상과 같은 대상의 식도에, 치료적으로 효과 있는 양의 세포외 기질 (extracellular matrix) (ECM) 하이드

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



로겔을 투여 하는 것을 포함 하며, 여기서 ECM 하이드로겔은 다음의 성질을 가진다: a) 50 %가 겔상으로 (gelation) 되는 시간이 약 37°C 의 온도에서 30 분 이내; b) 식도로의 주입에 적절한 점액성의 흐름; 및 c) 이것에만 국한하지 않으나, 10-70 Pa 과 같은, 10-600 파스칼 (Pascal) (Pa)의 강직성. 제한적이지 않은 특정한 예시에서, 하이드로겔은 식도 ECM 하이드로겔 일 수 있다. 다른 제한적이지 않은 특정한 예시에서, 대상은 바렛 씨 식도를 가질 수 있다.

추가적 실시양태들에서, 식도 세포외 기질(esophageal extracellular matrix) (ECM) 하이드로겔 (hydrogel) 이 포함된 조성물들이 공개 되며, 여기서, 식도 세포외 기질 하이드로겔은 다음의 성질을 가지며: a) 50 %가 겔상으로(gelation) 되는 시간이 약 37°C 에서 10 분 이내; b) 식도로의 주입에 충분한 점액성의 흐름; 및 c) 10-70 파스칼 (Pascal) (Pa)의 강직성, 여기서 조성물은 식도로의 투여를 위하여 제제화 된다. 이 조성물 들은 여기서 공개하는 방법들에 유용하다.

본 발명의 상기 서술 및 다른 목표, 양상, 및 장점들은, 수반되는 도면들을 참고로 한, 다음의 상세한 서술로부터 좀 더 분명해 질것이다.

명세서

청구범위

청구항 1

세포외 기질 하이드로겔 ((extracellular matrix (ECM) hydrogel))을 포함하는 식도 염증(esophageal inflammation) 치료용 약학적 조성물로서, 상기 ECM 하이드로겔은 하기의 특징을 가지는 조성물:

- a) 50% 겔화 되는 시간이 37°C에서 10분 이내;
 - b) 쉬어 속도(shear rate) 0.1/s에서 1 내지 40 Pa*s의 흐름 점성도 및 쉬어 속도 1000/s에서 0.01 내지 0.20 Pa*s의 흐름 점성도; 및
 - c) 강직성이 10에서 300 파스칼(Pa);
- 및 여기서 조성물은 식도로의 투여를 위하여 제제화 되는 특징인, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 50% 겔화 시간은 37°C 에서 a) 4에서 10분; 또는 b) 3에서 10분인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 하이드로겔은 10 내지 70 Pa의 강직성을 갖는, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 2 mg/ml 내지 16mg/ml의 ECM 하이드로겔을 포함하는, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 ECM 하이드로겔은:

- (a) 조직을 산성 용액에서 산성 프로테아제로 소화시켜 탈세포화된 ECM (decellurized ECM)을 용해화 시켜 소화된 ECM을 생산하고;
- (b) 소화된 ECM의 pH를 7.2에서 7.8 사이로 올려 중화된 소화 용액을 생산하고; 및
- (c) 소화된 ECM을 8mg/ml에서 12 mg/ml 농도의 ECM 하이드로겔로 희석 하여, 생산하게 하는, 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 (b) 소화된 ECM의 pH를 상승시키는 것은 염기 또는 등장 버퍼를 첨가 시켜 소화된 식도 ECM의 pH를 올리는 것을 포함하는, 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 산성 프로테아제는 펩신, 트립신, 또는 이들의 조합인, 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 ECM 하이드로겔은 25°C에서 또는 그 이하에서 유지되는 것인, 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 조성물은 식도의 상피층 장막을 회복시키는 것인, 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 조성물은 바렛씨 식도(Barrett's esophagus)를 치료하기 위한 것인, 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 조성물은 식도 제약(stricture)을 감소시키기 위한 것인, 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, ECM은 식도, 간, 방광, 소장, 또는 피부 ECM인 것인, 조성물.

청구항 13

제5항에 있어서, 탈세포화된 ECM(decellurized ECM)은 식도, 간, 방광, 소장, 또는 피부 ECM인 것인, 조성물.

청구항 14

키트로서, a) 용기, 여기서 용기는 제1항의 조성물, 또는 이들의 동결건조 형태를 포함하는 용기, 및 b) 조성물을 사용하는 설명서를 포함 하는, 키트.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련된 출원과의 교차 참조

[0002] (CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATION)

[0003] 본 출원은 여기서 그 전문이 참고 문헌으로 병합된, 2017 년 3월 2일에 U.S. 가출원 번호 No. 62/465,985로 출원된 것의 유리한 점을 청구한다.

[0004] 이 출원은 하이드로겔(hydrogel) 분야와 관련 되며, 특히 세포외 기질 (extracellular matrix) (ECM) 하이드로겔 (hydrogel)을, 바렛씨 식도 (Barrett's esophagus)와 같은, 식도 염증을 치료하기 위하여 사용하는 것에 관련 된다.

배경 기술

- [0005] 식도 선암 (esophageal adenocarcinoma) (EAC)은
- [0006] 빠르게 증가하고 있다; 모든 다른 암종의 증가율을 능가 하고 있다. 식도 선암 (esophageal adenocarcinoma) (EAC)은 참담한 예후와 연관 되며, 5 년 생존율이 15% 미만이다. 병이 발생한 환자들의 수는 1970 년대에 보다 600% 까지 높다 (Dubecz et al., J Gastrointest Surg. 2013 Nov 15; Prasad et al., Amer. J. Gastroentero. 105(7):1490-502, 2010).
- [0007] 바렛씨 식도는 식도의 아래 부분 (면부분)의 세포에 변질이 관련 되며, 이는 식도의 정상적인 중층편형상피 내벽 (stratified squamous epithelium lining)이 배상세포 (goblet cells)을 가진 단순한 원주 상피 (simple columnar epithelium) 로 대체되는 것이 특징이다. 바렛씨 식도는 식도 선암 (esophageal adenocarcinoma)과 깊은 연관이 있다. 바렛씨 식도의 주된 원인은 역류 식도염으로부터의 만성적인 산에의 노출에 적응 및 반응에 의한 것으로 생각 된다. 생체검사 후, 바렛씨 식도 세포는 4가지 일반적인 등급으로 분류 된다: 비이형성 (nondysplastic), 낮은-등급의 이형성 (low-grade dysplasia), 높은-등급의 이형성 (high-grade dysplasia), 및 명백한 상피성암 (frank carcinoma). 높은-등급의 이형성 (high-grade dysplasia), 및 초기 단계의 선암은 보통 내시경 절제 및 고주파 절제와 같은 내시경 치료로 처치 되며, 반면에 비이형성(nondysplastic), 및 낮은-등급 환자는 일반적으로 매년 내시경으로 관찰 하도록 권고 하고 있다. 식도 염증 및 바렛씨 식도를 치료하는데 사용 될 수 있는 방법 및 조성물들이 아직 필요 하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

발명의 효과

- [0008] 한 대상에서 염증을 억제하고 및/또는 식도 염증 효과를 완화시키는 방법들을 공개한다. 식도의 제약 (stricture)을 감소시키는 방법들은 또한 공개 한다. 이 방법들에는, 식도 염증 또는 제약 또는 제약의 위험을 가지고 있는 대상과 같은 대상의 식도에, 치료적으로 효과 있는 양의 세포외 기질 (extracellular matrix) (ECM) 하이드로겔을 투여 하는 것을 포함 하며, 여기서 ECM 하이드로겔은 다음의 성질을 가진다: a) 50 %가 겔 상으로(gelation) 되는 시간이 약 37°C 의 온도에서 30 분 이내; b) 식도로의 주입에 적절한 점액성의 흐름; 및 c) 이것에만 국한하지 않으나, 10-70 Pa 과 같은, 10-600 파스칼 (Pascal) (Pa)의 강직성. 제한적이지 않은 특정한 예시에서, 하이드로겔은 식도 ECM 하이드로겔 일 수 있다. 다른 제한적이지 않은 특정한 예시에서, 대상 은 바렛씨 식도를 가질 수 있다.
- [0009] 추가의 실시양태들에서, 식도 세포외 기질(esophageal extracellular matrix) (ECM) 하이드로겔 (hydrogel) 이 포함된 조성물들이 공개 되며, 여기서, 식도 세포외 기질 하이드로겔은 다음의 성질을 가지며: a) 50 %가 겔 상으로(gelation) 되는 시간이 약 37°C 에서 10 분 이내; b) 식도로의 주입에 충분한 점액성의 흐름; 및 c) 10-70 파스칼 (Pascal) (Pa)의 강직성, 여기서 조성물은 식도로의 투여를 위하여 제제화 된다. 이 조성물들은 여기서 공개하는 방법들에 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0010] 도면 1: 식도 ECM 하이드로겔 점성 프로파일
- 도면 2: 식도 ECM 하이드로겔 강직성 프로파일
- 도면 3: 식도 ECM 하이드로겔 겔상화 시간
- 도면 4a-4c. 점성 프로파일은 조직-특이 하다.

- 도면 5a-5c. 겔 강직성은 조직-특이 하다.
- 도면 6a-6c. ECM 겔상화 시간은 조직-특이 하다.
- 도면 7. ECM 하이드로겔은 항염증 사이토카인 분비를 촉진 시킨다.
- 도면 8a-8b. ECM은 상피 및 줄기 세포의 화학친화성(chemotaxis) 을 촉진한다.
- 도면 9. 임상 처치에서 EAC의 다이나믹한 호혜성 (reciprocity).
- 도면 10a-10b. 하이드로겔 투여 효과
- 도면 11. 30일 후에 하이드로겔 투여 효과.
- 도면 12a-12b. eECM 하이드로겔의 안전성 평가.
- 도면 13a-13d. 조직학
- 도면 14. 제약(stricture)을 치료하기 위한 용도.
- 도면 15. 조직학적 분석, 대조군 개.
- 도면 16. 조직학적 분석, ECM 하이드로겔로 처치한 개.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 하이드로겔로서 제조 될 때는, 세포외 기질 (extracellular-matrix) (ECM) 바이오스캐폴드(bioscaffolds)는 생물학적 활성을 갖는다 (Freytes et al., Biomaterials 29: 1630-7, 2008). 그러나, ECM 하이드로겔은 특유의 물리적 및 기계적 성질을 갖는다. 이러한 독특한 성질들은 ECM을 가능한 쉬트(sheet) 형태를 넘어 응용할 수 있도록 한다. ECM 하이드로겔은, 쉬트 형태와 비교 하여, 불규칙적인-형태 및 크기의 표면 면적에 전달 될 수 있어, 불규칙적인 모형을 가진 조직에 ECM이 접촉 할 수 있도록 하며, 고정 장치 ((예를 들어, 봉합선(suture), 스텐트(stent))를 필요로 하지 않고, 및 이것이 이식된 곳에 불리한 강직성을 부여 하지 않는다. 하이드로겔은 실온에서 액체 이지만 (프리-겔, pre-gel), 체온(37°C)에 노출 되었을 때는 겔 (gel)이 되는 특징을 가져, 다른 것들 중에서 주사기, 카테터(catheters), 관류기(irrigator), 및 탐침(probe)과 같은 장치를 통해 쉽게 전달 되도록 한다.
- [0012] 쉬트 형태의 ECM은 후기 단계 식도 이형성 및 종양 질환을 치료 하는데 사용되어 왔다, 그러나, 고정 장치의 필요성 (즉, 스텐트), 쉬트 형태의 강직성 및 이식이 상대적으로 침윤성인 점은 이의 사용을 확장하지 못 하게 하였다. ECM 하이드로겔의 특징적인 성질은 식도의 표면에 적용하기에 이상적이도록 하며, 및/또는 쉬트 형태로는 처치할 수 없는 식도 질환의 치료에 이상적이게 한다. ECM 하이드로겔의 점탄성(viscoelastic) 및 점막부착(mucoadhesion) 성질들은 식도 질환의 치료를 위한 잠재력을 갖게 한다. 그 외에, 하이드로겔은 식도의 암 부위 및 전-암 부위를 역전 시키는데 사용될 수 있다.
- [0013] 최근에는, 쉬트 형태가 식도의 후기 단계 암 및 전암 질환을 성공적으로 치료하는데 사용 되었다. 식도에 사용하기 위하여 쉬트를 주변을 둘러 싸도록 놓아 두며 스텐트로 그 장소에 고정 시켰다. 쉬트를 사용하는 데, 고정 장치 (즉, 봉합선 또는 스텐트)를 필요로 하는 것, 불규칙적인 크기의 홈을 채우지 못하는 것, 및 커버하는 부위에 한계 (쉬트의 크기)가 있는 것과, 같은 한계들이 있다. 식도에서는, 이러한 한계들은, 일시적인 스텐트의 사용 및 진전된 과정이 정당화 되는 몇몇 경우 중에 하나인, 후기 단계의 식도 질환 치료에 ECM 쉬트를 사용하는데, 제약을 두게 해왔다.
- [0014] 공개 되는 하이드로겔은 식도에 국부적으로 투여 될 수 있다. 하이드로겔은 표면을 코팅하기 위하여 식도의 루멘(lumen)에 투여 될 수 있다. 이는 비-침윤적인 적용이다. 어떤 실시 양태들에서는, 삼키는 것과 같은, 구강으로 적용한다. 다른 실시 양태들에서는, 위관영양법 (gavage)으로 적용 할 수 있다. 하이드로겔은 식도 조직의 표면에 형성 된다. 어떤 실시 양태들에서는, 하이드로겔은 점막을 코팅하고 및 하부에 있는 점막하층 또는 근육 계로는 침투하지 않는다.
- [0015] 식도 ECM 으로부터 생산 된 하이드로겔과 같은, 하이드로겔은 바렛씨 식도 치료, 및 선종으로의 전개 되는 것을 억제 하는데 사용될 수 있다는 것이 여기서 공개 된다. ECM 하이드로겔은 염증을 억제 할 수 있으며 염증 효과를 완화 시킬 수 있다. ECM 하이드로겔은 제약 (stricture)을 감소 시킬 수 있다. 어떤 실시 양태들에서는, ECM 하이드로겔은, 약 8mg/ml 내지 약 12 mg/ml 와 같은, 약 2 mg/ml 내지 약 20 mg/ml의 농도에서 사용될 때 효과

적이다.

[0016] [용어의 설명]

[0017] 달리 기록되지 않는 한, 기술적 용어들은 통상의 사용법에 따라 사용 된다. 분자생물학에서의 공통 용어의 정의는 Benjamin Lewin, *Genes V*, published by Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); 및 Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)에서 찾아 볼 수 있다.

[0018] 본 공개의 여러 가지 실시양태들의 검토를 촉진시키기 위하여, 특별한 용어들의 다음의 설명들의 제공 된다:

[0019] **산성 프로테아제 (단백질분해효소)(Acid Protease):** 펩타이드 결합을 쪼개는 효소로서, 이 효소는 산성 pH에서 펩타이드 결합을 쪼개는 활성이 증가 한다. 예로서 및 제한 없이, 산성 프로테아제에는 펩신 및 트립신이 포함 될 수 있다.

[0020] **바렛씨 식도 (Barrett's Esophagus):** 식도의 아래 부분(면 부분)의 세포의 비정상적인 변화 ((변질형성 (metaplasia) 또는 이형성(dysplasia)). 바렛씨 식도는 식도의 정상적인 중층편형상피 내벽 (stratified squamous epithelium lining)이 배상세포 (goblet cells)을 가진 단순한 원주 상피 (simple columnar epithelium) 로 대체 될 때 진단 된다. 바렛씨 식도를 가진 많은 서브 그룹 환자들은 증상을 갖고 있지 않으나, 바렛씨 식도는 위식도 역류 질환 (gastroesophageal reflux disease) (GERD)으로 의료적 치료를 찾는 5-15%의 환자에서 발견 된다. 바렛씨 식도는 식도 선암과 강하게 연관 되어 있으며, 및 전암 상태로 간주 된다. 바렛씨 식도의 주 원인은 역류 식도염으로부터 만성적인 산에의 노출에 적응으로 간주 된다. 생체검사 후, 바렛씨 식도 세포는 4가지 일반적인 등급으로 분류 된다: 비이형성(nondysplastic), 낮은-등급의 이형성 (low-grade dysplasia), 높은-등급의 이형성 (high-grade dysplasia), 및 명백한 상피성암 (frank carcinoma).

[0021] **염기 (Base):** pH 가 7 이상인 화합물 또는 화합물의 용액. 예로서 및 제한 없이, 염기는 알카라인 하이드록사이드 (alkaline hydroxide) 또는 알카라인 하이드록사이드의 수용액 이다. 어떤 실시양태들에서는, 염기는 NaOH 또는 PBS에 있는 NaOH 이다.

[0022] **분쇄하다 (Comminute) ((분쇄 (comminution) 및 분쇄하는 (comminuting))):**, 제한 없이, 빻고(grinding), 섞고 (blending), 찢고(shredding), 절편으로 하고 (slicing), 갈고 (milling), 자르고(cutting), 찢는 (shredding) 것을 포함하여, 큰 입자들을 작은 입자들로 감소 시키는 공정. ECM은, 제한적이지 않지만, 수화물 형태 (hydrate form), 냉동, 공기-건조, 동결건조, 분말, 스위트-형태를 포함한 어느 형태로 있는 동안에 분쇄 될 수 있다.

