



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112469449 B

(45) 授权公告日 2022. 08. 09

(21) 申请号 201980041792.8

(22) 申请日 2019.06.20

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112469449 A

(43) 申请公布日 2021.03.09

(30) 优先权数据
62/688,195 2018.06.21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.12.21

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/038315 2019.06.20

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/246442 EN 2019.12.26

(73) 专利权人 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·贝狄拉克 L·T·萨拉丁
J·D·纳兰霍·古铁雷斯

(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

(51) Int.Cl.
A61L 24/00 (2006.01)
A61L 24/10 (2006.01)
A61L 24/04 (2006.01)
A61K 35/38 (2015.01)
A61L 31/04 (2006.01)
A61L 31/14 (2006.01)

(56) 对比文件
US 6099567 A, 2000.08.08
Ning B等.Endoscopic submucosal
dissection and endoscopic mucosal
resection for early stage esophageal
cancer.《Annals of cardiothoracic
surgery》.2017,第6卷(第2期),

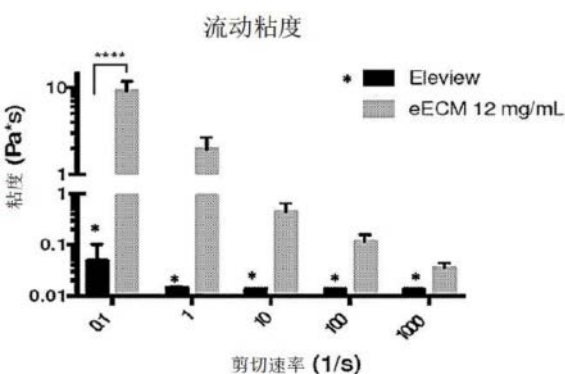
审查员 陈天奇
权利要求书2页 说明书18页 附图9页

(54) 发明名称

细胞外基质 (ECM) 水凝胶作为食管粘膜下流
体垫的用途

(57) 摘要

公开了用于从受试者的食管区域的固有肌
层中剥离粘膜和粘膜下层的方法。这些方法包括
将包含细胞外基质 (ECM) 水凝胶的药物组合物粘
膜下注射到受试者的食管中,以在食管区域的粘
膜下层和下层固有肌层之间形成垫,其中ECM水
凝胶具有以下特征:a) 在约37℃的温度下达到
50%凝胶化的时间少于30分钟;b) 适于输注到食
管的流动粘度;和c) 约10至约400帕斯卡 (Pa) 的
刚度。ECM水凝胶不是膀胱ECM水凝胶。



1. 一种细胞外基质 (ECM) 水凝胶在制备用于从受试者的食管区域的固有肌层中剥离粘膜和粘膜下层的药物组合物中的用途,

所述药物组合物用于粘膜下注射到所述受试者的食管区域中, 以在所述食管的所述粘膜下层和下层固有肌层之间形成垫, 从而从所述受试者的食管的所述下层固有肌层剥离所述粘膜和所述粘膜下层并抑制其中的炎症; 其中所述ECM水凝胶具有以下特征:

a) 达到50%凝胶化的时间为在37°C的温度下少于30分钟;

b) 适于输注到食管的流动粘度; 和

c) 10至400帕斯卡 (Pa) 的刚度;

其中所述ECM水凝胶不是膀胱ECM水凝胶。

2. 根据权利要求1所述的用途, 其中达到50%凝胶化的时间为在37°C下2至30分钟。

3. 根据权利要求1所述的用途, 其中达到50%凝胶化的时间为在37°C下2至10分钟。

4. 根据权利要求2所述的用途, 其中达到50%凝胶化的时间为3至10分钟。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的用途, 其中所述流动粘度为在0.1/s的剪切速率下0.1至100 Pa*s, 并且在1000/s的剪切速率下0.01至0.2 Pa*s。

6. 根据权利要求1-4中任一项所述的用途, 其中所述流动粘度为在1/s的剪切速率下0.1至30 Pa*s, 并且在100/s的剪切速率下0.02至0.8 Pa*s。

7. 根据权利要求1-4中任一项所述的用途, 其中所述ECM水凝胶具有10-300 Pa的刚度。

8. 根据权利要求1-4中任一项所述的用途, 其中所述ECM水凝胶是食管ECM水凝胶。

9. 根据权利要求1-4中任一项所述的用途, 其中所述水凝胶中的ECM浓度为2 mg/mL至16 mg/mL。

10. 根据权利要求1-4中任一项所述的用途, 其中所述ECM水凝胶通过以下方法产生:

(a) 通过在酸性溶液中用酸性蛋白酶消化组织来溶解脱细胞的细胞外基质 (ECM) 以产生消化的ECM; 和

(b) 将所述消化的ECM的pH升高到pH 7.2至7.8之间以产生中和的消化液。

11. 根据权利要求10所述的用途, 其中 (b) 升高所述消化的ECM的pH包括添加碱或等渗缓冲液以升高所述消化的ECM的pH。

12. 根据权利要求10所述的用途, 其中所述酸性蛋白酶是胃蛋白酶、胰蛋白酶或其组合。

13. 根据权利要求1-4中任一项所述的用途, 其中所述ECM水凝胶在被施用于所述受试者之前被保持在25°C或低于25°C。

14. 根据权利要求1-4中任一项所述的用途, 其中所述ECM水凝胶适合于在内窥镜下或通过导管注射。

15. 根据权利要求1-4中任一项所述的用途, 其中从受试者的食管区域的固有肌层中剥离粘膜和粘膜下层包括从所述食管中剥离食管不典型增生或癌。

16. 根据权利要求15所述的用途, 其中所述癌是腺癌。

17. 根据权利要求15所述的用途, 其中从受试者的食管区域的固有肌层中剥离粘膜和粘膜下层包括从患有巴雷特食管的受试者的食管中剥离所述粘膜和所述粘膜下层。

18. 根据权利要求1-4中任一项所述的用途, 其中从受试者的食管区域的固有肌层中剥离粘膜和粘膜下层还包括在所述垫上进行内窥镜切除程序以去除剥离的粘膜和粘膜下层。

19. 根据权利要求18所述的用途,其中所述切除程序是内窥镜粘膜切除术或内窥镜粘膜下剥离术。

20. 根据权利要求19所述的用途,其中从受试者的食管区域的固有肌层中剥离粘膜和粘膜下层包括:

分割所述垫,使得水凝胶保留在所述食管的所述下层固有肌层上,并且从所述食管区域中去除所述粘膜和所述粘膜下层。

21. 根据权利要求1-4中任一项所述的用途,其中所述受试者是人类。

细胞外基质 (ECM) 水凝胶作为食管粘膜下流体垫的用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年6月21日提交的美国临时申请号62/688,195的权益,其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 这涉及内窥镜切除术,具体地涉及细胞外基质 (ECM) 水凝胶作为用于从食管中的固有肌层剥离粘膜和粘膜下层的粘膜下层垫的用途,其中ECM水凝胶不是膀胱ECM水凝胶。

背景技术

[0004] 内窥镜检查是一种无需使用侵入性手术即可通过称为内窥镜的仪器检查人体的中空器官或腔的内部的程序。内窥镜检查可用于外科手术,例如烧灼出血血管,食管狭窄扩张,去除息肉、腺瘤和小肿瘤,进行活组织检查或去除异物。内窥镜检查程序可以在胃肠道、呼吸道、耳朵、泌尿道、女性生殖系统中进行,并且通过小切口在常闭型体腔中进行,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)。内窥镜是一种照明的,通常是光纤、柔性或刚性的管状器械,用于可视化中空器官或部分(例如,食管)的内部以进行诊断或治疗目的,通常具有一个或多个工作通道以使器械(例如,钳子、手术用电刀、内窥镜注射针或剪刀)通过,或便于取出活组织检查样品。它在其远端部分包括合适的灯和成像装置,并且它可以通过身体的自然开口,例如口、肛门、耳部、鼻,或者通过小的手术切口插入。

[0005] 内窥镜检查程序广泛应用于胃肠道。例如,内窥镜检查程序可用于检查覆盖胃肠道的粘膜,并检测大小病理病变,例如炎症组织、息肉、假息肉、锯齿状病变、腺瘤、溃疡、不典型增生、肿瘤前和肿瘤形成以及肿瘤。内窥镜检查程序可用于活组织检查和病理学病变(息肉、腺瘤、不典型增生(dysplasia)、巴雷特不典型增生(Barrett's dysplasia)、肿瘤前和肿瘤形成、肿瘤)的切除。外科手术干预包括胃肠道内窥镜检查中常用的两种类型的内窥镜切除术程序以切除病理性病变:内窥镜粘膜切除术(EMR)和内窥镜粘膜下剥离术(ESD)。这两种技术允许微创治疗胃肠息肉、腺瘤、不典型增生、巴雷特不典型增生和涉及淋巴结转移风险最小的早期癌症。仍然需要用于食管的内窥镜检查程序的药剂。

发明内容

[0006] 本文公开了用于从受试者的食管区域的固有肌层中剥离粘膜和粘膜下层的方法。这些方法包括:将包含细胞外基质 (ECM) 水凝胶的药物组合物粘膜下注射到受试者食管的区域中,以在食管的粘膜下层和下层固有肌层之间形成垫,其中ECM水凝胶具有以下特征:a) 在约37°C的温度下达到50%凝胶化的时间少于30分钟;b) 适于输注到食管的流动粘度;和c) 约10至约400帕斯卡 (Pa) 的刚度,从而从食管区域的下层固有肌层剥离粘膜和粘膜下层。在一些实施方案中,这些方法还抑制受试者食管中的炎症。ECM水凝胶不是膀胱ECM水凝胶。

[0007] 在其他实施方案中,这些方法还包括;将包含细胞外基质 (ECM) 水凝胶的药物组合物粘膜下注射到受试者的食管区域中,以在食管的粘膜下层和下层固有肌层之间形成垫,从而从食管区域的下层固有肌层剥离粘膜和粘膜下层。在一些实施方案中,这些方法还抑制受试者食管中的炎症。ECM水凝胶不是膀胱ECM水凝胶。

[0008] 在一些实施方案中,剥离方法包括内窥镜粘膜切除术或内窥镜粘膜剥离术。

[0009] 从下面参照附图进行的详细描述,本发明的前述和其他目的、特征和优点将变得更加明显。

附图说明

[0010] 图1A-1E. 粘弹性。在1010°C (A) 下,以增加的剪切速率 (0.1-10001/s) 测试ELEVIEW™和食管ECM (eECM) 12mg/mL的粘度特征。温度迅速升高至37°C,以引起凝胶化并测量最大储能模量 (G') 和损耗模量 (G'') (B)。显示了ELEVIEW™ (C) 和12mg/mL的eECM水凝胶 (D) 的时间扫描的代表图。对于eECM 12mg/mL,测得达到50%凝胶化的时间,但对于Eleview™则无法测量,因为ELEVIEW™不会凝胶化 (在时间扫描测试期间 $G'' > G'$) (E)。

[0011] 图2A-2B. 粘膜粘附强度。ELEVIEW™和eECM 12mg/mL对猪食管肌层 (A) 或食管粘膜 (B) 的粘膜粘附强度。

[0012] 图3. 巨噬细胞激活。在暴露于eECM和ELEVIEW™之后,抗炎和促炎标记物的巨噬细胞表达。

[0013] 图4A-4C. 粘膜下层流体垫-食管。与ELEVIEW™相比,在注射ECM (eECM) 后,食管粘膜下层 (A) 中粘膜下层流体垫的高度随时间的测量。注射后和75分钟后,注射2mL测试剂后的组织外观 (B)。75分钟后剥离并暴露测试剂 (C)。

具体实施方式

[0014] 本文公开了细胞外基质 (ECM) 水凝胶作为用于从食管中的固有肌层剥离粘膜和粘膜下层的粘膜下层垫的用途,例如在食管内窥镜检查中通常使用的任何内窥镜切除手术中,以去除病理性病变,例如EMR和ESD。ECM水凝胶不是膀胱ECM水凝胶。

[0015] 术语

[0016] 除非另有说明,否则根据常规用法使用技术术语。分子生物学中常用术语的定义可以在Benjamin Lewin, Genes V, 由Oxford University Press出版,1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew等人 (编辑), The Encyclopedia of Molecular Biology, 由Blackwell Science Ltd. 出版,1994 (ISBN 0-632-02182-9); 和Robert A. Meyers (编辑), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, 由VCH Publishers, Inc. 出版,1995 (ISBN 1-56081-569-8) 中找到。

[0017] 为了便于审阅本公开的各种实施方案,提供了以下对特定术语的解释:

[0018] 酸性蛋白酶: 裂解肽键的酶,其中该酶在酸性pH下具有裂解肽键的增强活性。例如但不限于,酸性蛋白酶可包括胃蛋白酶和胰蛋白酶。

[0019] 巴雷特食管 (Barrett's Esophagus): 食管细胞,通常是食管下部 (远端) 中的异常变化 (化生或不典型增生)。巴雷特食管是当食管的正常分层鳞状上皮衬里的一部分被具有杯状细胞的单层柱状上皮替代时的诊断。寻求胃食管返流疾病 (GERD) 的医疗护理的患者

