



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101902980 A

(43) 申请公布日 2010. 12. 01

(21) 申请号 200880122063. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 11. 14

A61B 18/18 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61N 5/02 (2006. 01)

60/996, 377 2007. 11. 14 US

A61N 5/04 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 06. 21

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2008/065620 2008. 11. 14

(87) PCT申请的公布数据

W02009/063083 EN 2009. 05. 22

(71) 申请人 新波医药系统股份有限公司

地址 瑞士尼翁

(72) 发明人 J·戈古塞夫 J·布凯德若兰尼耶

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

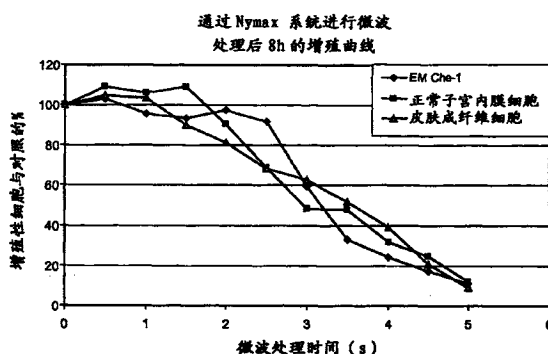
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 6 页

(54) 发明名称

射频场对细胞生长的作用和用于腹腔镜处理的方法

(57) 摘要

本发明涉及射频 / 微波处理装置的用途及其对细胞生长和存活的作用, 并且特别是在子宫内膜异位细胞的更具体实施方式中。在另一方面, 本发明涉及射频 / 微波能量在所需群体中影响细胞生长的用途, 同时基本上避免对邻近或附近细胞的有害加热和破坏作用。使用所述装置, 对细胞和组织的特定处理方案和控制能量输出可以影响人的特定细胞和疾病, 例如, 涉及不受控制或有害细胞生长的那些。



1. 处理细胞以阻止细胞增殖的方法,其包括以下述一种或多种的 RF/MW 能量处理细胞:具有平均功率 10W 的约 2.45GHz 以 1 秒到 15 秒的所需时间段;或约 5 到约 125 焦耳之间,并且测量下述中的一种或多种:随着时间的过去细胞生长或增殖的减少;关于集落形成的能力;或基因组 DNA 降解。

2. 用于测定用于细胞的细胞生长抑制 RF/MW 处理的方法,其包括对所述细胞应用来自双极装置的 RF/MW 能量,并且测量下述中的一种或多种:随着时间的过去细胞生长或增殖的减少;关于集落形成的能力;或基因组 DNA 降解。

3. 处理子宫内膜异位的方法,其包括提供 RF/MW 发射装置,并且递送约 5 至约 125 焦耳,由此用于生长或集落形成的细胞能力得以减少。

4. 权利要求 3 的方法,其中使用最低限度侵入性技术将所述发射装置插入体内。

5. 用于处理子宫内膜异位或细胞增殖性疾病的 MW 发射装置,其包括用于发射 MW 的手提式双极尖端,所述手提式双极尖端包括在腹腔镜手术棒(wand)内,所述装置能够递送约 25 至约 125 焦耳,或在约 10W 下约 2.54GHz 以 1 至 15 秒。

6. 权利要求 5 的装置,其经配置用于人中的子宫内膜异位的腹腔镜处理。

7. 如权利要求 1 中要求的用于处理有此需要的患者中的子宫内膜异位的方法,其中递送 RF/MW 能量的装置经配置用于人中的腹腔镜手术,并且由此所述处理导致对与所述子宫内膜异位相关的增殖性细胞的细胞损害。

8. 如权利要求 1-4 或 7 中任一项的方法,其进一步包括用荧光或自体荧光化合物处理细胞或组织,由此所述处理面积或细胞通过荧光进行指示。

射频场对细胞生长的作用和用于腹腔镜处理的方法

[0001] 本申请要求于 2007 年 11 月 14 日提交的美国临时申请号 60/996,377 的优先权利,所述美国临时申请的完整内容通过引用合并入本文。