[0023] **진단 (Diagnosis):** 신호, 증상 및 여러 가지 검사 결과들에 의해 질병을 동정하는 과정. 이 과정을 통해 도달하는 결론은 또한 “한 진단 (“a diagnosis”) 이라고 불린다. 보통 수행되는 테스트의 형태에는 혈액 검사, 의학적 이미징, 및 생체검사 (조직검사)가 포함된다.

[0024] **세포외 기질 (Extracellular Matrix) (ECM):** 조직 및 기관의 비-세포 성분.

[0025] 자연적인 ECM 들 (포유류 및 사람과 같은 다세포 개체에서 발견 되는 ECM 들)은 제한적이지 않으나, 콜라겐 (collagens), 엘라스틴(elastins), 라미닌(laminins), 글라이코사미노글라이칸(glycosaminoglycans), 프로테오글라이칸(proteoglycans), 항미생물제 (antimicrobials), 화학유인물(chemoattractants), 싸이토카인 (cytokines), 및 성장 인자(growth factors)를 포함하는 구조적 및 비-구조적 생체분자들의 혼합체이다. 포유류에서는, ECM은 자주 건조된 무게로 약 90%의 여러 가지 형태의 콜라겐 (collagen)을 포함한다. 생물학적 스케폴드(biological scaffold)는 주어진 조직 또는 기관으로부터 세포를 제거하여 만들어 질 수 있다. ECM의 조성 및 구조는 조직의 기원 (source)에 따라 다르다. 예를 들어, 소장 점막하층(small intestine submucosa) (SIS), 방광 기질 (urinary bladder matrix) (UBM), 식도 (esophagus) (E), 및 간 기질 EMC (liver stroma ECM)는 각 조직마다 필요로 하는 독특한 세포적인 영역(cellular niche) 때문에 이들의 전체적인 구조 및 조성에서 각각 다르다. 완전한 “세포외 기질 (extracellular matrix)” 및 “ 완전한 ECM(intact ECM)” 바이오스케폴드 (bioscaffold) 는, 이것에 만 국한 하지 않으나, 콜라겐(collagens), 엘라스틴(elastins), 라미닌(laminins), 글라이코사미노글라이칸(glycosaminoglycans), 프로테오글라이칸(proteoglycans), 항미생물제 (antimicrobials), 화학유인물(chemoattractants), 싸이토카인(cytokines), 및 성장 인자(growth factors)를 포함하는 구조적 및 비-구조적 생체분자들의 활성을 이상적으로 유지하고 있는, 여기서 서술된 것과 같은 제한

없이 분쇄된 EMC 와 같은, 세포외 기질로 구성 된다.

- [0026] EMC 내에서 생체 분자들의 활성은, 예를 들어, 화학적 및 효소적으로 크로스-링크 (cross-link) 시키고 및/또는 ECM을 투석 시켜(dialyzing), 화학적으로 또는 기계적으로 제거 될 수 있다. 완전한 EMC는 효소적으로 소화되거나, 크로스-링크 되거나 및/또는 투석이 절대적으로 되지 않은 것이며, 이는 소화, 투석 및/또는 크로스-링크 과정, 또는 용해시키기 이전에 저장 및 EMC를 다루는 동안 자연적으로 일어나는 과정 이외에는 다른 컨디션들의 대상이 되지 않은 것을 의미한다. 그러므로, 상당히 크로스-링크 되고, 및/또는 투석 된 ECM (여기서 서술된 사용에 있어서 ECM의 겔화 및 기능성 성질에 상당히 영향을 주지 않는 사소한 방식에 있어서도)은 “완전한 (intact)” 것으로 간주 되지 않는다.
- [0027] **위내시경 (Esophagogastroduodenoscopy) (EGD) 또는 상부 위장관 내시경(Upper Gastrointestinal Endoscopy):** 십이지장까지의 위장관 상부 어느 부위든 시각화 하는 진단적 내시경 과정. “식도 내시경 (esophageal endoscopy)” 는 식도를 시각화하는 어느 내시경 과정이다. 식도 내시경은 때로는EGD 또는 상부 위장관 내시경의 한 부분으로서 수행 될 수 있다. 용어들은 그렇게 표현적으로 언급 되지 않는 한 상호 배타적이지 않다.
- [0028] **겔화 (Gelation):** 솔(sol)에서 겔 (gel) 형태로 형성시키는 과정.
- [0029] **위식도 역류 질병(Gastroesophageal Reflux Disease) (GERD):** 위에서 식도로 위산이 역류하여 점막의 손상이 원인이 되어 일어나는 만성적 증상. “GERD는 보통 정상적으로 위의 윗부분(가까운 부분)을 닫히도록 하는 식도 아래 의 괄약근이 비정상적으로 이완되는 것을 포함하는 위와 식도 사이 장막의 변화, 식도로부터 위 역류 방출의 손상, 또는 열공 탈장 (hiatal hernia) 이 원인이 되어 일어난다. 이 변화는 영구적이거나 또는 일시적일 수 있다.
- [0030] **흐름의 점성도 (Flow Viscosity):** 전단 응력 (shear stress) 또는 장력(tensile stress)에 의한 액체의 점차적인 변형에의 저항 수치. 점성도는 다른 속도로 움직이고 있는 액체 내에서의 액체의 두 표면 사이의 상대적인 움직임을 반대하는 액체의 성질. 액체를 역지로 튜브로 통과하게 할 때, 액체를 구성하는 입자들은 일반적으로 튜브의 축 (tube's axis) 가까이에서는 좀 더 빠르게 움직이고 이의 벽에서는 좀 더 천천히 움직인다. 액체가 계속 움직이도록 하기 위하여 입자 사이의 마찰을 극복하기 위한 긴장도(stress) (튜브의 두 끝 사이의 압력의 차이와 같은)가 필요로 하다. 주어진 속도 패턴에서, 요구되는 긴장도는 액체의 점성도에 비례한다. 점성도는 점도계(viscometers) 및 유량계(rheometers)로 측정 된다. 점성도는 파스칼 초(pascal second) (Pa*s) 로서 측정 될 수 있다. 20°C의 물은 1.002 mPa*s의 점성도를 가진다.
- [0031] **하이드로겔:** 친수성인 폴리머 체인의 네트워크이며, 때로는 물이 분산 매체인 콜로이드겔로서 발견 된다. 하이드로겔은 매우 흡수성인 자연적 또는 합성적 폴리머 네트워크이다. 하이드로겔은 또한 자연적인 조직과 비슷한 정도의 유연성을 소유 한다.
- [0032] **염증 (Inflammation):** 조직에 상해로 인해 일어나는 국부적인 반응. 염증은 정상적인 (건강한) 환경 하에 있는 조직의 그러한 부위에서 발견 된 세포와 같은 수를 초과하는 수로, 어느 조직 공간, 어느 부류의 백혈구 유닛트 또는 부위에 나타나거나 또는 이동하는 특징이 있다. 염증은 병원, 손상된 세포 또는 자극과 같은 유해한 자극에 대한 맥관 조직의 복잡한 생물학적 반응에 의해 지휘된다.
- [0033] **등장 버퍼 용액 (Isotonic Buffered Solution):** pH 7.2 와 7.8 사이로 완충된 용액이며 등장 환경을 촉진하기 위해 균형된 농도의 염을 가진다.
- [0034] **낮은 등급 이형성 및 높은 등급 이형성 (식도의) ((Low Grade Dysplasia and High Grade Dysplasia (of the Esophagus)):** 식도의 병리학적 컨디션. 일반적으로, 식도 이형성에서는 식도의 내부 라이닝(lining)에 정단 뮤신 (apical mucin)이 없다. 자주, 이형성 상피에서는 배상세포(goblet cell)가 없고 및 비-배상 원주 세포 (non-goblet columnar cell)에 뮤신(mucin)이 고갈 되어 있는 것이 보인다. 낮은 배율에서는, 이 부분들은 관련 되지 않은 부분에 비교하여 좀더 과다염색성 (hyperchromatic)인 것으로 나타난다.
- [0035] 고급 등급의 이형성에서, 식도의 선상 구조(glandular architecture)의 왜곡이 보통 나타나며 및 다음과 같이 표시 될 수 있다; 이는 소낭선(crypt)의 가지 및 결눈(lateral budding), 점막 표면의 융모모양 구조, 또는 상피세포의 선내 (intraglandular) 브리징으로 “등-에서-등” 선 (gland)의 체 모양 (cribriform) 패턴을 형성 하는 것으로 구성된다. 점막 표면에, 핵이 “둥글게 (round up)” 되고, 및 핵들 간에 서로의 일정한 관계가 없어진 것이 특징인, 핵의 양극성 (polarity)을 손실한 이형성 상피 (dysplastic epithelium)가 있다.
- [0036] **예방 또는 치료 (preventing or treating):** 질병의 역제는, 예를 들어, 염증이 원인이 된 것과 같이 질병의 위

힘이 있는 사람에서, 질병의 전개를 부분적으로 또는 전적으로 억제 하는 것을 의미한다. 식도 선암의 위험이 있는 사람의 한 예는 바렛씨 식도 또는 GERD를 가진 사람이다. 질병 과정을 억제 하는 것은 질병 전개를 예방 하는 것을 포함한다. “치료(treatment)”는 질병의 징후 또는 증상 또는, 질병이 전개 되기 시작한 이후와 같은, 병리적 컨디션을 완화 시키는 치료적 중재를 의미한다.

[0037] **전단응력 (쉬어 스트레스)(shear stress):** 재료의 횡단면과 동일 평면상의 스트레스 성분. 쉬어 스트레스는 횡단면과 평행한 힘의 벡터로부터 나온다. 평균 쉬어 스트레스를 계산하는 형식은 단위 면적 당 힘이다

$$\tau = \frac{F}{A},$$

[0038]

[0039] 상기 τ =쉬어 스트레스, F =적용된 힘, A =적용된 힘 벡터에 평행한 면적을 가진 재료의 횡단면.

[0040] **제약 (Stricture):** 삼키기 곤란함의 원인이 되는 식도가 좁아지거나 또는 조이는 것. 식도의 제약 증상들에는 속쓰림(heartburn), 입이 쓰거나 또는 신맛, 숨막힘(choking), 기침, 숨가쁨 (shortness of breath), 잦은 트림(burping) 또는 딱조질 (hiccups), 삼키기 통증 또는 곤란 (pain or trouble swallowing), 객혈 및/또는 체중 감소가 포함된다. 식도의 제약은 위식도 역류 질병 (gastroesophageal reflux disease), 식도염 (esophagitis), 식도 하부 괄약근의 기능저하 (dysfunctional lower esophageal sphincter), 운동 장애 (disordered motility), 가성소다 섭취 (lye ingestion), 또는 열공 탈장 (hiatal hernia)에 의해 원인이 될 수 있다. 제약은 식도 수술 및 레이저 치료 또는 광역학적 요법 (photodynamic therapy)과 같은 다른 치료 후에 형성 할 수 있다. 부위가 아무는 동안에, 흉터가 형성 되어, 조직을 당기고 조이게 되어, 삼키기 어렵게 한다. 제약은 염증의 결과 일 수 있다. 바륨 삼키기 검사 또는 상부 위장관 내시경이 식도 제약을 진단 하는데 사용 될 수 있다.

[0041] **강직성 (stiffness):** 물체 또는 액체의 경직성. 세포외 기질의 강직성은 강직성 구배 (durotaxis)에서 세포를 이동하게 가이드 하는데 매우 중요하다. 강직성은, 제곱 미터(square meter) 당 1 뉴턴 (newton) 인, 파스칼 (Pascal) (Pa) 로 측정 될 수 있다.

[0042] **치료제 (Therapeutic agent):** 일반적인 의미로 사용되며, 치료하는 제제, 예방적인 제제, 및 대체 제제를 포함 한다. “치료(treatment)” 또는 “치료하는 (treating)” 은, ECM 하이드로겔과 같은, 물질을 환자에게 어느 질병의 증상을 측정할 만큼 감소 시키고, 억제시키고, 또는 완화 시키고, 질병의 진전을 늦추거나, 또는 질병 퇴행의 원인이 되기에 충분한 양으로 제공함을 의미한다. 어떤 실시양태들에서는 질병의 치료는 환자가 질병의 증상을 나타내기 이전에 시작 할 수 있다. 공개 되는 방법들은 식도 염증을 억제하고 및/또는 식도 염증의 효과를 완화시킨다.

[0043] **치료적으로 효과적인 양 (Therapeutically effective amount):** ECM 하이드로겔과 같은, 조성물의 “치료적으로 효과적인 양” 은, 환자에게 투여 하였을 때, 증상의 완화, 감소 되는 진전의 감소, 또는 질병 퇴행을 하게 하는 것과 같은 치료 유익점을 제공하는 효과적인 양을 의미한다. 특별화된 ECM 하이드로겔의 양은 치료되는 대상에서, 염증의 억제 및/또는, 제약과 같은, 염증 효과의 완화와 같은 바람직한 효과를 달성 하기에 충분 하다. 치료적으로 효과적인 양은, 식도와 같은 것에, 전신적으로 또는 국부적으로 투여 될 수 있다. 추가로, ECM 하이드로겔의 효과적인 양은 일회 용법으로, 또는 시간에 걸쳐 몇몇의 용법으로 투여 될 수 있다. 그러나, 효과적인 양은 적용되는 제제, 치료 되는 대상, 고통의 심각성 및 타입, 및 화합물의 투여 방식에 의존 될 것이다. 여기서 공개되는 방법에 사용된 ECM 하이드로겔은 의학적 및 수의학적 환경에서 모두 적용된다. 그러므로, 일반적인 용어, “대상(subject)”, 또는 “환자(patient)” 는, 이것에만 국한하지 않으나, 인간 또는 다른 유인원, 개, 고양이, 말 및 소와 같은 수의학적 대상들을 포함하는 모든 동물을 포함하는 것으로 이해 된다.

[0044] 달리 설명 되지 않는 한, 여기서 사용된 모든 기술적인 및 과학적인 용어들은 이 공개가 속하는 분야의 통상 전문가들에 의해 보통 이해 되는 것과 같은 의미들을 가진다. “a,” “an,” 및 “the” 와 같은 단수 용어들에 는 문맥에서 달리 명확하게 제시하지 않는 한 복수 대상을 포함한다. 마찬가지로, “또는 (or)” 이란 단어도, 문맥에서 달리 명확하게 제시하지 않는 한, “및(and)” 을 포함 하려는 의도가 있다. 핵산 또는 폴리펩티드에 주어진, 모든 염기 크기 또는 아미노산 크기, 모든 분자량 또는 분자 질량 값은 대략적이며, 및 서술을 위해 제공 된다는 것이 더 이해 되어야 한다. 여기서 서술된 것과 비슷하거나 또는 동등한 방법들 또는 재료들이 실제로 및 본 공개를 테스트 하는데 사용 될 수 있다 하더라도, 적절한 방법들 및 재료들이 하기에 서술 된다. “포함된다(comprise)” 란 용어는 “포함하다(include)” 를 의미한다. “약 (about)” 이란 용어는 5 퍼센트 이내를 제시한다. 여기서 언급된 모든 논문들, 특허 출원서, 특허, 및 다른 참고물은 그 전문이 참고 문헌에 병

합 되고 있다. 분쟁이 있을 경우에는, 용어의 설명을 포함한, 본 명세서는, 조절 할 것이다. 추가로, 재료, 방법, 및 예시들은 실례일 뿐이며 및 제한 하려는 의도는 아니다.

[0045] 세포외 기질(ECM) 하이드로겔 ((Extracellular Matrix (ECM) Hydrogels))

[0046] ECM 하이드로겔을 제조 하는 방법들이, 예를 들어, U.S. 특허 No. 8,361,503에 공개 되어 있다. 여기서 공개 된 방법에 사용될 수 있는 하이드로겔을 생산하기 위하여 어떤 타입의 세포외 기질 조직도 사용 될 수 있다 (U.S. 특허Nos. 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; 및 ECM 관련된 6,893,666 참조). 어떤 실시 양태들에서, ECM은, 척추동물, 예를 들고 및 제한 없이, 척추동물, 제한적이지 않으면서, 인간, 원숭이, 말, 돼지, 소 및 양을 포함하는 온혈 포유류 척추 동물로부터 분리 될 수 있다. 특이적 비-제한적인 예시들에서, ECM은 돼지와 사람이다.

[0047] ECM 은 제한 없이, 방광, 장, 간, 식도 및 피부를 포함하는 어느 기관이나 조직으로부터 유래 될 수 있다. 한 실시양태에서, ECM은 방광에서 분리 되었다. 다른 실시양태에서, ECM은 식도로부터 분리 된다. ECM 은 ECM의 기저막 (basement membrane) 부분을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 어떤 실시양태들에서는, ECM은 적어도 기저막의 한 부분을 포함한다. 다른 실시양태들에서는, ECM 은 세포 배양으로부터 얻어진다. ECM 하이드로겔은 두 개 또는 그 이상의 조직 소스 (source)의 조합으로 생산될 수 있다.