中,有5-15%的患者发现巴雷特食管,尽管巴雷特食管患者的大亚组没有症状。巴雷特食管与食管腺癌密切相关,被认为是一种癌前病变。巴雷特食管的主要病因被认为是对胃反流引起的慢性酸暴露的一种适应。活组织检查后,巴雷特食管的细胞可分为四大类:非不典型增生、低级不典型增生、高级不典型增生和症状明显(frank)癌。

[0020] 碱:pH大于7的化合物或化合物的溶液。例如但不限于,碱是碱性氢氧化物或碱性氢氧化物的水溶液。在某些实施方案中,碱是NaOH或NaOH的PBS溶液。

[0021] 粉碎(comminution和comminuting):将较大的颗粒减小为较小的颗粒的过程,包括但不限于通过研磨、共混、切碎、切片、碾磨、切割或切碎。ECM可以任何形式粉碎,包括但不限于水合形式、冷冻、风干、冻干、粉末状、片状形式。

[0022] 诊断:通过疾病的体征、症状和各种检查结果识别疾病的过程。通过该过程得出的结论也称为“诊断”。通常进行的检查形式包括血液检查、医学成像和活组织检查。

[0023] 剥离:分离或切开组织的过程,例如在外科手术过程中。

[0024] 内窥镜注射针或内窥镜注射针导管:装置通常是长装置(例如,长达约230cm),并且其包括长导管,在该导管内部的内注射管具有可滑动地设置的远端注射针。通常,近端致动手柄联接至导管和注射管,以使一个相对于另一个移动。针可以伸缩。通常通过手柄上的鲁尔接头将流体注入注射管。

[0025] 内窥镜注射针通常通过内窥镜的导管递送至注射部位。为了保护内腔免于损坏,在将装置插入内窥镜之前,操纵输注针装置的手柄以将远端注射针抽回到导管的内腔中。当内窥镜注射针装置的远端位于注射部位时,操纵其手柄以将注射针向远侧移出导管的内腔。在一些实施方案中,当前进到最远端位置时,注射针的暴露部分的长度可为约4-6mm。

[0026] 内窥镜粘膜切除术(EMR):开发用于去除局限于胃肠道(GI)浅表层(粘膜和粘膜下层)的无蒂或扁平赘生物的内窥镜技术。从下层固有肌层切除粘膜和粘膜下层。内窥镜粘膜剥离术(ESD)是指专门为去除较大的病变(例如,从胃肠道)而开发的内窥镜技术,其中,从胃肠道的其他层剥离粘膜和粘膜下层。EMR和ESD通常都涉及在粘膜下层和下层固有肌层之间,在靶病变下注射物质,以起到垫作用,并使粘膜下层和上层粘膜隆起。使用EMR,然后用勒除器去除隆起性病变,通过抽吸将其移动到小杯中。使用ESD,用专用刀剥离病变下的粘膜下层,引起粘膜下层和上层粘膜分离。ESD能够去除比可能使用EMR的更大且可能更深的病变部位,具有根治性目的。通过将物质注射到食管的粘膜下平面可以促进EMR和ESD,这可以有效地将上层粘膜与下层固有肌层分开,同时将粘膜隆起到邻近的食管粘膜上方。层的这种分离和患病组织的隆起有助于外科医生分离、抓握和去除目标组织。

[0027] 细胞外基质(ECM):组织和器官的非细胞成分。天然ECM(在多细胞生物(例如,哺乳动物和人类)中发现的ECM)是结构和非结构生物分子的复杂混合物,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、抗微生物剂、化学引诱剂、细胞因子和生长因子,且通常在不同组织和器官之间的具体组成有所不同。在哺乳动物中,ECM通常包含其各种形式的以干重质量计约90%胶原蛋白。由ECM组成的生物支架可以通过从给定的组织或器官中去除细胞来创建而留下ECM。ECM的组成和结构根据组织的解剖学来源而变化。例如,由于每个组织所需的独特细胞生态位,小肠粘膜下层(SIS)、膀胱基质(UBM)、膀胱粘膜下层(UBS)、食管(E)和肝基质ECM各自的整体结构和组成各不相同。完整的“细胞外基质”和“完整的ECM”生物支架由尚未溶解的细胞外基质组成,保留其3维超微结构,理想情况下保

留其结构和非结构生物分子的活性,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、抗微生物剂、化学引诱剂、细胞因子和生长因子,例如但不限于本文所述的粉碎的ECM。

[0028] 可以化学或机械地改变ECM内生物分子的活性,例如通过化学或酶促交联和/或通过透析ECM。完整的ECM基本上没有经过酶消化、交联和/或透析,这意味着ECM尚未经过消化、透析和/或交联过程,或在储存期间自然发生的过程以外的条件和在溶解前处理ECM。因此,透析的ECM(除了琐碎的方式之外,其在本质上不会影响ECM在其本文所述的用途中的凝胶化和功能特性),不认为是“完整的”。

[0029] 食管胃十二指肠镜(EGD)或上胃肠道内窥镜检查:可视化胃肠道的任何上部直至十二指肠的诊断性内窥镜检查程序。“食管内窥镜检查”是使食管可视化的任何内窥镜检查程序。食管内窥镜检查有时可以作为EGD或上胃肠道内窥镜检查的一部分进行。除非明确指出,否则这些术语并不相互排斥。

[0030] 凝胶化:由溶胶形成凝胶。

[0031] 胃食管返流疾病(GERD):从胃回流到食管的胃酸内容物引起的粘膜损伤的慢性症状。GERD通常由胃与食管之间的屏障的改变引起,包括食管下括约肌的异常松弛,食管下括约肌通常保持胃的顶部(近端部分)闭合,食管胃反流的排出受损或食管裂孔疝。这些改变可能是永久的或暂时的。

[0032] 流动粘度:流体对由剪切应力或拉伸应力引起的逐渐变形的抵抗力的量度。粘度是流体的一种性质,其与流体中以不同速度运动的两个表面之间的相对运动相反。当流体被迫通过管时,组成流体的颗粒通常在管的轴附近移动较快,而在其管壁附近则移动较慢。需要应力(例如管两端之间的压力差)以克服颗粒层之间的摩擦,以保持流体运动。对于给定的速度模式,所需的应力与流体的粘度成正比。粘度用粘度计和流变仪测量。粘度可以帕秒(Pa*s)的形式测量。20℃的水的粘度为1.002mPa*s。

[0033] 水凝胶:亲水的聚合物链网络,有时以胶体凝胶的形式存在,其中水是分散介质。水凝胶是高吸收性的天然或合成聚合物网络。水凝胶还具有与天然组织相似的柔韧程度。术语“膀胱ECM水凝胶”包括UBM和UBS水凝胶。

[0034] 炎症:由组织损伤引起的局部反应。炎症的特征在于出现或迁移到任何组织空间、单位或区域中的任何类别的白细胞的数量超过在正常(健康)情况下在该组织区域内发现的此类细胞的数量。炎症由血管组织对有害刺激物(例如,病原体、受损的细胞或刺激物)的复杂生物反应协调演化。

[0035] 等渗缓冲溶液:缓冲至pH值为7.2至7.8并具有平衡浓度的盐的溶液以促进等渗环境。

[0036] (食管的)低级不典型增生和高级不典型增生和化生:食管的病理状态以异常细胞形态为特征,但细胞类型仍可识别为鳞状上皮细胞。通常,在食管不典型增生中,食管的内衬细胞中没有顶端粘蛋白。在低倍镜下,与未累及区域相比,这些区域可能显得更深染。

[0037] 对于高级不典型增生,细胞形态学的变化变得更加明显,但从技术上讲,细胞仍是一种类型的鳞状上皮。

[0038] 当细胞从鳞状上皮细胞改变为另一种细胞类型(例如,通常形状呈立方或柱状的腺细胞)时,该过程称为化生。对于化生,通常会出现食管的腺体结构变形,并且可能会被

标记;它由隐窝的分支和侧芽生、粘膜表面的绒毛状结构、或上皮细胞的腺内桥接组成以形成“背靠背”腺体的筛状排列。粘膜表面有异常上皮细胞伴有核极性丧失,其特征是细胞核“聚集”,并且细胞核彼此之间缺乏一致关系。

[0039] 预防或治疗:抑制疾病是指抑制疾病的部分或全部发展,例如在具有患有诸如由炎症引起的疾病的风险的人中。具有食管腺癌风险的人的一个实例是患有巴雷特食管或GERD的人。抑制疾病过程包括预防疾病的发展。“治疗”是指改善疾病或病理状态的体征或症状的治疗干预措施,例如在疾病或病理状态开始发展之后。

[0040] 剪切应力:与材料横截面共面的应力分量。剪切应力由平行于横截面的力矢量分量产生。计算平均剪切应力的公式是每单位面积的力

[0041]
$$\tau = \frac{F}{A},$$

[0042] 其中 τ =剪切应力,F=施加的力,A=材料的横截面积,其面积平行于施加的力矢量。

[0043] 狭窄:食管变窄或变紧导致吞咽困难。食管狭窄的症状包括胃灼热、口中有苦味或酸味、窒息、咳嗽、呼吸短促、经常打嗝或呃逆、吞咽疼痛或困难、吐血和/或体重减轻。食管狭窄可能由胃食管反流疾病、食管炎、食管下括约肌功能障碍、蠕动紊乱、碱液摄入或食管裂孔疝引起。食管手术和其他治疗方法(例如,激光治疗或光动力治疗)后可能会形成狭窄。当该区域愈合时,会形成疤痕,导致组织拉动和紧缩,导致吞咽困难。狭窄可能是发炎的结果。钡餐检查或上胃肠道内窥镜检查可用于诊断食管狭窄。

[0044] 刚度:物体或流体的刚性。细胞外基质的刚度对于引导细胞趋硬性迁移很重要。刚度可以帕斯卡(Pa)为单位测量,其为每平方米一牛顿。

[0045] 治疗剂:在一般意义上使用,它包括治疗剂、预防剂和替代剂。“治疗(Treatment)”或“治疗(treating)”是指以足以可测量地减少、抑制或减轻任何疾病症状,减慢疾病进程或引起疾病消退的量向患者提供物质,例如ECM水凝胶。在某些实施方案中,可以在患者表现出疾病症状之前开始疾病的治疗。所公开的方法抑制食管炎症和/或减轻食管炎症的影响。

[0046] 治疗有效量:组合物(诸如ECM水凝胶)的“治疗有效量”是指当施用于患者时可有效提供诸如减轻症状的治疗益处的量。如果一定量的ECM水凝胶足以在被治疗的受试者中获得期望的效果,例如当注射到食管的粘膜下组织时形成凝胶并从下层固有肌层剥离上层粘膜,则其是治疗有效的。形成粘膜下层垫的有效量将取决于所用的制剂、待治疗的受试者、患病的严重程度和类型以及施用方式。

[0047] 在本文公开的方法中使用的ECM水凝胶在医学和兽医学环境中都有应用。因此,通用术语“受试者”或“患者”应理解为包括所有动物,包括但不限于人类或兽医受试者,例如其他灵长类动物、狗、猫、马和牛。

[0048] 膀胱ECM:源自任何哺乳动物膀胱的细胞外基质。该术语包括膀胱基质(UBM)ECM和膀胱粘膜下层(UBS)ECM。膀胱壁由以下几层组成:粘膜层(包括过渡上皮细胞层和固有膜)、粘膜下层、多达三层肌肉和外膜(疏松的结缔组织层)-从管腔到近腔侧的厚度横截面列出的。UBS由组织组合物制备,该组织组合物包括从近腔肌层和至少脊椎动物膀胱段的粘膜层的内腔部分分层的膀胱粘膜下组织(参见美国专利号5,554,389,通过引用并入本文)。UBM

ECM由膀胱上皮细胞基底膜和紧邻基底膜的固有膜制备(参见美国专利号6,576,265,通过引用并入本文)。所公开的方法不使用由膀胱ECM产生的水凝胶。

[0049] 除非另外说明,否则在此使用的所有技术和科学术语具有与由本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。除非上下文另有明确规定,否则单数术语“a”、“an”和“the”包括复数指示物。类似地,除非上下文另外明确指出,否则单词“或”旨在包括“和”。还应理解,针对核酸或多肽给出的所有碱基大小或氨基酸大小以及所有分子量或分子质量值均为近似值,并提供用于描述。虽然与本文所述的那些相似或等同的方法和材料可用于本公开的实践或检测,但下面描述合适的方法和材料。术语“包含(comprises)”是指“包括(includes)”。术语“约”表示在5%以内。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献都通过引用将其全部内容并入。在发生冲突的情况下,以本说明书(包括术语解释)为准。另外,材料、方法和实施例仅是说明性的而不旨在是限制性的。

[0050] 细胞外基质(ECM)水凝胶

[0051] 制备ECM水凝胶的方法公开在例如,美国专利号8,361,503中。任何类型的细胞外基质组织均可用于产生可用于本文公开的方法的水凝胶(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;和6,893,666)。在某些实施方案中,ECM是从脊椎动物中分离出来的,例如但不限于,从温血哺乳动物脊椎动物中分离出来的,包括但不限于人、猴、马、猪、牛和绵羊。在特定的非限制性实例中,ECM是猪或人。