发明领域

[0002] 本发明涉及用于处理组织的装置和方法以及能量转移对细胞的作用。在一个特别方面,本发明涉及射频/微波处理装置的用途及其对细胞生长和存活的作用,并且在一个更具体的实施方式中,其对子宫内膜异位细胞的作用。在另一个方面,本发明涉及射频/微波能量在所需群体中影响细胞生长的用途,同时基本上避免对邻近或附近细胞的有害加热和破坏作用。因此,在一个方面,本发明涉及能量处理对细胞和组织控制。如下文所示,对细胞短的集中处理导致细胞增殖速率的显著减少和/或细胞 DNA 的降解。基于对特定细胞和组织的作用,可以设计和/或控制处理以避免或基本上避免对周围细胞的热破坏。处理的装置和方法可以在许多疾病条件中使用,包括但不限于子宫内膜异位。

[0003] 发明关联性和相关领域描述

[0004] 存在通过暴露于射频(RF)能量用于诱导对活细胞的毒性作用的各种方法。对于大多数部分,在这些处理中使用的 RF 场给细胞加热,最终导致细胞死亡或损害。由于几个原因,包括细胞之间和组织内的热转移,该作用一般包括相对大的面积并且不限于特定细胞。

[0005] 作为细胞增殖性疾病的一个类型,子宫内膜异位是特征在于组织如子宫内膜(子宫的衬里)的生长超过子宫或在子宫外的常见医学病状。该疾病影响全世界估计 90,000,000 名女性(通常约 30 至 40 岁从未怀孕过的女性)。在其他罕见病例中,子宫内膜异位也在皮肤、肺、眼、横膈膜和脑组织中发现。

[0006] 处理一般经由手术,并且备选方案,尤其是腹腔镜或最低限度侵入性的方法是希望的。然而,一般的 RF 装置和处理不是特异性的,具有副作用,并且不采用对细胞生长的控制作用。

[0007] 发明概述

[0008] 在一个方面,本发明满足了用于处理增殖性或受损害细胞的改良方法的需要。在其他方面,该方法可以用于引起细胞损害并且在特定细胞或组织子集中诱导修复。因此,各种细胞处理方法和方案可以包括在本发明的范围中。部分地,这些处理基于对经处理细胞的特定作用的识别,作用可以在组织内的大小和程度中得到控制和限制。在另一个方面,本发明的方法涉及测量射频/微波处理对细胞和组织的作用。在另一个方面,本发明涉及减少细胞生长或增殖的处理。

[0009] 更特别地,本文的发现指出通过射频/微波(RF/EMFs)场处理子宫内膜异位细胞、基质细胞和成纤维细胞抑制了它们增殖和集落形成能力。因此,RF/MW 处理可以是用于各种细胞和组织处理方法的重要工具和方法,所述处理方法包括子宫内膜异位病变的腹腔镜处理、衰老或受损害皮肤的处理、以及人和动物的相似处理。

[0010] 本公开内容自始至终,申请人参考期刊论文、专利文件、出版参考文献、网页和其

他信息来源。本领域技术人员可以使用任何所引用的信息来源的完整内容,以利用且使用本发明的方面。各自和每一个所引用的信息来源特别通过引用整体合并入本文。允许或需要时,这些来源的部分可以包括在这个文件中。然而,本公开内容中特别定义或解释的任何术语或短语的含义不应由任何来源的内容修饰。下述说明书和实施例仅示例本发明的范围和本公开内容的内容,并且不限制本发明的范围。事实上,本领域技术人员可以设想且构建下文列出的实施例的众多修饰,而不背离本发明的范围。

[0011] 附图简述

[0012] 图 1 描述了在用多个时间段的 MW 能量处理后 8 小时测量的增殖性细胞的 % 的曲线图。使子宫内膜 (EM Che-1) 细胞与正常子宫内膜细胞和皮肤成纤维细胞相比较。

[0013] 图 2 描述了在用多个时间段的 MW 能量处理后 72 小时测量的增殖性细胞的 % 的曲线图。再次,使子宫内膜 (EM Che-1) 细胞与正常子宫内膜细胞和皮肤成纤维细胞相比较。在 3 秒或更多秒的处理后存在的增殖性细胞的百分比极低,指出这种 3-5 秒的处理足以抑制在条件下的增殖。