[0048] U.S. 특허 No. 8,361,503 (참고문헌으로 여기에 병합 됨)에서 공개 된 대로, 돼지 방광 ECM과 같은, 방광 ECM 은 장막(tunica serosa) 및 근육층(tunica muscularis) 둘 다 포함 하는 바깥층(abluminal)을 제거 하기 위하여 방광 조직을 메스(scalpel) 손잡이 및 습윤된 거즈 (gauze)로 세로로 닦는 움직임을 사용하여 문질러서 제조 된다. 조직 조각을 뒤집은 다음, 장막의 루멘 부분은 똑같은 닦는 움직임을 사용하여 하부의 조직으로부터 얇은 조각으로 분리 된다. 어떤 실시양태들 에서는, 점막하층의 천공이 방지 된다. 이들 조직들이 제거 된 후, 결과로 얻어진 ECM은 주로 점막하층 (tunica sumucosa)으로 구성 된다. 세포가 제거된 피부 ECM 으로부터의 하이드로겔의 생산은, 여기서 참고문헌으로 병합된, 울프 등에 (Wolf et al., Biomaterials 33: 7028-7038, 2012) 공개 되고 있다. 식도 조직으로부터의 ECM 생산은, 예를 들어, 둘 다 여기서 참고문헌으로 병합 된, Badylak et al. J Pediatr Surg. 35(7):1097-103, 2000 및 Badylak et al., J Surg Res. 2005 September; 128(1):87-97, 2005에 공개 되어 있다. 여기서 참고문헌으로 병합 된, U.S. 특허 No. 6,893,666, 은 방광, 피부, 식도 및 소장 으로부터 ECM 생산을 공개 한다.

[0049] 상업적으로 구입할 수 있는ECM 제제들도 여기서 서술된 방법, 장치, 및 조성물에 또한 사용될 수 있다. 한 실시 양태에서, ECM은 소장 점막하층 또는 SIS로부터 유래된다. 상업적으로 구입가능 한 제제에는, 이것에만 국한하지 않으나, Surgisis™, Surgisis-ES™, Stratasys™, 및 Stratasys-ES™ (Cook Urological Inc.; Indianapolis, Ind.) 및GraftPatch™ (Organogenesis Inc.; Canton Mass.) 이 포함된다. 다른 실시양태에서는, ECM은 피부로부터 유래 된다. 상업적으로 구입가능 한 제제에는, 이것에만 국한하지 않으나, Pelvicol™ (유립에서는 Permacol™ 로서 팔린다; Bard, Covington, Ga.), Repliform™ (Microvasive; Boston, Mass.) 및 Alloderm™ (LifeCell; Branchburg, N.J.)이 포함된다. 다른 실시양태에서는, ECM은 방광으로부터 유래 된다. 상업적으로 구입가능 한 제제에는, 이것에만 국한하지 않으나 UBM (Acell Corporation; Jessup, Md.)이 포함된다.

[0050] ECM 제조를 위하여 사용되는 조직의 소스(source)는 많은 여러 방법으로 수확 할 수 있으며, 일단 수확되면, 수확된 조직의 여러 부분이 사용될 수 있다. ECM은 또한 식도 및 소장으로부터 제조 되었으며, 하이드로겔이 이 ECM으로 제조 되었으며, 예를 들어, 여기에 참고문헌으로 병합된, Keane et al., Tissue Eng. Part A, 21(17-18): 2293-2300, 2015, 참조. 식도 ECM은 외 근육층 (muscularis externa)으로부터 점막 및 점막하층을 기계적으로 분리하고 및 점막층을 트립신이 포함된 버퍼에서 소화시키고, 이어서 슈크로스 (sucrose), 트리톤-X100 (TRITON-X100®데옥시콜릭 에시드 (deoxycholic acid), 피아세틱에시드(peracetic acid) 및 DNase에 노출 시켜 제조 할 수 있다. 소장 점막하층 (small intestinal submucosa) (SIS) 은 온전한 소장으로부터 소장점막 (tunica mucosa), 장막(tunica serosa), 및 외 근육층(tunica muscularis externa)의 표면 층을 기계적으로 제거하고, 점막하층 (submucosa), 점막근관(muscularis mucosa) 및 기저 치밀층 (basilar stratum compactum) 은 온전하게 남겨 두면서 제조 될 수 있다. SIS 는 그 후 피아세틱 에시드 (peracetic acid) 로 처리 된다. 예시적인 프로토콜이 케인 등 (Keane et al.) 에 제공 된다.

[0051] 한 실시양태에서, ECM은 수확된 돼지 방광으로부터 분리 되어 방광 매트릭스 (urinary bladder matrix) (UBM)가

제조된다. 과량의 결합조직 및 잔뇨는 방광으로부터 제거 된다. 장막(tunica serosa), 외 근육층 (tunica muscularis externa), 점막하층(tunica submucosa) 및 대부분의 점막근관(muscularis mucosa)은 기계적인 마모 (mechanical abrasion) 또는 효소 처리, 수화작용(hydration) 및 마모의 조합으로 제거 될 수 있다. 이런 조직들의 기계적인 제거는 외층 ((특히 루멘의 평활 근육층 (abluminal smooth muscle layer)) 및 장막의 루멘 부분까지도 (상피 층) 세로로 닦는 움직임을 사용하여 마모로 달성 시킬 수 있다. 이런 조직들의 기계적인 제거는, 예를 들어, 에디슨-브라운 겸자 (Adson-Brown forceps) 및 멧젠바움 가위 (Metzenbaum scissors)로 및 메스 손잡이 (scalpel handle) 또는 습윤된 거즈로 감은 다른 거칠은 물체로 세로로 닦는 움직임을 사용하여 근육층(tunica muscularis) 및 점막하층(tunica submucosa)을 닦아 내어 조직 장간막 (mesenteric tissues)을 제거 시켜 달성 시킬 수 있다. 장막층의 상피 세포들은, 예를 들어 및 제한 없이, 고장액 생리식염수 (hypertonic saline)인, 탈-상피화 용액에 조직을 담가서 또한 분리 시킬 수 있다. 결과로 얻어진 UBM은 장막 (tunica mucosa) 및 인접한 고유층(tunica propria)의 기초막을 포함하며, 이는 더 나이가 피아세틱 에시드로 처리되며, 동결건조 되고 및 가루화 된다, U.S. 특허 No. 8,361,503 참조.

[0052] 어떤 실시 양태들에서, 상피세포들은, 예를 들어 및 제한 없이 1.0 N 식염수 (1.0 N saline)와 같은 고장 식염수 (hypertonic saline)의 탈-상피화 용액에 10 분에서 4 시간의 범위의 기간 동안 먼저 조직을 담가서 얇은 조각으로 분리 시킬 수 있다. 고장 식염수에 노출시켜 상피세포를 밑에 있는 기저막에서부터 효과적으로 제거 시킨다. 초기 얇은 조각으로의 분리 과정 후 남은 조직에는 상피 기저막 및 기저막에 외루멘(abluminal)인 조직 층들이 포함된다. 이 조직은 다음으로 더 나아가 상피 기저막이 아닌 외루멘 (abluminal) 조직의 대부분을 제거 하는 처리를 받게 된다. 기계적인 마모 또는 효소 처리, 수화작용(hydration) 및 마모의 조합으로 외부 장막 (outer serosal), 외막 (adventitial), 평활근 조직 (smooth muscle tissues), 점막하층(tunica submucosa) 및 대부분의 점막근관(muscularis mucosa)들이 나머지 탈-상피화 된 조직으로부터 제거 된다.

[0053] ECM 은, 이것에만 국한하지 않으나, 피아세틱 에시드 (peracetic acid) 에 노출, 낮은 용량의 감마선, 가스 플라즈마 멸균(gas plasma sterilization), 에틸렌옥사이드 (ethylene oxide) 처리, 초임계 CO₂ (supercritical CO₂), 또는 전자 빔 처리를 포함한 여러가지의 표준 기술로 멸균 시킬 수 있다. 좀더 전형적으로, ECM의 멸균은 0.1% (v/v) 피아세틱 에시드 (peracetic acid), 4% (v/v) 에탄올(ethanol), 및 95.9% (v/v) 멸균 수에 2 시간 동안 담가서 얻어진다. 피아세틱 에시드 잔여물은 PBS (pH=7.4) 로 10분 동안 두 번 및 멸균 물로 15 분 동안 두 번 세척하여 제거 된다. ECM 재료는 프로필렌 옥사이드(propylene oxide) 또는 에틸렌 옥사이드(ethylene oxide) 처리, 감마 방사선 처리 ((0.05 에서 4 mRad), 가스 플라즈마 멸균, 피아세틱 에시드 멸균, 초임계 CO₂, 또는 전자 빔 처리로 멸균 시킬 수 있다. ECM은, 단백질 재료를 크로스-링킹 하게 하는 글루타르알데하이드 (glutaraldehyde)로 처리 시켜 멸균 시킬 수도 있다, 그러나 이 처리는 재료를 상당히 변경시켜 이는 천천히 재 흡수 되거나 또는 전혀 재 흡수 되지 않게 하며 및 흉터 조직 형성과 좀더 가깝게 닮은 다른 타입의 숙주 리모델링 또는 구조상의 리모델링보다는 피막형성 (encapsulation) 을 조장한다. 단백질의 크로스-링킹은 또한 카보디이미드(carbodiimide)로 또는 디하이드로터말(dehydrothermal) 또는 광산화(photooxidation) 방법으로 유도 될 수 있다. U.S. 특허No. 8,361,503에서 공개 된 대로, ECM은 0.1% (v/v) 피아세틱 에시드 (peracetic acid) (a), 4% (v/v) 에탄올, 및 96% (v/v) 멸균수에 2 시간 동안 담가서 살균 시킬 수 있다. ECM 재료는 그 후 15 분 동안 PBS (pH=7.4)로 두 번 및 15 분 동안 디이온화 (deionized)된 물로 두 번 세척 시켰다.

[0054] 관심 있는 조직을 분리 한 후, 탈세포화는 여러 가지 방법들로, 예를 들어 및 제한 없이, 고장 식염수, 피아세틱 에시드, 트리톤-X (TRITON-X® 또는 다른 세제에 노출시켜, 수행 될 수 있다. 멸균과 탈세포화는 동시에 될 수 있다. 예를 들어 및 제한 없이, 상기 서술된, 피아세틱 에시드로의 멸균은 또한 ECM 의 탈세포화로도 역할 할 수 있다. 탈세포화 된 ECM은 그 후 동결건조 (냉동-건조) 또는 공기 건조로 건조 될 수 있다. 건조된 ECM은, 이것에만 국한하지 않으나, 찢기 (tearing), 빻기 (milling), 자르기 (cutting), 갈기(grinding) 및 깎기 (shearing)를 포함하는 방법들로 곱게 빻을 수 있다. 곱게 빻은 ECM은 또한 더 나아가, 예를 들어 및 제한 없이, 냉동 또는 동결-건조 상태에서 갈기(grinding) 또는 빻기 (milling)와 같은 방법들로, 분말 형태로 가공 될 수 있다. 용해성인ECM 조직을 제조 하기 위하여, 곱게 빻은 ECM은 산성 프로테아제로 산성 용액에서 소화시켜 소화된 용액을 형성 시킨다.

[0055] ECM 의 소화 용액은 전형적으로 실온에서 어느 양의 시간 동안 끊임없이 교반 시키면서 유지 된다. ECM 소화액은 곧바로 사용될 수 있거나, 또는 -20°C에서 저장 될 수 있거나, 또는, 예를 들어 및 제한 없이, -20°C 또는 -80°C 에서 냉동 시킬 수 있다.

- [0056] 일단 ECM 이 용해되면 (전형적으로 상당히 완전히) 용액의 pH는 7.2 및 7.7 사이로 올라가며, 및 한 실시양태에 따르면 pH 7.4로 올라간다. NaOH를 포함하는, 수산기 이온을 함유하는 염기와 같은, 염기들은 용액의 pH를 올리는데 사용될 수 있다. 마찬가지로, 예를 들어 및 제한 없이, 인산 버퍼화된 생리 식염수 (Phosphate Buffered Saline) (PBS)를 포함하는 등장 버퍼와 같은 버퍼들이 용액을 타겟 pH 로 가져오기 위해, 또는 겔의 pH 및 이온 강도를, 생리적 pH 및 이온 컨디션과 같은, 타겟 수준으로 유지시키는데 도와주기 위해 사용될 수 있다. 이는 “전-겔(pre-gel) 용액을 형성 한다. 중화된 소화 용액(전-겔)은 37°C 온도에 가깝게 되면 겔화 될 수 있으며, 여기서 온도는 생리적 온도에 도달 된다. 방법은 전형적으로 겔화 전에 투석 단계는 포함되지 않으며, 특정한 속도로 37°C 에서 전형적으로 겔이 되는 좀 더-완전한 ECM-유사 매트릭스가 만들어진다 (하기 참조).
- [0057] 그러므로, ECM 은 전형적으로, 제한적이지 않게, 방광, 식도, 또는 소장 중 하나로부터와 같이, 포유류 조직으로부터 유래 될 수 있다. ECM 하이드로겔은, 2, 3, 또는 4 조직 소스(tissue source)와 같은, 두 개 또는 그 이상의 조직 소스로부터 생산 될 수 있다. 한 비-제한적인 실시양태에서, ECM은 동결 건조 되고 및 급게 팽아진다. ECM 은 그 후 산성 용액에서 산성 프로테아제로 용해시켜, 식도 ECM 과 같은, 소화된 ECM을 생산한다. 산성 프로테아제는, 제한 없이, 펩신 또는 트립신 이거나, 또는 이들의 조합 일 수 있다. ECM 은 그 후, 약 pH 2 보다 크거나, 또는 pH 2와 4 사이, 예를 들어 0.01M HCl 용액과 같은, 프로테아제에 적절하거나 또는 최적인 산성 pH에서 용해화 될 수 있다. 용액은 전형적으로 조직 타입에 따라 (예를 들어, 하기 예시 참조), 섞으면서 ((교반(stirring), 휘젓기(agitation), 혼합(admixing), 혼합(blending), 회전(rotating), 기울이기(tilting), 등)) 약 12 내지 약 48 시간 동안 용해화 된다. ECM 하이드로겔은 다음에 의해 제조 된다 (i) 세포외 기질 (extracellular matrix) 급게 팽기, (ii) 완전한, 비-투석 또는 비-크로스-링킹 된 세포외 기질을 산성 용액에서 산성 프로테아제로 소화시켜 소화된 용액을 생산, (iii) 소화된 용액의 pH를 7.2에서 7.8 사이로 올려 중화된 소화액 ((전-겔 용액 (pre-gel solution)))을 생산 하고, 및 (iv) 관심 있는 대상의 식도 내에서 약 37°C 의 온도에서 용액을 겔화 시킨다.
- [0058] ECM 하이드로겔은, 약 37°C 의 온도에 노출 시켰을 때, 겔을 형성한다. “전-겔 (pre-gel)” 형태에 있는 ECM 하이드로겔은 냉동 시킬 수 있으며 및, 예를 들어 및 제한 없이, -20 °C 또는 -80 °C에 저장 시킬 수 있다. 전-겔 (pre-gel)” 형태에 있는 ECM 하이드로겔은, 25°C와 같은, 실온에 저장 시킬 수 있다. 그러므로, ECM 하이드로겔은, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, ° C와 같은 37°C 이하에서는 전-겔 형태로 있다. ECM 하이드로겔은 저장을 위해 냉동 시킬 수 있으며, 및 그러므로 0°C 이하에 저장 시킬 수 있다. 여기서 사용된 대로, “전-겔 형태(pre-gel form)” 또는 “전-겔 (pre-gel)” 이란 용어는 pH가 증가 되었으나, 겔이 안된 ECM 하이드로겔을 의미한다. 예를 들어 및 제한 없이, 전-겔 형태에 있는 ECM 하이드로겔은 pH 가 7.2 에서 7.8 사이를 가진다. ECM 하이드로겔은 식도 염증을 가진 대상에게 전-겔 형태로, 카테터 (catheter)를 통해 구강으로, 또는 내시경적으로 와 같이 전달 될 수 있다.
- [0059] 전-겔 형태에 있는 ECM 하이드로겔은 환자의 식도로 주입될 수 있다. 일단, 약 37°C 인, 식도로 주입되면, ECM 하이드로겔은 겔로 되고 및 식도를 코팅한다. 이론에 의해 결속 됨이 없이, ECM 하이드로겔은, 제한 적이지 않으나, 싸이토카인 과 같은, 많은 자연적 용해성 인자들을 포함한다. 식도와 같은, 여러 가지 다양한 조직으로부터 제조된 비-투석된(전체ECM) 제제의 특이적인 성질들이 여기에 공개 된다. 하이드로겔은 ECM 하이드로겔이 구강 투여, 내시경적 투여, 또는 카테터를 통해 식도로 투여 될 수 있는 그러한 키네틱스로 겔이 되며, 및 하이드로겔은 이어서 내부에서 겔화 되고 및 식도를 코팅한다.
- [0060] 어떤 실시양태에서, ECM 하이드로겔은 다음의 성질을 갖는다: a) 50% 겔화 되는 시간이 약 37°C의 온도에서 30 분 이내; b) 식도에 주입되기 적절한 흐름 점액도; 및 c) i) 약 10 에서 약 300 파스칼(Pascal)(Pa), ii) 약 10 에서 약 450 Pa; iii) 약 10 에서 약 600 Pa; iv) 약 5 에서 약 1000 Pa; v) 약 10 에서 약 1000 Pa, 또는 vi) 약 10 에서 약 70 Pa의 강직성 (stiffness).
- [0061] 실시양태들에서, ECM 하이드로겔은 다음의 성질을 갖는다: a) 50% 겔화 되는 시간이 약 37°C의 온도에서 30 분 이내; b) 식도에 주입되기 적절한 흐름 점액도; 및 c) 약 10 에서 약 300 파스칼(Pa)의 강직성. 다른 실시양태들에서, ECM 하이드로겔은 다음의 성질을 갖는다: a) 50% 겔화 되는 시간이 약 37°C의 온도에서 30 분 이내; b) 식도에 주입되기 적절한 흐름 점액도; 및 c) 약 10 에서 약 450 파스칼(Pa)의 강직성. 다른 실시양태들에서,

ECM 하이드로겔은 다음의 성질을 갖는다: a) 50% 겔화 되는 시간이 약 37°C의 온도에서 30 분 이내; b) 식도에 주입되기 적절한 흐름 점액도; 및 c) 약 10 에서 약 600 파스칼(Pa)의 강직성.