[0052] ECM可以源自非膀胱的任何器官或组织,包括但不限于肠、肝、食管和真皮。ECM可以源自肾脏、心脏、子宫、大脑、血管、肺、骨、肌肉、胰腺、胃、脾脏或结肠。在一个实施方案中,ECM来自食管。在另一个实施方案中,ECM来自小肠或真皮。ECM可以包括或不包括ECM的基底膜部分。在某些实施方案中,ECM包括基底膜的至少一部分。在其他实施方案中,ECM是从细胞培养物中收获。ECM水凝胶可以通过两种或多种组织来源的组合产生。

[0053] 美国专利号6,893,666(通过引用并入本文)也公开了由皮肤、食管和小肠产生ECM。Wolf等人,Biomaterials 33:7028-7038,2012(通过引用并入本文)中公开了由脱细胞真皮ECM产生水凝胶。由食管组织产生ECM公开于例如,Badylak等人,J Pediatr Surg.35(7):1097-103,2000和Badylak等人,J.Surg.Res.2005September;128(1):87-97,2005中,二者通过引用并入本文。只要ECM不是从膀胱中产生的,就可以使用这些方法中的任何一种。

[0054] 市售的ECM制剂也可以用于本文所述的方法、装置和组合物中。在一个实施方案中,ECM来源于小肠粘膜下层或SIS。市售制剂包括但不限于,SURGISISTM、SURGISIS-ESTM、STRATASISTM和STRATASIS-ESTM(Cook Urological Inc.;Indianapolis,Ind.)以及GRAFTPATCHTM(Organogenesis Inc.;Canton Mass.)。在另一个实施方案中,ECM来源于真皮。市售制剂包括但不限于,PELVICOLTM(以PERMACOLTM在欧洲销售;Bard,Covington,Ga.)、REPLIFORMTM(Microvasive;Boston,Mass.)和ALLODERMTM(LifeCell;Branchburg,N.J.)。

[0055] 可以多种方式来收获用于制备ECM的源组织,并且一旦被收获,就可以使用所收获组织的各种部分。还已经从食管和小肠制备ECM,并且已经从该ECM制备水凝胶,参见例如,

Keane等人, *Tissue Eng. Part A*, 21 (17-18):2293-2300, 2015, 通过引用并入本文。食管ECM可通过从外肌层机械分离粘膜和粘膜下层,并在包括胰蛋白酶的缓冲液中消化粘膜层,然后将其暴露于蔗糖、TRITON-X100®、脱氧胆酸、过乙酸和DNA酶制备。小肠粘膜下层(SIS)可以通过从完整的小肠中机械去除粘膜层、浆膜和外肌层的浅表层,使粘膜下层、粘膜肌层和基底层致密完整来制备。然后用过乙酸处理SIS。示例性方案在Keane等人中提供。

[0056] 在一些实施方案中,可以通过首先将组织浸泡在去上皮细胞的溶液例如高渗盐水(例如但不限于,1.0N盐水)中10分钟至4小时的时间来使上皮细胞分层。暴露于高渗盐溶液中有效地从下层基底膜去除上皮细胞。在初始分层过程之后剩余的组织包括上皮基底膜和位于上皮基底膜的近腔的组织层。接下来,对该组织进行进一步处理,以去除大部分的近腔组织,但不去除上皮基底膜。

[0057] ECM可通过许多标准技术进行消毒或灭菌,包括但不限于,暴露于过乙酸、低剂量伽马辐射、气体等离子体灭菌、环氧乙烷处理、超临界CO₂或电子束处理。更典型地,通过浸泡在0.1% (v/v) 过乙酸、4% (v/v) 乙醇和95.9% (v/v) 无菌水中2小时来获得ECM的消毒。通过用PBS (pH=7.4) 洗涤两次时间为15分钟并用无菌水洗涤两次时间为15分钟来去除过乙酸残留物。ECM材料可以通过环氧丙烷或环氧乙烷处理、伽马辐照处理(0.05至4mRad)、气体等离子体灭菌、超临界CO₂或电子束处理进行灭菌。还可以使用戊二醛处理对ECM进行灭菌,这会引起蛋白质材料的交联,但是这种处理方法会实质上改变材料,使其被缓慢再吸收或根本不被再吸收,并引发不同类型的宿主重塑,它更像是瘢痕组织形成或包囊而不是建设性重塑。蛋白质材料的交联也可以用碳二亚胺或脱水热或光氧化方法诱导。如美国专利号8,361,503中所述,将ECM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小时进行消毒。然后将ECM材料用PBS (pH=7.4) 洗涤两次时间为15分钟,并用去离子水洗涤两次时间为15分钟。

[0058] 在分离出目标组织之后,可以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®或其他去污剂中。消毒和脱细胞可以同时进行。例如但不限于,上述用过乙酸消毒也可用于使ECM脱细胞。然后,可以将脱细胞的ECM干燥、冻干(冷冻干燥)或风干。可以通过包括但不限于撕裂、碾磨、切割、研磨和剪切的方法粉碎干燥的ECM。粉碎的ECM还可通过例如但不限于,例如处于冷冻或冷冻干燥状态的研磨或碾磨的方法进一步加工成粉末形式。

[0059] 为了制备用于制备ECM水凝胶的溶解的ECM组织,将粉碎的ECM在酸性溶液用酸性蛋白酶消化以形成消化液。ECM的消化液通常在室温下持续搅拌一定时间。ECM消化液可以立即使用,也可以在-20℃下储存或在例如但不限于-20℃或-80℃下冷冻。

[0060] 一旦将ECM溶解(通常基本上完全溶解),溶液的pH就升高到7.2至7.8,并且根据一个实施方案,升高到pH 7.4。碱,例如含氢氧离子的碱(包括NaOH),可用于升高溶液的pH。同样地,缓冲剂,例如等渗缓冲剂,包括但不限于磷酸盐缓冲盐水(PBS),可用于使溶液达到目标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和离子状态。这形成“预凝胶”溶液。该预凝胶在室温下为液体形式的粘稠溶液。中和的消化液(预凝胶)可以在接近37℃的温度下凝胶化,其中该温度接近生理温度。在一些实施方案中,该方法通常在凝胶化之前不包括透析步骤,产生更完整的ECM样基质,该基质通常在37℃下以特定速率凝胶化(见下文)。

[0061] 因此,ECM通常可源自哺乳动物组织,例如但不限于真皮、食管、小肠、肾脏、肝脏、心脏、子宫、大脑、血管、肺、骨、肌肉、胰腺、胃、脾或结肠中的一种。ECM不是膀胱,因此不是UBM或UBS。

[0062] ECM水凝胶可以由两种或更多种组织来源,例如2、3或4种组织来源产生。在一个非限制性实施方案中,将ECM冻干并粉碎。然后,将ECM用酸性蛋白酶在酸性溶液中溶解,以产生消化的ECM,例如食管ECM。酸性蛋白酶可以是但不限于,胃蛋白酶或胰蛋白酶或其组合。然后,可将ECM在适用于或最佳用于蛋白酶的酸性pH下溶解,例如大于约pH 2,或在pH至4之间,例如在0.01M HCl溶液中。取决于组织类型(例如,参见以下实施例),在混合(搅拌、搅动、掺和、共混、旋转、倾斜等)下,通常将溶液溶解约12至约48小时。ECM水凝胶通过(i)粉碎细胞外基质,(ii)通过在酸性溶液中用酸性蛋白酶消化来溶解完整的、未透析的或未交联的细胞外基质,以产生消化液,(iii)将消化液的pH升高至pH 7.2至7.8之间以产生中和的消化液(预凝胶溶液),以及(iv)在目标受试者的食管内在约37℃的温度下使溶液凝胶化进行制备。当使用酸性蛋白酶消化ECM时,预凝胶溶液和所得的水凝胶可能包含灭活的蛋白酶。

[0063] 当暴露在约37℃的温度下时,ECM水凝胶会形成凝胶。可以将“预凝胶”形式的ECM水凝胶冷冻并储存在例如但不限于-20℃或-80℃下。“预凝胶”形式的ECM水凝胶可在室温(例如约25℃)下储存。因此,ECM水凝胶在低于37℃下为预凝胶形式,例如在25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4℃下。ECM水凝胶可以冷冻储存,因此可以在低于0℃下储存。如本文所用,术语“预凝胶形式”或“预凝胶”是指其中pH增加但尚未凝胶化的ECM水凝胶。例如但不限于,预凝胶形式的ECM水凝胶的pH在7.2至7.8之间。可以使用内窥镜以预凝胶形式将ECM水凝胶递送至受试者。

[0064] 预凝胶形式的ECM水凝胶适合引入患者的食管中。一旦粘膜下引入到约37℃的食管中,ECM水凝胶就会凝胶化,并在食管的固有肌层和粘膜下层之间形成ECM水凝胶垫,提起粘膜下层进行手术切除。不受理论的束缚,ECM水凝胶包括许多天然的可溶性因子,例如但不限于细胞因子。本文公开了由多种组织制备的非透析的(整个ECM)制剂的具体特征。

[0065] 在一些实施方案中,ECM水凝胶具有以下特征:a)在约37℃的温度下达到50%凝胶化的时间少于30分钟;b)适于输注到食管的流动粘度;和c) i) 约10至约400帕斯卡(Pa), ii) 约10至约450Pa; iii) 约10至约600Pa, iv) 约5至约1,000Pa, v) 约10至1,000Pa, 或vi) 约10至约70Pa的刚度。

[0066] 在实施方案中,ECM水凝胶具有以下特征:a)在约37℃的温度下达到50%凝胶化的时间少于30分钟;b)适于输注到食管的流动粘度;和c) 约10至约300帕斯卡(Pa)的刚度。在其他实施方案中,ECM水凝胶具有以下特征:a)在约37℃的温度下达到50%凝胶化的时间少于30分钟;b)适于输注到食管的流动粘度;和c) 约10至约450帕斯卡(Pa)的刚度。在其他实施方案中,ECM水凝胶具有以下特征:a)在约37℃的温度下达到50%凝胶化的时间少于30分钟;b)适于输注到食管的流动粘度;和c) 约10至约600帕斯卡(Pa)的刚度。

[0067] 在其他实施方案中,ECM水凝胶具有以下特征:a)在约37℃的温度下达到50%凝胶化的时间少于30分钟;b)适于输注到食管的流动粘度;和c) 约5至约1,000帕斯卡(Pa)的刚度。在其他实施方案中,ECM水凝胶具有以下特征:a)在约37℃的温度下达到50%凝胶化的时间少于30分钟;b)适于输注到食管的流动粘度;和c) 约10至约1,000帕斯卡(Pa)的刚度。

在更多实施方案中,ECM水凝胶具有以下特征:a)在约37℃的温度下达到50%凝胶化的时间少于30分钟;b)适于输注到食管的流动粘度;和c)10-70帕斯卡(Pa)的刚度。

[0068] 在一些实施方案中,ECM水凝胶具有以下特征:a)在约37℃的温度下达到50%凝胶化的时间少于30分钟;b)适于输注到食管的流动粘度;和c) i) 约10至约400帕斯卡(Pa), ii) 约10至约450Pa; iii) 约10至约600Pa, iv) 约5至约1,000Pa, v) 约10至1,000Pa, 或vi) 约10至约70Pa的刚度。

[0069] 在一些实施方案中,ECM水凝胶具有以下特征:a)在约37℃的温度下达到50%凝胶化的时间少于20分钟;b)适于输注到食管的流动粘度;和c) i) 约10至约400帕斯卡(Pa), ii) 约10至约450Pa; iii) 约10至约600Pa, iv) 约5至约1,000Pa, v) 约10至1,000Pa, 或vi) 约10至约70Pa的刚度。

[0070] 在实施方案中,ECM水凝胶具有以下特征:a)在约37℃的温度下达到50%凝胶化的时间少于20分钟;b)适于输注到食管的流动粘度;和c)约10至约300帕斯卡(Pa)的刚度。在其他实施方案中,ECM水凝胶具有以下特征:a)在约37℃的温度下达到50%凝胶化的时间少于20分钟;b)适于输注到食管的流动粘度;和c)约10至约450帕斯卡(Pa)的刚度。在其他实施方案中,ECM水凝胶具有以下特征:a)在约37℃的温度下达到50%凝胶化的时间少于20分钟;b)适于输注到食管的流动粘度;和c)约10至约600帕斯卡(Pa)的刚度。

[0071] 在其他实施方案中,ECM水凝胶具有以下特征:a)在约37℃的温度下达到50%凝胶化的时间少于20分钟;b)适于输注到食管的流动粘度;和c)约5至约1,000帕斯卡(Pa)的刚度。在其他实施方案中,ECM水凝胶具有以下特征:a)在约37℃的温度下达到50%凝胶化的时间少于20分钟;b)适于输注到食管的流动粘度;和c)约10至约1,000帕斯卡(Pa)的刚度。在更多实施方案中,ECM水凝胶具有以下特征:a)在约37℃的温度下达到50%凝胶化的时间少于20分钟;b)适于输注到食管的流动粘度;和c)10-70帕斯卡(Pa)的刚度。