[0014] 图 3、4 和 5 显示在对照处理、2 秒 MW 处理 (2s) 和 5 秒 MW 处理 (5s) 后的培养细胞。

[0015] 图 6、7 和 8 显示在对照处理、2 秒 MW 处理 (2s) 和 5 秒 MW 处理 (5s) 后的培养细胞。

[0016] 图 9A 和 9B 显示在对照 (9A) 与 MW 处理 (9B) 细胞比较中的集落形成能力。

[0017] 图 10 显示来自对照处理的细胞,用 MW 处理 1 秒 (1s)、2 秒 (2s) 和 3 秒 (3s) 的细胞的凝胶电泳分离的基因组 DNA。标记 DNA (M) 显示在左侧。特别地在 2s 和 3s 条带中可见 DNA 的明显降解。

[0018] 示例性实施方案的详述

[0019] 在一个方面,本发明涉及 RF/MW 能量对多种细胞类型,包括子宫内膜异位和成纤维细胞的用途。子宫内膜异位细胞系 EM. Che-1、正常子宫内膜基质细胞和人皮肤成纤维细胞在具有 10% FCS、L- 谷氨酰胺和抗生素的 DMEM 培养基中进行培养。对于 RF/MW 处理, Nymax 装置 (如待审批申请 PCT/EP2007/059486 或 US 11/882,453 中描述的装置) 用于细胞处理。细胞在 96 微孔板中生长,并且暴露于所需能量场 (2450MHz) 多个时间段。评估了经过数小时 / 数天的细胞生长的进展、随着时间的过去的集落形成能力和 DNA 断裂的发生。多种方法可以用于测量在经处理的细胞中的这些特征或作用,包括 BrDU 掺入测定法、在 MATRIGEL 膜中的三维细胞生长操作、和通过细胞 DNA 的电泳。

[0020] 在处理,经处理的 EM. Che-1、基质细胞和皮肤成纤维细胞在培养 3 小时、24 小时和 49 小时后的生长曲线,显示增殖速率的显著减少。与基质细胞和皮肤成纤维细胞的那种相比较,EM. Che-1 细胞的生长抑制更强烈。此外,EM. Che-1 细胞的集落形成能力在处理 (3 秒) 后减少 42% $\pm$ 3,这在处理后约 8 天进行评估,并且与对照相比较。

[0021] 可以将本文描述的处理方法并入众多人和动物处理方案中,所述处理方案包括如 Chapron, 等人 (Hum Reproduct. 14 :329-332 (1999)) 描述的子宫内膜异位的处理、以及如 PCT/EP2007/059486 或 US 11/882,453 中描述的皮肤斑点和皱纹的处理。涉及增殖细胞的选择性破坏的其他病状例如癌症也可以从本文描述的方法中获益。

实施例

[0022] 子宫内膜异位细胞培养模型 (1)

[0023] 命名为 Em Che-1 的人细胞系得自来自 35 岁患者的腹膜结节的活组织检查。细胞在 DMEM+10% FCS+L- 谷氨酰胺 + 抗生素中在基底膜基质 (MATRIGEL™ Basement Membrane Matrix ;BDBiosciences) 上生长。细胞显示出基质样、粘附细胞形态,并且具有在基质中形成集落的能力。细胞类似异常核型,但具有细胞角蛋白 8、9、18 标记蛋白质,雌激素受体 (ER) 和孕酮受体 (PR) 的一致表达。细胞显示于图 4 和 5 中。

[0024] 子宫内膜异位细胞培养模型 (2)

[0025] 经培养的自体子宫内膜基质细胞 (图 7 和 8 中所示) 维持在补充有 10% FCS、L- 谷氨酰胺和抗生素的 DMEM 培养基中。

[0026] 人皮肤成纤维细胞 (图 3 和 6) 也可以在 MW 处理中使用,并且用于对照,与增殖子宫内膜细胞相比较。

[0027] 细胞增殖速率可以使用本领域已知的测定法,例如 TACS™ XTT 细胞增殖测定法 (Trevigen, Inc) 进行确定。类似地,集落形成能力可以通过在 MATRIGEL™ (BD Biosciences) 中培养进行确定,并且细胞 DNA 断裂可以使用经分离的基因组 DNA 的标准凝胶电泳进行评估。