[0062] 다른 실시양태들에서, ECM 하이드로겔은 다음의 성질을 갖는다: a) 50% 겔화 되는 시간이 약 37°C의 온도에서 30 분 이내; b) 식도에 주입되기 적절한 흐름 점액도; 및 c) 약 5 에서 약 1000 파스칼(Pa)의 강직성. 다른 실시양태들에서, ECM 하이드로겔은 다음의 성질을 갖는다: a) 50% 겔화 되는 시간이 약 37°C의 온도에서 30 분 이내; b) 식도에 주입되기 적절한 흐름 점액도; 및 c) 약 10 에서 약 1000 파스칼(Pa)의 강직성. 다른 실시양태들에서, ECM 하이드로겔은 다음의 성질을 갖는다: a) 50% 겔화 되는 시간이 약 37°C의 온도에서 30 분 이내; b) 식도에 주입되기 적절한 흐름 점액도; 및 c) 10-70파스칼(Pa)의 강직성.

[0063] 제한적이지 않은 특별한 실시예시에서, ECM 하이드로겔은 식도 하이드로 겔이다. 다른 제한적이지 않은 특별한 실시예시에서, ECM 하이드로겔은 두 개 또는 그 이상의 조직 소스 (tissue source)로부터 생산 될 수 있다. 더 나아가 제한적이지 않은 실시예시에서, ECM 하이드로겔은 방광 또는 소장(small intestine)으로부터 생산될 수 있다.

[0064] 추가적인 제한적이지 않은 특별한 실시예시에서, ECM 하이드로겔은 다음에 의해 생산 될 수 있다: (a) 산성 용액에서 산성 프로테아제로 조직을 소화시켜 세포로 되어 있지 않은 세포의 기질을 용해화 시켜 소화된 식도 ECM을 생산하고; (b) 소화된 용액의 pH를 7.2에서 7.8 사이로 올려 중화된 소화 용액을 생산하고; (c) 소화된 ECM을 약 8mg/ml 에서 약 12 mg/ml 과 같은, 약 2 mg/ml 에서 약 16 mg/ml 농도의 ECM 하이드로겔로 회석한다. 이 하이드로겔은 그 후 대상의 식도로 주입되며, 거기서 이는 겔화 된다. ECM은 식도 ECM일 수 있다.

[0065] 여기서 공개되는 방법들에서 사용된 ECM 하이드로겔들은 50% 겔화 시간이 약 37°C의 온도에서, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 1, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 분 이내와 같이, 30 분 이내의 시간을 가진다. 어떤 실시양태들에서, ECM 하이드로겔들은 약 37°C의 온도에서 10분 이내의 겔화 시간을 가진다. 다른 실시양태들에서, 50% 겔화 시간이 약 37°C의 온도에서 약 3 내지 약30분이다. 더 나아가 실시양태들에서, 50% 겔화 시간이 약 37°C의 온도에서 약 4내지 약 10분이다. 또 다른 실시양태들에서, 50% 겔화 시간이 약 37°C의 온도에서 약 5 내지 약10분 또는 약 10 분 내지 약 20 분 이다.

[0066] 공개 되는 ECM 하이드로겔들은 식도에 주입 되기 적절한 흐름 점성도를 가질 수 있다. 어떤 실시 양태에서, ECM 하이드로겔은 쉬어 속도 (shear rate) 0.2/s 에서 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 또는 90 Pa*s 와 같이 쉬어 속도 (shear rate) 0.2/s 에서 약 10 내지 약 100 Pa*s까지의 흐름 점성도를 가진다. 더 나아가 실시 양태에서, ECM 하이드로겔은 쉬어 속도 (shear rate) 0.1/s 에서 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 또는40 Pa*s와 같이, 쉬어 속도 (shear rate) 0.1/s 에서 약 1 내지 약 40 Pa*s까지의 흐름 점성도를 가진다.

[0067] 다른 실시 양태들에서, ECM 하이드로겔은 쉬어 속도 (sheer rate) 1000/s에서 약 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.10, 0.11, 0.12, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.17, 0.19 또는 0.2와 같은, 쉬어 속도(sheer rate) 1000/s에서 약 0.01 내지 약 0.20 Pa*s까지의, 또는 쉬어 속도 (sheer rate) 1000/s에서 약 0.01 내지 약 0.10 Pa*s까지의 흐름 점성도를 가진다.

[0068] 더 실시양태에서, ECM 하이드로겔은 약0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 또는 0.08 Pa*s 와 같은, 100/s 쉬어 속도에서 약0.02 내지 약 0.8 Pa*s까지, 또는100/s 쉬어 속도에서 약 0.1 내지 약0.8 Pa*s 까지를 갖는다.

[0069] 더 나아가 실시양태들에서, ECM 하이드로겔은 쉬어 속도 0.2/s에서 약 10 내지 약 100 Pa*s까지의 흐름 점성도를 가지며 및 쉬어 속도 1000/s에서 약 0.01 내지 약 0.10 Pa*s까지의 흐름 점성도를 가진다. 더 실시양태들에서, ECM 하이드로겔은 쉬어 속도 0.1/s에서 1 내지 40 Pa*s까지의 흐름 점성도를 가지며 및 쉬어 속도 1000/s에서 0.01 내지 약 0.2 Pa*s까지의 흐름 점성도를 가진다.

[0070] 다른 실시양태들에서, ECM 하이드로겔은 쉬어 속도 1s 에서 1에서 약 30 Pa*s까지 또는 1에서 약 20 Pa*s 까지, 또는 1 에서 약10 Pa*s 까지 와 같은, 쉬어 속도 1/s 에서 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9 Pa*s 와 같은, 약 1 내지 약 40 Pa*s까지의 흐름 점성도를 갖는다. 쉬어 속도는, 예를 들어, 쉬어 속도 1/s에서10, 20, 30 또는 40 Pa*s이 될 수 있다. 다른 실시예시들에서, ECM 하이드로겔은 쉬어 속도 100/s 에서 약 0.05, 0.06,

0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.15 또는 0.2와 같은, 쉬어 속도 100/s 에서 약 0.05 에서 약 0.20까지의 흐름 점성도를 갖는다. 흐름 점성도는 쉬어 속도 1/s 에서 약 0.1 에서 약 25 Pa*s까지, 및 쉬어 속도 100/s 에서 약 0.02 에서 약 0.8 Pa*s까지이다. 추가의 실시 양태들에서, 흐름 점성도는 쉬어 속도 1/s 에서 약 1에서 약 10 Pa*s까지, 및 쉬어 속도 100/s 에서 약 0.05 에서 0.20까지 이다.

[0071] 더 나아간 실시양태들에서, ECM 하이드로겔은 쉬어 속도 0.2/s 에서 약 10 에서 약 100 Pa*s까지의 흐름 점성도를 갖는다. 다른 실시양태들에서, ECM 하이드로겔은 쉬어 속도 1000/s 에서 약 0.01 에서 약 0.10 Pa*s까지의 흐름 점성도를 갖는다. 다른 실시양태들에서, ECM 하이드로겔은 쉬어 속도 0.1/s 에서 약 1 에서 약 40 Pa*s까지 및 쉬어 속도 1000/s 에서 약 0.01 에서 약 0.2Pa*s까지 흐름 점성도를 갖는다

[0072] 공개되는 ECM 하이드로겔은 i) 약 10 에서 300 파스칼(Pa), ii) 약 10 에서 600 파스칼(Pa), iii) 약 5 에서 약 1000 Pa, iv) 약 10에서 1000 Pa, 또는 v) 약 10 에서 약 70 Pa의 강직성을 가진다. ECM 하이드로겔은, 약 10에서 약 70 Pa까지, 약 10에서 약 100 파스칼(Pa)까지, 또는 약 10 에서 약 150 Pa까지, 약 10에서 200 Pa까지, 또는 약 10 에서 약 250 파스칼(Pa)까지와 같이, 약 10 에서 약 300 파스칼(Pa)까지의 강직성을 가질 수 있다. 어떤 실시양태들에서, 공개 되는 ECM 하이드로겔은 약 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 또는 70 Pa의 강직성을 갖는다. 다른 실시양태들에서, 공개되는 ECM 하이드로겔은 약 10 에서 약 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 또는 300 Pa까지의 강직성을 가진다. 더 나아간 실시양태들에서, 공개되는 ECM 하이드로겔은 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 또는 300Pa의 강직성을 가질 수 있다.

[0073] 어떤 실시양태들에서, 하이드로겔에서 ECM 농도는, 약 8 mg/ml 에서 약 12 mg/ml 또는 약 2 mg/ml 에서 약 16 mg/ml 과 같이, 약 2 mg/ml 에서 약 20 mg/ml 까지다. 다른 실시양태들에서, 하이드로겔에서 ECM 농도는 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16 mg/ml 이다. 사용되는 예시적인 농도들에는, 이것에만 국한 하지 않으나, 약 9 mg/ml에서 약 11 mg/ml까지, 및 약 10 mg 에서 약 12 mg/ml 까지 가 포함된다. 추가의 예시적인 농도에는 약 8 mg/ml 에서 10 mg/ml까지, 약 8 mg/ml 에서 약 11 mg/ml까지, 약 8 mg/ml 에서 약 13 mg/ml까지, 약 8 mg/ml 에서 약 14 mg/ml까지, 약 8 mg/ml 에서 약 15 mg/ml 까지, 및 약 8 mg/ml 에서 16 mg/ml 까지 가 포함된다. 더 나아간 사용되는 예시적인 농도에는 또한 약 6 mg/ml 에서 약 12 mg/ml, 약 13 mg/ml, 약 14 mg/ml, 약 15 mg/ml 또는 약 16 mg/ml까지 포함된다.

[0074] 공개되는 ECM 하이드로겔은 키트(kit)의 성분으로서 제공될 수 있다. ECM 하이드로겔은 냉동 또는 동결 건조 형태로 제공 될 수 있다. 어떤 실시양태들에서, 키트는, 동결 형태에 있는 것과 같은, 하이드로겔을 포함하는 한 용기(container), 동결된 하이드로겔을 용해시키는 용액을 포함하는 한 용기, 및 선택적으로 용해시킨 형태를 중화시키는 용액을 포함하는 한 용기와 같은, 하이드로겔을 형성하는데 필요한 성분들을 포함 할 수 있다. 다른 실시양태들에서, 키트는 용해시킨 하이드로겔을 포함하는 한 용기, 및 중화제를 포함하는 두 번째 용기를 포함 할 수 있다.

[0075] 선택적으로, 그러한 키트는 포장, 설명서 및 버퍼, 기질, 또는 다른 치료 성분들과 같은 여러 다른 시약들을 포함하는 추가의 성분들을 포함한다. 키트는 용기 및 라벨 또는 용기에 또는 용기와 연관된 포장 삽입물을 포함할 수 있다. 적절한 용기에는, 예를 들어 병, 바이알, 주사기, 등을 포함한다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 여러 다양한 재료로부터 형성 될 수 있다. 용기는 전형적으로, 한 대상에서 식도 염증을 억제 및/또는 식도 염증 효과를 완화 시키는데 효과적인, 냉동 또는 동결 건조 형태와 같은, ECM 하이드로겔을 포함하는 조성물을 가지고 있다. 몇몇의 실시양태들에서, 용기는 멸균 접근 포트(access sport) (예를 들어 용기는 피하주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 가진 정맥주사 용액 가방 또는 바이알 일 수 있다)를 가질 수 있다. 라벨 또는 포장 삽입물은 이 조성물이 바렛씨 식도와 같은, 특별한 컨디션을 치료하는데 사용됨을 제시한다.

[0076] 라벨 또는 포장 삽입물은 전형적으로 더 나아가 사용에 대한 설명서를 포함 할 것이다. 포장 삽입물은 증상, 사용법, 용법, 투여, 사용금지 사유, 및/또는 그러한 치료적 생산품을 사용 하는데 관한 주의점에 대한 정보를 포함하는 치료적인 생산품의 상업적인 포장에 의례적으로 포함되는 설명서를 전형적으로 포함한다. 설명서 자료들은 전자 형태(컴퓨터 디스켓 또는 콤팩트 디스크와 같은)의 필기로 또는 시각적(비디오 파일과 같은)일 수 있다. 키트는 또한 키트가 디자인 된 특별한 적용을 촉진 시키기 위하여, 주사 바늘 또는 카테터(catheters)와 같은, 추가의 성분을 포함할 수 있다. 키트는 추가로 특정한 방법을 실행하는데 일상적으로 사용되는 버퍼 및 다른 제제들을 포함할 수 있다. 키트 및 적절한 내용물들은 이 분야 전문가들에게는 잘 알려져 있다.

[0077] 치료 방법(Methods of Treatment)

- [0078] 식도 염증을 치료하는 방법들이 여기서 공개 된다. 식도의 제약 (stricture)을 감소시키기 위한 방법들이 또한 공개된다. 이론에 역매임이 없이, ECM 하이드로겔은 초기 단계의 종양성(neoplastic) 식도 질환 및 이형성 (dysplastic) 식도 질환을 치료 하게 한다. 공개 되는 하이드로겔은 전-종양(pre-neoplastic) 및 종양성 (neoplastic) 식도 질환 둘 다를 치료하는데 사용될 수 있다. 공개 되는 하이드로겔들의 다양성은 이들을 식도 화상, 궤양 및 식도의 여러 곳, 비-연결된 부분을 통해 펼쳐 있을 수 있는 병리적 증상을 치료 하는데 사용 될 수 있게 한다. 공개 되는 하이드로겔들은 스텐트(stent) 또는 외과적인 기술의 사용의 필요 없이 긴 부분 또는 흩어져 있는 식도 손상 부분의 치료에 또한 유용하다. 이러한 컨디션에서 쉬트 형태의 ECM을 사용하는 것은 가능하지 않다, 왜냐하면 식도의 표면을 통해 다수의 스텐트 및 ECM 쉬트가 요구되기 때문이다. 더욱이, ECM의 쉬트 및 하이드로겔 형태는 활성 성분의 관점에서 주된 차이를 가지고 있다. 공개되는 하이드로겔의 어느 것이나 이런 치료 방법에 유용하다. 숙련된 의사와 같은, 이 분야 전문가 중 하나는 치료 효율을 바로 동정 할 수 있다.
- [0079] 그러므로, 식도 염증을 가진 대상이 선택 될 수 있다. 식도의 제약 (stricture)을 갖고 있거나 갖을 위험이 있는 대상이 선택 될 수 있다.
- [0080] 어떤 실시예시들에서, 대상은 분명히 식도 선암 (esophageal adenocarcinoma) (EAC) (예를 들어, EAC를 가지고 있지 않고, 및/또는 전에 위식도 역류 질환 (gastroesophageal reflux disease) (GERD) 또는 바렛씨 식도를 갖지 않은)의 증상을 보이지 않는 대상과 같이, 건강하지만, 그러나 식도 염증을 가지고 있다. 어떤 예시에서, 건강한 대상은 의학적 전문가에 의해 조사 될 때 건강하고 GERD와 같은 증상들이 없는 것으로 규정된 그런 사람이다. 그러나, 대상은 예를 들어 내시경 투여에 의해 측정될 때는 식도 염증을 가지고 있다. 어떤 실시예시에서, 이 공개 된 방법들은 이 염증을 억제 한다.
- [0081] 다른 실시예시들에서, 그 대상은 GERD 및/또는 바렛씨 식도를 가진다. 특별한 비-제한적인 예시에서는, 그 대상은 위식도의 불편함을 억제 시키기 위해 양성자 펌프 억제제 또는 히스타민 길항제 와 같은 산 감소(acid reducing) 약물을 사용 할 수 있다. 그 대상은 담배 피우기 및/또는 알코올 사용 때문에 위험도가 증가 될 수 있다. 그 대상은 낮은-등급의 이형성 또는 높은-등급의 식도 이형성을 가질 수 있다. 어떤 실시예시들에서, 그 대상은 식도 선암을 가지고 있지 않다. 그러나, 그 대상은 식도 선암의 위험성이 있을 수 있다.
- [0082] 어떤 실시예시들에서, 이 방법은 대상에서 식도 종양의 전개를 억제 또는 뒤집을 수 있다. 다른 실시예시들에서, 이 방법은 대상의 식도에서 상피층 장막을 회복시킨다. 더 나아간 실시예시들에서, 이 방법은 대상의 식도에서 상처 부위로의 상피 세포 및/또는 줄기 세포 둘 다의 화학친화성(chemotaxis)을 증가 시킨다. 더 나아간 실시예시들에서, 이 방법은 식도 선암의 전개를 억제 한다. 다른 실시예시들에서, 치료는 대상에게 양성자 펌프 억제제 또는 히스타민 길항제 약물들의 사용을 감소 시키거나 피하게 한다. 그러나, 공개 되는 방법들은 양성자 펌프 억제제 또는 히스타민 길항제 약물들과 연관되어 사용될 수 있다.
- [0083] 더 나아간 실시예시들에서, ECM 하이드로겔로 처치 하지 않은 것과 같은 대조군에 비교하여 치료는 제약을 감소 시킨다. 치료는 ECM 하이드로겔로 처치하지 않은 것과 같은 대조군에 비교하여, 식도의 둘레를 증가 시킨다.
- [0084] ECM 하이드로겔은, 여기서 공개된 대로, 실온 또는 그 이하의 온도 (예를 들어, 약 25°C)와 같은, 겔화 되는 온도에 또는 그 이하의 온도에서 유지된다. ECM 하이드로겔은, 투여 되기 전에, 예를 들어, 25°C 또는 4°C에서 유지 될 수 있다. 효과적인 양의 ECM 하이드로겔은, 전-겔 형태에서, 그 후 대상의 식도에 투여 된다. ECM 하이드로겔은 구강으로 투여 될 수 있어, 하이드로겔이 대상에 의해 삼켜지고 식도에 전달될 때 겔화 된다. ECM 하이드로겔은 카테터나 또는 내시경적 투여를 사용하여, 식도에 직접 투여 될 수 있다. ECM 하이드로겔은, 대략 37°C의 온도인, 대상의 식도에서 겔화 된다. 어떤 실시예시들에서는, 약 10ml에서 약 30 ml까지의 ECM 하이드로겔과 같이, 약 10, 15, 20, 25 또는 30 ml 의 ECM 하이드로겔과 같이, 약 5 에서 약 60 ml까지의 ECM 하이드로겔이 대상에게 투여 된다. ECM 하이드로겔은 동결 건조 되거나 또는 냉동된 형태에서 제공 될 수 있으며, 및 대상에게 투여하기 바로 전에 재구성 될 수 있다.
- [0085] 공개되는 방법들에는, 이것에 국한 하지 않으나, 식도 염증을 가진 대상, 또는 제약을 갖고 있거나 또는 제약의 위험이 있는 대상과 같은 대상의 식도에, 여기서 공개 된 대로 치료적으로 효과 있는 양의 ECM 하이드로겔을, 전-겔 형태로 투여하여, 하이드로 겔이 대상의 식도에서 겔화 되도록 하는 것을 포함한다. 어떤 실시예시들에서는, ECM 하이드로겔은 a) 50%겔화 되는 시간이 약 37°C의 온도에서 30 분 이내, b) 식도에 유입 되기에 적절한 흐름 점성도; 및 c) 10-70 파스칼 (Pa)의 강직성 이다. 그러나, 상기 공개된 어느 하이드로겔도 사