[0072] 在另一个实施方案中,ECM水凝胶具有以下特征:a)在约37℃下达到50%凝胶化的时间少于10分钟;b)足以注射到食管中的流动粘度;c)约10至约300帕斯卡(Pa)的刚度;和d)水凝胶是食管水凝胶。

[0073] 在具体的非限制性实例中,ECM水凝胶是食管水凝胶。在其他具体的非限制性实例中,ECM水凝胶可以由两种或更多种组织来源产生。在另外的非限制性实例中,ECM水凝胶可以由真皮、食管或小肠产生。ECM水凝胶不是膀胱ECM水凝胶。

[0074] 在另外的具体的非限制性实例中,通过以下方式产生ECM水凝胶:(a)通过在酸性溶液中使用酸性蛋白酶消化组织来溶解无细胞的细胞外基质(ECM)以产生消化的ECM;(b)将消化的ECM的pH升高到pH 7.2至7.8之间,以产生中和的消化液;(c)将消化的ECM稀释至ECM水凝胶的浓度为约2mg/ml至约16mg/ml,例如约8mg/ml至约12mg/ml。然后将该水凝胶引入受试者的食管中,在其中凝胶化。在一个非限制性实例中,ECM可以是食管ECM。

[0075] 在本文公开的方法中使用的ECM水凝胶在约37℃的温度下达到50%凝胶化的时间少于30分钟,例如少于29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3分钟。在一些实施方案中,ECM水凝胶在约37℃的温度下达到50%凝胶化的时间少于10分钟。在一些实施方案中,在约37℃的温度下达到50%凝胶化的时间为约2至约30分钟。在另外的实施方案中,在约37℃的温度下达到50%凝胶化的时间为约2至约10分钟。在更多的实施方案中,达到50%凝胶化的时间为约3至约10分钟。在其他实施方案中,在

约37℃的温度下达到50%凝胶化的时间为约3至约30分钟。在另外的实施方案中,在约37℃的温度下达到50%凝胶化的时间为约4至约10分钟。仍在其他实施方案中,在约37℃的温度下达到50%凝胶化的时间为约5至约10分钟或约10至约20分钟。

[0076] 所公开的ECM水凝胶可以具有适合于输注到食管中的流动粘度。在一些实施方案中,ECM水凝胶在0.2/s的剪切速率下具有约10至约100Pa*s的流动粘度,例如在0.2/s的剪切速率下约10、20、30、40、50、60、70、80或90Pa*s的流动粘度。在另外的实施方案中,在约0.1/s的剪切速率下的流动粘度为约0.1至约100Pa*s,在1000/s的剪切速率下的流动粘度为约0.01至约0.2Pa*s。在更多的实施方案中,在1/s的剪切速率下的流动粘度为约0.1至约30Pa*s,在约100/s的剪切速率下为约0.02至约0.8Pa*s。

[0077] 在一些实施方案中,ECM水凝胶在1/s的剪切速率下的流动粘度为约0.1至约30Pa*s。在另外的实施方案中,ECM水凝胶在约0.1/s的剪切速率下具有约0.1至约100Pa*s的流动粘度。在具体的非限制性实例中,ECM水凝胶在0.1/s的剪切速率下的流动粘度为0.5至约50Pa*s,或ECM水凝胶的流动粘度为约1至约40Pa*s。在0.1/s的剪切速率下的示例性流动粘度为约0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90或100Pa*s。

[0078] 在其他实施方案中,ECM水凝胶在1000/s的剪切速率下具有约0.01至约0.20Pa*s的流动粘度,或在1000/s的剪切速率下具有约0.01至约0.10Pa*s的流动粘度,例如在1000/s的剪切速率下约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或0.2。

[0079] 在更多的实施方案中,ECM水凝胶在100/s的剪切速率下具有约0.02至约0.8Pa*s,或在100/s的剪切速率下具有约0.1至约0.8Pa*s,例如约0.02、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或0.8Pa*s。

[0080] 在其他实施方案中,ECM水凝胶在1/s的剪切速率下的流动粘度为约0.1至约30Pa*s,例如约1至约20Pa*s,或1至约10Pa*s,或0.5至25Pa*s,例如在1/s的剪切速率下为约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25或30Pa*s。在1/s的剪切速率下,剪切速率可以是例如5、10、20或30Pa*s。在其他实施方案中,ECM水凝胶在100/s的剪切速率下具有约0.02至约0.8的流动粘度,例如在100/s的剪切速率下约0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7或0.8。在1/s的剪切速率下的流动粘度可为约0.1至约30Pa*s,并且在100/s的剪切速率下为约0.02至约0.8Pa*s。在其他实施方案中,在1/s的剪切速率下的流动粘度为约1至约10Pa*s,并且在100/s的剪切速率下为约0.02至约0.5。

[0081] 在另外的实施方案中,ECM水凝胶在0.1/s的剪切速率下具有约10至约100Pa*s的流动粘度。在其他实施方案中,ECM水凝胶在1000/s的剪切速率下具有约0.01至约0.2Pa*s的流动粘度。在其他实施方案中,ECM水凝胶在0.1/s的剪切速率下具有约1至约40Pa*s的流动粘度,并且在1000/s的剪切速率下为0.01至0.2Pa*s。

[0082] 公开的ECM水凝胶具有的刚度为i) 约10至约400帕斯卡(Pa), ii) 约10至约600Pa, iii) 约5至约1,000Pa, iv) 约10至1,000Pa,或v) 约10至约70Pa。ECM水凝胶可具有约10至约300帕斯卡(Pa)的刚度,例如约10至约70Pa,约10至约100帕斯卡(Pa),或约10至约150Pa,约10至约200Pa,或约10至约300Pa。在一些实施方案中,公开的ECM水凝胶具有约10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65或70Pa的刚度。在其他实施方案中,公开的ECM水凝胶具有约

10至约80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390或400Pa的刚度。在另外的实施方案中,公开的ECM水凝胶可具有约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或300Pa的刚度。

[0083] 在一些实施方案中,水凝胶中的ECM浓度为约2mg/ml至约20mg/ml,例如约8mg/ml至约12mg/ml或约2mg/ml至约16mg/ml。在其他实施方案中,水凝胶中的ECM浓度为约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16mg/ml。使用的示例性浓度包括但不限于,约9mg/ml至约11mg/ml,和约10mg/ml至约12mg/ml。其他示例性浓度包括约8mg/ml至约10mg/ml、约8mg/ml至约11mg/ml、约8mg/ml至约13mg/ml、约8mg/ml至约14mg/ml、约8mg/ml至约15mg/ml、和约8mg/ml至约16mg/ml。使用的另外的示例性浓度还包括约6mg/ml至约12mg/ml、约13mg/ml、约14mg/ml、约15mg/ml或约16mg/ml。

[0084] 公开的ECM水凝胶可以作为试剂盒的组件提供。ECM水凝胶可以冷冻或冻干形式提供。在一些实施方案中,试剂盒可包括形成水凝胶所需的组件,例如一个包含水凝胶的容器,例如以冻干形式,一个包含用于溶解冻干的水凝胶的溶液的容器,以及任选地包含用于中和溶解形式的中和溶液的容器。在其他实施方案中,试剂盒可包括包含溶解的水凝胶的容器和包含中和剂的第二容器。

[0085] 任选地,这种试剂盒包括附加组件,包括包装、说明书和各种其他试剂,例如缓冲液、底物或其他治疗成分。试剂盒可包括容器以及在容器上或与容器相关的标签或包装说明书。合适的容器包括例如,瓶、小瓶、注射器等。容器可以由多种材料形成,例如玻璃或塑料。容器通常容纳包括ECM水凝胶的组合物,例如以冷冻或冻干形式,其对于抑制受试者的食管炎症和/或减轻食管炎症的影响是有效的。在几个实施方案中,容器可以具有无菌接入端口(例如,容器可以是静脉输液袋或具有可被皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。标签或包装说明书指示该组合物用于特定状况如结肠直肠癌的内窥镜检查程序。

[0086] 标签或包装说明书通常还将包括使用说明。包装说明书通常包括通常包含在治疗产品的商业包装中的使用说明,该说明包含关于使用此类治疗产品的适应症、用法、剂量、施用、禁忌症和/或注意事项的信息。说明材料可以电子形式(例如,计算机软盘或光盘)书写,也可以是可视的(例如,视频文件)。试剂盒还可以包括附加组件,以方便针对特定应用设计试剂盒,例如针头或导管。试剂盒可另外包括常规用于实施特定方法的缓冲液和其他试剂。试剂盒和适当的内容物是本领域技术人员众所周知的。

[0087] 细胞外基质 (ECM) 水凝胶

[0088] 治疗方法

[0089] 本文公开了用于从受试者的食管中的固有肌层剥离粘膜和粘膜下层的方法,这些方法包括将包含细胞外基质 (ECM) 水凝胶的药物组合物粘膜下注射到食管中,其中ECM水凝胶不是膀胱ECM水凝胶(例如,UBS或UBM),以在食管区域的粘膜下层和下层固有肌层之间形成垫。该方法可以是EMR或EMD。

[0090] EMR是一种内窥镜技术,开发用于去除局限于胃肠道浅表层(粘膜和粘膜下层)的无蒂或扁平赘生物。EMR通常用于去除小于2cm的病变或零碎去除较大的病变。EMR在评估切除标本以进行准确的病理分期中也起着重要作用。与息肉切除术相反,EMR涉及通过向粘膜下层注射流体剂(通常为生理盐水(NS)溶液)来从肌肉层提升病变。EMR也可用于获取标本

以进行准确的组织病理学分期以确定淋巴结转移的风险。EMR通过切除肠壁粘膜下层的中部或较深部分,促进病变粘膜的完全去除。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术的方法:(1)注切法;(2)注射、提升和切割方法;(3)帽辅助EMR(EMRC);和(4)套扎EMR(EMRL)。在注切技术中,通过创建粘膜下流体垫将患病粘膜从肌肉层提升,捕获,使用手术用电勒除器绞勒,然后切除。然而,向薄粘膜下层注射是一个精准过程,注射的溶液往往会迅速消散,与隆起的病变相比,使用勒除器难以捕获平坦和凹陷的病变,并且难以去除较大或位于死角的病变(Uraoka等人,Drug Design,Development and Therapy 2008:2131-138)。注射辅助EMR通常用于大的平坦结肠息肉。

[0091] 内窥镜粘膜下剥离术(ESD)是专门开发用于去除较大病变。使用手术用电刀沿粘膜下层直接剥离病变,即使大面积病变也可整块切除。预计ESD可以代替传统的手术来治疗某些癌性分级,但由于其穿孔和出血并发症的发生率比常规EMR高,因此与EMR相比,它需要更高层次的内窥镜技术和经验。ESD可以使用多种手术用电刀,例如绝缘头透热刀、针刀、钩刀、弯刀(flex knife)、三角刀、平头刀(flush knife)、喷溅针和小口径尖端透明罩。这些刀可与高频手术用电流(HFEC)发生器一起使用。ESD特征在于三个步骤:(1)注射流体以形成粘膜下层垫,从肌肉层抬高病变;(2)环绕切除病变周围的粘膜;和(3)剥离病变下方的粘膜下层结缔组织(参见Kakushima等人,Wold J.Gastroenterol.14(9):2962-2967,2008,通过引用并入本文)。先前已经开发各种粘膜下层注射溶液,并显示在EMR期间使用是令人满意的,但是引入更长的ESD程序需要更长效的溶液,以帮助在剥离粘膜下层期间确定切割线(Uraoka等人,Drug Design,Development and Therapy 2008:2131-138)。本公开的方法满足该需求。

[0092] EMR中使用了粘膜下层注射,因为将流体注射到粘膜下层垫中有助于在捕获靶病变之前(例如使用勒除器)分离要去除的组织,从而减少热损伤以及穿孔和出血的风险同时也便于切除。粘膜下层注射在EMR程序中起着重要作用,因为溶液必须在适当的位置保留足够的时间,并且需要形成半球形状以利于勒除。此外,提供足够高的粘膜下层高度导致在ESD程序期间安全地进行粘膜下切割(Uraoka等人,Drug Design,Development and Therapy 2008:2131-138)。此外,由于程序引起的炎症,保留在程序部位的任何垫都应具有抗炎特性。ECM水凝胶将减轻狭窄并促进再上皮化。本公开的方法也满足该需求。

[0093] 在一些实施方案中,所公开的方法利用具有抗炎特性,并且廉价、无毒、易于注射并提供高、持久的粘膜下层垫的ECM水凝胶。ECM水凝胶以预凝胶形式施用,然后在注射部位凝胶化以形成垫。可以在程序期间剥离垫,使得一些水凝胶保留在下层固有肌层上,从而帮助愈合。公开的ECM水凝胶有助于闭合由去除切除的粘膜/粘膜下层而产生的伤口。在一些实施方案中,该程序是ESD。在其他实施方案中,该程序是EMR。