[0028] RF/MW 暴露系统

[0029] RF/MW 处理装置 (如待审批申请 PCT/EP2007/059486 或 US11/882, 453 中描述的) 通过双极、手提式探针用于允许非常精确的能量转移。细胞可以在 96 孔板中维持亚融合,暴露于具有平均功率 10W 的 2.45GHz 以多个时间,例如约 1 秒到约 12.5 秒。一般的能量递送可以是约 5 到约 125 焦耳之间。

[0030] 结果

[0031] RF/MW 对细胞生长的作用

[0032] 在暴露于 RF 以不同时间 (0 至 5 秒) 后, EM. Che-1 子宫内膜异位细胞、自体子宫内膜基质细胞和人皮肤成纤维细胞的生长曲线 (在 8 小时和 76 小时后,图 1 和 2) 显示增殖速率的显著减少。图 3-8 中的细胞显微照片显示相同结果。集落形成能力在图 9A 和 9B 的显微照片中进行比较,而经 MW 处理的子宫内膜异位细胞 (9B) 显示与未经处理的子宫内膜异位细胞相比较,在 25 至 125 焦耳处理后 8 天集落数目的明显减少。基因组细胞 DNA 降解可以通过使用常规方法分离基因组 DNA 并且通过凝胶电泳分离 DNA 进行测量。一般结果在图 10 的凝胶中的条带比较中描述。

[0033] 腹腔镜处理

[0034] 腹腔镜处理装置,例如本领域可用的那些 (参见例如, Karl Storz, Thubingen, Germany) 可以用于显现在处理过程中和在处理后对细胞的作用,以监视最佳处理方案。该装置可以与上文所述 RF/MW 处理装置结合使用。指示子宫内膜异位细胞的荧光探针也可以加入处理中,从而使得可以显现特定处理位点。

[0035] 上文呈现的实施例和申请的内容仅限定且描述了由本发明涵盖的许多方法、处理方案、人处理和细胞测量过程中的某些。另外的产物、装置和方法可以根据本发明产生且使用。实施例和说明书的部分都不应视为对本发明总体范围或下述权利要求含义的限制。