용될 수 있다. ECM 하이드로겔은, 어떤 실시양태들에서, 이것에만 국한 하지 않으나 돼지 또는 인간 조직과 같은 어느 포유류 조직에서든 유래 할 수 있으며, 및 어느 비-제한적인 예시들에서, 방광, 소장, 또는 식도이다. 상기 공개된 어느 하이드로겔도 식도 염증의 치료를 위해 및/또는 대상의 식도에서 상피층 장막을 회복시키기 위해 사용될 수 있다. 상기 공개 된 어느 하이드로겔도 식도 또한 제약 (stricture)를 치료 하기 위해 사용될 수 있다. 어떤 실시양태들에서, 표면에 국부적인 전달은 원하지 않는 어느 부작용을 피한다. 특별한 비-제한적인 예시에서, 대상은 바렛씨 식도를 가지거나, 또는 바렛씨 식도를 가질 위험성이 있다.

[0086] 공개되는 하이드로겔들은 전-겔 형태로 식도의 점막에 국부적으로 투여 될 수 있다. 하이드로겔은 비-외과적 적용 방법을 사용하여 표면을 코팅하기 위해 식도의 루멘에 투여 될 수 있다. 어떤 실시예시들에서, 적용은 전-겔 형태에서 하이드로겔을 삼키는 것과 같은 구강으로 이다. 다른 실시예시들에서, 적용은 위관 영양(gavage)일 수 있으며, 여기서 전-겔 형태의 하이드로겔이 원하는 부위에 놓여 질 수 있다. 어느 실시양태들에서, 하이드로겔은 점막을 코팅하며, 및 하부의 점막하층 또는 근육계로 침투 하지 않는다

[0087] 이 분야 전문가 중 하나는 하이드로겔을 바로 제조 할 수 있어, 전-겔 형태는 치료 될 대상에 의해 삼켜 질 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 하이드로겔은, 특별히 치료를 필요로 하는 식도의 부위로, 의약품이 국부적으로 전달되는 것을, 확실히 하기 위하여 내시경을 통하여 전-겔 형태로 제공된다. 예를 들어, 하이드로겔의 국부 전달은 내시경/위내시경을 통해 할 수 있다. 일반적으로, 전달은 하이드로겔의 전-겔 형태의 비-외과적인 전달을 위해, 전달은 식도 점막에 국부적 이다. 하이드로겔은 표면에서 겔화 되며 및 점막의 원하는 부위에 코팅 된다. 어떤 실시양태들에서, ECM 하이드로겔은 겔화 되며 및 점막을 보호하기 위하여 보호적 장막을 제공한다.

[0088] 어떤 실시양태들에서, 식도위장관내시경(esophagogastroduodenoscopy) (EGD) 또는 상부 위장내시경은 관심 있는 대상을 위해 수행 될 수 있다. 이 과정들은 관심 있는 대상을 선택하고, 하이드로겔의 적용 전에 수행 될 수 있다. 이 과정들은 또한 공개되는 방법들의 사용 다음에, 그 대상에서 효과를 평가 하고, 및 추가의 적용이 필요 한지를 결정하기 위하여, 수행 될 수 있다.

[0089] 예시적인 실시양태들 (Exemplary Embodiments)

[0090] 조항 1. 한 대상에서 식도 염증을 억제하거나 또는 식도 제약 (stricture)을 감소시키기 위한 한 방법으로, 식도 염증이 있는 대상의 식도에 치료적으로 효과 있는 양의 세포외 기질 하이드로겔 (extracellular matrix (ECM) hydrogel) 투여를 포함하며, 여기서 ECM 하이드로겔은 다음의 특징들을 가진다: a) 50% 겔화 되는 시간이 약 37°C의 온도에서 30 분 이내; b) 식도에 주입되기 적절한 흐름 점액도; 및 c) i) 약10 에서 약 300 파스칼 (Pascal)(Pa), ii) 약 10 에서 약 450 Pa; iii) 약 10 에서 약 600 Pa; iv) 약 5 에서 약 1000 Pa; v) 약 10 에서 약 1000 Pa, 또는 vi) 약 10 에서 약 70 Pa까지의 강직성 (stiffness), 그럼으로써 대상에서 식도 염증을 억제하거나 또는 식도 제약(stricture)를 감소시킨다.

[0091] 조항 2. 조항 1 의 방법에 있어서, 여기서 50 % 겔화 시간이 37°C에서 약 3 에서 약 30분까지이다.

[0092] 조항 3. 조항 1 의 방법에 있어서, 여기서 50 % 겔화 시간이 37°C에서 약 3 에서 약 10분 까지이다.

[0093] 조항 4. 조항 2의 방법에 있어서, 여기서 50 % 겔화 시간이 약 4 에서 약 10분까지이다.

[0094] 조항 5. 조항 1-4 중 어느 하나의 방법에 있어서, 여기서 쉬어 속도 (sheer rate) 약 0.1/s 에서 흐름 점성도가 약 1 에서 약40 Pa*s까지 및 쉬어 속도 (sheer rate) 1000/s 에서 흐름 점성도가 약0.01 에서 약 0.2 Pa*s까지 이다.

[0095] 조항 6. 조항 1-4 중 어느 하나의 방법에 있어서, 여기서 쉬어 속도 1/s 에서 흐름 점성도가 약 0.1에서 약 25 Pa*s까지, 및 쉬어 속도 약 100/s 에서 약 0.02에서 약 0.8 Pa*s 까지이다.

[0096] 조항 7. 조항 1-6 중 어느 하나의 방법에 있어서, 여기서 ECM 하이드로겔은 강직성 10-70 Pa 를 가진다.

[0097] 조항 8. 조항 1-7 중 어느 하나의 방법에 있어서, 여기서 ECM 하이드로겔은 식도 ECM 하이드로겔 이다.

[0098] 조항 9. 조항 1-8 중 어느 하나의 방법에 있어서, 여기서 하이드로겔에서 ECM 농도는 2 mg/ml 에서 16mg/ml이다.

[0099] 조항 10. 조항 1-9 중 어느 하나의 방법에 있어서, 여기서ECM 하이드로겔은 구강으로, 내시경적으로 또는 카테터를 통해 투여 된다.

- [0100] 조항 11. 조항 1-10 중 어느 하나의 방법에 있어서, 여기서ECM 하이드로겔은 (a) 산성 용액에서 산성 프로테아제로 조직을 소화시켜 세포로 되어 있지 않은 세포의 기질을 용해화 시켜 소화된 식도 ECM을 생산하고; 및 (b) 소화된 용액의 pH를 7.2에서 7.8 사이로 올려 중화된 소화 용액을 생산하여 생산 한다.
- [0101] 조항 12. 조항 11의 방법에 있어서, 여기서 (b) 소화된 ECM의 pH를 올리는 것은 염기 또는 등장 버퍼를 첨가시켜 소화된 ECM의 pH를 올리는 것을 포함한다.
- [0102] 조항 13. 조항 10 또는 조항 11의 방법에 있어서, 여기서 산성 프로테아제는 펩신, 트립신 또는 이들의 조합이다.
- [0103] 조항 14. 조항 1-13의 어느 한 항의 방법에 있어서, 여기서 ECM 하이드로겔은 대상에게 투여 되기 전에 25°C 이하에서 유지된다.
- [0104] 조항 15. 조항 1-14의 어느 한 항의 방법에 있어서, 여기서 대상은 바렛씨 식도를 가지거나 또는 바렛씨 식도의 위험성이 있다.
- [0105] 조항 16. 조항 15의 방법에 있어서, 여기서 이 방법은 대상에서 식도 종양의 전개를 억제 한다.
- [0106] 조항 17. 조항 1-16의 어느 한 항의 방법에 있어서, 여기서 ECM 하이드로겔은 대상의 식도에서 상피층 장막(epithelial barrier)을 회복시킨다.
- [0107] 조항 18. 조항 1-17의 어느 한 항의 방법에 있어서, 여기서 ECM 하이드로겔은 대상의 식도에 있는 손상 부위로의 상피 세포 및/또는 줄기 세포 둘 다의 화학친화성(chemotaxis)을 증가 시킨다.
- [0108] 조항 19. 조항 1-18의 어느 한 항의 방법에 있어서, 여기서 ECM 하이드로겔은 대상에서 식도 제약을 감소시킨다
- [0109] 조항 20. 세포의 기질 하이드로겔((extracellular matrix (ECM) hydrogel))을 포함하는 조성물로서, 여기서 ECM 하이드로겔은 다음의 특징을 가진다: a) 50% 겔화 되는 시간 이 약 37°C에서 10분 이내; b) 식도로 주사 되기 충분한 흐름 점액도; 및 i) 약 10 에서 약 300 파스칼(Pascal)(Pa), ii) 약 10 에서 약 450 Pa; iii) 약 10 에서 약 600 Pa; iv) 약 5 에서 약 1000 Pa; v) 약 10 에서 약 1000 Pa, 또는 vi) 약 10 에서 약 70 Pa까지의 강직성(stiffness), 및 여기서 조성물은 식도로 투여를 위해 제제화 된다.
- [0110] 조항 21. 조항 20의 조성물에 있어서, 여기서 50% 겔화 시간은 약 37°C 에서a) 약 3 에서 30 분; b) 약 4 에서 10 분; 또는 c) 약 3 에서 약 10분 이다.
- [0111] 조항 22. 조항 20 또는 조항 21의 조성물에 있어서, 여기서 하이드로겔은 약 10 에서 70 Pa의 강직성을 가진다.
- [0112] 조항 23. 조항 20-22의 어느 한 항의 조성물에 있어서, 약 2 mg/ml 에서 약 16mg/ml의 ECM 하이드로겔을 포함한다.
- [0113] 조항 24. 조항 21-23의 어느 한 항의 조성물에 있어서, 여기서 ECM 하이드로겔은: (a) 식도 조직을 산성 용액에서 산성 프로테아제로 소화시켜 세포로 되어 있지 않은 세포의 기질을 용해화 시켜 소화된 식도 ECM을 생산하고; (b) 소화된 용액의 pH를 7.2에서 7.8 사이로 올려 중화된 소화 용액을 생산하고; 및(c) 소화된 식도 ECM을 약 8mg/ml 에서 약 12 mg/ml 농도의 ECM 하이드로겔로 회석 하여, 생산된다.
- [0114] 조항 25. 조항 24의 조성물에 있어서, 여기서 (b) 소화된 ECM의pH 를 상승시키는 것은 염기 또는 등장 버퍼를 첨가시켜 소화된 식도 ECM의 pH를 올리는 것을 포함한다.
- [0115] 조항 26. 조항 24 또는 조항 25의 조성물에 있어서, 여기서 산성 프로테아제는 펩신, 트립신, 또는 이들의 조합이다.
- [0116] 조항 27. 조항 20-26의 어느 한 항의 조성물에 있어서, 여기서 ECM 하이드로겔은 25°C에서 또는 그 이하에서 유지 시킨다.
- [0117] 조항 28. 조항 20-27의 어느 한 항의 조성물에 있어서, 대상의 식도 염증을 억제하는 용도 이다.
- [0118] 조항 29. 조항 20-27의 어느 한 항의 조성물에 있어서, 대상의 식도에 상피층 장막을 회복시키는 용도 이다.
- [0119] 조항 30. 조항 28 또는 조항 29의 조성물에 있어서, 여기서 대상은 바렛씨 식도를 가진다.

- [0120] 조항 31. 조항 20-27의 어느 한 항의 조성물에 있어서, 대상에서 식도 제약(stricture)을 감소시키기 위함이다.
- [0121] 조항 32. a) 용기, 여기서 용기는 조항 20-31중 어느 하나의 조성물, 또는 이들의 동결건조 형태를 포함하는 용기, 및 b) 조성물을 사용하는 설명서를 포함 하는 키트.
- [0122] 조항 33. 조항 1-19의 방법 중 어느 하나에서 사용을 위한 조성물.
- [0123] 이 공개는 다음의 비-제한적인 실시예시들로서 분명히 보여준다.

[0124]

[0125] **실시예시들 (EXAMPLES)**

[0126] 점막 염증, 또는 점막염(mucositis)은 위장 관 (gastrointestinal tract)의 점막 내벽(라이닝)이 붓고, 가렵고, 및 불편한 염증적 컨디션이다. 점막염(mucositis)은 부식 및 궤양의 결과가 될 수 있으며, 이는 위장관의 전체에 나타날 수 있다. 자주 감염 및/또는 궤양이 관여되는, 점막 내벽의 염증으로서, 점막염은 심각하고 및 때로는 고통스러운 컨디션이다. 세포외 기질 (ECM) 하이드로겔은, 식도 감염과 같은 점막 감염을 치료하는 잠재적인 치료제인 것으로 여기서 공개 된다. ECM 하이드로겔은 점막에 계속적인 인설트 (insult)로부터 보호적인 장벽을 제공 할 수 있으며, 항-염증 환경을 촉진시키고, 및/또는 손상 되고 및 염증이 생긴 점막의 수선을 촉진 시킬 수 있다.

[0127] **실시예시 1 (Example 1)**

[0128] **하이드로겔의 점탄성 성질 (Viscoelastic Properties of Hydrogels)**

[0129] 상동 식도 ECM(eECM) 하이드로겔에 대한 한 범위의 ECM농도 (4-16 mg/ml) 에서 유동학 (Rheology) 이 수행 되었다. 샘플들을 겔화 온도 보다 훨씬 아래인, 10⁰에 있는 유량계(rheometer)에 놓고, 및 ECM 전-겔(pre-gel)의 점성도 프로파일을 측정하기 위하여 항상성 상태(steady state) 흐름 테스트 (flow test) ((쉬어 속도(shear rate) 0.1-1000 1/s))가 수행되었다 (도면 1).

[0130] 각 쉬어 속도에서, 점성도는 증가하는ECM 농도에 따라 증가 하며, 및 ECM 전-겔은 점도-감소 (shear-thinning) (쉬어 속도가 증가하면 점성도는 감소) 한다. 점도-감소는 카테터를 통해 주사 될 수 있는 ECM 전-겔의 좋은 성질로서 여기서 쉬어 속도 10-1000 1/s의 범위를 경험할 수 있다. 주사 가능하다는 입증은 더 나아가, 비디오 (video)에서 얻을 수 있으며, 여기서 ECM 전-겔 (식도 ECM 및 UBM, 8-12mg/mL 테스트, 청색 염색)이 구강 위관영양 (gavage) (5fr 크기, ~ 15.9 G) 을 통해 주사가가능 함을 보여준다. 온도는 그 후 겔화를 유도하기 위해 37°C로 빨리 올리고, 및 겔 강직성 (stiffness)(도면 2) 및 겔화 시간(도면 3)을 측정하기 위하여 타임 스윕(time sweep) ((0.5% 진동 압력(oscillatory strain))를 37°C에서 수행 하였다. 도면 2 는 형성된 ECM 하이드로겔의 저장 모듈(storage module) (G') 또는 “강직성(stiffness)” 이 ECM 농도의 증가에 따라 증가함을 보여 준다. 비슷한 경향이 손실 모듈(loss module) (G''), 또는 형성된 ECM 하이드로겔의 점성 성분에서 관찰 되었다. 50% 겔화 시간은 타임 스위프트 테스트 동안에 측정 되었다 (도면 3). eECM은 겔화 시간은 농도 의존적임을 보여준다, 즉 ECM 농도가 증가하면 겔화 시간은 감소함을, 보여준다.