[0094] 生理盐溶液(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)已用作内窥镜切除术的粘膜下层垫,但是这些溶液的固有特性由于溶液的快速分散,使其难以产生适当的粘膜下层流体垫,保持期望的高度并将垫保持在期望位置。此外,在ESD中,一旦粘膜/粘膜下层被去除,这些试剂将不会保留在下层固有肌层上。此外,这些试剂对愈合过程无帮助,例如通过减少炎症。使用ECM水凝胶满足这些需求。

[0095] 本文公开的ECM水凝胶可以在任何ESD或ESR中使用。如美国专利号9,364,580(通过引用并入本文)所公开的,内窥镜注射针是可以是很长的(高达约230)cm并且包括相对长

的导管的装置,在其中可滑动设置具有远端注射针的内部注射管。需要时,近端致动手柄联接至导管和注射管,以使一个相对于另一个移动。通常通过手柄上的鲁尔接头将流体注入注射管。内窥镜注射针装置通常通过内窥镜的工作通道被递送到注射部位。为了保护内窥镜工作通道的内腔不受损害,在将装置插入内窥镜之前,操纵输液针装置的手柄以将远端注射针抽回到导管的内腔中。当装置通过内窥镜的内腔移动时,这防止注射针的尖点暴露。当内窥镜注射针装置的远端位于注射部位时,再次操纵其手柄以将注射针向远侧移出导管的内腔。当前进到最远端位置时,注射针的暴露部分的长度约为4-6mm。

[0096] 在刺穿注射部位后,通常装在5ml至10ml的配备有连接到注射针手柄的鲁尔锁接头的注射器中的预凝胶形式的ECM可以通过注射管和针递送到注射部位,例如在粘膜下层和下层固有肌层之间。

[0097] 在内窥镜程序期间通常使用的注射针和其他配件(例如,用于息肉切除术的勒除器、剪切装置、活体取样钳等)穿过内窥镜的一个或多个特定通道,通常称为工作通道或操作通道。根据所使用的内窥镜的类型,工作通道的内径可能会有所不同。然而,在GI内窥镜检查中使用的最常见的内窥镜具有内径在约2mm至约5mm范围内的工作通道。通常,内窥镜配件的制造商生产具有允许它们适合所有工作通道的外径的配件。在一些实施方案中,内窥镜注射针的导管的外径在1.9mm至2.3mm的范围内,例如约1.9、2.0、2.1、2.2或2.3cm。因此,考虑到内部注射管包含在外部导管中,其内径通常为1mm或更小。预凝胶形式的公开的ECM水凝胶可以容易地通过这些导管。

[0098] 可以将预凝胶形式的ECM水凝胶用于内窥镜切除术手术中,通过注射器从其主容器中吸取一定体积的乳剂,并通过插入直接位于浅表粘膜层下方的内窥镜的工作通道中的内窥镜注射针注射适量的所述乳剂,以将液体体积沉积到粘膜下层中,其在适当位置成为垫:粘膜表面的隆起使内窥镜医师可以轻松切除在内窥镜检查程序中发现的粘膜病变,即使病变是平坦的,因此没有伸入内腔(例如,食管内腔)。

[0099] 垫中至少有一种染料的存在可以帮助内窥镜医师观察粘膜下的结构(例如,粘膜下层和外肌壁),从而降低内窥镜医师进行切除程序可能对所述结构造成损伤的风险。染料的使用可以使垫腔和粘膜基底可视化。从粘膜表面去除病变会产生粘膜伤口。由药物组合物的注射量产生的垫的持久性允许内窥镜切除程序得以执行而无需重新注射。预凝胶形式的ECM水凝胶被粘膜下注射到受试者的食管中,例如在病变或肿瘤区域,以在食管区域的粘膜下层和下层固有肌层之间形成垫。可以剥离垫,使得一部分ECM水凝胶保持在下层固有肌层上,并有助于愈合过程。

[0100] 所公开的方法可用于食管。在非限制性实例中,该方法包括从食管剥离食管癌或腺癌的方法。在另一个非限制性实例中,该方法包括从患有巴雷特食管的受试者的食管中剥离粘膜和粘膜下层。

[0101] 本文所公开的ECM水凝胶被维持在其凝胶化的温度或低于其凝胶化的温度下,例如在室温或低于室温(例如,约25℃)下。在施用前,ECM水凝胶可保持在例如,25℃或4℃下。然后,将有效量的预凝胶形式的ECM水凝胶施用于受试者的食管。ECM水凝胶可以冻干或冷冻的形式提供,并在施用于受试者之前复溶。

[0102] 所公开的方法可用于任何受试者,包括人类和兽医受试者。受试者可以是任何年龄。在一个实施方案中,将包含预凝胶形式的ECM水凝胶的组合物注射到人的靶组织中以形

成垫,然后将其任选地进行内窥镜手术程序,例如切除程序。ECM可以来自与接受治疗的受试者相同的物种,也可以来自不同的物种。在一些实施方案中,受试者是人,并且ECM水凝胶来源于人和/或猪组织。在其他实施方案中,ECM水凝胶来源于非人灵长类、狗、猫、马或牛。ECM也可以来自商业来源。ECM水凝胶不是膀胱ECM水凝胶,例如UBM或UBS。

[0103] 公开的方法是侵入性的,因为它们需要从食管区域的固有肌层剥离粘膜和粘膜下层的注射。本文公开的任何方法可包括将包含ECM水凝胶的药物组合物粘膜下注射到受试者的食管中,以在食管区域的粘膜下层和下层固有肌层之间形成垫。ECM水凝胶具有以下特征:a)在约37℃的温度下达到50%凝胶化的时间少于20分钟;b)适于输注到食管的流动粘度;和c)约10至约400帕斯卡(Pa)的刚度。ECM水凝胶凝胶化并将粘膜和粘膜下层从下层固有肌层中剥离,并抑制受试者食管区域中的炎症。预凝胶形式的ECM水凝胶可以通过内窥镜或经由导管施用。

[0104] 在一些实施方案中,切除程序是内窥镜粘膜切除术或食管内窥镜粘膜下剥离术,并且该方法包括从食管中剥离食管癌或腺癌的方法。在更多的实施方案中,该方法包括从患有不典型增生的患者的食管中剥离粘膜和粘膜下层。在更多的实施方案中,该方法包括从患有巴雷特食管的受试者的食管中剥离粘膜和粘膜下层。

[0105] 该方法还可包括在垫上进行内窥镜切除程序。在一些实施方案中,该方法包括分割垫,使得水凝胶保留在食管的下层固有肌层上,并且从食管区域中去除粘膜和粘膜下层。在一些非限制性实例中,保留在下层固有肌层上的水凝胶垫的部分下调了食管中促炎性巨噬细胞激活。

[0106] ECM可以来源于膀胱以外的任何组织。因此,水凝胶不是UBM或UBS。在一些实施方案中,在约37℃的温度下,水凝胶达到50%凝胶化的时间少于30分钟。在一些特定的非限制性实例中,在约37℃下达到50%凝胶化的时间为约2至约30分钟。在其他具体的非限制性实例中,在约37℃下达到50%凝胶化的时间为约2至约10分钟。在另外的非限制性实例中,达到50%凝胶化的时间为约3至约10分钟。

[0107] 在另外的实施方案中,预凝胶形式的流动粘度足以注射到食管。在一些实施方案中,ECM水凝胶在约0.1/s的剪切速率下的流动粘度为约0.1至约100Pa*s,在1000/s的剪切速率下的流动粘度为约0.01至约0.2Pa*s。在一些非限制性实例中,在1/s的剪切速率下的流动粘度为约30Pa*s,并且在约100/s的剪切速率下为约0.02至约0.8Pa*s。

[0108] 在另外的实施方案中,ECM水凝胶在引入组织时具有约10至约300帕斯卡(Pa)的刚度;其中ECM水凝胶具有10-70Pa的刚度。在另外的实施方案中,水凝胶中的ECM浓度为2mg/ml至约16mg/ml。

[0109] 可以通过本文公开的任何方法来生产ECM水凝胶。在一些实施方案中,ECM水凝胶通过(a)通过在酸性溶液中用酸性蛋白酶消化组织来溶解脱细胞的细胞外基质(ECM)以产生消化的ECM;和(b)将消化的ECM的pH升高到pH 7.2至7.8之间以产生中和的消化液制备。在另外的实施方案中,升高消化的ECM的pH的步骤(b)包括添加碱或等渗缓冲液以升高消化的ECM的pH。在另外的实施方案中,使用酸性蛋白酶,例如胃蛋白酶、胰蛋白酶或其组合。ECM水凝胶可以是食管ECM水凝胶。

[0110] 在一些实施方案中,在施用给受试者之前,将ECM水凝胶维持在25℃或更低。在一些实施方案中,将ECM水凝胶维持在约4℃至约28℃,例如约4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、

15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27或28℃。ECM水凝胶可保持在约4℃下,并在约4℃至约25℃下使用,或临用前加热至仅约25℃。在一些实施方案中,控制温度确保ECM水凝胶保持其预凝胶形式,因此适合于在粘膜下层和下层固有肌层之间注射。在另外的实施方案中,水凝胶在施用于受试者时,例如在达到例如37℃的温度时凝胶化。

[0111] 实施例

[0112] ELEVIEW™和ECM水凝胶是不同的生物材料。ELEVIEW™(Aries Pharmaceuticals, Inc, Dublin, Ireland)是Poloxamer 188的市售低粘度乳液,临床上可用于为EMR和ESD程序提供粘膜下提升。本文公开了ELEVIEW™在37℃下不会形成稳定形成的水凝胶,而是在37℃下在一个小时内保持液态。相反,12mg/mL的食管ECM水凝胶(eECM)(根据本文公开的方法制备的,即通过ECM的蛋白酶消化)形成在37℃(体温)下稳定形成的水凝胶。ELEVIEW™和eECM可以注射到粘膜下方。理想的生物材料将粘附在两层上。ELEVIEW™和eECM 12mg/mL对肌肉的粘膜粘附强度没有差异。令人惊讶地,eECM对粘膜的粘膜粘附力比ELEVIEW™强。此外,eECM通过巨噬细胞极化向重塑表型表现出生物活性。这表明细胞外基质水凝胶可有效地用作粘膜下层垫,因此可用于从下层固有肌层中剥离粘膜下层。

[0113] 实施例1

[0114] 材料和方法

[0115] 流变学

[0116] 用温度控制的40mm平行板流变仪(AR2000)测定ELEVIEW™和eECM 12mg/mL的粘弹性。将样品保持在4℃并加载到预冷至10℃的具有平行板几何形状 of 的流变仪上。矿物油用于密封样品板界面,并在测试期间最大程度地减少蒸发。依次对每个样品进行一系列流变测试。进行在10℃下的稳态流动曲线以确定在剪切速率范围(0.1-1000s⁻¹)下样品的粘度分布。板温度从10℃迅速升高到37℃,并通过在1rad/s的频率下施加小的0.5%的振动应变以在37℃下进行振荡时间扫描,测量最大储能模量(G')、最大损耗模量(G'')和凝胶化动力学。提取数据并在Prism(版本6, GraphPad)中进行分析用于统计分析(n=3)。

[0117] 粘膜粘附到肌层

[0118] 通过从下层肌层中剥离粘膜和粘膜下层来机械分离猪粘膜和肌层。将ELEVIEW™和eECM(12mg/mL)移液管吸取至6孔板中。将粘膜或肌层粘在置于ELEVIEW™或eECM顶部的半球(直径40mm)的底面上,以便与ELEVIEW™或eECM接触的粘膜或肌层的表面积对所有测试保持恒定。将构建体在37℃下孵育1小时以粘附于粘膜或肌层。1小时后,将构建体放置在具有10N载荷传感器和球破裂附件的MTS Insight拉伸机上,将其设置为10Hz的测量频率。将球破裂附件牢固地附接到半球,并将半球以5mm/min的速度升高。最大力值被认为是粘附力,减去自由悬挂构建体的力。如果粘膜或肌层与水凝胶之间发生脱离,测量才是可接受的(n=3)。

[0119] 离体粘膜下层流体垫性能

[0120] 将猪食管置于37℃的孵化器中,并用温度计监测其温度,直到组织达到37℃。在达到目标温度后,使用23G针以12mg/mL将2mL的ELEVIEW™或中和的eECM注射到粘膜下层中。在该程序期间,将eECM保持在冰上。对组织进行评估,并以15分钟的时间间隔在度量证明旁边拍照,时间长达75分钟。在整个程序中,将组织保持在37℃下孵育。在75分钟后,剥离并评估注射有测试剂的区域。在整个实验过程中,在注射药剂后,使用ImageJ量化粘膜的高度。