通过 Nymax 系统进行微波
处理后 8h 的增殖曲线

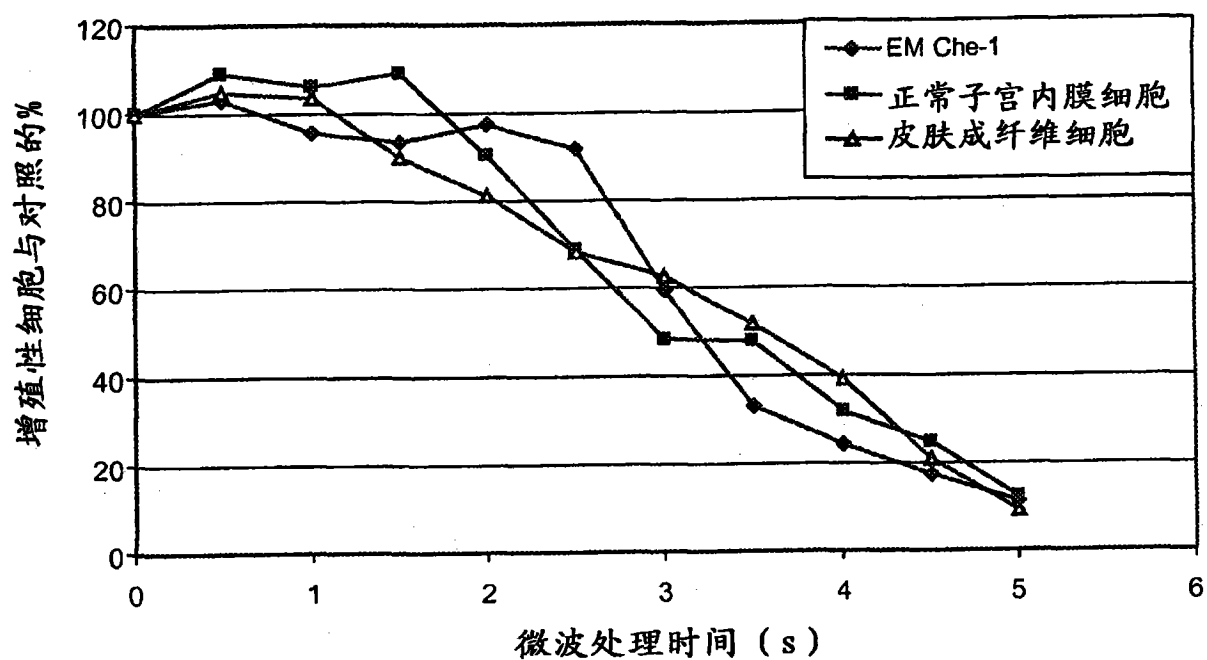


图 1

通过 Nymax 系统进行微波
处理后 76h 的增殖曲线

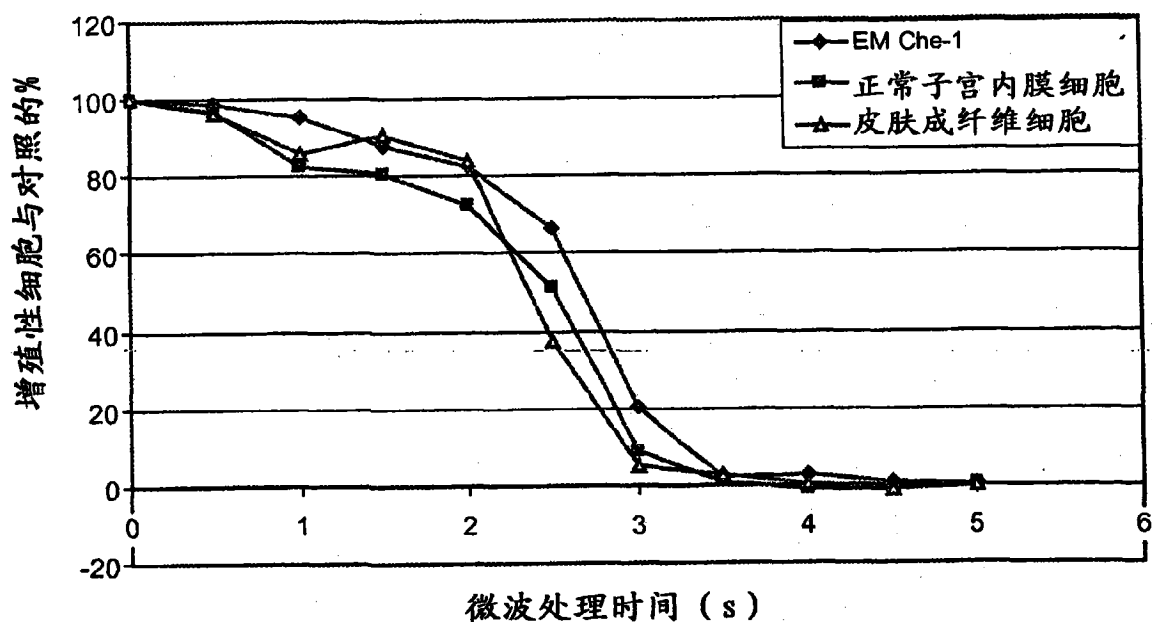


图 2