[0131] 유동학은 두 개의 비-상동ECM 하이드로겔에 대해 수행 되었다: 방광 기질 ECM(UBM) 및 피부ECM(MIRM5). 점탄성 성질들은 상동 식도 ECM 하이드로겔 (eECM)과 비교하여 도면들4-6에 보여준다.

[0132]

eECM											
4 mg/mL				8 mg/mL				12 mg/mL			
Mean (Pa)	SD (Pa)	N		Mean (Pa)	SD (Pa)	N		Mean (Pa)	SD (Pa)	N	
Max G'	5.74	0.73	3	39.64	43.18	3		56.95	66.72	3	
UBM				8 mg/mL				12 mg/mL			
Mean (Pa)	SD (Pa)	N		Mean (Pa)	SD (Pa)	N		Mean (Pa)	SD (Pa)	N	
Max G'	53.49	5.29	3	87.36	18.64	3		129.70	16.46	3	
dECM				8 mg/mL				12 mg/mL			
Mean (Pa)	SD (Pa)	N		Mean (Pa)	SD (Pa)	N		Mean (Pa)	SD (Pa)	N	
Max G'	0.42	0.57	3	3.26	1.17	3		35.16	33.44	3	

[0133] 일정한 쉬어 테스트 (steady shear test)가 도면 1에서 서술된 것과 비슷하게 수행 되었다. 피부 ECM(도면 4b) 및 UBM(도면 4c) 는 증가되는 ECM 농도 및 ECM 하이드로겔의 점도-감소(shear-thinning) 프로파일과 함께 농도-의존적인 점성도 증가를 보여준다, 즉 각 ECM 농도에서 쉬어 속도가 높아지면 점성도는 감소한다. 점성도 범위는 각 조직 타입마다 뚜렷이 차이가 있다.

- [0134] UBM ECM(도면 5c)는 식도 ECM 과 비슷하게ECM농도가 증가함에 따라 증가된 저장모듈(storage module) (강직성, stiffness)을 보여준다(도면 5a). 피부 ECM (도면 5b)은 4 mg/mL의 낮은 농도에서 하이드로겔은 형성 되지 않으며, 다른 조직 소스로부터 유래된 ECM 하이드로겔은 모두가 비슷한 행위를 보이는 것은 아님을 보여준다. 세가 지 ECM 하이드로겔의 강직성 범위는 뚜렷이 차이가 있다.
- [0135] 피부 ECM (도면 6b)은 농도-의존적 겔화 시간을 보였다, 즉 식도 ECM(도면 6a)과 비슷하게, ECM농도가 증가하면 겔화 시간은 감소하며, 반면에 UBM은 농도-독립적 겔화 시간을 보였다, 즉 겔화 시간은 모든 ECM 농도에서 일정 하게 유지 되었다(도면 6c). 뚜렷이 다른 겔화 프로파일은 더 나아가 다른 조직 소스로부터 유래된 ECM하이드로 겔의 다양성을 보여주고 있다. 그러므로, 식도 하이드로겔은 특유의 성질을 보이며, 및 이것에만 국한 하지 않 으나, 8 mg/ml에서 약12 mg/ml까지와 같은, 다양한 농도에서 유용하다.
- [0136] **실시예시 2 (Example 2)**
- [0137] **ECM 하이드로겔로 점막 염증 치료 (Treating mucosal inflammation with an ECM hydrogel)**
- [0138] 점막 염증 (mucosal inflammation), 또는 점막염 (mucositis) 은 위장 관 (gastrointestinal tract)의 점막 내 벽(라이닝)이 붓고, 가렵고, 및 불편한 염증적 컨디션이다. 점막염(mucositis)은 궤양의 결과가 될 수 있으며, 이는 위장 관의 전체에 나타날 수 있다. 자주 감염 및/또는 궤양이 관여되는, 점막 내벽의 염증으로서, 점막염 은 심각하고 및 때로는 고통스러운 컨디션이다.
- [0139] 점막염은 예를 들어, 때로는 암의 화학- 또는 방사선 치료요법의 합병증으로서 전개 된다. 암 치료의 방사선 및 화학요법치료의 목표는-빨리 분열하는 암세포를 죽이기 위함-또한 위장 관과 같은 점막 내벽부분의 상피 세 포들에도 영향을 주어, 점막염을 일으키게 한다. 방사선 및/또는 화학요법 치료제에의 노출은 때로는 점막 상피 및 하부의 결합 조직의 세포 완전성 (integrity)에 상당한 방해를 주는 결과가 되어, 예를 들어, 식도 및 GI관 다른 부분에서와 같이, 점막 부위에 염증, 감염 및/또는 궤양을 초래하게 한다.
- [0140] 세포외 기질 (ECM) 하이드로겔은 점막 염증 치료를 위한 치료제이다. 이론에 결속 되지 않고, ECM이 점막 치유 를 지지할 수 있는 기전은 (1) 점막에 계속적인 인설트 (insult)로부터 보호적인 장벽을 제공 할 수 있는 하이드로겔 형성, (2) 항-염증인 환경을 촉진시키고, 및/또는 (3) 손상 되고 및 염증이 생긴 점막의 수선을 촉진 시 킴에 의해서이다. 식도 하이드로겔의 성질에 대하여, 실시예시1에 공개된 대로 조사되었다.
- [0141] 대식세포 (Macrophages)는, ECM 하이드로겔에 노출 되었을 때, 증가된 수준의 PGE2를 포함하는, 주로 항-염증적 인 분비된 사이토카인 프로파일을 끌어낸다 (도면 7). 항-염증 사이토카인의 수준은 ECM이 유래된 조직에 따라 다양하다. 식도 하이드로겔은 강한 항-염증 효과를 제공한다.
- [0142] 점막의 수선은 염증의 감소뿐만 아니라 상피 장벽 및/또는 물리적 장벽의 복구를 또한 필요로 한다. ECM 하이드로겔은 상피 세포 및 줄기 세포 둘 다의 화학진화성 (chemotaxis)을 증가시켜 상피 장벽의 복구를 촉진 시킬 수 있다. ECM에 노출된 대식세포의 분비된 산물은 상피 세포의 이주를 강화시킨다 (도면 8a). 더 나아가, ECM 하이드로겔은 식도 줄기 세포의 화학진화성(chemotaxis)을 직접적으로 촉진 시킨다; 이 효과들은 ECM이 유도된 소스 조직에 달려 있다 (도면 8b). 식도 줄기 세포는 식도 ECM 및 소장 ECM쪽으로 선호적으로 이동한다. 도면 9는 바 렛씨 식도의 치료의 예를 보여준다.
- [0143] 도면 10a 는 구강 투여 후 40분의 효과를 보여 주며, 정상적인 삼킴에도 불구하고 하이드로겔이 점막을 코팅하 여 남아 있으며 및 동정 될 수 있었다. 이는 구강 삼킴이 효과적임을 확인 하기 위하여 생체-내에서 겔의 점막 부착성을 테스트 하기 위하여 수행되었다. 도면 10b에서 보여준 대로, 카테터 및 내시경을 사용하여, 하이드로 겔이 식도 내에 특정한 부위로 전달 되었다 (이 경우 링의 모습으로). 그러므로, 하이드로겔은 식도 내에 특정 한 국부 위치로 전달되었다.
- [0144] 도면 11은 또한 하이드로겔 처치의 효과를 보여준다. 윗 줄은 식도 염증이 있는 동물들에서 적어도 3개월 동안 끊임없는 역류의 결과를 보여준다. 왼쪽의 세 마리 개는 오메프라졸(Omeprazole)(양성자 펌프 억제제) 및 식도 ECM 하이드로 겔로 처치 되었다. 마지막 동물(오른쪽 판별)은 오메프라졸로만 처치 되었다. 30일 동안의 처치 후에, ECM 하이드로겔을 수여 받은 세 동물에서는 식도 염증의 개선을 볼 수 있었다. 오메프라졸만 수여 받은 동물은 아무 개선을 보이지 않았다 (회색 박스, 오른쪽 판별).
- [0145] 도면 12a-12b는 ECM 하이드로겔의 안전성 평가를 보여준다. 동물은 식도염을 일으키게 하기 위하여 산 역류를 증가시키는 과정을 겪게 하였으며, 및 이어서 바렛씨 식도가 생기게 하였다. BE를 유도하는 수술 후 또는 하이드로겔 처치 동안에 여덟 마리 동물 중 아무 동물도 몸무게 감소가 없었다 (도면 12a). 생리적 계수들이 분석

되었다. 하루 두 번씩 30 일 동안 하이드로겔 투여 후에, 동물의 생리적 계수들은 안정적 이었고 정상범위를 벗어나지 않았다 (도면 12b).

[0146] ECM 처치 전의 동물 모델에서, ECM 하이드로겔로 처치될 개 및 ECM 하이드로겔로 처치 되지 않을 개 둘 다에서 원주형 이형성(columnar metaplasia)이 전개 되었다 (도면 13a 및 13 b). ECM+오메프라졸로 처치 후 처치된 개는 개선 되었으며 원주형 이형성이 보이지 않았다 (도면 13c). EMC 하이드로겔로 처치 되지 않은, 대조군 동물에서는 같은 부위에 편평상피 (squamous epithelium) 작은 패치를 가진 원주형 이형성이 있었다 (도면 13d).

[0147] 실시예시 3

[0148] ECM 하이드로겔로 제약 치료 (Treating Stricture with an ECM Hydrogel)

[0149] 재료 및 방법

[0150] 두 마리의 잡종(mongrel) 개에서 EMR 및 ESD 기술(Nieponice, 2009, 18657808)의 조합을 사용하여 5 cm의 세로 넓이 (longitudinal width)의 완전한 원주의 점막 절제가 수행 되었다. 평가된 처치는 하루 두 번의 UBM 하이드로겔의 투여 및 처치 하지 않은 대조군 이었다. 동물이 제약(stricture)의 어떤 임상적인 징후가 보이면 또는 과정 후 한달 후에 내시경이 수행 되었다. 동물에 대한 내시경 발견에 따라, 만약 가능하고 필요하면 확장(dilation)이 수행 되었다. 만약 동물이 심각한 제약을 보이거나 또는 풍선 확장 후 2 개월 후의 시간 포인트에 도달하면 안락사 시켰다. 부검에서, 동물 조직은 제약을 결정하기 위해 측정 되었으며 및 샘플은 조직학적 분석을 위해 모아졌다. 동물 모델은 다음의 종점을 측정하게 하였다.

- [0151] 1. 절제된 부위의 내시경적 모습
- [0152] 2. 식도 측정치
- [0153] 3. 최종 시간포인트에서 조직학적 평가.

[0154] 외과적 과정 및 수술 후 처리 (Surgical Procedure & Postoperative Care)

[0155] 각 개는 아셉프로마진 Acepromazine (0.01 mg/kg, SC) 및 케타민 (ketamine) (5-11 mg/kg)으로 유도 시키고 외과적 평면 마취 (surgical plane anesthesia)는 기관 내 튜브를 통해 1-5% 이소플루오란(Isoflurane)으로 유지 시켰다. 유도 후에, 동물은 수술 테이블로 옮겨지고 멸균 수술실 안에 놓여 졌다. 전 과정 및 관찰 동안에 동물에 2 ml/kg/h 의 젖산 링거 용액(lactated Ringer's solution)이 주입 되었다. 온도는 동물 밑에 놓아 둔 따뜻한 물이 재순환 되는 열 패드(heating pad)를 통해 조절 되었다. 심장, 호흡수, 체온 및 민감성과 같은 생리적 계수들이 이 과정 동안 모니터 되었다. 과정을 시작하기 전에 25mg/kg 의 세파졸린 (Cefazolin)의 항생제 예방이 투여 되었다.

[0156] 동물은 반듯이 옆으로(supine decubitus)로 놓여지고 식도를 평가 하기 위해 펜탁스EG3430K (Pentax EG3430K) 내시경을 사용하여 평가 되었다. 입에서부터 GE 접경까지의 거리가 측정 되었다. 식도에서 참조 포인트가 동정된 후에, 올림퍼스 인젝토릭스 (Olympus Injectorforce) 4mm 23G 주사바늘을 사용하여 생리식염수를 주사하여 점막 및 점막하층이 분리 시켰다. ESD 및 루프 EMR(Loop EMR) 기술을 사용하여 길이 5 cm 의 완전한 원주의 점막 (100%)이 제거 되었다. ESD 기술은 액체 또는 ECM을 점막/점막하층에 주사하여 점막을 점막하층으로부터 분리 시키고 그 후 내시경 TT 칼을 사용하여 그 부분을 잘라서 수행한다. EMR을 실행하기 위해, 연결 밴드가 있는 쿡 듀엣 키트(Cook Duette Kit)가 사용 되었다. 점막은 그 후 올가미(snare)를 사용하여 잘라 내었다. 절제된 부위는 스폿 엔도스코픽 마커(Spot Endoscopic Marker)를 사용하여 표시 되었다.

[0157] 점막이 제거 된 후, 이 과정 동안에 50 mL 의 12mg/mL UBM 하이드로겔이 전달 되었고 및 미라 EDC190 내시경 전달 케테터 (MILA EDC190 Endoscopic delivery catheter)를 사용하여 절제 부위에 적용되었다. 동물은 하이드로겔이 겔화 되도록 하기 위하여 5 분 동안 마취상태 하에 유지 시켰다. 과정 후에는 동물은 회복 시키고 관찰 되도록 놓여 졌다.

[0158] 수술 과정 및 흡입 마취 종료 후에, 동물은 24 시간 동안 계속적으로 모니터 되었다. 체온은 측정되고 매 12 시간마다 기록 되었다. 동물은 따뜻하게 유지 시키고 및 저체온증을 막기 위해 건조 시켰으며 이들이 흉골 위치 (sternal position)를 유지할 때까지 30분 마다 한번씩 회전 시켰다.

[0159] 동물이 안정화 될 때까지, 개들은 방에서 다른 동물과 단독 방에서 유지 되었으며, 그 후에는 정상적인 거주 시설에 놓여졌다. 각 수술 과정 다음에는 고통을 위해 부프레노르핀(Buprenorphine) (0.005-0.01 mg/kg IM 또는 IV, q12h)이 5 일 동안 투여 되었으며, 만약 고통의 증상이 있으면 계속되었으며 세파라신 (cephalexin) (35

mg/kg q12)이 5 일 동안 투여 되었다.

[0160] 과정 후 및 연구가 끝날 때까지, 동물은 호흡 패턴의 증가, 목소리 표현, 구토 사건(emetive episodes), 음식물 삼키기 어려움 및/또는 활동의 감소가 측정되었으며, 음식물 섭취 감소, 몸무게 손실, 및 고통의 징후와 같은 식도 협착의 징후에 대하여 모니터 되었다. 만약 이러한 징후들이 보이면, 동물은 콘트라스트 식도조영 (contrast esophagogram) 및 /또는 내시경으로 평가 된다.

[0161] **내시경 모니터링 및 풍선 확장 (Endoscopic monitoring & Balloon Dilation)**

[0162] 초기 수술 과정 후 한 달에 만약 어느 제약의 징후가 있으면 동물들은 내시경 과정을 거쳤다. 추가로, 모든 동물들은 안락사 이전에 내시경 과정을 거쳤다. 마취는 아셉프로마진 (acepromazine) (0.1-0.5mg/kg)으로 유도 되었으며 및 내시경을 수행하기 위하여 이소플루란 (isoflurane) (1-5%)으로 유지 시켰다.

[0163] 만약 동물이 내시경 하는 동안에 가볍고 및 중간정도의 제약을 가진 것으로 진단 되면, 풍선 확장 (balloon dilation) 이 수행된다. 확장 과정을 수행하기 위하여 올림퍼스 20mm 풍선 확장기(Olympus 20mm balloon dilator)가 사용 된다. 내시경 안내지침 하에서, 풍선은 중간 정도 또는 대략 10 mL 의 멸균된 0.9% NaCl로 동정 될 수 있는 상당한 양의 저항이 있을 때까지 확장 시키며, 및 확장은 30-60초간 유지 시켰다. 확장 후, 미라 EDC 190 카테터 (MILA EDC 190 catheter)를 사용하여 50 mL 의 ECM을 상처 난 부위에 즉시 적용하고 및 젤이 되도록 5 분 동안 놓아 둔다. 이 과정 후에, 동물은 적어도 1 시간 동안 음식물 또는 물에 접근하지 못하게 하였다.