[0121] 巨噬细胞分离和激活

[0122] 如前所述收获小鼠骨髓[1,2]。简言之,通过CO₂吸入和脱颈使6至8周龄雌性C57b1/6小鼠(Jackson Laboratories,Bar Harbor,ME)安乐死。无菌地,去除从近端后肢到足的皮肤,使骨和膝关节脱节,并分离胫骨。使髌股关节脱节以分离股骨。在去除多余的组织后,将骨保持在冰上,并在含有巨噬细胞完全培养基的无菌培养皿中冲洗,该巨噬细胞完全培养基由DMEM(Gibco,Grand Island,NY)、10%胎牛血清(FBS)(Invitrogen,Carlsbad,CA)、10%L929上清液[2]、50μM的β-巯基乙醇(Gibco)、100U/ml的青霉素、100μg/ml的链霉素、10mM的非必需氨基酸(Gibco)和10mM的hepes缓冲液组成。切断骨头的末端,并用完全培养基冲洗骨髓腔以收集骨髓。洗涤细胞,以 2×10^6 个细胞/ml铺板,并使其在37℃,5%CO₂下分化为巨噬细胞时间为7天,如前所述每48小时更换完全培养基[3]。在7天后,将所得天然巨噬细胞用由在DMEM中的10%FBS、100μg/ml链霉素、100U/ml青霉素组成的基础培养基处理,并且如前所述的下列条件之一:(1)20ng/ml IFN γ 和100ng/ml LPS以促进M1样表型,(2)20ng/ml IL-4以促进M2样表型,(3)250μg/ml的胃蛋白酶对照缓冲液,(4)250μg/ml的食管ECM,或(5)在37℃,5%CO₂下相同体积的ELEVIEW™时间为24小时[4]。

[0123] 巨噬细胞的免疫标记

[0124] 在24小时后,洗涤巨噬细胞并用2%多聚甲醛固定。在PBS洗涤后,将细胞在由0.1%Triton-X 100、0.1%吐温20、4%正常山羊血清和2%牛血清白蛋白(BSA)组成的封闭溶液中在室温下孵育1小时,以防止非特异性抗体结合。在封闭溶液中稀释以下一抗:(1)对于泛-巨噬细胞标记物在1:100稀释下的单克隆抗F4/80(Abcam,Cambridge,MA),(2)对于M2标记物在1:100稀释下的多克隆抗iNOS(Abcam,Cambridge,MA),(3)对于M2标记物在1:100稀释下的多克隆抗Fizz1(Peprotech,Rocky Hill,NJ),(4)对于M2标记物在1:100稀释下的肝精氨酸酶(Abcam,Cambridge,MA)的多克隆[5-7]。将细胞在一抗中于4℃下孵育16小时。在PBS洗涤后,将细胞在荧光团缀合的二抗(Alexa Fluor山羊抗大鼠488或山羊抗兔488,Invitrogen)中于室温下孵育1小时。在PBS洗涤后,在用活细胞显微镜对三个200倍场成像之前,用4'6'双脒基-2-苯基吡啶(DAPI)对细胞核进行复染。将曝光时间标准化为阴性同型对照,并在图像之间保持恒定。使用CellProfiler图像分析软件对图像进行定量,以获得阳性F4/80、iNOS、Fizz1和Arginase1百分比。

[0125] 体内使用ECM作为EMR的粘膜下流体垫

[0126] 用乙酰丙嗪(0.01mg/kg,SC)和氯胺酮(5-11mg/kg)诱导麻醉,并通过气管内导管用1-5%异氟烷维持手术平面麻醉。在整个程序过程中和术后即刻,向动物I.V.施用2ml/kg/h的乳酸林格氏液。通过放置在动物下方的热水循环加热垫控制温度。在该程序期间监测生理参数,例如心脏、呼吸率、体温和反应性。在开始程序前,施用25mg/kg的头孢唑林进行抗生素预防。

[0127] 用Pantax EG3430K内窥镜将动物置于仰卧位置,以评估器官。在确定器官中的参考点之后,通过使用Olympus Injectorforce 4mm 23G针头以8mg/ml注射蓝色染色水凝胶,将切除部位的粘膜和粘膜下层分开。始终保持该温度以防止凝胶化和针头的潜在堵塞。每个部位注射约2-5ml的蓝色凝胶。使用套扎EMR技术去除粘膜的整个周缘(100%),长度为5cm。对于EMR,使用带有结扎带的Cook Duette试剂盒。然后使用勒除器切除粘膜。

[0128] 统计学

[0129] 使用双因素方差分析来比较自变量剪切速率和样品对因变量粘度的影响;并比较自变量样本和模量类型对因变量模量的影响。使用Sidak事后多重比较检验,并使用95%置信区间确定显著性,并校正多重比较的p值。进行t检验,用于比较ELEVIEW™和eECM 12mg/mL的粘膜粘附强度。

[0130] 实施例2

[0131] 粘弹性

[0132] ELEVIEW™在0.11/s剪切速率下的粘度显著低于eECM 12mg/mL ($p < 0.0001$),并在11/s下趋向于显著性较小 ($p = 0.054$) (图1A)。ELEVIEW™没有形成稳定形成的水凝胶,因为损耗模量(G'')平均值(0.09 ± 0.04 Pa)大于储能模量(G')平均值(0.05 ± 0.01 Pa),同时遵循稳定形成的ECM水凝胶的定义,eECM 12mg/mL具有储能模量(G') (56.95 ± 66.72 Pa),其比损耗模量(G'') (7.62 ± 6.30 Pa)大约一个数量级(Freytes等人,Biomaterials,2008.29(11):p.1630-7) (图1B)。ELEVIEW™的时间扫描的代表图进一步证明ELEVIEW™不会形成水凝胶(图1C),而eECM 12mg/mL的储能模量呈S形增长并随时间平稳(图1D)。因此,对于eECM 12mg/mL (4.5 ± 3.5 min),可以计算达到50%凝胶化的凝胶化时间,而对于ELEVIEW™,则不能计算(图1E)。

[0133] 实施例3

[0134] 对肌层的粘膜粘附力

[0135] ELEVIEW™ (0.16 ± 0.05 N) 和eECM (0.21 ± 0.08 N) 没有显示出与肌层明显不同的粘膜粘附性(图2A)。与ELEVIEW™ (0.15 ± 0.06 N) 相比,eECM对粘膜具有更高的粘膜粘附强度 (0.37 ± 0.02 N) ($p = 0.0053$) (图2B)。

[0136] 实施例4

[0137] 巨噬细胞激活

[0138] 暴露于eECM的巨噬细胞显示出FIZZ1的激活,FIZZ1是一种具有最小iNOS表达的抗炎标记物(促炎标记物)。iNOS表达在ELEVIEW™、eECM和载体(胃蛋白酶)对照之间相当(图3)。ELEVIEW™没有显示任何生物活性。

[0139] 实施例5

[0140] 离体粘膜下层流体垫性能

[0141] ELEVIEW™和eECM通过向食管中注射2mL测试剂成功地创建了流体垫。两种测试剂可以很容易地用23G针头注射。从注射的那一刻起,ELEVIEW™似乎开始扩散。高度的测量和宏观外观证实了这一观察结果(图4)。食管在0到15分钟没有高度损失(图4)。ELEVIEW™的高度损失比eECM更大。两种测试剂的高度持续下降,但是很明显,ELEVIEW™在食管中的损失更大。

[0142] 在75分钟后剥离,在食管中显示出ELEVIEW™和eECM之间的差异。注射ELEVIEW™的区域显示粘稠液体,对粘膜或下层肌肉层无明显粘附。先前注射过eECM的区域显示残留并粘附在粘膜和下层肌肉上的清晰和明确质量的凝胶。(图4)。这与证明ELEVIEW™不能形成凝胶的上述结果(参见实施例2)一致(图1D)。

[0143] 实施例6

[0144] 体内使用ECM作为EMR的粘膜下流体垫

[0145] ECM水凝胶可通过一根长内窥镜针头递送,没有任何阻力。成功实现并维持粘膜的

抬高,以促进EMR程序,且蓝色染料可见,表明这些位置是为了切除而产生的剥离。使用勒除器将组织取出。在肉眼观察时,去除的粘膜组织包括一部分凝胶。去除粘膜后,水凝胶中的蓝色染料似乎会扩散到食管的整个周缘,并且通过使用水凝胶可以实现全周长。

[0146] 鉴于可以应用公开的发明的原理的许多可能的实施方案,应当认识到,图示的实施方案仅是本发明的优选实例,而不应被视为对本发明范围的限制。相反,本发明的范围由所附权利要求书限定。因此,我们要求所有落入这些权利要求的范围和精神内的发明作为我们的发明。