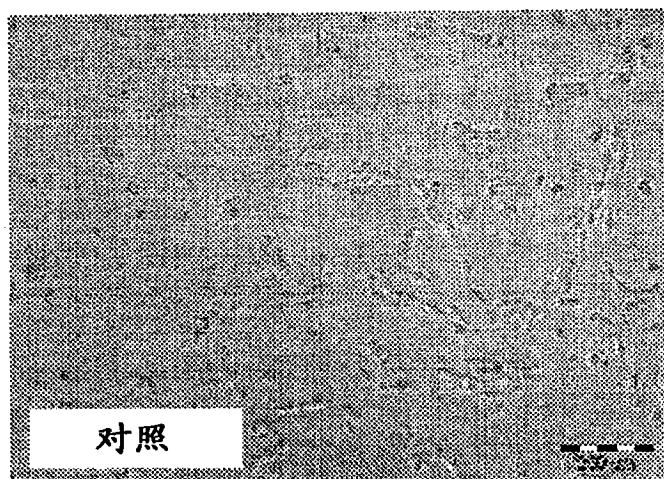


图 3

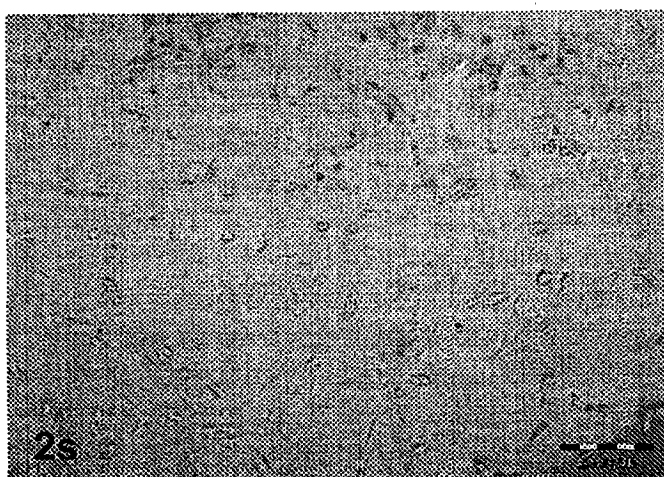


图 4

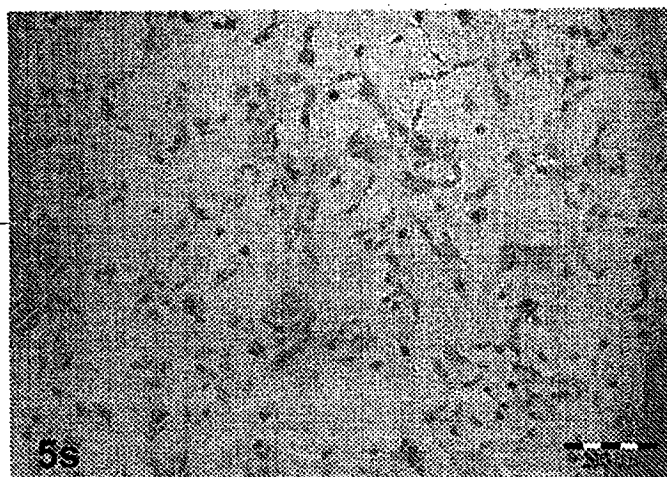


图 5