[0164] **ECM 전달 (ECM Delivery)**

[0165] ECM 은 60 ml 카테터 팁(cathether tip) 주사기를 사용하여 15°C에서 구강으로 동물에게 전달 되었다. 50mL이 매일 두 번씩 0일째부터 연구가 완료 될 때까지 전달 되었다. 동물들은 각 하이드로겔 전달 후 한 시간 동안 먹거나 또는 마시지 못하게 하였다.

[0166] **부검 (Necropsy)**

[0167] 부검 시에 내시경이 이전에 서술된 대로 수행 되었다. 안락사는 마취 상태에서 펜토바르비탈 소듐 IV(Pentobarbital Sodium IV) (390 mg / kg BW)을 투여하여 수행 되었다. 사망이 확인 된 후에, 식도는 몸체에 있을 때와 같은 차원을 유지 시키면서 모았다. 식도의 측정은 0.5 cm 씩 떨어져 있었고 및 기록 되었다.

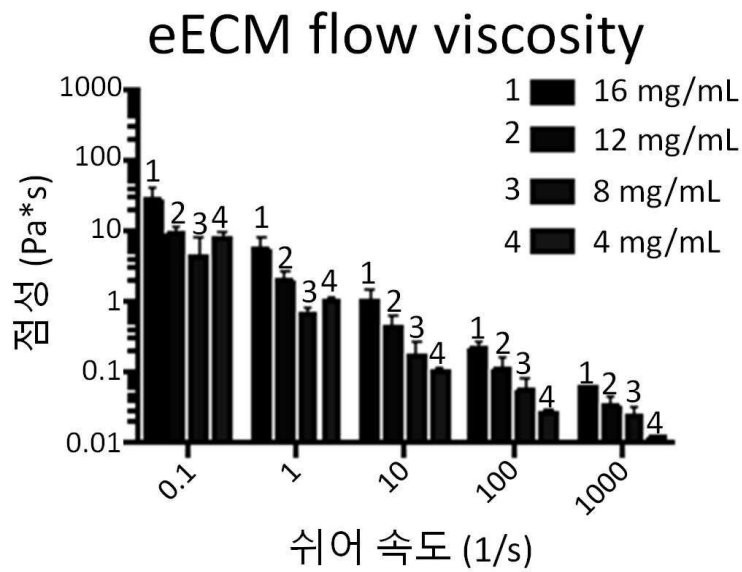
[0168] ECM 하이드로겔은 제약을 치료 하였다. 도면 14 에서 보여진 대로, 점막의 완전 원주형 절제 (full circumferential resection) 모델 (바렛씨 식도 모델과 다름) 에서, 동물들은 ECM 하이드로겔로 81일까지 처치 되었다. 대조군 동물은 심각한 치료불가능한 제약 (stricture)을 가졌으며 및 14일 후에 안락사 시켰다. ECM 처치된 한 동물은 21째 날에 식도 협착을 보였으며 이는 확장시켰다. 확장 2 달 후에, 이 동물은 희생 시켰고 식도 측정을 하였다. ECM 처치된 동물은 대조군에 비교하여 좀 내부 둘레가 좀 더 넓고 및 둘레의 감소가 더 낮았다.

[0169] 도면 15에서 보여 준 대로, 대조군 동물은 14 일째에 세포 침윤이 높은 무질서한 콜라겐 퇴적 및 점막 절제가 만들어진 중앙부위에 부식을 보였다. 도면 16에서 보여진 대로, 처치된 동물들은 흠집이 있는 중앙 부위에 세포 침윤이 더 낮은 재-상피형성화 및 좀 더 조직화되고 밀집한 콜라겐 퇴적을 보인다.

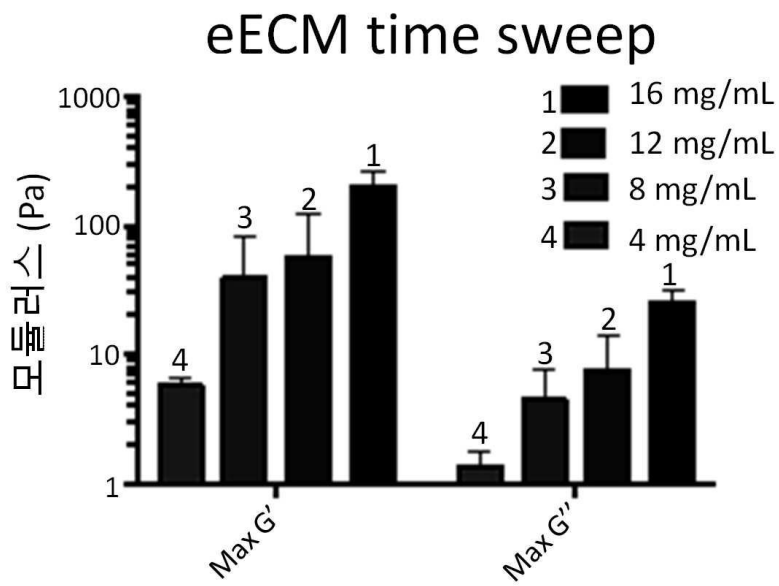
[0170] 공개되는 본 발명의 원리가 적용되는 많은 가능한 실시양태들의 관점에서, 제시된 실시양태들은 단지 바람직한 실시예시들일 뿐으로 인식 되어야 하며 본 발명의 범위를 제한 하려는 것으로 간주 되어서는 안 된다. 오히려, 본 발명의 범위는 하기의 청구항에 의해 정의 된다. 그러므로 우리는 이러한 청구의 범위 및 정신 내에 있는 모두를 우리의 발명으로서 청구 한다.