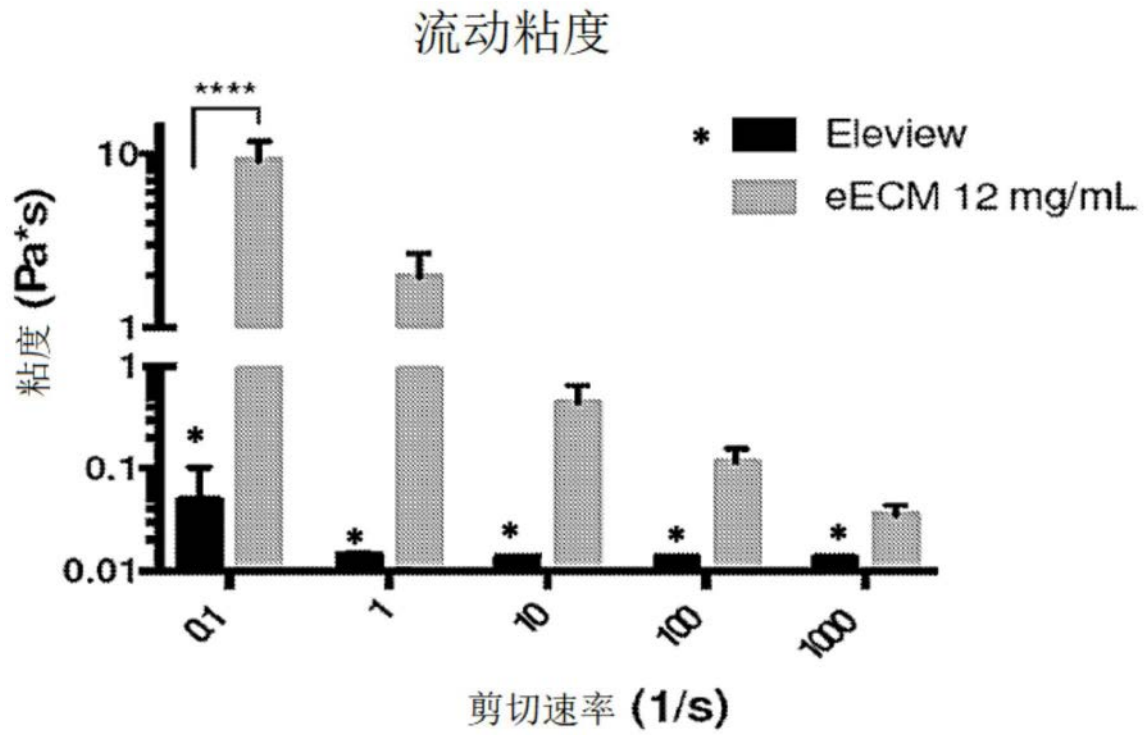


图1A

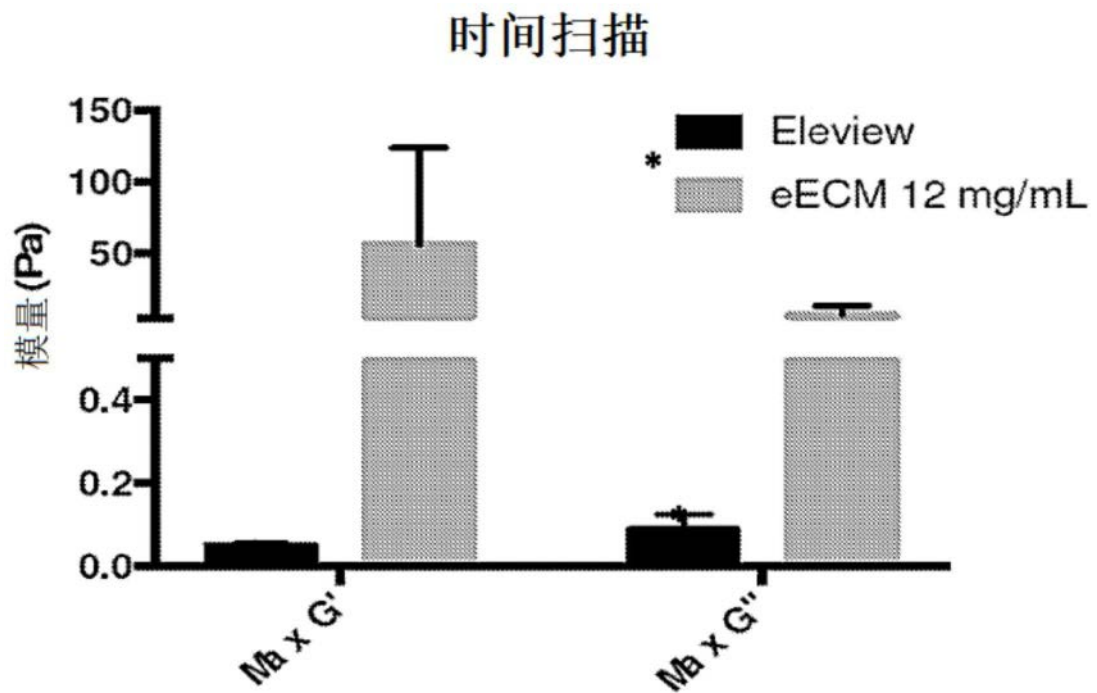


图1B

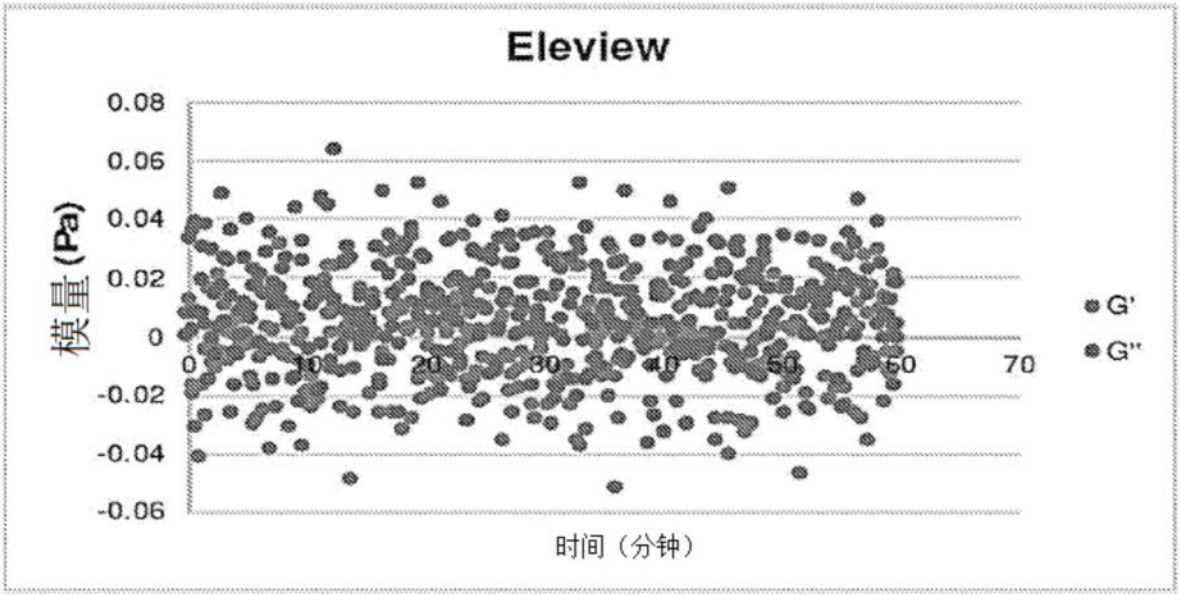


图1C

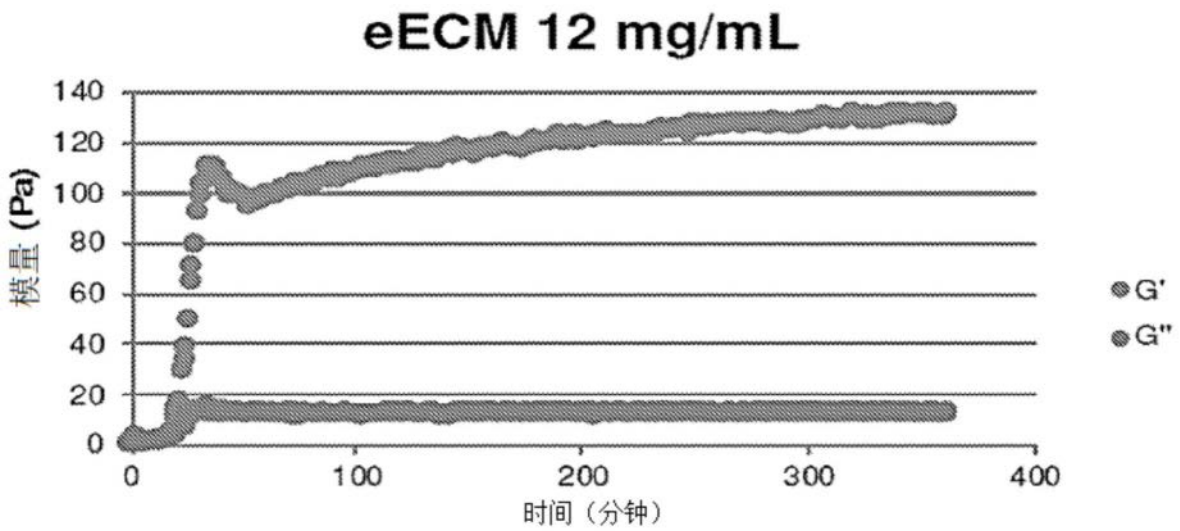


图1D

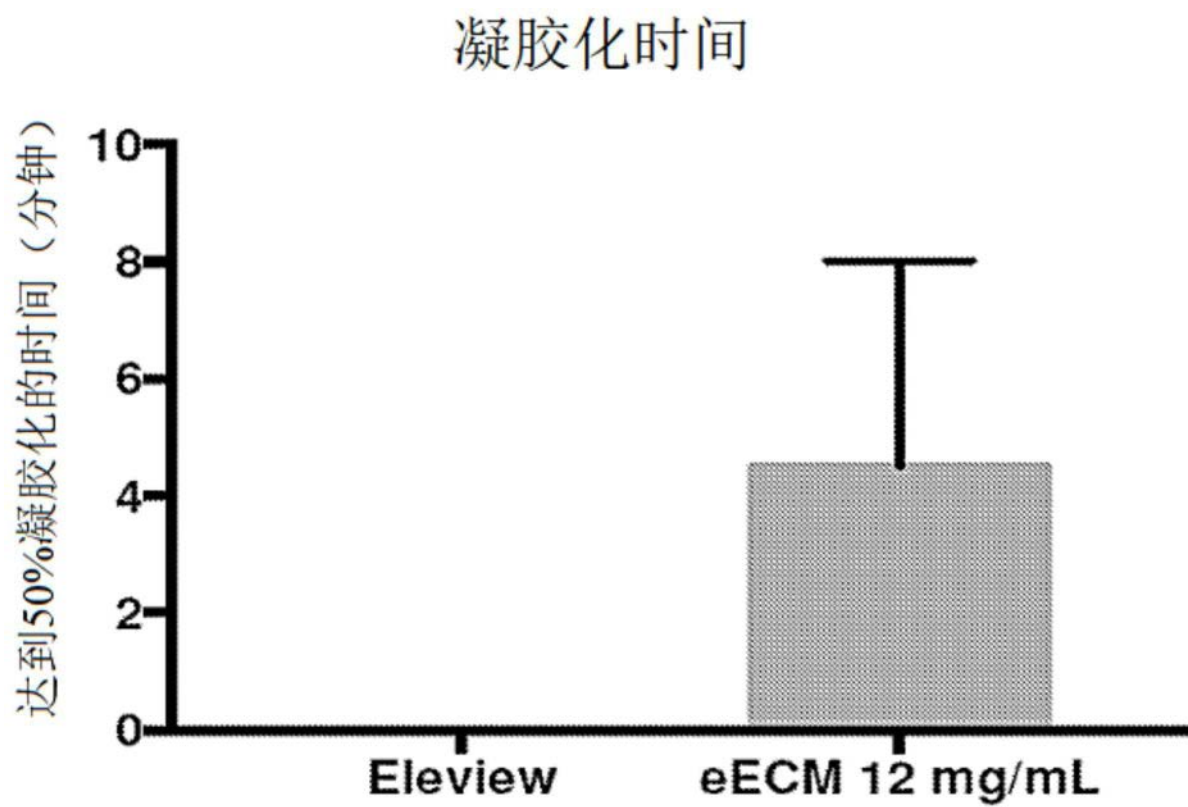


图1E

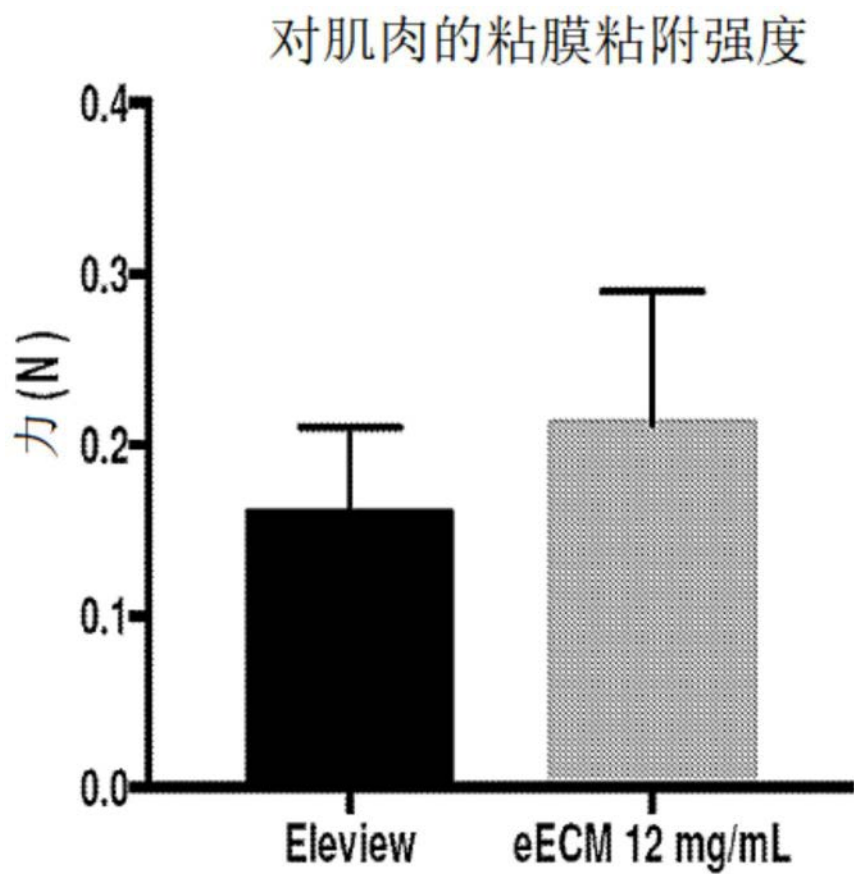