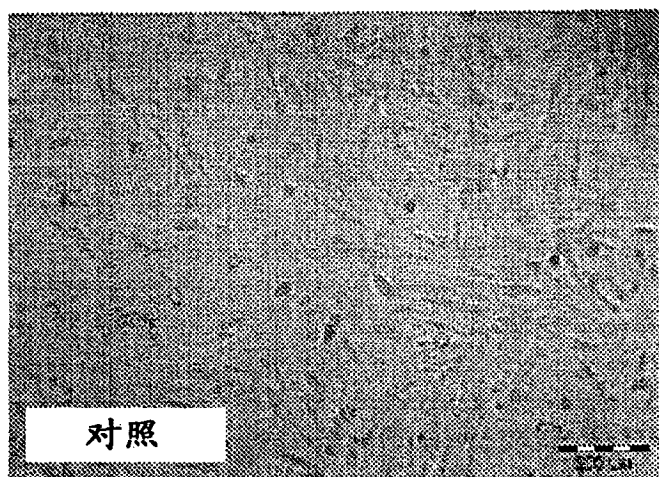


图 6

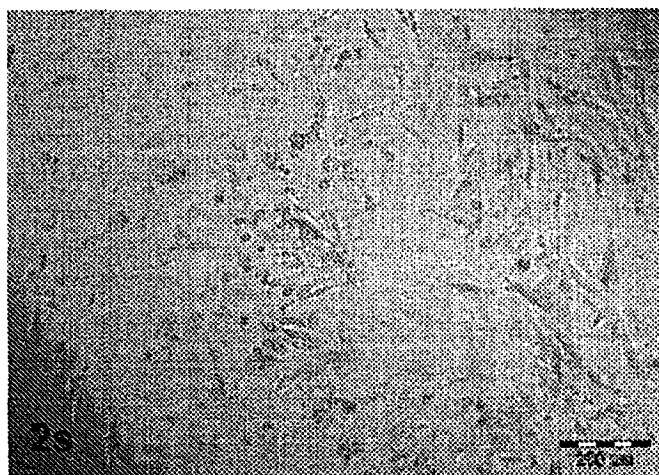


图 7

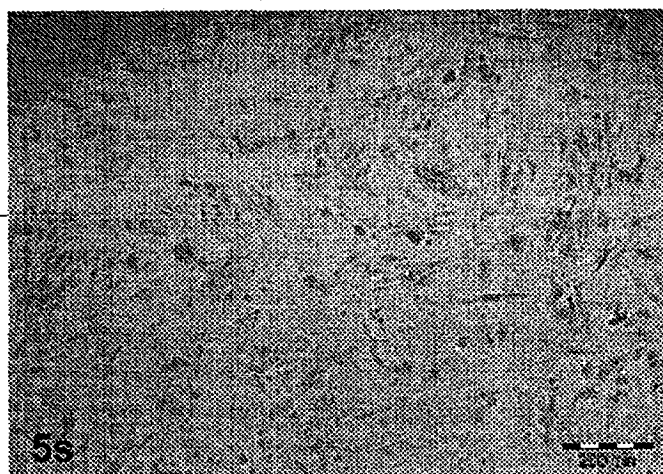
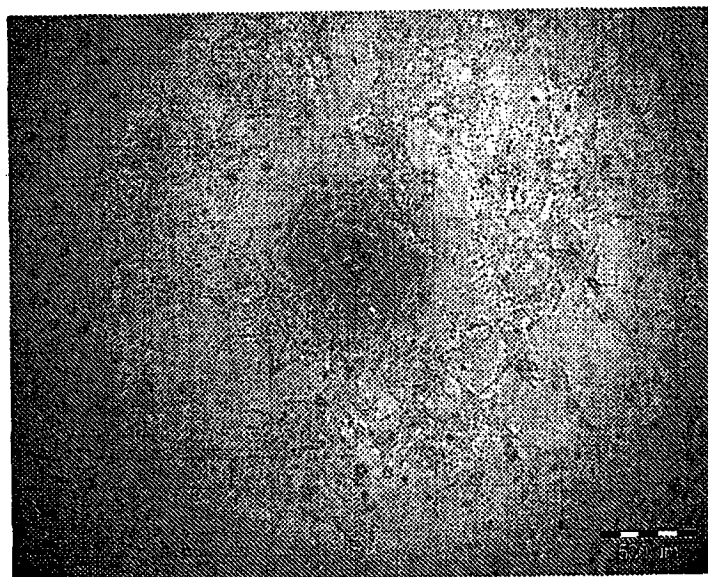