도면

도면1

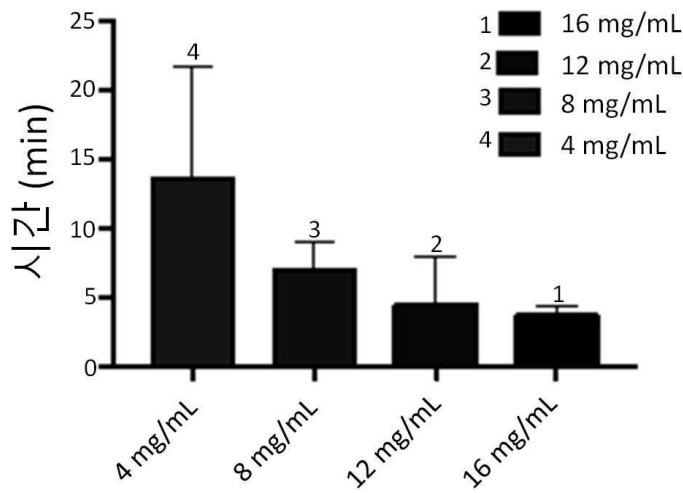


도면2

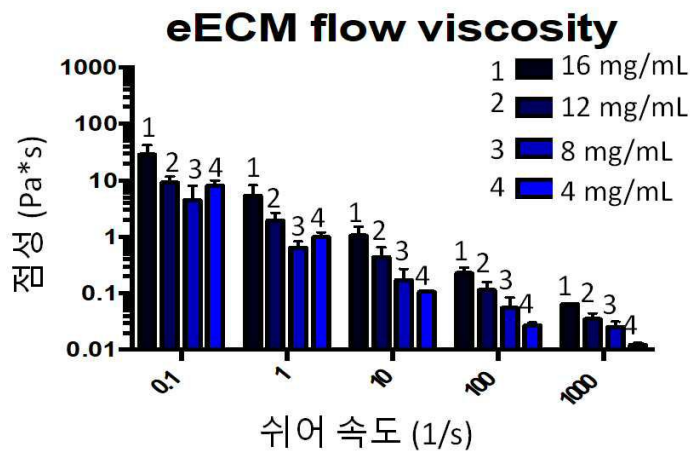


도면3

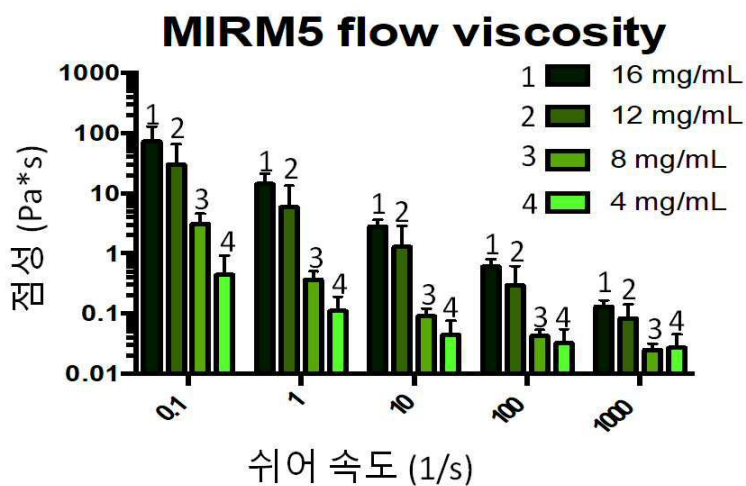
eECM Time to 50% Gelation



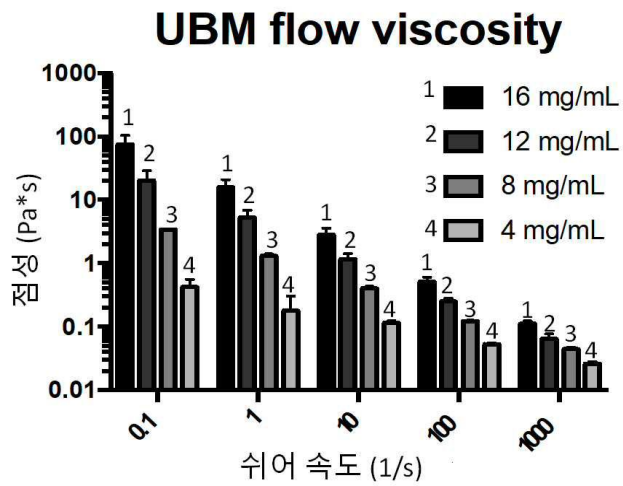
도면4a



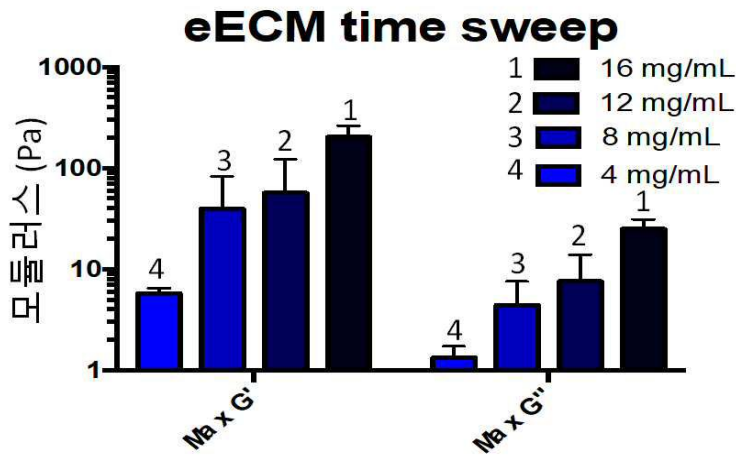
도면4b



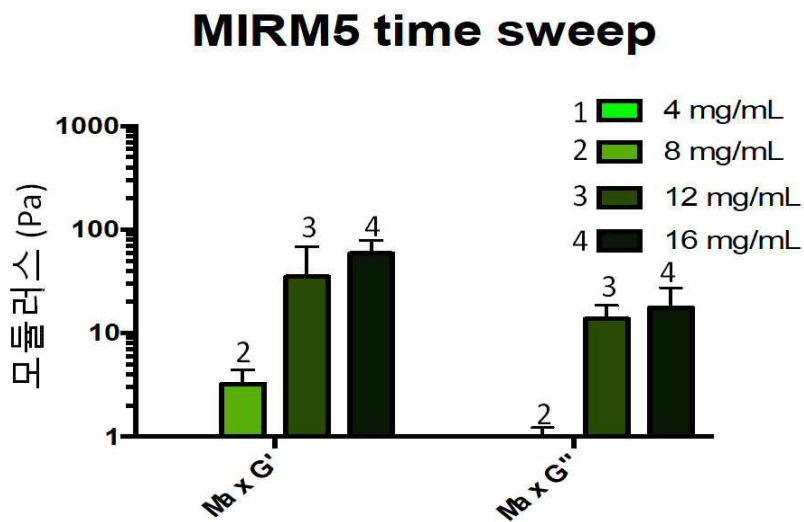
도면4c



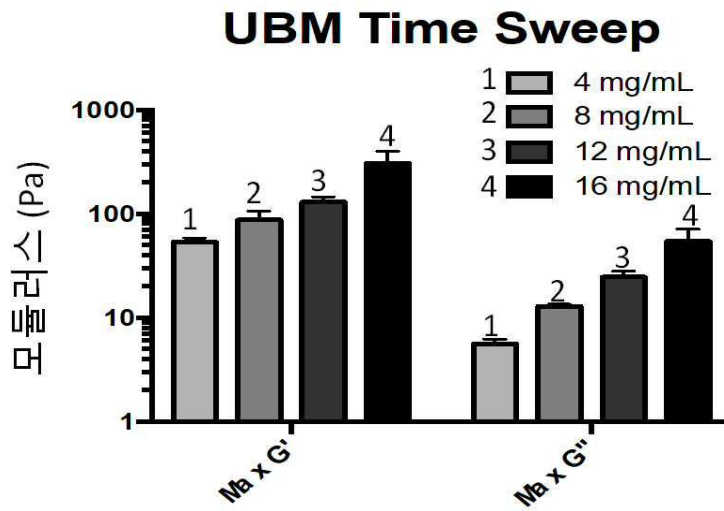
도면5a



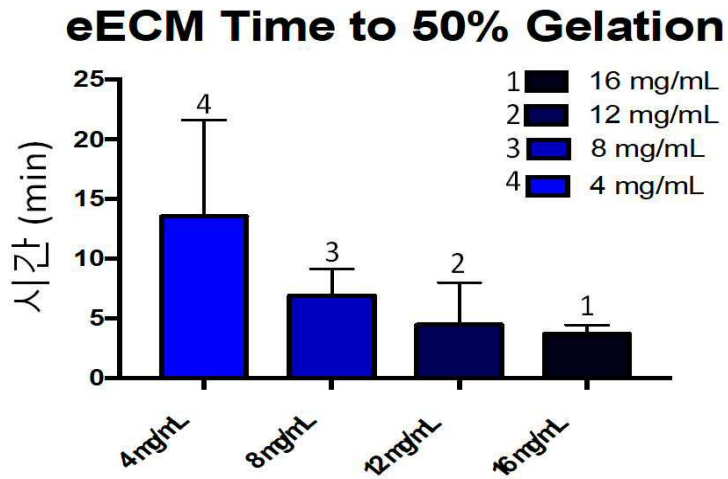
도면5b



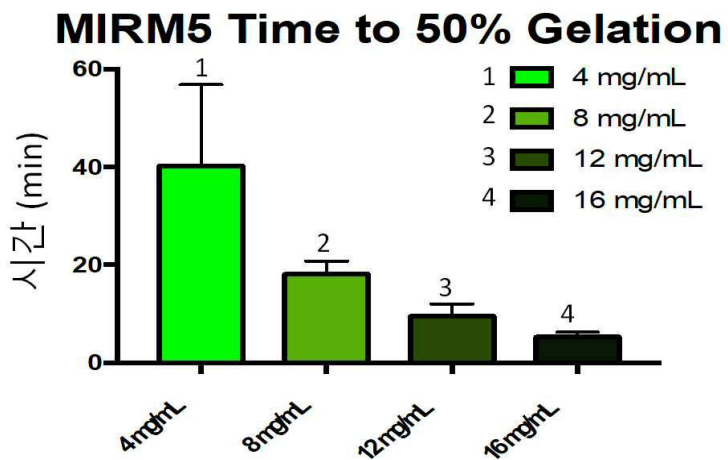
도면5c



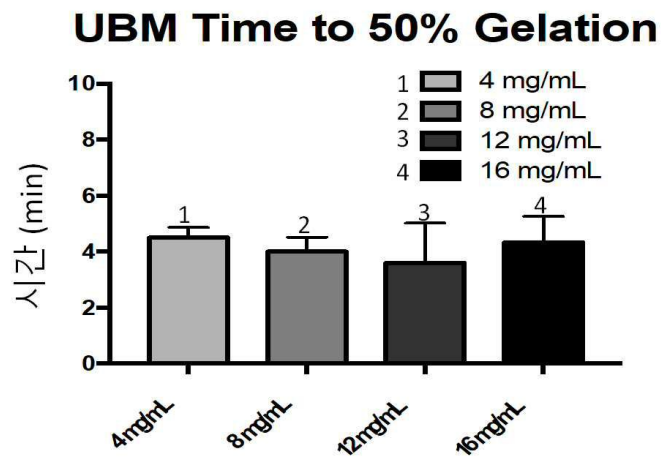
도면6a



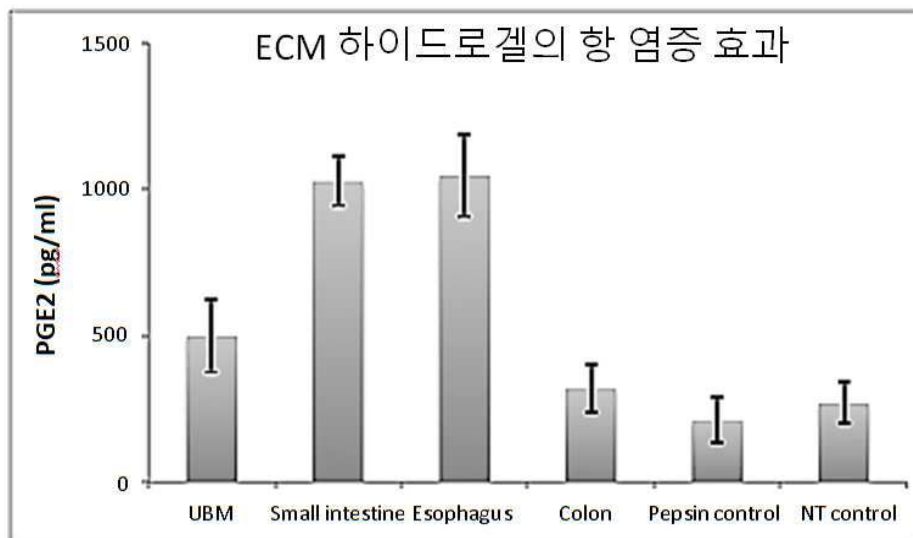
도면6b



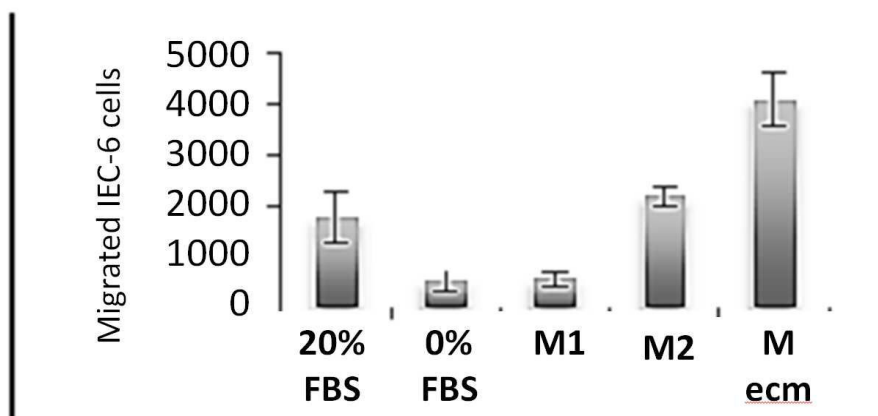
도면6c



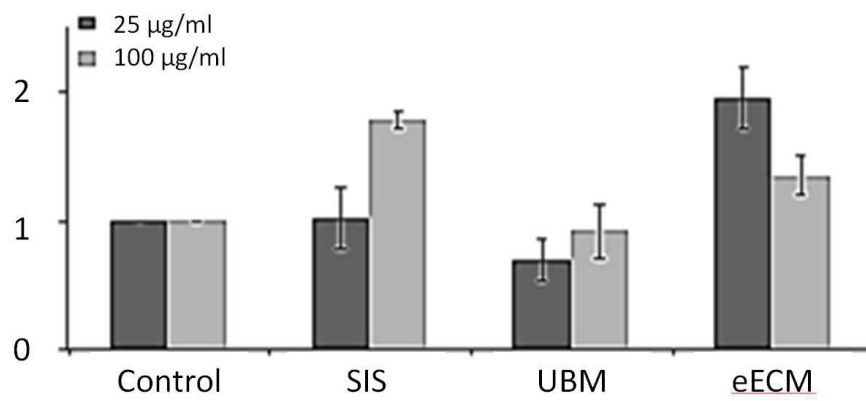
도면7



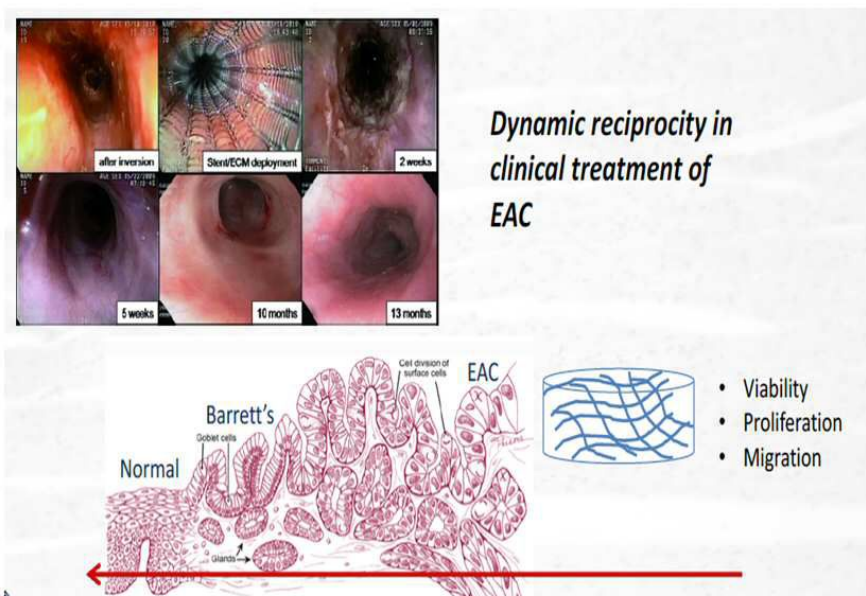
도면8a



도면8b



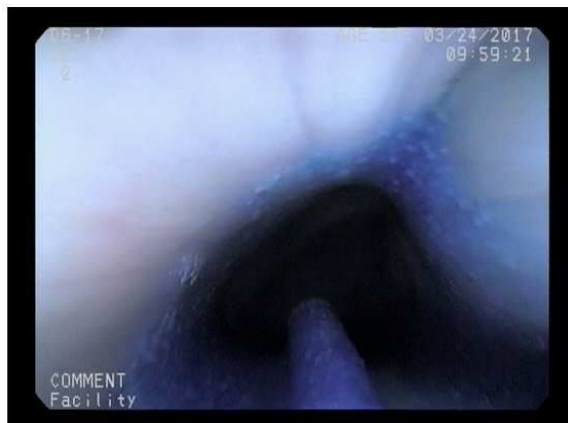
도면9



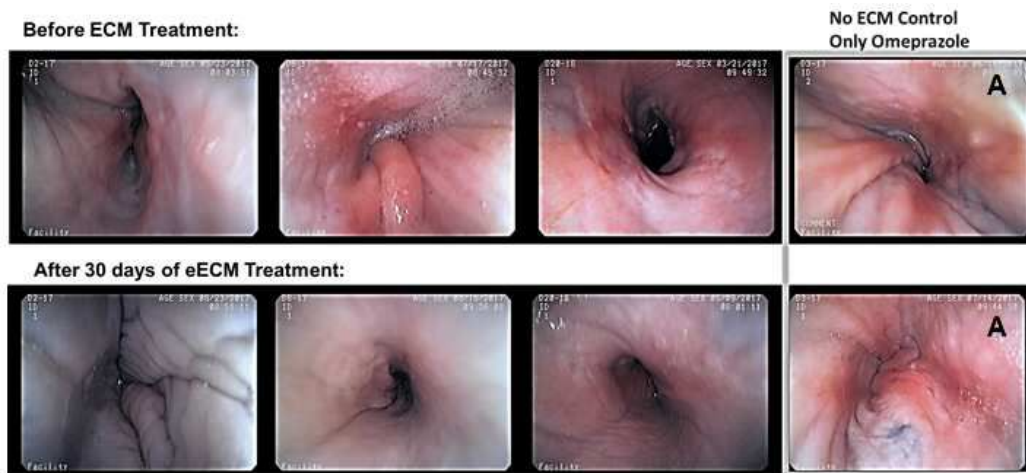
도면10a



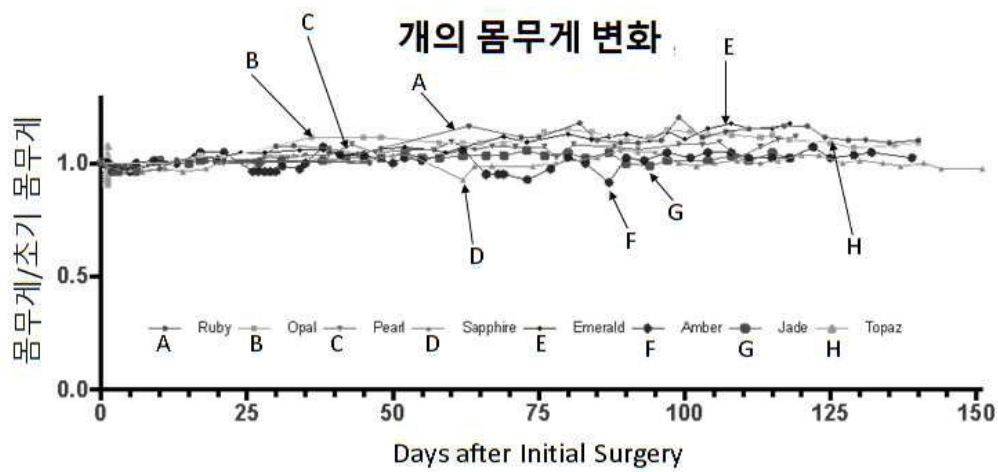
도면10b



도면11



도면12a



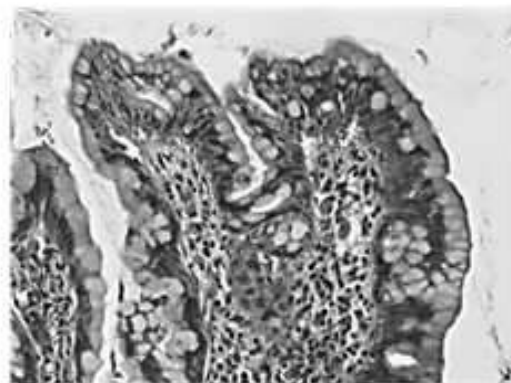
도면12b

ANALYSIS	Before ECM Treatment (n=3)	After 30 days ECM Treatment (n=3)	Normal Range	Units
ALB (Albumin)	3.325	3.4	2.5 - 4.4	G/DL
ALP (Alkaline Phosphatase)	15	17.33	20 - 150	U/L
ALT (Alanine aminotransferase)	42.25	57.67	10 - 118	U/L
AMY (Amylase)	339	427	200 - 1200	U/L
TBIL (Total Bilirubin)	0.275	0.2	0.1 - 0.6	MG/DL
BUN (Blood urea nitrogen)	12.75	11.67	7 - 25	MG/DL
CA (Calcium)	10.15	10.2	8.6 - 11.8	MG/DL
PHOS (Phosphorus)	4.9	4.17	2.9 - 6.6	MG/DL
CRE (Creatinine)	0.75	0.87	0.3 - 1.4	MG/DL
GLU (Glucose)	92.75	112	60 - 110	MG/DL
NA ⁺ (Sodium)	153	137.67	138 - 160	MMOL/L
K ⁺ (Potassium)	4.35	4	3.7 - 5.8	MMOL/L
GLOB (globulin)	1.525	1.7	2.3 - 5.2	G/DL

도면13a

ECM + Omeprazole

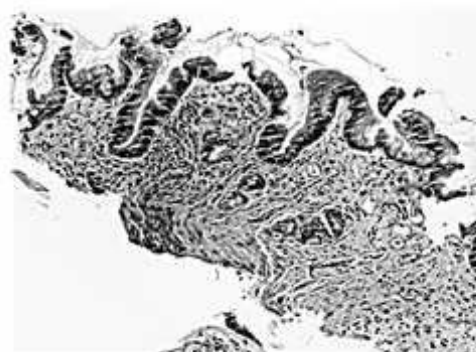
ECM 처리 전



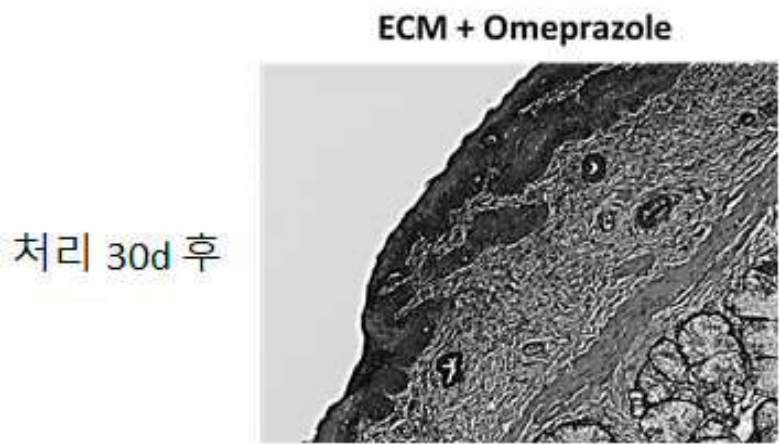
도면13b

Omeprazole (Control)

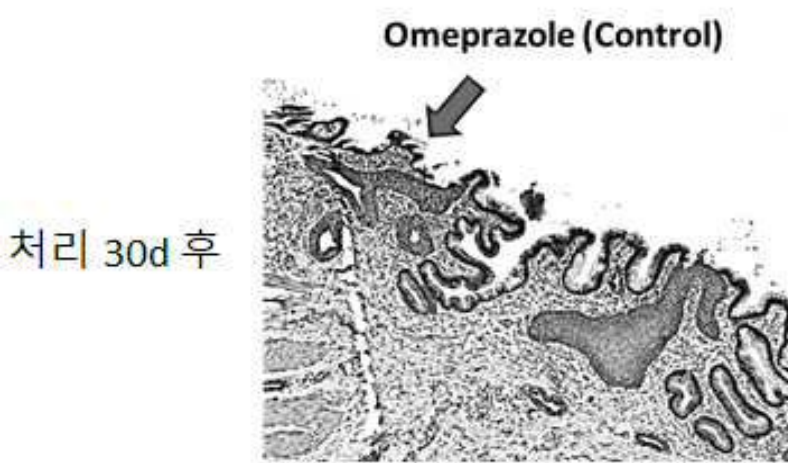
ECM 처리 전



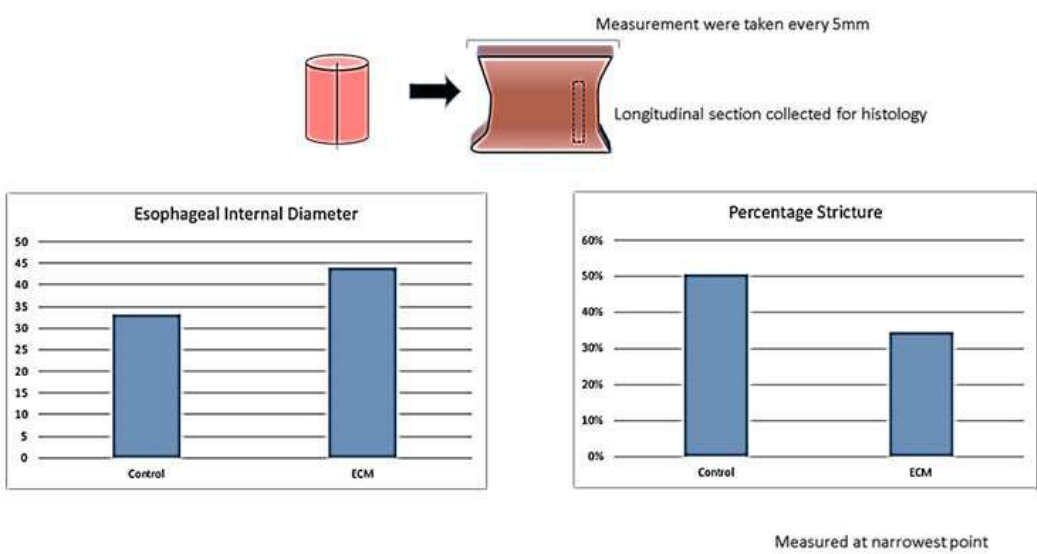
도면13c



도면13d

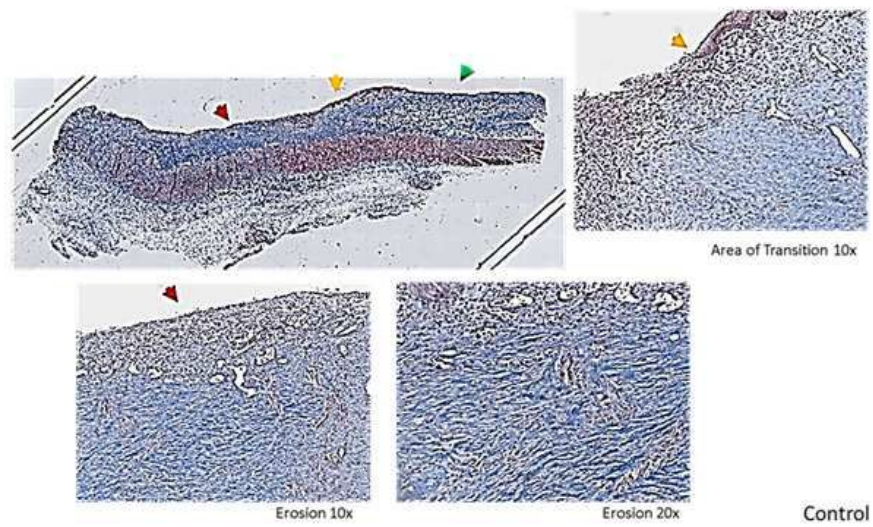


도면14



도면15

Trichrome - Control Dog



도면16

Trichrome - Treatment Dog