图2A

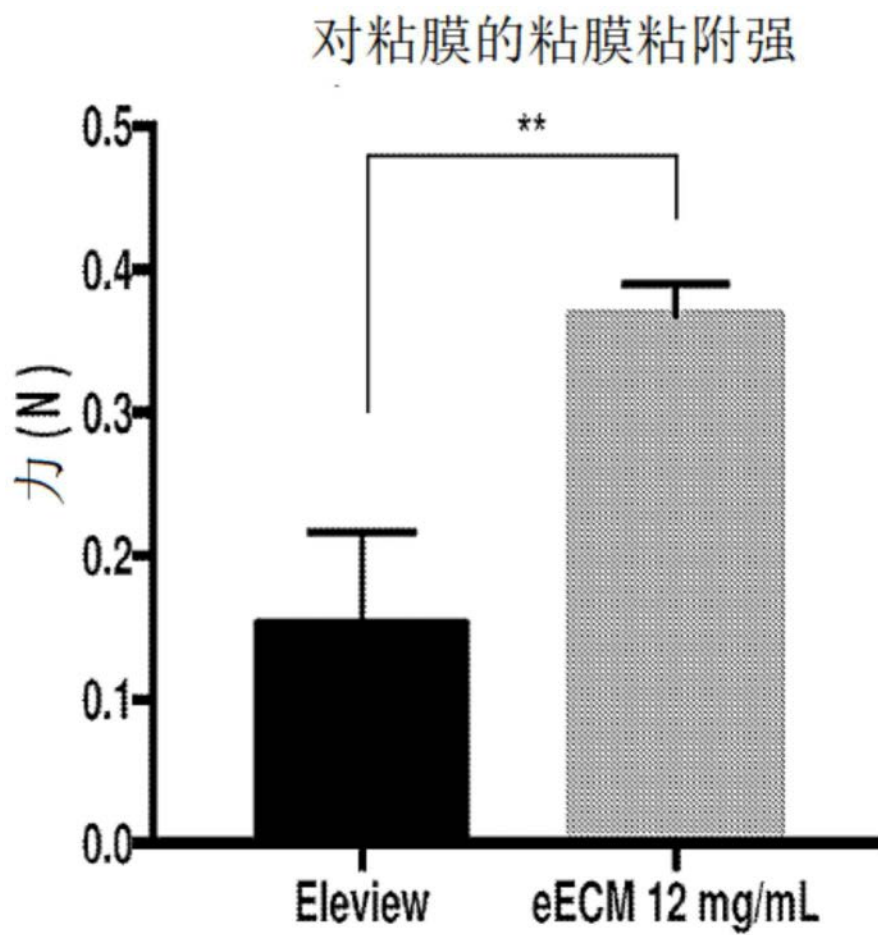


图2B

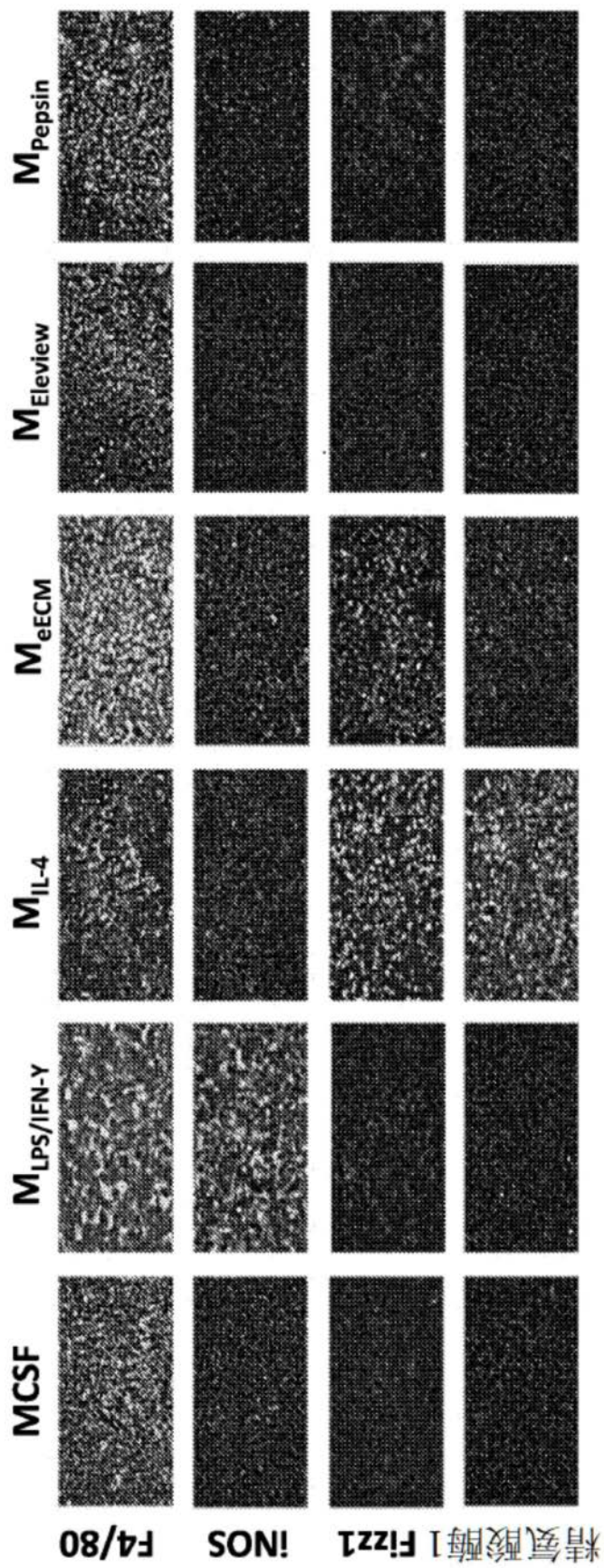


图3

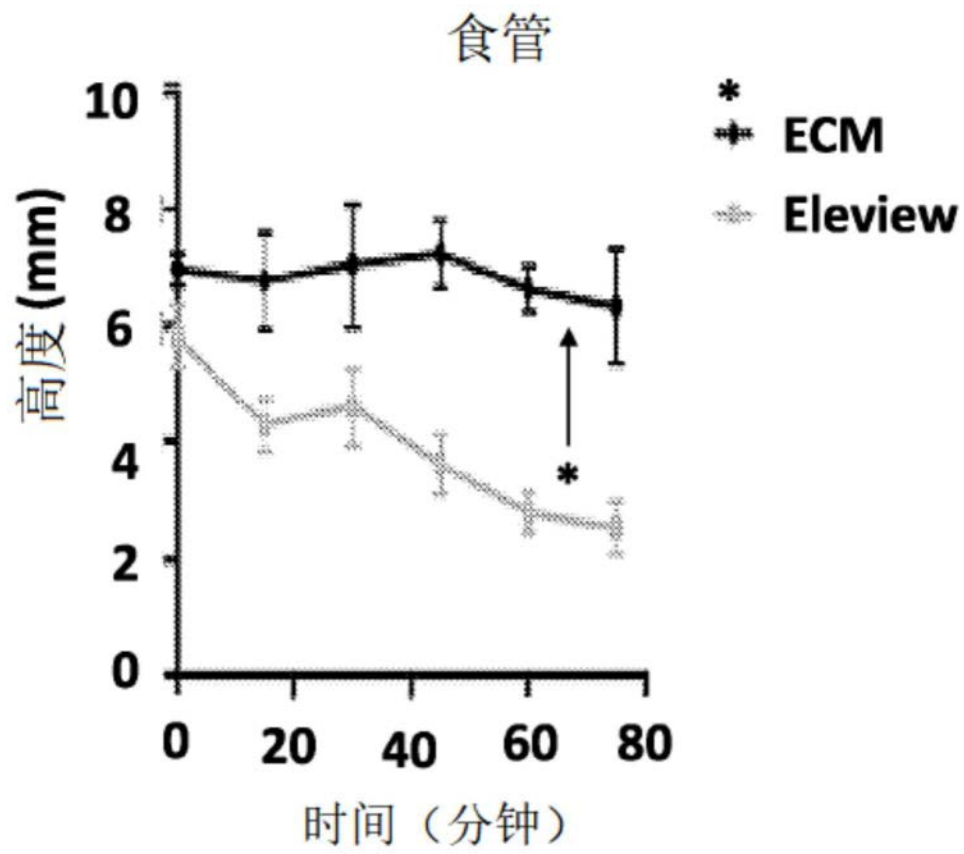


图4A

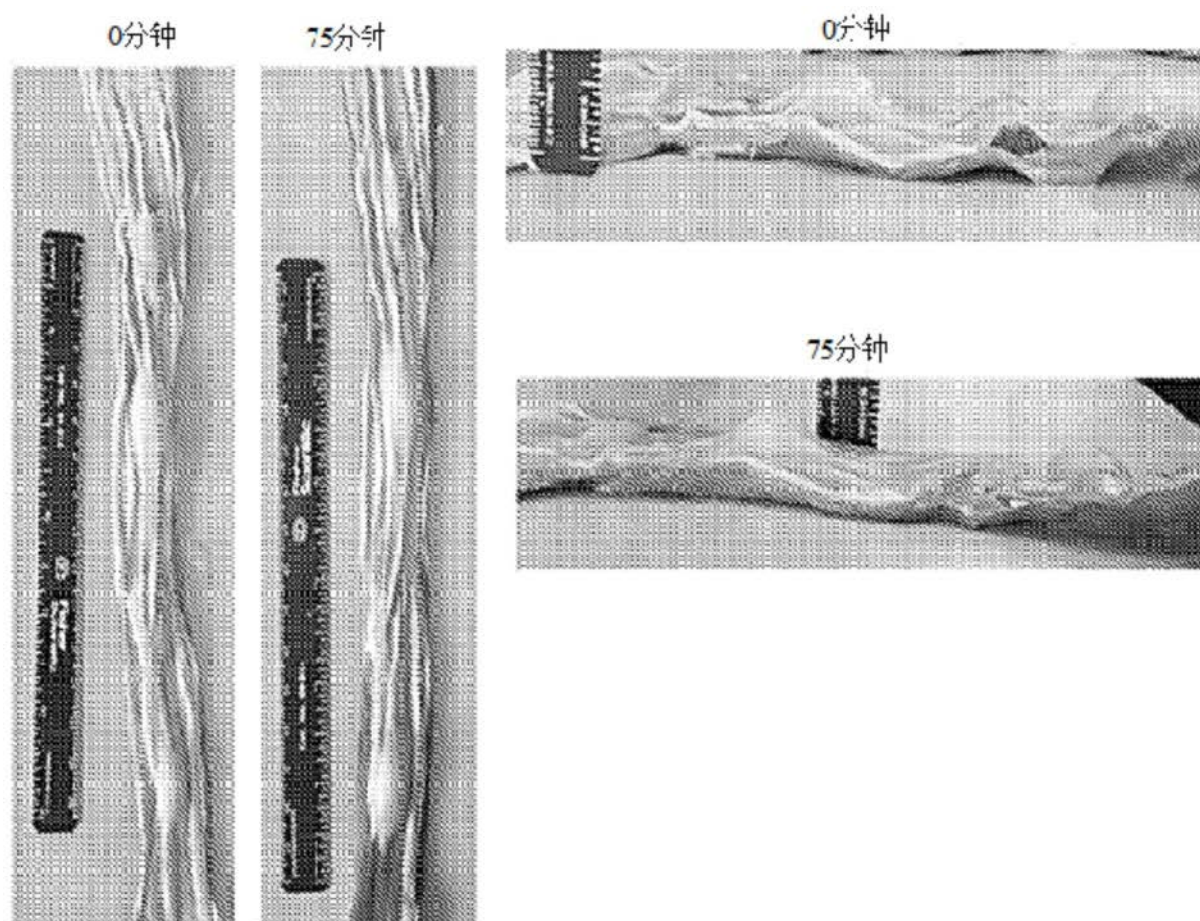


图4B

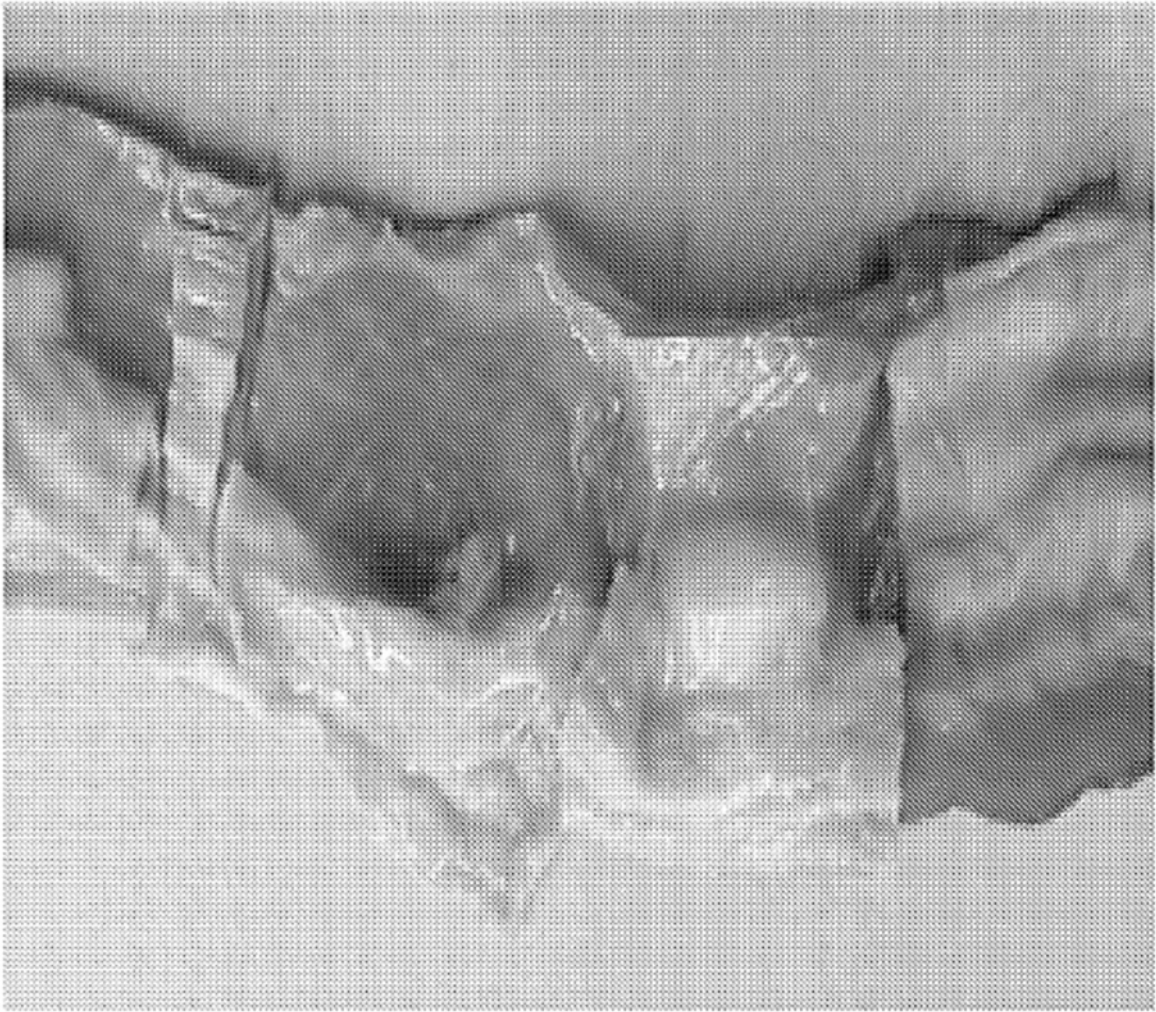


图4C