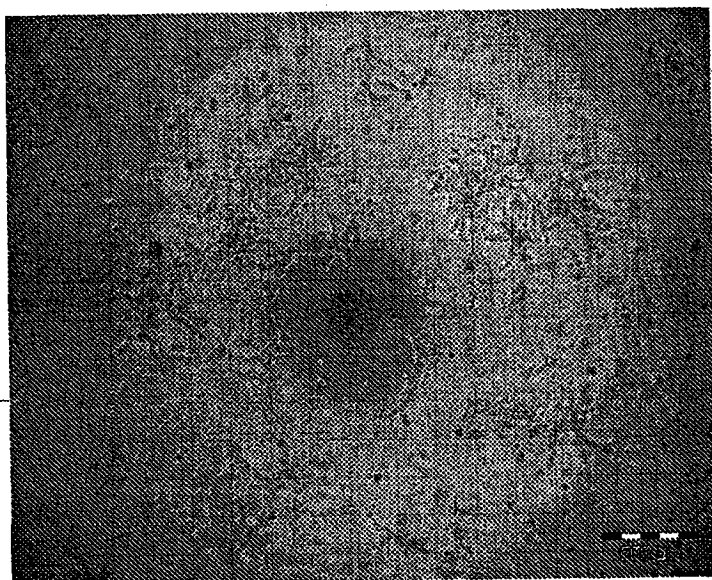
图 8

8天中培养的EM. Che-1细胞



对照（未处理）

图 9A



Nymax处理（3s）

图 9B

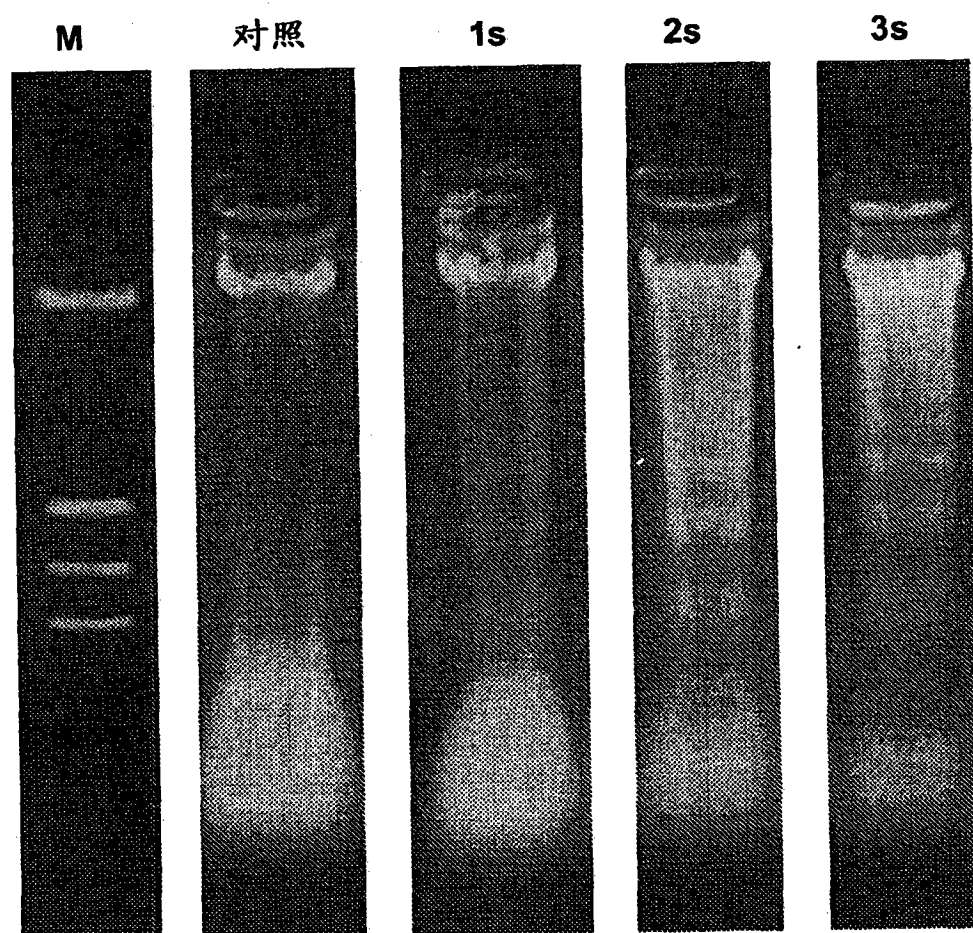


图 10

专利名称(译)	射频场对细胞生长的作用和用于腹腔镜处理的方法		
公开(公告)号	CN101902980A	公开(公告)日	2010-12-01
申请号	CN200880122063.7	申请日	2008-11-14
[标]发明人	J·戈古塞夫 J·布凯德若兰尼耶		
发明人	J·戈古塞夫 J·布凯德若兰尼耶		
IPC分类号	A61B18/18 A61N5/02 A61N5/04		
CPC分类号	A61N5/045 A61B18/1815 A61N1/40 A61N5/02 A61B18/18		
优先权	60/996377 2007-11-14 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及射频/微波处理装置的用途及其对细胞生长和存活的作用，并且特别是在子宫内膜异位细胞的更具体实施方式中。在另一方面，本发明涉及射频/微波能量在所需群体中影响细胞生长的用途，同时基本上避免对邻近或附近细胞的有害加热和破坏作用。使用所述装置，对细胞和组织的特定处理方案和控制能量输出可以影响人的特定细胞和疾病，例如，涉及不受控制或有害细胞生长的那些。

